



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias

Silvia Vega-Castaño<sup>a</sup>, Laura Ferreira<sup>b,c</sup>, Magdalena González-Ávila<sup>d</sup>, Fernando Sánchez-Juanes<sup>b,c</sup>, M. Inmaculada García-García<sup>a,c,d</sup>, José Elías García-Sánchez<sup>a,d</sup>, Jose Manuel González-Buitrago<sup>b,c,e,1</sup> y Juan Luis Muñoz-Bellido<sup>a,c,d,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>b</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>c</sup> Grupo de Investigación Reconocido MICRAPE, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 19 de noviembre de 2011

Aceptado el 6 de marzo de 2012

On-line el 20 de abril de 2012

#### Palabras clave:

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Anaerobios

Identificación

### R E S U M E N

**Objetivo:** La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos en los servicios de microbiología clínica. No obstante, los datos relativos a algunos grupos de microorganismos son todavía controvertidos. En el presente estudio se ha determinado la fiabilidad de la EM MALDI-TOF para la identificación de aislamientos clínicos de bacterias anaerobias, en comparación con técnicas bioquímicas convencionales, y usando como referencia en caso de discrepancias la secuenciación de ARNr 16S.

**Material y métodos:** Se analizaron 126 aislamientos clínicos de bacterias anaerobias mediante el sistema API 20A (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y mediante EM MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemania), utilizando la base de datos BioTyper 2.0 (Bruker Daltonics, Alemania). Cuando se produjeron discrepancias, o la EM MALDI-TOF no fue capaz de identificar microorganismo alguno, se usó como método de identificación de referencia la secuenciación del ARNr 16S.

**Resultados:** El método bioquímico y la EM MALDI-TOF coincidieron, a nivel de especie, en el 60,9% de los casos, y solo a nivel de género en el 20,3%. De las 48 identificaciones discrepantes, la secuenciación respaldó la identificación por EM MALDI-TOF a nivel de especie en 32 casos (66,7%), y a nivel de género en 8 (16,7%). Dicha secuenciación apoyó la identificación bioquímica a nivel de especie solamente en 2 casos (4,2%), y a nivel de género en 26 casos (54,2%). En los 8 casos en que la EM MALDI-TOF no obtuvo identificación alguna o la obtenida fue refutada a nivel de género por la secuenciación de ARNr 16S, la especie a la que correspondía en realidad el microorganismo no se encontraba incorporada a la base de datos BioTyper II.

**Conclusiones:** Los datos obtenidos en este estudio demuestran que, en conjunto, la espectrometría de masas ofrece una identificación de bacterias anaerobias más fiable que la identificación bioquímica convencional (un 24% más de identificaciones correctas a nivel de especie), con un número de errores mayores (identificación incorrecta a nivel de género) 2,5 veces inferior. Puesto que todas las identificaciones fallidas a nivel de género derivaron de la no incorporación de varias especies a la base de datos, a medida que esta base de datos se vaya completando, las diferencias probablemente se incrementarán.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Reliability of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification of anaerobic bacteria

#### A B S T R A C T

#### Keywords:

MALDI-TOF mass spectrometry

**Aim of the study:** MALDI-TOF mass spectrometry (MS) is becoming a major resource in the Clinical Microbiology laboratory. Results on some groups of microorganisms are still controversial. We have studied

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlmubel@usal.es (J.L. Muñoz-Bellido).

<sup>1</sup> Estos dos autores comparten autoría senior.

the reliability of MALDI-TOF MS for the identification of anaerobic clinical isolates was studied compared to conventional biochemical methods, with rRNA 16S sequencing being used as a reference when discrepancies arose.

**Material and methods:** A total of 126 anaerobic bacteria clinical isolates were studied by using API20A kits (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and MALDI-TOF MS (Autoflex II, Bruker Daltonics, Germany), and using the data library BioTyper 2.0 (Bruker Daltonics, Germany). When discrepancies arose, or MALDI-TOF MS was not able to identify any microorganism, rRNA 16S sequencing was used as the reference standard.

**Results:** The biochemical method and MALDI-TOF MS agreed in identifying 60.9% of isolates at species level, and 20.3% of isolates at genus level. Among the 48 discrepancies observed, rRNA 16S sequencing supported MALDI-TOF MS identification, at species level, in 32 isolates (66.7%), and in 8 isolates (16.7%) at genus level. rRNA 16S sequencing supported biochemical identification in only two isolates (4.2%) at species level, and in 26 isolates (54.2%) at genus level. The eight isolates for which MALDI-TOF MS did not manage to identify, or the identification obtained was rejected by sequencing, belonged to species that are still not added to the BioTyper II data library.

**Conclusions:** Results obtained in this study show that, overall, MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria is more reliable than identification obtained by conventional biochemical methods (24% more correct identifications at species level). The number of major errors (incorrect identification at the genus level) is also 2.5-times lower. Moreover, all the major errors obtained by MALDI-TOF MS were due to the absence of some species in the data library. Thus, when data libraries are more complete, reliability differences between both methods will probably be even higher.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF ha revolucionado la metodología de identificación de microorganismos en microbiología clínica por su rapidez, fiabilidad y bajo coste en consumibles. Diversos estudios demuestran su gran fiabilidad en la identificación de diferentes grupos de microorganismos (enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, estafilococos, levaduras, etc.). Sin embargo, algunos grupos de microorganismos presentan todavía limitaciones, como es el caso de los estreptococos del grupo *viridans*, o han sido estudiados de manera menos detallada, como ocurre, entre otros grupos, con las bacterias anaerobias. Mientras algunos estudios muestran porcentajes de identificación correcta muy satisfactorios<sup>1-5</sup>, otros ofrecen porcentajes que no van más allá del 60-70%. Por otra parte, existen estudios que demuestran que, probablemente, la identificación bioquímica clásica de estos microorganismos tenía una resolución insuficiente para la identificación de la gran variedad de bacterias anaerobias potencialmente patógenas para el hombre. De este modo, agrupaba dentro de la misma especie a microorganismos en realidad diferentes, y era incapaz de identificar a otros, llevando en conjunto a una considerable simplificación de la etiología de las infecciones por bacterias anaerobias. La disponibilidad de técnicas de mayor resolución, como la secuenciación del ARNr 16S, y sobre todo la EM MALDI-TOF, mucho más aplicable en la rutina diaria del Laboratorio de Microbiología Clínica, probablemente dará una visión más exacta de la complejidad real del grupo de los microorganismos anaerobios patógenos y de la importancia como patógenos de especies que, hasta ahora, estaban probablemente infradiagnosticadas.

## Material y métodos

Se analizaron 126 aislamientos clínicos de bacterias anaerobias que fueron identificados mediante el sistema API 20A® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La identificación bioquímica de estos microorganismos aparece reflejada en la tabla 1.

### Espectrometría de masas MALDI-TOF

La EM se llevó a cabo siguiendo métodos previamente descritos<sup>6</sup>. Cada microorganismo fue procesado por duplicado, según las instrucciones del fabricante (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). La identificación se llevó a cabo a partir de colonias crecidas en agar Wilkins-Chalgren con 5% de sangre desfibrinada, preparado

a partir de medio deshidratado Wilkins Chalgren anaerobe agar (Oxoid, Thermo Scientific, Basingstoke, Reino Unido), o en agar *Brucella* con 5% de sangre desfibrinada suplementado con gentamicina y vancomicina (bioMérieux, La Balme Les Grottes, Francia), tras 48 h de incubación en condiciones de anaerobiosis. La identificación se llevó a cabo sobre una sola colonia de cada microorganismo.

1. **Preparación de la muestra.** Se depositó una pequeña cantidad de una colonia directamente sobre la placa *ground steel* del espectrómetro de masas, formando una delgada película. Sobre ella se aplicó 1 µl de la solución matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%) y se dejó secar a temperatura ambiente.
2. **Espectrometría de masas.** Las medidas se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Se obtuvo el espectro entre 2 y 20 kDa de forma automática, trabajando en modo lineal positivo a una frecuencia de 200 hertzios. Los parámetros que se fijaron para el espectrómetro fueron IS1 a 20 kV, IS2 a 18,6 kV, lente a 6 kV, PIE a 40 ns. El protocolo de trabajo del MALDI Biotyper proporciona la adquisición óptima de la muestra (acumulación de 500 disparos del láser en diferentes lugares de la muestra). Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla de calibrantes comercial (extracto de *Escherichia coli* DH5 α más 2 proteínas adicionales: RNAasa A y mioglobina para cubrir un intervalo de 4 a 17 kDa).
3. **Análisis de los espectros.** Para la identificación de los microorganismos, el espectro obtenido de los microorganismos problema se procesó con el programa MALDI Biotyper 2.0. La lista de picos generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 2.0, usando un algoritmo de comparación integrado en el software. Tras importar el espectro al programa, todo el proceso, desde su análisis hasta su identificación, se lleva a cabo de forma automática, sin intervención alguna por parte del usuario.
4. **Valoración de resultados.** Las identificaciones mediante MALDI-TOF se clasificaron como *fiable a nivel de especie* (puntuación en la comparación entre el perfil del microorganismo problema y la base de datos  $\geq 2$ ), *fiable a nivel de género* (puntuación  $\geq 1,7$  y  $< 2$ ) y *no fiable* (puntuación  $< 1,7$ ). Las identificaciones que entraron en esta última categoría se consideraron fallidas. En cuanto a la comparación entre MALDI-TOF y los sistemas clásicos, se diferenció según hubiera correlación de género y especie, correlación solo de género (bien porque el sistema solo identificara

**Tabla 1**  
Correlación entre la identificación bioquímica y la identificación por EM MALDI-TOF en bacterias anaerobias

| API 20A                     | Aislamientos (n) | Correlación con MALDI-TOF a nivel de especie n (%) | Correlación con MALDI-TOF a nivel de género n (%) | Sin correlación de género ni especie n (%) |
|-----------------------------|------------------|--|---|--|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 85               | 66 (77,6)  | 13 (15,3)   | 6 (7,1)                                    |
| <i>B. ovatus</i>            | 5                | 4 (80)   | 1 (20)  | 0 (0)                                      |
| <i>B. caccae</i>            | 2                | 0 (0)  | 2 (100)   | 0 (0)                                      |
| <i>B. stercoris</i>         | 2                | 0 (0)  | 0 (0)   | 2 (100)                                    |
| <i>B. uniformis</i>         | 1                | 1 (100)  | 0 (0)   | 0 (0)                                      |
| <i>B. vulgatus</i>          | 4                | 3 (75)   | 1 (25)  | 0 (0)                                      |
| <i>B. thetaiotaomicron</i>  | 1                | 0 (0)  | 1 (100)   | 0 (0)                                      |
| <i>P. asaccharolytica</i>   | 10               | 0 (0)  | 0 (0)   | 10 (100)                                   |
| <i>P. bivia</i>             | 3                | 3 (100)  | 0 (0)   | 0 (0)                                      |
| <i>P. intermedia</i>        | 2                | 0 (0)  | 2 (100)   | 0 (0)                                      |
| <i>Prevotella spp.</i>      | 5                | 0 (0)  | 2 (40)  | 3 (60)                                     |
| <i>P. corporis</i>          | 1                | 0 (0)  | 0 (0)   | 1 (100)                                    |
| <i>P. melaninogenica</i>    | 1                | 0 (0)  | 1 (100)   | 0 (0)                                      |
| <i>P. distasonis</i>        | 1                | 0 (0)  | 1 (100)   | 0 (0)                                      |
| <i>C. perfringens</i>       | 1                | 1 (100)  | 0 (0)   | 0 (0)                                      |
| <i>F. varium</i>            | 1                | 0 (0)  | 0 (0)   | 1 (100)                                    |
| <i>E. lenta</i>             | 1                | 0 (0)  | 0 (0)   | 1 (100)                                    |
| Total                       | 126              | 78 (60,9)  | 26 (20,3)   | 24 (18,8)                                  |

a este nivel, o porque hubiera discrepancia en la especie identificada), o no hubiera correlación de especie ni género. En este último caso, la identificación se consideró asimismo fallida.

#### Secuenciación de ARNr 16S

Cuando no existió correlación entre la identificación bioquímica y la obtenida por MALDI-TOF, o este último no ofreció identificación fiable alguna, la identificación se corroboró mediante secuenciación del ARNr 16S<sup>7</sup>.

#### Resultados

Los resultados obtenidos mediante identificación convencional y mediante EM MALDI-TOF aparecen reflejados en la tabla 1. El método bioquímico y la EM MALDI-TOF coincidieron, a nivel de especie, en el 60,9% de los casos, y a nivel de género en el 20,3%, de modo que, en conjunto, las identificaciones coincidieron, al menos a nivel de género, en el 81,2% de los casos. En los aislamientos identificados por métodos bioquímicos dentro del género *Bacteroides*, las identificaciones fueron coincidentes a nivel de especie en el 74% de los casos, y a nivel de género en el 18%, de modo que, en conjunto, las identificaciones fueron coincidentes como mínimo a nivel de género en el 92% de los casos.

Sin embargo, en los aislamientos identificados bioquímicamente dentro del género *Porphyromonas*, la identificación fue discordante a nivel de especie y a nivel de género en el 100% de los casos, y en los identificados dentro del género *Prevotella*, la identificación fue coincidente solo en el 25% de los casos a nivel de especie y en el 41,7% a nivel de género. Por el contrario, el 33,3% de los aislamientos mostraron una identificación discordante a nivel de género y especie.

Cuando se compararon las divergencias con la identificación obtenida por secuenciación de ARNr 16S (tabla 2) se observó que, de 48 identificaciones discrepantes, la secuenciación respaldó la identificación por EM MALDI-TOF a nivel de género y especie en 32 casos (66,7%), y a nivel de género en ocho (16,7%). De estos 8 casos, en tres (2 *Prevotella oris* y un *Bacteroides dorei*) el microorganismo identificado por la secuenciación de ARNr 16S no estaba recogido en la base de datos Biotyper 2.0, por lo que fueron identificados como *Prevotella* spp. (ninguna especie alcanzó el score de 2.0), *Prevotella buccae* y *Bacteroides uniformis*. De los 5 restantes, en 2 la especie que obtuvo mayor score fue la misma que posteriormente se corroboró por secuenciación de ARNr 16S (*Prevotella buccae*, score: 1.914; *Prevotella melaninogenica*, score: 1,705), mientras

que en otros 3, la especie con mayor score fue distinta (*Prevotella nigrescens* por EM MALDI-TOF [score 1,726-1,771] en 3 casos identificados por secuenciación como *Prevotella intermedia*).

En los 8 casos (16,7%) en que la EM MALDI-TOF no fue capaz de identificar el aislamiento ni siquiera a nivel de género, ello se debió a que, según la secuenciación de ARNr 16S, se trataba de especies no incluidas en la base de datos Biotyper 2.0 (2 *Bacteroides cellulosilyticus*, 2 *Bacteroides ureolyticus*, un *Dialister pneumosintes*, un *Negativicoccus succinivorans*, un *Olsenella* spp., un *Prevotella corporis*).

Por el contrario, de las 48 identificaciones discrepantes, la secuenciación de ARNr 16S apoyó la identificación bioquímica a nivel de especie solamente en 2 casos (4,2%) (un *Prevotella corporis*, un *Prevotella melaninogenica*), y a nivel de género en 26 casos (54,2%). La comparación global entre ambos métodos, tomando como referencia la secuenciación de ARNr 16S, aparece en la tabla 3.

#### Discusión

Los estudios sobre aplicación de EM-MALDI-TOF a la identificación de microorganismos muestran, en general, resultados muy positivos respecto a su fiabilidad<sup>6,8-11</sup>. Sin embargo, existen grupos concretos de microorganismos en los que existe menos experiencia, o los resultados publicados son más heterogéneos. Uno de ellos es el de las bacterias anaerobias. Algunos estudios muestran buenos resultados en la identificación de determinados géneros. Este es el caso de algún estudio relativo a la identificación de *Clostridium*, aunque, como ocurre en general en relación con las bacterias anaerobias, la rentabilidad diagnóstica del método está muy condicionada por la calidad de la base de datos usada como referencia<sup>1</sup>. En nuestro caso solo se incluye un aislamiento de *C. perfringens*, que fue correctamente identificado, pero la casuística es excesivamente baja para obtener conclusiones. Un estudio reciente muestra también buenos resultados en la identificación de especies de *Prevotella* aisladas de cuadros de periodontitis<sup>2</sup>. En el presente estudio se incluyeron 20 aislamientos de *Prevotella*, de acuerdo con la identificación por secuenciación. De ellos, 12 se identificaron por EM MALDI-TOF correctamente a nivel de especie (60%) y 8 a nivel de género (40%). No se identificó incorrectamente como *Prevotella* ningún aislamiento perteneciente a otros géneros. Los resultados son inferiores a los obtenidos en otros géneros, como *Bacteroides* (80,8% de identificaciones correctas a nivel de especie), pero son sin embargo muy superiores a los obtenidos con la identificación bioquímica, que han resultado mediocres en la identificación de

**Tabla 2**  
Identificación por ARNr 16S de las discrepancias entre la identificación convencional y la EM MALDI-TOF

| API 20A (n)  | Id. EM MALDI-TOF (n)  | Id. rRNA 16S (n)  |
|--|---|---|
| <i>Bacteroides fragilis</i> (19)   | Id. no fiable (score <1,7) (2)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (4)<br><i>Parabacteroides distasonis</i> (3)<br><i>Bacteroides nordii</i> (1)<br><i>Bacteroides vulgatus</i> (3)<br><i>Bacteroides ovatus</i> (3)<br><i>Prevotella</i> spp. <sup>b</sup> (1)<br><i>Prevotella buccae</i> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1) | <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> <sup>a</sup> (2)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (4)<br><i>Parabacteroides distasonis</i> (3)<br><i>Bacteroides nordii</i> (1)<br><i>Bacteroides vulgatus</i> (3)<br><i>Bacteroides ovatus</i> (3)<br><i>Prevotella buccae</i> (1)<br><i>Prevotella oris</i> <sup>a</sup> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1) |
| <i>Bacteroides ovatus</i> (1)<br><i>Bacteroides. caccae</i> (2)  | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)   | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)   |
| <i>Bacteroides stercoris</i> (2)   | <i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Fusobacterium varium</i> (1)   | <i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Fusobacterium varium</i> (1)   |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> (1)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)<br><i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (10)  | <i>Bacteroides uniformis</i> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella</i> spp. <sup>c</sup> (3)<br>Id. no fiable (score <1,7) (2)<br><i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1)   | <i>Bacteroides dorei</i> <sup>a</sup> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella intermedia</i> (3)<br><i>Bacteroides ureolyticus</i> <sup>a</sup> (2)<br><i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1)  |
| <i>Prevotella intermedia</i> (2)   | Id. no fiable (score <1,7) (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Prevotella</i> spp. <sup>d</sup> (1)  | <i>Dialister pneumosintes</i> <sup>a</sup> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella nigrescens</i> (1)<br><i>Prevotella oris</i> <sup>a</sup> (1)  |
| <i>Prevotella</i> spp. (5)   | Id. no fiable (score <1,7) (1)<br>Id. no fiable (score <1,7) (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella oralis</i> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)   | <i>Negativicoccus succinivorans</i> <sup>a</sup> (1)<br><i>Olsenella</i> spp. <sup>a</sup> (1)<br><i>Bacteroides fragilis</i> (1)<br><i>Prevotella oralis</i> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)   |
| <i>Prevotella corporis</i> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)<br><i>Parabacteroides distasonis</i> (1)<br><i>Fusobacterium varium</i> (1)<br><i>Eggerthella lenta</i> (1) | Id. no fiable (score <1,7) (1)<br><i>Prevotella</i> spp. <sup>e</sup> (1)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1)<br><i>Bifidobacterium longum</i> (1)  | <i>Prevotella corporis</i> <sup>a</sup> (1)<br><i>Prevotella melaninogenica</i> (1)<br><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)<br><i>Prevotella bivia</i> (1)<br><i>Bifidobacterium longum</i> (1)  |

<sup>a</sup> Especie no incluida en la versión utilizada de la base de datos (Biotyper 2.0).

<sup>b</sup> Especie con score más elevado: *Prevotella buccae* (1.914).

<sup>c</sup> Especie con score más elevado: *Prevotella nigrescens* (1.726-1.771).

<sup>d</sup> Especie con score más elevado: *Prevotella buccae* (1.856).

<sup>e</sup> Especie con score más elevado: *Prevotella melaninogenica* (1.705).

*Prevotella*. El método bioquímico identificó correctamente 5 de 20 aislamientos a nivel de especie (25%) y 4 a nivel de género (16%), errando la identificación a nivel de género en el 59% de los casos. Además, identificó erróneamente como *Prevotella* a 4 aislamientos de los 106 anaerobios no pertenecientes al género *Prevotella* incluidos en el estudio (3,8%).

Un estudio más amplio sobre 270 aislamientos clínicos de bacterias anaerobias, no restringido a géneros concretos, muestra que el 97,5% de los aislamientos fueron identificados a nivel de especie (score >2,00) por MALDI-TOF. Además, en 10 de los 11 aislamientos en que se dieron discrepancias con respecto a la identificación convencional, la secuenciación del ARNr 16S confirmó la identificación obtenida por MALDI-TOF<sup>3</sup>. Del mismo modo, otra publicación realizada en 2011 muestra un 95% de identificaciones correctas en cocos grampositivos anaerobios, usando también como referencia la secuenciación de ARNr 16S<sup>4</sup>, una vez confeccionada una base de

datos a medida que incluía el perfil de cepas tipo de las principales especies de cocos grampositivos anaerobios.

Sin embargo, otras publicaciones recientes ofrecen resultados menos favorables. En un estudio comparativo de 2 sistemas comerciales de EM MALDI-TOF sobre 79 aislamientos pertenecientes a 19 géneros, usando como referencia la secuenciación de ARNr 16S, Shimadzu identificó correctamente el 71% de los aislamientos a nivel de género, y el 61% a nivel de especie. Bruker Daltonics obtuvo resultados inferiores, con el 61 y el 51%, respectivamente. No obstante, cuando el mismo estudio se realizó con una versión actualizada del software de Bruker Daltonics, los resultados se equipararon<sup>6</sup>. Otro estudio posterior, también publicado en 2011, sobre más de 500 aislamientos de bacterias anaerobias muestra también porcentajes de identificación correcta del 61%<sup>8</sup>, y el estudio más reciente publicado hasta el momento muestra porcentajes similares (67% de identificaciones correctas con Bruker frente a

**Tabla 3**  
Comparación de errores a nivel de género y especie de la identificación convencional y la espectrometría de masas MALDI-TOF, tomando como referencia la secuenciación de rRNA 16S

| Rapid 32A (n)                   |                     |                    | Id. EM MALDI-TOF (n) |                     |                      |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Id. correcta <sup>a</sup> n (%) | Error especie n (%) | Error género n (%) | Id. correcta n (%)   | Error especie n (%) | Error género n (%)   |
| 80 (63,5)                       | 26 (20,6)           | 20 (15,9)          | 110 (87,3)           | 8 (6,3)             | 8 (6,3) <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Se consideraron identificaciones correctas aquellas en que coincidieron la identificación bioquímica y la identificación por EM MALDI-TOF y, en caso de discrepancia, las que fueron corroboradas por la secuenciación del rRNA 16S.

<sup>b</sup> Los 8 errores a nivel de género correspondieron a microorganismos no existentes en la base de datos Biotyper 2.0.

49% con Shimadzu)<sup>9</sup>. Estos estudios muestran resultados inferiores al nuestro, en el que la EM MALDI-TOF identificó correctamente a nivel de especie al 87,6% de los aislamientos y, a nivel de género, al 93,7%. La mayor parte de los estudios referidos inciden en la importancia de la base de datos para obtener buenos resultados con este sistema<sup>10</sup>. Esta circunstancia es ratificada por otros autores, que afirman que la utilidad clínica de estos sistemas para la identificación de bacterias anaerobias pasa por una optimización de las bases de datos disponibles<sup>11</sup>. Los resultados de nuestro estudio corroboran esta afirmación, ya que el 100% de las identificaciones fallidas (*score* <1,7) por EM MALDI-TOF corresponde a microorganismos cuyos perfiles no estaban incluidos en la versión de la base de datos utilizada.

Un estudio reciente demuestra que, si se elaboran bases de datos de referencia amplias de los grupos fenotípicos, basadas en una identificación inequívoca por secuenciación de ARNr 16S, los resultados posteriores de la EM MALDI-TOF en muestras clínicas mejoran sensiblemente<sup>4</sup>. Del mismo modo, un estudio reciente limitado al género *Bacteroides* muestra que la correlación con la secuenciación del ARNr 16S es mucho mayor en el caso de la EM MALDI-TOF que en el de la identificación bioquímica convencional (87% frente a 52,3%), y que en la mayoría de los casos las identificaciones erróneas derivan de la no inclusión de algunas especies descritas recientemente en las bases de datos<sup>12</sup>. Esto es especialmente evidente, en el caso de este estudio, en *Bacteroides dorei*, que es también incorrectamente identificado como *B. uniformis* en nuestro estudio al no estar presente *B. dorei* en la base de datos Biotyper 2.0.

Hace casi 10 años, Shah auguraba que la EM MALDI-TOF iba a tener un notable impacto en el diagnóstico de los numerosos microorganismos anaerobios que crecen mal en los medios de cultivo habituales y se identifican de manera poco fiable por los sistemas de identificación convencionales<sup>13</sup>. Los datos que van estando disponibles, al igual que los obtenidos en este estudio, demuestran que, en conjunto, la EM ofrece una identificación de bacterias anaerobias sensiblemente más fiable que la identificación bioquímica convencional (un 24% más de identificaciones correctas a nivel de especie en el presente estudio), con un número de errores mayores (identificación incorrecta a nivel de género) muy inferior (2,5 veces inferior en este estudio). Además, todas las identificaciones fallidas a nivel de género derivan de la no inclusión de diferentes especies en la base de datos, de modo que, a medida que esta

base de datos se vaya completando, las diferencias serán probablemente incluso mayores.

## Bibliografía

- Grosse-Herrenthey A, Maier T, Gessler F, Schaumann R, Böhnelt H, Kostrzewa M, et al. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*. 2008;14:242-9.
- Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:372-6.
- Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M, ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:796-802.
- Veloo AC, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34:58-62.
- Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1501-6.
- Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñiz MC, et al. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:492-7.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 2003;55:541-55.
- Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab*. 2009;55:289-96.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1549-54.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two MALDI-TOF mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1169-75.
- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48:900-7.
- Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Gómez M, Picazo JJ. Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe*. 2012;18:163-5.
- La Scola B, Fournier PE, Raoult D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe*. 2011;17:106-12.