



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight

Yanick Hoyos-Mallecot, Consuelo Miranda-Casas, Jorge J. Cabrera-Alvargonzalez*, Cristina Gómez-Camarasa, M. Dolores Pérez-Ramirez y José María Navarro-Marí

Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de mayo de 2012

Aceptado el 2 de septiembre de 2012

On-line el 8 de diciembre de 2012

Palabras clave:

Espectrometría de masas

Matrix-assisted laser desorption-ionisation

time-of-flight

Identificación bacteriana

Hemocultivo

R E S U M E N

Introducción: La espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) es una técnica rápida y fiable de identificación bacteriana.

Métodos: Se evalúa un método para identificación directa del hemocultivo fácil, rápido de realizar y de bajo coste.

Resultados: El porcentaje de identificaciones con puntos de corte de $\geq 1,7$ y $\geq 1,4$ para aceptable identificación de especie y género fue del 77,5 y del 93,8%, respectivamente.

Conclusión: El buen funcionamiento, la rapidez y el bajo coste hacen que esta técnica sea apropiada y fácil de implantar en los laboratorios de microbiología clínica.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Bacterial identification from blood cultures by a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry technique

A B S T R A C T

Introduction: Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry is rapid and accurate for the bacterial identification.

Methods: We have evaluated a less laborious and less time consuming method for microorganism identification directly from positive blood cultures.

Results: When we considered the scores ≥ 1.7 and ≥ 1.4 for acceptable identification of species and genus, the percentage of identification was 77.5% and 93.9%, respectively.

Conclusions: This method is reliable, rapid and cost-effective for implementation in routine use in clinical microbiology laboratories.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Mass spectrometry

Matrix-assisted laser desorption-ionisation

time-of-flight

Bacteria identification

Blood culture

Introducción

La espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) ha demostrado ser una técnica rápida y fiable para la identificación bacteriana en los laboratorios de microbiología clínica. Su realización directamente a partir de los hemocultivos positivos permite reducir considerablemente el tiempo de obtención del resultado respecto a los métodos

convencionales, ofreciendo la posibilidad de implementar un tratamiento antimicrobiano precoz más dirigido en los pacientes con sepsis.

Hasta la fecha se han publicado varios protocolos, algunos basados en diferentes centrifugaciones y lavados para eliminar los eritrocitos¹ y otros que utilizan tubos separadores de suero², ambos seguidos de una extracción con ácido fórmico/acetónitrilo.

Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) ha comercializado un método, Sepsityper[®], con el cual se han obtenido buenos resultados de identificación³ pero que, al incluir también un paso de extracción, resulta laborioso cuando se utiliza en la rutina diaria del laboratorio de microbiología clínica.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: xurxocabal@hotmail.com (J.J. Cabrera-Alvargonzalez).



Figura 1. Procedimiento esquematizado de MALDI-TOF directo de hemocultivo.
* HCCA: alfa-cyano-4-ácido hidroxicinámico.

En un estudio realizado con la base de datos de ANDROMAS⁴ se ha descrito un método que permite reducir el coste y el tiempo utilizando saponina como agente lisante de eritrocitos. Más recientemente, Martiny et al.⁵ han desarrollado un procedimiento parecido pero utilizando la base de datos de BRUKER (Biotyper), eliminando una de las 2 fases de lavado y sin ningún tipo de extracción, mostrando buenos resultados.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido evaluar los resultados de las identificaciones bacterianas obtenidas con MALDI-TOF directamente del hemocultivo, utilizando una modificación de la técnica de Martiny et al. que podría mejorar la tasa de identificaciones sin aumentar el tiempo de realización.

Métodos

Durante el periodo comprendido entre febrero y abril 2012, 100 hemocultivos (BACTEC Plus Aerobic/Anaerobic, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) positivos elegidos aleatoriamente se estudiaron con la técnica de MALDI-TOF y se compararon simultáneamente con los métodos convencionales utilizados en nuestro laboratorio: tinción de Gram, WIDER (Soria Melguizo, España), Vitek (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) y MALDI-TOF de las colonias. La técnica de MALDI-TOF directamente del hemocultivo se realizó como la descrita por Martiny pero se añadió un procedimiento de extracción rápida con ácido fórmico⁶ sobre la extensión de la muestra en la tarjeta y se utilizó como detergente dodecilsulfato sódico (SDS) en lugar de saponina (fig. 1).

Las muestras se analizaron en un microflex LT system, calibrado con Bruker Bacterial Test Standard. Para la identificación se sumaron hasta 240 disparos en modo automático, el espectro resultante

se importó al software MALDI BioTyper 3.0 y se comparó con la base de datos existente. El análisis se realizó siempre por duplicado y se retuvo el valor más alto de las 2 determinaciones. Los resultados de las identificaciones se clasificaron en diferentes franjas de valores y se caracterizaron utilizando 2 tipos de puntos de corte. Por una parte, los recomendados por los fabricantes, en donde ≥ 2 identifica como especie, entre 1,9 y 1,7 identifica como género y $< 1,7$ no identifica. Por otra, los basados en la experiencia de otros autores^{2,7} que consideran que puntos de corte más bajos (PCMB) como $\geq 1,7$ y $\geq 1,4$ son aceptables para especie y género, respectivamente, y $< 1,4$, «no identifica».

Resultados

De los 100 hemocultivos positivos, 2 fueron falsos positivos, los cuales, con valores $< 1,4$, se clasificaron por la técnica de MALDI-TOF como «no identifica» con ambos puntos de corte.

Los 98 restantes presentaron la siguiente distribución: 25 bacilos gramnegativos (BGN), 71 grampositivos (GP) y 2 levaduras. No hubo ningún hemocultivo polimicrobiano.

En la tabla 1 se reflejan los microorganismos aislados y la comparación de su identificación por los métodos convencionales usados en el laboratorio con la resultante del MALDI directo del hemocultivo con sus correspondientes valores.

A pesar de retener solo el microorganismo con el valor más alto de las 2 determinaciones, cabe destacar que coincidieron las identificaciones en todos los duplicados a excepción de 7 casos que correspondían a cepas con valor $< 1,4$ y, por lo tanto, fueron considerados como «no identifica».

Utilizando los puntos de corte comerciales, se identificaron correctamente a nivel de género el 96% de los BGN y el 73,3% de los GP, a nivel de especie el 88% de los BGN y el 35,3% de los GP, y no se identificaron el 4% de los BGN y el 26,7% de los GP. Cuando se utilizaron los PCMB se obtuvo identificación correcta de género en el 100% de los BGN y en el 93% de los GP, identificación correcta de especie en el 96% de BGN y el 73,3% de GP, y el 7% de los GP no fueron identificados.

Dentro del grupo de los GP, la única identificación errónea fue un *Streptococcus mitis*, que se identificó como *Streptococcus pneumoniae*, un error bastante común debido a la gran semejanza de estas 2 especies⁸ y que se produjo con los 2 tipos de punto de corte. En las últimas actualizaciones del software ya se advierte que la técnica no es capaz de diferenciar entre estas 2 especies, limitando la identificación a *S. pneumo/mitis*, por lo que más que un error debe considerarse una limitación de la técnica MALDI-TOF.

El único anaerobio aislado, *Clostridium baratii*, no fue identificado. Respecto a las levaduras, solo una pudo identificarse a nivel de género y cuando se utilizaron los PCMB.

El porcentaje total de identificaciones correctas usando los puntos de corte comerciales fue de 77,5% a nivel de género, 47,9% a nivel de especie y 22,5% no fueron identificados. Al utilizar los PCMB, las cifras fueron del 93,9, del 77,5 y del 6,1%, respectivamente.

Discusión

Nuestro protocolo, como el descrito por Martiny, es perfectamente adaptable a la rutina de trabajo en un laboratorio de microbiología clínica y proporciona un mayor porcentaje de identificaciones correctas que puede deberse al uso del método de extracción rápida con ácido fórmico. Saffert et al.⁹, combinando SDS y una extracción larga, obtienen resultados muy similares a los nuestros con una serie muy semejante.

La gran diferencia entre el porcentaje de identificaciones correctas entre BGN y GP es un hecho ya constatado en otras series^{1,5}. En nuestro estudio se ha aislado un mayor porcentaje de GP y

Tabla 1
Comparación de la identificación bacteriana con los métodos convencionales y la técnica rápida de MALDI-TOF directa del hemocultivo

Métodos convencionales	MALDI directo del hemocultivo	Franjas de valores				
		3-2,3	2.299-2	1.999-1,7	1.699-1,4	< 1,4
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 1)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 1)	1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3)		1	1	1	
<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 1)	1				
<i>Escherichia coli</i> (n = 15)	<i>Escherichia coli</i> (n = 15)	7	8			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 5)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 5)	3	1	1		
Totales gramnegativos (n = 25)		48%	40%	8%	4%	0%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 1)	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 1)		1			
<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 9)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 9)	2	5	2		
<i>Staphylococcus capitis-capitis</i> (n = 4)	<i>Staphylococcus capitis-capitis</i> (n = 4)		2	1	1	
<i>Staphylococcus hominis</i> (n = 11)	<i>Staphylococcus hominis</i> (n = 11)	2	4	4	1	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 4)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 4)		1	2	1	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 22)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 21)		1	12	7	1
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 1)				1	
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> (n = 2)	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> (n = 1)				1	
	<i>Starkeya novella</i> (n = 1)					1
<i>Staphylococcus cohnii</i> (n = 1)	<i>Staphylococcus cohnii</i> (n = 1)			1		
<i>Staphylococcus warneri</i> (n = 1)	<i>Staphylococcus warneri</i> (n = 1)		1			
<i>Staphylococcus pasteurii</i> (n = 1)	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (n = 1)			1		
<i>Micrococcus luteus</i> (n = 1)	<i>Micrococcus luteus</i> (n = 1)			1		
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 2)	<i>Enterococcus faecium</i> (n = 2)		2			
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 5)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 5)		3	2		
<i>Enterococcus durans</i> (n = 1)	<i>Enterococcus durans</i> (n = 1)			1		
<i>Streptococcus mitis/oralis</i> (n = 1)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n = 1)		1			
<i>Streptococcus thermophilus</i> (n = 2)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (n = 1)				1	
	<i>Enterococcus faecium</i> (n = 1)					1
<i>Corynebacterium urealyticum</i> (n = 1)	<i>Corynebacterium urealyticum</i> (n = 1)				1	
<i>Crynebacterium freneyi</i> (n = 1)	<i>Enterococcus faecium</i> (n = 1)					1
<i>Clostridium baratii</i> (n = 1)	<i>Pseudomonas syringae</i> (n = 1)					1
Totales grampositivos (n = 71)		5,7%	29,6%	38%	19,7%	7%
<i>Candida albicans</i> (n = 2)	<i>Candida albicans</i> (n = 1)				1	
	<i>Filifactor villosus</i> (n = 1)					1
Totales levaduras (n = 2)				50%	50%	
Totales (n = 98)		16/98 (16,3%)	31/98 (31,6%)	29/98 (26,6%)	16/98 (16,4%)	6/98 (6,1%)

observamos que la baja tasa de identificación correcta, sobre todo a nivel de especie y con los puntos de corte establecidos por los comerciantes (35,3%), se debe principalmente a especies de estafilococos coagulasa negativos, que en muchos casos son considerados contaminantes pero que son aislados frecuentemente en hemocultivos. La mejora que resulta cuando aplicamos los PCMB (73,3%) podría ser mayor con la ampliación del número de espectros de cada especie incluida en la base de datos¹⁰.

Pensamos que la fiabilidad de las identificaciones con PCMB, ya demostrada por varios artículos, sugiere un reajuste de los puntos de corte. Nosotros también observamos en este estudio la buena concordancia de las identificaciones de MALDI-TOF y de los métodos convencionales cuando se aplican PCMB. Algunos autores consideran adecuado aplicar en estos casos criterios adicionales, como la necesidad de que coincidan las 3 primeras identificaciones de MALDI-TOF o que exista una diferencia significativa (generalmente 0,3) entre las primeras identificaciones coincidentes y la primera discrepante. En nuestro estudio, aunque solo hemos aplicado el criterio de PCMB, hemos observado que además en todos los casos en que se consideró aceptable identificación de género o aceptable identificación de especie, las 3 primeras identificaciones de MALDI-TOF coincidían en el género y en la especie, respectivamente. En 15 de los 16 microorganismos con valores en el intervalo de 1,7 a 1,4, la identificación con ambos métodos coincidía incluso también a nivel de especie, aunque 5 coincidían solo en la primera identificación proporcionada por MALDI-TOF.

Como limitación de nuestro trabajo tendríamos que destacar la casi ausencia de anaerobios (solo un aislado) o de levaduras (solo 2), que no nos permite sacar conclusiones. En ambos tipos de microorganismos se ha descrito su dificultad para ser identificados por la técnica de MALDI-TOF y se ha sugerido la necesidad de ampliar

la base de datos para ellos. Algunos autores mejoran sus resultados con las 2 modificaciones que aquí se realizan, la extracción rápida con ácido fórmico y PCMB similares a los aquí utilizados⁶.

Por último nos gustaría resaltar el bajo coste de este método, tanto en reactivos como en tiempo. La técnica para un hemocultivo se realiza en aproximadamente 20 min, pero si consideramos que en la rutina diaria se suelen trabajar varios hemocultivos a la vez, el tiempo por hemocultivo se vería aún más reducido.

Concluimos que los buenos resultados, unidos a la rapidez y al bajo coste de esta técnica, hacen de ella una medida apropiada y fácil de implantar dentro de los laboratorios de microbiología clínica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:546–51.
2. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1631–8.
3. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS one.* 2011;6:e23285.
4. Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux M-E, Beretti J-L, Lotz A, et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2011;27.

5. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 25.
6. Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, de Baere T, Surmont I, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31: 841–8.
7. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1542–8.
8. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, Filimonova AV, Ilina EN, Dubovickaya VA, et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol*. 2011;11:1709–15.
9. Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:21–6.
10. Alatoom A, Cunningham S, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2868–73.