

## Identificación directa de microorganismos a partir de hemocultivos positivos utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

► Natalia Azula<sup>1a\*</sup>, Silvia Relloso<sup>1a</sup>, Rubén Barrios<sup>2b</sup>, Federico Nicola<sup>2a</sup>, Jorgelina Smayevsky<sup>1a</sup>

---

<sup>1</sup> Bioquímica.

<sup>2</sup> Bioquímico.

<sup>a</sup> Laboratorio de Bacteriología, Micología y Parasitología, Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno – CEMIC, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> BD Diagnostics Systems, Argentina.

\* Autora para correspondencia.

### Resumen

La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) permite la identificación de microorganismos directamente de las colonias en pocos minutos. En este estudio se ha desarrollado y evaluado un protocolo reducido para identificar microorganismos directamente de las botellas de hemocultivos positivos en 30 minutos con una alta sensibilidad y especificidad, utilizando MALDI-TOF. Un total de 2535 hemocultivos positivos fueron estudiados por el método directo de MALDI-TOF MS, a partir de una alícuota de sangre de las botellas y el método de colonia, utilizando los cultivos desarrollados en medios sólidos. Del total de hemocultivos positivos incluidos en este estudio, 2381 (93,9%) fueron monomicrobianos y 146 (5,8%) polimicrobianos. Mil trescientos treinta (55,9%) de los aislamientos correspondieron a cocos gram positivos, 922 (38,7%) a bacilos gram negativos, 60 (2,5%) a anaerobios, 36 (1,5%) a bacilos gram positivos y 13 a levaduras. La concordancia global entre ambos métodos fue del 81,7% a nivel de especie (90,0% para bacilos gram negativos, 76,7% para cocos gram positivos y 33,3% para bacilos gram positivos). Se identificó al menos un germen en el 88% de las botellas positivas con desarrollo polimicrobiano. Los resultados del presente estudio demostraron que el protocolo basado en MALDI-TOF MS permite la identificación microbiana directamente de hemocultivos positivos en un tiempo corto, con una alta precisión, con excepción de los bacilos gram positivos.

**Palabras clave:** Identificación directa de microorganismos; Hemocultivos; Espectrometría de masas; MALDI-TOF

*Direct identification of microorganisms in positive blood culture bottles by mass spectrometry (MALDI-TOF MS)*

### Abstract

*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) enables the identification of microorganisms directly from colonies within minutes. In this study this technology was adapted and tested for use with blood culture bottles, thus allowing identification in 30*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

minutes once the blood culture is detected as positive by the automate. A total of 2535 blood culture bottles reported as positive were tested by MALDI-TOF MS directly from positive blood culture bottles and colonies. A total of 2381 (93.9%) and 146 (5.8%) of the positive blood cultures were monomicrobial and polymicrobial, respectively. And 1330 (55.9%), 922 (38.7%), 60 (2.5%), 36 (1.5%) and 13 of the isolates were gram-positive cocci (GPC), gram-negative bacilli (GNB), anaerobic bacteria, gram-positive bacilli (GPB) and yeast respectively. Concordance between both methods was 81.7% (76.7% of GPC, 90% of GNB, 74.2% of anaerobic bacteria and 33.3% of GPB) in monomicrobial cultures. Eighty eight per cent of the polymicrobial cultures were identified correctly in at least one of the two bacteria. The results of the present study show that this fast, MALDI-TOF MS based method allows microbial identification directly from positive blood culture in a short time, with a high accuracy, with the exception of gram-positive bacilli.

**Keywords:** Direct identification of microorganisms; Blood culture; Mass spectrometry; MALDI-TOF

## Identificação direta de microrganismos em frascos de hemoculturas positivas utilizando espectrometria de massas (MALDI-TOF MS)

### Resumo

A espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) permite a identificação de microrganismos diretamente das colônias em minutos. Nesse estudo, foi desenvolvido um protocolo reduzido para identificar microrganismos diretamente das garrafas de hemoculturas positivas em 30 minutos com alta sensibilidade e especificidade, utilizando MALDI-TOF. Um total de 2535 hemoculturas positivas foram relatadas -o método direto de MALDI-TOF MS, a partir de uma alíquota de sangue dos vidros e o método de colônia, a partir das culturas desenvolvidas em meios sólidos. Do total de hemoculturas positivas incluídas neste estudo, 2.381 (93,9%) eram monomicrobianas e 146 (5,8%) eram polimicrobianas. Mil trezentos e trinta (55,9%) dos isolados corresponderam a cocos gram-positivos, 922 (38,7%) bacilos gram-negativos, 60 (2,5%) anaeróbios, 36 (1,5%) bacilos gram-positivos e 13 leveduras. A concordância geral entre os dois métodos foi de 81,7% em nível de espécie (90,0% para bacilos gram-negativos, 76,7% para cocos gram-positivos e 33,3% para bacilos gram-positivos). Pelo menos um germe foi identificado em 88% dos vidros positivos com desenvolvimento polimicrobiano. Os resultados do presente estudo demonstraram que o protocolo baseado em MALDI-TOF MS permite a identificação microbiana diretamente de hemoculturas positivas em um curto espaço de tempo, com alta precisão, com exceção de bacilos gram-positivos.

**Palavras-chave:** Identificação direta de microrganismos. Hemoculturas; Espectrometria de massas; MALDI-TOF

## Introducción

La identificación directa de bacterias y levaduras por MALDI-TOF, a partir de una botella de hemocultivo positiva representa un aporte importante en el manejo clínico de las bacteriemias y funguemias, ya que disminuye los tiempos del proceso de identificación. Además, permite instaurar o modificar tratamientos antimicrobianos con un conocimiento del microorganismo implicado a nivel de género y especie, pocos minutos después de ser informado el hemocultivo como positivo (1) (2) (3) (4). En pacientes que reciben tratamiento empírico apropiado, la mortalidad se reduce significativamente (5) (6) (7) (8) (9).

Los resultados de la identificación directa del hemocultivo detectado como positivo por MALDI-TOF

varían según el método de extracción de proteínas utilizado, como lo demuestra la bibliografía internacional. La Scola *et al.* (6) en un estudio que incluyó más de 500 hemocultivos, refirieron una identificación correcta del 66% (91% de las bacterias gram negativas y 49% de las gram positivas), Prod'hom *et al.* (8) con un menor número de hemocultivos, mostraron una identificación correcta del 79% (90% de las bacterias gram negativas y 73% de las gram positivas) y Stevenson *et al.* (5) refirieron en conjunto, una identificación del 76,4% en 212 hemocultivos positivos.

La correlación fue menor en bacterias gram positivas (31,8% a nivel de especie y 64,8% a nivel de género), principalmente en la identificación a nivel de especie en estafilococos coagulasa negativos y *Staphylococcus aureus*. En cuanto a las funguemias, de las 18 detectadas

por cultivo, sólo una se identificó mediante MALDI-TOF (1) (5) (6) (7) (8) (10) (11) (12).

Todos estos estudios demostraron las ventajas de la espectrometría de masas MALDI-TOF aplicada a la identificación directa a partir de hemocultivos positivos. Sin embargo, la metodología incluye varios pasos con diversos reactivos y centrifugaciones, lo que dificulta la realización de la técnica en la rutina diaria (5) (6) (13) (14) (15). En este laboratorio se ha desarrollado un protocolo reducido para concentrar los microorganismos intactos, eliminando las células sanguíneas, ya que las proteínas presentes en los glóbulos rojos y blancos y en el suero pueden originar picos espectrales que interfieren en la identificación. En este trabajo se demuestra la capacidad de esta estrategia para identificar microorganismos utilizando MALDI-TOF directamente de las botellas de hemocultivos positivos en 30 minutos con una alta sensibilidad y especificidad. Para ello se compararon los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de microorganismos directamente desde botellas de hemocultivos (MSD) detectadas como positivas utilizando el procedimiento estandarizado en el laboratorio frente a la identificación a partir de colonia (MC) en medio sólido.

## Materiales y Métodos

Se estudiaron los hemocultivos positivos (HP) registrados entre el 1/11/2013 y el 30/4/2018 en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la institución. Se incluyeron en el estudio 2535 hemocultivos detectados como positivos por el equipo BACTEC FX (Becton Dickinson) a los cuales se realizó el método directo de espectrometría de masas (MSD), a partir de una alícuota de sangre de las botellas y el método de colonia (MC), a partir de los cultivos desarrollados en medios sólidos. Las botellas analizadas correspondieron a los medios de cultivo *Plus Aerobic/F*, *Plus Anaerobic/F* y *Peds Plus//F*, para cultivo aeróbico, anaerobio y de especímenes pediátricos, respectivamente. A cada paciente se le tomó un *set* de hemocultivos correspondientes a 2 o 3 venopunciones, con un intervalo de tiempo aproximado entre ellas de 30 minutos. En general, se utilizaron dos botellas aerobias y una anaerobia o una botella aerobia y una anaerobia por *set* (16).

### I. Procesamiento de los hemocultivos positivos por el método de colonia

A partir de la botella positiva de hemocultivo se realizó la coloración de Gram y el subcultivo en agar sangre, agar chocolate, *ChromID CPS* (bioMérieux®, Marcy, l'Étoile, Francia) y caldo cerebro corazón (Laboratorios

Britania, Argentina). Los medios de cultivo se incubaron 24 h en estufa de dióxido de carbono a 35 °C. Los hemocultivos positivos con bacterias anaerobias fueron cultivados en agar sangre *Brucella* (Laboratorios Britania, Argentina) suplementado con hemina (5 µg/mL) y vitamina K1 (1 µg/mL) e incubados en condiciones de anaerobiosis por un período de 2-7 días. A partir del desarrollo en los subcultivos se realizó la identificación de las colonias aisladas por MALDI-TOF MS. En caso de estreptococos del grupo *viridans* y *Streptococcus pneumoniae* se agregó la prueba de solubilidad en bilis y de optoquina, según recomendaciones del fabricante (Bruker Diagnostics). Las identificaciones de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae* fueron confirmadas con las pruebas de sensibilidad a bacitracina, pirrolidonicilamidasa (PYR) y aglutinación con partículas de látex para confirmar que se trataba de estreptococos del grupo A, C o G.

### II. Procesamiento de los hemocultivos positivos por el método directo de espectrometría de masas MALDI-TOF

#### 1. Bacterias

Una alícuota de 6 mL de cada botella de HP se colocó en un tubo Vacutainer con gel separador (BD Vacutainer®) y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos, para eliminar las células sanguíneas, las proteínas de la sangre y del caldo de cultivo. Se descartó la mayor parte del sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL para resuspender los microorganismos depositados en la superficie del gel. La suspensión bacteriana se colocó en un tubo Eppendorf con 1 mL de agua destilada estéril y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para el lisado de los hematíes remanentes. Luego, se centrifugó en una ultracentrífuga (Giumelli® Z-127-D, Argentina) a 13 000 r.p.m. por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se reservó el *pellet* para su análisis inmediato por espectrometría de masas (Fig. 1).

#### 2. Levaduras

En el caso de la observación de levaduras en la coloración de Gram, se colocaron 2 mL del caldo del HP en un tubo Eppendorf. Se centrifugó 2 minutos a 13 000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 2 mL de agua estéril, se agitó en vórtex 1 min y se incubó la suspensión por 5 min a temperatura ambiente, para permitir la lisis de los glóbulos rojos. Se centrifugó nuevamente a 13 000 r.p.m. durante 2 min para sedimentar las levaduras. En el caso de observarse en la superficie del *pellet* una capa de hematíes, se eliminó con pipeta. Finalmente, el sedimento de levaduras libre de células sanguíneas se utilizó para el análisis por espectrometría de masas (Fig. 2).

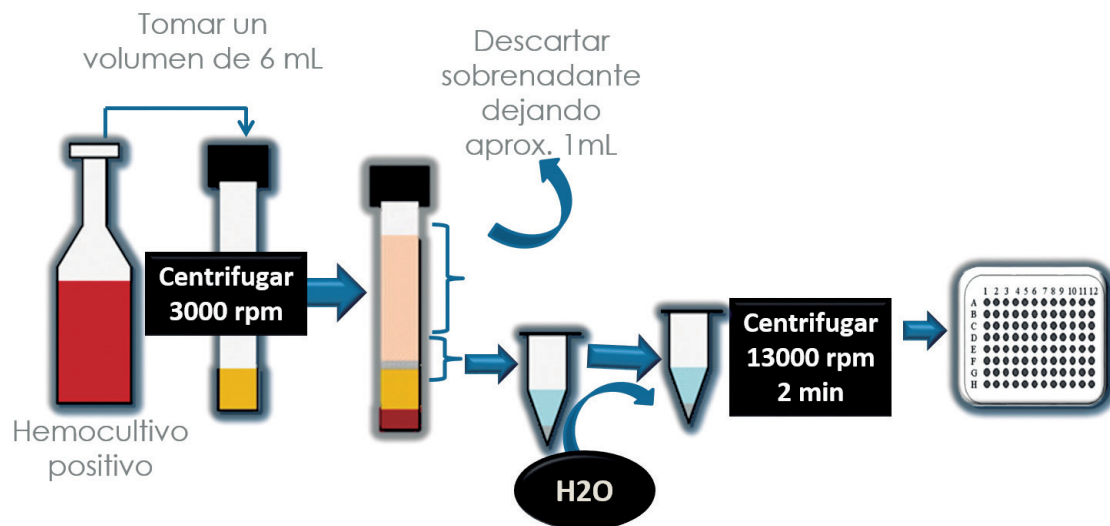


Figura 1. Bacterias.

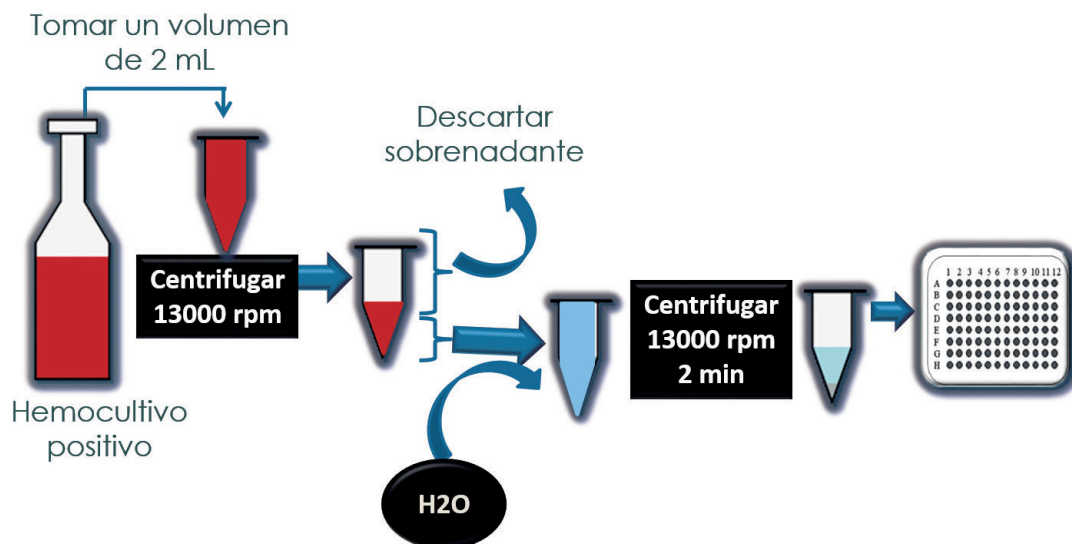


Figura 2. Levaduras.

### III. Extracción de proteínas y análisis por MALDI-TOF

Se depositó 1  $\mu$ L del *pellet* de II-1 o II-2 por duplicado sobre una placa de acero de análisis (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania); los pocillos fueron cubiertos con 1  $\mu$ L de ácido fórmico (Fluka, Alemania) al 70% para bacterias y al 100% para levaduras. Luego de secarse, los pocillos fueron cubiertos con 1  $\mu$ L de matriz [solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA; Bruker Daltonics) en 50% de acetonitrilo y 2,5% de ácido trifluoroacético]. Finalmente, la placa se colocó en el equipo y se realizó el análisis utilizando *Microflex LT/ FlexControl* (versión 3.1

Bruker Daltonics). Para la calibración del espectrómetro se utilizó un estándar, un extracto de proteínas de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas adicionales (BTS; Bruker Daltonics®). El BTS se utilizó también como control positivo para validar las corridas. Los espectros obtenidos fueron analizados por el *software MALDI Biotyper RTC 3.0* (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania). Se compararon con una base de datos y se les asignó un *score*. Se consideraron válidas las identificaciones con *score*  $\geq 1,700$  para género y especie, según los criterios aceptados por la literatura internacional (5) (6) (13) (14) (15) (17). El tiempo de lectura e interpretación aproximado fue de 1 minuto por pocillo.

## Resultados

Del total de hemocultivos positivos incluidos (2535) en este estudio, 2381 (93,9%) fueron monomicrobianos. Mil trescientos treinta (55,9%) de los aislamientos correspondieron a cocos gram positivos, 922 (38,7%) a bacilos gram negativos, 60 (2,5%) a anaerobios, 36 (1,5%) a bacilos gram positivos, 13 a levaduras y 20 a otros microorganismos. Ocho muestras informadas como positivas por el dispositivo BACTEC FX fueron negativas por cultivo y coloración de Gram (consideradas como falsos positivos). En estos casos no revelaron una identificación confiable (*score* <1,700) por MSD.

El método directo logró la identificación correcta a

nivel de género y especie en el 81,9% y 81,7% respectivamente de los hemocultivos evaluados, con un *score*  $\geq 1,700$ . No se observó ninguna diferencia en la identificación a nivel de especie con *score* de 1,700 a 2,000 y  $\geq 2,000$  al confirmar los resultados con el análisis de una colonia aislada por espectrometría de masas.

Las identificaciones fueron coincidentes por ambos métodos en el 90,0% de los casos entre los bacilos gram negativos, 76,7% para los cocos gram positivos y 33,3% para los bacilos gram positivos (Tabla I).

El presente estudio incluyó 922 bacilos gram negativos. El método directo permitió la identificación a nivel de especie para *Enterobacterales* en 674 de 713 botellas de hemocultivos (94,5%), y a nivel de género en 681 de 713 botellas (95,5%).

Tabla I. Identificación de bacterias y levaduras directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS (MSD)				
		N° ID		Scores		
		correctas	erróneas	<1,7	1,7 – 2,0	$\geq 2,0$
<b>Bacilos gram negativos</b>	<b>922</b>	<b>842</b>	<b>7</b>	<b>80</b>	<b>137</b>	<b>705</b>
<i>Enterobacterales</i>	713	681		32	75	606
BGNNF	201	153		48	62	91
Otros BGN	8	8				8
<b>Cocos gram positivos</b>	<b>1330</b>	<b>1020</b>	<b>7</b>	<b>303</b>	<b>497</b>	<b>530</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	623	465		158	286	179
<i>Staphylococcus aureus</i>	234	194		40	80	114
Otros SCN	242	185		56	74	111
<i>Enterococcus</i> spp.	69	67		2	9	58
<i>Streptococcus</i> spp.	131	93	7	31	42	58
Otros CGP	31	16		15	6	10
<b>Anaerobios</b>	<b>60</b>	<b>46</b>		<b>14</b>	<b>17</b>	<b>29</b>
<b>Levaduras</b>	<b>13</b>	<b>11</b>		<b>2</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	6	6			5	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1			1	
<i>Candida albicans</i>	1			1		
<i>Trichosporon asahii</i>	5	4		1	4	
<b>Bacilos gram positivos</b>	<b>36</b>	<b>12</b>		<b>24</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Otros microorganismos</b>	<b>20</b>	<b>20</b>			<b>6</b>	<b>14</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	4	4			2	2
<i>Campylobacter fetus</i>	2	2			1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	13	13			3	10
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	1				1
<b>Total</b>	<b>2381</b>	<b>1951</b>	<b>7</b>	<b>423</b>	<b>673</b>	<b>1285</b>

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; otros BGN: incluye bacilos gram negativos de la familia *Aeromonadaceae*; BGNNF: bacilos gram negativos no fermentadores; SCN: estafilococos coagulasa negativos; CGP: cocos gram positivos; ID: identificados/identificación.

Las especies dentro del complejo *Enterobacter cloacae* no pueden separarse definitivamente (19) (20). En el estudio, MALDI-TOF MS identificó 59 de los 63 hemocultivos como miembros del complejo *Enterobacter cloacae* (93,7%). En el 71,4% de los casos la identificación se logró con un *score*  $\geq 2,000$  (Tabla II).

Los resultados demostraron que MALDI-TOF MS permitió una excelente identificación, a nivel de especie, para todas las enterobacterias estudiadas, a excepción de *Salmonella* spp., en la que la identificación sólo se logró a nivel de género. En 7 HP con bacilos gram negativos, el método directo y el método de colonia los identificó como *Salmonella* spp.

Tabla II. Identificación de bacilos gram negativos directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS			
		N°	Scores		
			<1,7	1,7 - 2,0	$\geq 2,0$
<b>Bacilos gram negativos</b>					
<i>Enterobacterales</i>					
<i>Escherichia coli</i>	374	358	16	22	336
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	150	144	6	7	137
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	20		2	18
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i>	63	59	4	14	45
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	9	1		9
<i>Citrobacter freundii</i>	11	9	2	2	7
<i>Morganella morganii</i>	10	10			10
<i>Serratia marcescens</i>	43	40	3	22	18
<i>Salmonella</i> spp.	7	7 <sup>1</sup>			7
<i>Proteus mirabilis</i>	20	20		4	16
<i>Providencia stuartii</i>	2	2			2
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1		1	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	2		1	1
<i>Aeromonadaceae</i>					
<i>Aeromonas</i> spp.	8	8 <sup>2</sup>			8
<b>Total</b>	<b>721</b>	<b>689</b>	<b>32</b>	<b>75</b>	<b>614</b>
<b>Bacilos gram negativos no fermentadores</b>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83	76	7	18	58
<i>Pseudomonas putida</i>	8	5	3	3	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	57	38	19	32	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18	17	1	1	16
<i>Acinetobacter pittii</i>	4	4		1	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	2		1	1
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1	1			1
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	1			1
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	8	6	2	3	3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	6	3	3	3	
Otros BGNNF	13	0	13		
<b>Total</b>	<b>201</b>	<b>153</b>	<b>48</b>	<b>62</b>	<b>91</b>
<b>Total</b>	<b>922</b>	<b>842</b>	<b>80</b>	<b>137</b>	<b>705</b>

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; 1: No es posible la identificación de las diferentes especies o serovariedades de *Salmonella* spp.; 2: No es posible la identificación de las diferentes especies de *Aeromonas* spp.

Los bacilos gram negativos no fermentadores se identificaron a nivel de especie en 153 de 201 botellas (76,1%). En el caso de los bacilos gram negativos no fermentadores más frecuentes, el método directo identificó el 91,6% de *Pseudomonas aeruginosa*, el 66,7% de *Stenotrophomonas maltophilia* y el 94,7% de *Acinetobacter baumannii* (Tabla II).

En conjunto, el MSD logró una identificación global para bacterias gram negativas del 90,0% a nivel de especie y del 91,3% a nivel de género (Tabla III).

El grupo de los cocos gram positivos incluyó 1330 aislados que correspondían a 9 géneros y 39 especies. Los enterococos se identificaron por el método directo a nivel de género y especie en 67 de las 69 botellas de HP (97,1%). En el 84,1% de los casos, la identificación se logró con un *score*  $\geq 2,000$ . Los estreptococos se identificaron en el 71% de los HP por el método directo, tanto a nivel de especie como de género (Tabla IV). Las mayores discrepancias se observaron en el género *Streptococcus*, más precisamente entre *Streptococcus mitis* y *Streptococcus pneumoniae*, así como también entre *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae*. El método directo permitió identificar 43 de los 57 *S. pneumoniae* y 4 de los 13 *S. mitis*. Sin embargo, 3 botellas de HP con *S. mitis* con *scores*  $> 1,700$ , se identificaron incorrectamente como *Streptococcus pneumoniae* y una botella con *Streptococcus pneumoniae* se identificó erróneamente como *S. mitis*. En el grupo de los estreptococos piogénicos, el método directo identificó 3 de los 4 *S. dysgalactiae*, mientras que 1 se identificó incorrectamente como *S. pyogenes*. Dos *S. pyogenes* fueron incorrectamente identificados como *S. dysgalactiae*.

Dentro de la familia *Streptococcaceae*, 8 de 10 *Streptococcus oralis*, 10 de 11 *Streptococcus gallolyticus*, 7 de 7 *Streptococcus agalactiae*, 6 de 6 *Streptococcus anginosus*, 3 de 5 *Streptococcus salivarius*, 5 de 5 *Granulicatella adiacens*, 1 de 4 *Streptococcus sanguinis*, 1 de 2 *Streptococcus parasanguinis*, 1 de 2 *Gemella haemolysans* y el único *Streptococcus gordonii* fueron identificados correctamente a nivel de especie directamente del hemocultivo.

Con respecto al género *Staphylococcus*, se encontraron diferencias entre los estafilococos coagulasa negativos y *Staphylococcus aureus*, con porcentajes de identificación a nivel de especie de 75,1% y 82,9% respectivamente. Para *S. aureus*, en el 58,8% de los casos la identificación se logró con un *score*  $\geq 2,000$ , mientras que para los estafilococos coagulasa negativos esto ocurrió en sólo el 44,6% de los casos (Tabla V).

En 60 botellas anaerobias se aislaron 62 bacterias anaerobias. El protocolo de MSD detectó 46 de las mismas. La concordancia global entre ambos métodos fue del 74,2% con una puntuación  $\geq 1,700$ .

Tabla III. Desempeño del protocolo de identificación directa por MALDI-TOF MS frente a la identificación de colonia de bacilos gram negativos.

Grupo	n° aislamientos ID por MC	n° HP ID directamente por MSD	% de concordancia de ID a nivel de género	% de concordancia de ID a nivel de especie
BGN	721	689	95,6	93,5 <sup>1</sup>
BGNNF	201	153	76,1	76,1
BGN total	922	842	91,3	90,0 <sup>1</sup>

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; BGN: incluye *Enterobacterales* y *Aeromonadaceae*; BGNNF: Bacilos gram negativos no fermentadores; BGN total: incluye BGN y BGNNF; ID: identificados/identificación; 1: No es posible la identificación de las diferentes especies o serovariedades de *Salmonella* spp. ni *Aeromonas* spp.

Tabla IV. Desempeño del protocolo de identificación directa por MALDI-TOF MS frente a la identificación de colonia de cocos gram positivos comprendidos en distintos grupos.

Familias	n° aislamientos ID por MC	n° HP ID directamente por MSD	% de concordancia de ID a nivel de género y especie
<i>Staphylococcaceae</i>	1099	844	76,8
<i>Micrococcaceae</i>	31	16	51,6
<i>Enterococcaceae</i>	69	67	97,1
<i>Streptococcaceae</i>	131	93	71,0
CGP total	1330	1020	76,7

ID: identificación/identificados; HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; CGP: cocos gram positivos.

Tabla V. Identificación de cocos gram positivos directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS (MSD)				
		N° ID		Scores		
		correctas	erróneas	<1,7	1,7 - 2,0	≥2,0
<b>Staphylococcaceae</b>						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	623	465		158	286	179
<i>Staphylococcus aureus</i>	234	194		40	80	114
<i>Staphylococcus hominis</i>	100	80		20	26	54
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	80	57		23	33	24
<i>Staphylococcus capitis</i>	35	26		9	5	21
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	5	3		2	2	1
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	5	5				5
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4	4			2	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	6	4		2	2	2
<i>Staphylococcus caprae</i>	4	3		1	2	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1	1				1
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1	1			1	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1			1	
<b>Total</b>	<b>1099</b>	<b>844</b>		<b>255</b>	<b>440</b>	<b>404</b>
<b>Micrococcaceae</b>						
<i>Micrococcus luteus</i>	14	8		6	2	6
<i>Rothia mucilaginoso</i>	5	3		2	1	2
<i>Rothia aeria</i>	1	1				1
<i>Kocuria kristinae</i>	11	4		7	3	1
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>16</b>		<b>15</b>	<b>6</b>	<b>10</b>
<b>Enterococcaceae</b>						
<i>Enterococcus faecalis</i>	49	47		2	5	42
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15			3	12
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1				1
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1				1
<i>Enterococcus avium</i>	1	1			1	
<i>Enterococcus durans</i>	1	1				1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	1				1
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>67</b>		<b>2</b>	<b>9</b>	<b>58</b>
<b>Streptococcaceae</b>						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	57	43	1 <sup>1</sup>	13	17 <sup>1</sup>	27
<i>Streptococcus mitis</i>	13	4	3 <sup>2</sup>	6	5 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	10	8		2	2	6
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	11	10		1	3	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<b>7</b>	<b>7</b>			<b>1</b>	<b>6</b>
<i>Streptococcus anginosus</i>	6	6			4	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	5	3		2	1	2



Tabla V. Continuación

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS (MSD)				
		N° ID		Scores		
		correctas	erróneas	<1,7	1,7 – 2,0	≥2,0
<b>Streptococcaceae</b>						
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	1		3	1	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4	3	1 <sup>4</sup>		2 <sup>4</sup>	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2		2 <sup>3</sup>			2 <sup>3</sup>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	1		1	1	
<i>Streptococcus mutans</i>	2			2		
<i>Streptococcus gordonii</i>	1	1			1	
<i>Granulicatella adiacens</i>	5	5			4	1
<i>Gemella haemolysans</i>	2	1		1		1
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>93</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	<b>42</b>	<b>58</b>
<b>Total</b>	<b>1330</b>	<b>1020</b>	<b>7</b>	<b>303</b>	<b>497</b>	<b>530</b>

HP: hemocultivo positivo; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; ID: identificados/identificación; 1: identificación incorrecta como *Streptococcus mitis*; 2: identificación incorrecta como *Streptococcus pneumoniae*; 3: identificación incorrecta como *Streptococcus dysgalactiae*; 4: identificación incorrecta como *Streptococcus pyogenes*.

En el caso de los bacilos gram positivos aerobios, se evaluaron 36 botellas de hemocultivos. Se logró identificar los gérmenes a nivel de especie en 12 botellas (33,3%), utilizando el método directo. Los géneros que lograron identificarse directamente del hemocultivo fueron *Bacillus* spp., *Microbacterium* spp. y *Paenibacillus* spp. Por otro lado, las botellas en las cuales no se logró la identificación por método directo incluyeron microorganismos de los géneros *Corynebacterium* y *Bifidobacterium* (Tabla VI). En todos los casos estos bacilos gram positivos fueron considerados contaminantes.

La identificación directa de bacterias exigentes como *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* y *Neisseria meningitidis* se logró en el 100% de los casos (Tabla I).

En 13 HP con levaduras, el MSD informó correctamente 11 de ellas a nivel de género y especie. Las especies identificadas fueron *Candida parapsilosis* (n=6), *Candida guilliermondii* (n=1) y *Trichosporon asahii* (n=4). El MSD informó una botella con una identificación no confiable score <1,700 (*Candida albicans*) y en otra botella no se pudo obtener un espectro proteico (*Trichosporon asahii*).

El 5,8% (n=146) de los HP fueron polimicrobianos (84% con 2 microorganismos y 16% con 3 microorganismos). Se identificó al menos un germen en 129 de las 146 botellas positivas con un score ≥1,700. No se produjo ninguna identificación incorrecta en el caso de HP con mezclas de bacterias. Las 146 botellas polimicrobianas correspondieron a 107 sets de hemocultivos; en 27 de ellos con 2 o 3 botellas cada uno se pudieron identificar en conjunto 2 o 3 gérmenes (Tabla VII).

Es importante destacar que cada botella de hemocultivo se procesó tan pronto como se detectó como positiva. El tiempo transcurrido entre la alarma del equipo BACTEC FX y la identificación del germen por el método de espectrometría de masas directo fue de 30 minutos.

## Discusión y Conclusiones

La identificación de los microorganismos que desarrollan en las botellas de hemocultivos se realiza luego de un subcultivo en medio sólido e incubación durante 18-24 h y, dependiendo del procedimiento utilizado en cada laboratorio, puede demorar entre horas a varios días, en particular cuando se trata de microorganismos exigentes.

La espectrometría de masas MALDI-TOF ha mostrado ser capaz de identificar la mayoría de los microorganismos causantes de bacteriemias y fungemias directamente desde el hemocultivo, en el momento en que éste es detectado como positivo por el sistema automatizado con una alta confiabilidad. Pese a que la identificación directa desde los hemocultivos presentó algunos inconvenientes en sus inicios, como los bajos porcentajes de identificación de algunos cocos gram positivos o la detección de candidemias en algunos estudios, otros muestran excelentes resultados en estos aspectos (18).

Para bacilos gram negativos MSD presentó un excelente rendimiento. En este estudio permitió identificar correctamente el 94,5% de las enterobacterias a nivel de especie y el 95,5% a nivel de género.

Tabla VI. Identificación de bacilos gram positivos directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS (MSD)			
		N° Total	Scores		
			<1,7	1,7 - 2,0	≥2,0
<b>Bacillus spp.</b>					
<i>Bacillus cereus</i>	5	4	1	2	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	2		1	1
<i>Bacillus pumilus</i>	2	1	1		1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1			1
<i>Brevibacillus agri</i>	1	1		1	
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Corynebacterium spp.</b>					
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	5		5		
<i>Corynebacterium afermentans</i>	2		2		
<i>Corynebacterium striatum</i>	2		2		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1		1		
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1		1		
<b>Total</b>	<b>11</b>		<b>11</b>		
<b>Otros bacilos gram positivos</b>					
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	2	1	1	1	
<i>Paenibacillus pasadenensis</i>	1	1			1
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	1	1		1	
<i>Bifidobacterium brevis</i>	1		1		
BGP no ID	9		9		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

HP: Hemocultivo positivo; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; BGP no ID: Bacilos gram positivos no identificados; ID: identificados/identificación.

Actualmente, seis especies íntimamente relacionadas han sido asignadas al complejo *E. cloacae* incluyendo *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* y *Enterobacter nimipressuralis* (19). La discriminación de estas especies por métodos fenotípicos, así como por la secuenciación del gen *16SrRNA*, es difícil. De igual forma, la discriminación de las especies dentro del complejo no es posible por espectrometría de masas (20). En este trabajo, el método MSD permitió identificarlos como miembros del complejo *E. cloacae* en el 93,7% de los casos.

El género *Salmonella* se distinguió fácilmente de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* por el método directo. La MSD sería adecuada para el tamizaje rápido del género; la posterior identificación del serotipo depende de los métodos tradicionales de serotipificación.

En el caso de los bacilos gram negativos no fermentadores, donde las pruebas bioquímicas convencionales son poco exactas para las especies poco frecuentes, MALDI-TOF MS demostró ser de mucha utilidad (21). En el presente estudio, el protocolo directo permitió la identificación a nivel de especie de más del 90% de los bacilos gram negativos no fermentadores de interés clínico como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, aunque sólo el 66,7% de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Todos estos resultados se lograron 24 horas antes que por el método de colonia.

Es importante resaltar que la diferenciación de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* de los miembros de los géneros *Pseudomonas* o *Acinetobacter*, el mismo día en que se positiviza el hemocultivo, permite instaurar tempranamente un tratamiento más apropiado a la espera de los resultados de las pruebas de sensibilidad.

Tabla VII. Descripción de microorganismos aislados de hemocultivos polimicrobianos.

N° set	FC	Total de microorganismos identificados por el MC	Microorganismos identificados por el método directo de MALDI-TOF MS
1	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
2	1	<i>Escherichia coli</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>Escherichia coli</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	1	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
	2	<i>S. haemolyticus</i> + <i>Salmonella</i> sp.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
4	1	<i>S. hominis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	2	<i>S. hominis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
5	1	<i>S. marcescens</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	2	<i>S. marcescens</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
6	1	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
7	1	<i>S. haemolyticus</i> + <i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	2	<i>S. haemolyticus</i> + <i>E. faecium</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
8	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2	<i>S. haemolyticus</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
9	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	2	<i>Acinetobacter baumannii</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10	1	<i>Streptococcus salivarius</i> + <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>Streptococcus salivarius</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
11	1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	2	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12	1	<i>S. haemolyticus</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13	1	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
	2	<i>Pantoea agglomerans</i> + <i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
14	1	<i>S. grupo mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>S. grupo mitis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	1	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3	<i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16	1	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
17	1	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
18	1	<i>S. marcescens</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	2	<i>S. marcescens</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

FC: botella de hemocultivo; MC: método de colonia.

Tabla VII. Continuación

N° set	FC	Total de microorganismos identificados por el MC	Microorganismos identificados por el método directo de MALDI-TOF MS
19	1	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>M. morgani</i>	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>M. morgani</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	3	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>M. morgani</i>	<i>Morganella morgani</i>
20	1	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. avium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i>
21	1	<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>S. epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
22	1	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
23	1	<i>E. coli</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
24	1	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	1	<i>E. faecalis</i> + <i>M. morgani</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	2	<i>E. faecalis</i> + <i>M. morgani</i>	<i>Morganella morgani</i>
26	1	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
27	1	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	2	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

FC: botella de hemocultivo; MC: método de colonia.

Aunque el número de muestras fue reducido, el uso de MALDI-TOF directamente de los frascos de hemocultivos resultó eficaz en la identificación de bacterias exigentes como *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* y *Neisseria meningitidis*. Se lograron identificaciones correctas en la totalidad de las muestras (n=20), entre 24-48 horas antes que por el método de colonia.

A diferencia de lo informado inicialmente por otros autores, el presente estudio identificó directamente de la muestra el 75,1% de los estafilococos coagulasa negativos (SCN) y el 82,9% de los aislados de *S. aureus* a nivel de especie.

La Scola *et al.* identificaron el 38-93% de los estafilococos coagulasa negativos y el 40-58% de los aislados de *S. aureus* según el protocolo utilizado. Sin embargo, este trabajo contaba con un escaso número de frascos con bacterias gram positivas (n=70-90) (6) (7).

Para el género *Staphylococcus* el objetivo principal es diferenciar *S. aureus* de los SCN y esto se cumplió con precisión en el 100% de los hemocultivos por metodología directa. La posibilidad de diferenciación de *S. aureus* de SCN en forma rápida y precisa es de gran relevancia clínica para discriminar una infección grave de una posible contaminación.

En el caso de los estreptococos se identificaron en el 71% de los hemocultivos positivos a nivel de especie, un porcentaje superior al informado por otros investigadores. Ferreira *et al.* lograron identificar sólo el 50% de los frascos con gérmenes de este grupo (6) (10). Las principales fallas de identificación a nivel de especie observadas en el presente trabajo correspondieron a *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* así como también a *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae*. De un total de 139 aislamientos de la familia *Streptococcaceae*, en sólo 7 falló la identificación directa. El menor rendimiento de la espectrometría de masas con respecto al género *Streptococcus*, como lo advierte el fabricante, podría deberse a la estrecha relación de las diferentes especies, a la composición de la pared celular de bacterias gram positivas que les confiere una mayor resistencia a la lisis y a la presencia de proteínas sanguíneas remanentes, que puedan interferir en los perfiles de proteínas. La dificultad para discriminar entre estas especies representa una limitación actual de MALDI-TOF MS. Los perfiles espectrales de *S. mitis* y *S. pneumoniae* a menudo son indistinguibles; es por eso que todos los microorganismos identificados por el método directo como *S. pneumoniae* o estreptococos del grupo *S. mitis* deben confirmarse realizando las pruebas de solubilidad en bilis y optoquina (22) (23). Además,

las identificaciones de *S. pyogenes* y *S. dysgalactiae* deben combinarse con una prueba de aglutinación con partículas de látex para llegar al resultado de certeza (24) (25).

Las bacteriemias por bacterias anaerobias se asocian con una tasa de mortalidad del 15-30% y representan el 1-15% de todos los HP-según el contexto clínico. La identificación de estos gérmenes exigentes en muestras clínicas es un desafío para el laboratorio de microbiología. De allí, la importancia de los datos obtenidos en este estudio que demostraron que el protocolo utilizado constituye un recurso valioso para la identificación de este tipo de microorganismos directamente de hemocultivos (26).

La tecnología MALDI-TOF se reconoce como un método eficiente para la identificación desde colonia de bacilos gram positivos en comparación con los métodos convencionales (27) (28). Sin embargo, la detección directa de hemocultivos de este grupo de bacterias presenta grandes inconvenientes, ya sea por su gruesa capa de peptidoglicano que puede hacer que estas bacterias sean más resistentes a la lisis y extracción de proteínas, su bajo inóculo en las muestras y la interferencia de las proteínas sanguíneas en los espectros proteómicos obtenidos.

Respecto de las funguemias, en un estudio de 330 hemocultivos, Ferreira *et al.* no lograron detectarlas en forma confiable con la metodología utilizada; sólo pudieron detectar un episodio de los 18 analizados (10). Marinach-Patrice *et al.* (18) analizaron 36 hemocultivos simulados, utilizando sangre humana enriquecida con diferentes especies de *Candida*. Utilizando un protocolo de varios pasos de lisis con dodecilsulfato de sodio al 0,1%, lavados y centrifugaciones, lograron una identificación correcta a nivel de especie en la totalidad de las muestras. La principal limitación del trabajo radica en que se evaluaron hemocultivos simulados y no muestras clínicas. En el presente trabajo se identificaron correctamente a nivel de especie 11 de los 13 hemocultivos positivos con levaduras con el método directo de MALDI-TOF entre 24-48 horas antes que por el método de colonia.

Uno de los principales inconvenientes que se planteó inicialmente en relación a la identificación directa fue la imposibilidad de identificación cuando había más de un microorganismo implicado, derivado de la superposición de los distintos perfiles proteicos. Algunos autores informaron la detección directa de al menos una de las bacterias pero con una cantidad limitada de muestras (n=3-20) (5) (6) (29) (30). Esto puede constituir un problema de cierta importancia, ya que estudios previos estimaban que aproximadamente un 5% de los hemocultivos presentaban más de un microorganismo.

El elevado número de botellas de hemocultivos con desarrollo polimicrobiano (n=146) en el presente estudio permitió obtener una información relevante. Por un lado, el protocolo implementado logró la identificación de al menos un germen en el 88,4% de los casos. A diferencia de otros trabajos, no se produjeron identificacio-

nes erróneas. Además, al analizar las mezclas de microorganismos se identificaron preferentemente los bacilos gram negativos sobre los cocos gram positivos y bacilos gram negativos no fermentadores. Es decir, que se identificó el microorganismo predominante y que presentaba una menor dificultad en la extracción de proteínas.

En la actualidad, MALDI-TOF MS es considerada una prueba de diagnóstico rápido molecular (PDRm). Las PDRm son un complemento de los métodos de laboratorio convencionales para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo, ya que permiten reducir el tiempo para una terapia antimicrobiana efectiva, la mortalidad, la duración de la estancia hospitalaria y los costos en la atención de salud. Estas pruebas incluyen no sólo MALDI-TOF MS sino también, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (PNA-FISH) específicas de especie y sistemas de micromatrices de nanotecnología. La implementación simultánea con los programas de administración de antimicrobianos (ASP) puede reforzar estos beneficios (31) (32) (33) (34). Timbrook *et al.* realizaron un metaanálisis para evaluar el impacto de las PDRm sobre el riesgo de mortalidad, el tiempo hasta la terapia efectiva y la duración de la estancia hospitalaria, en comparación con los métodos de microbiología convencionales en pacientes con bacteriemias y funguemias. En este metaanálisis encontraron que el riesgo de mortalidad disminuía significativamente con las PDRm en presencia de ASP, pero no en su ausencia. Además, las PDRm se asociaron con una disminución del tiempo para la terapia efectiva y la duración de la estancia hospitalaria. Aunque no evaluaron los costos, las disminuciones observadas en la duración de la internación tienen implicaciones en el ahorro de costos por día de hospitalización evitado (32).

En otro estudio, Pliakos *et al.* evaluaron la rentabilidad de las PDRm solas y en combinación con un ASP para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo, utilizando los métodos de laboratorio convencionales sin ASP como estrategia de diagnóstico de referencia. En este estudio los autores demostraron que el uso de PDRm era una estrategia rentable que se asociaba con una alta eficacia terapéutica y ahorros en los costos de atención médica, ya sea que se use en combinación con un ASP o no. La estrategia más rentable y efectiva fue asociar MALDI-TOF MS con un ASP. Esto podría deberse al hecho de que el análisis MALDI-TOF MS tiene un tiempo de respuesta rápido y puede detectar una gama muy amplia de patógenos. Por este motivo, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) apoya el uso de PDRm y ASP como medio para optimizar la terapia antimicrobiana (31).

En resumen, el presente trabajo permitió realizar identificaciones certeras de especies de bacterias y levaduras, en minutos después de informar el hemocultivo como positivo. Esto constituye una herramienta muy importante en el manejo de pacientes infectados, ya que

permite instaurar o cambiar tratamientos y descartar contaminantes. Aunque la sensibilidad es todavía mejorable para la identificación de algunas especies, la especificidad es excelente, de modo que cuando el sistema informa la presencia de un determinado microorganismo con un *score* adecuado, este dato es extremadamente confiable. Por lo tanto, puede afirmarse que MALDI-TOF MS es una metodología rápida y confiable, elegible en el entorno clínico para la identificación de bacterias y hongos levaduriformes directamente de HP.

### Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

### Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

### Correspondencia

Bioq. NATALIA AZULA  
CEMIC, Galván 4102,  
1431, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
Correo electrónico: azulanatalia@gmail.com

### Referencias bibliográficas

- Bellido Muñoz J, Castaño Vega S, Ferreira L, Juanes Sánchez F, Buitrago González J. Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 383-93.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013 Jul; 26 (3): 547-603.
- Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of blood-stream infections. *Clin Infect Dis* 2009; 48: S238-45.
- Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1418-23.
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010 Feb; 48 (2): 444-7.
- La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4: e8041.
- Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol* 2018 May; 9: 1097.
- Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1481-3.
- Vlek A, Boten M, Boel C. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *Plos One* 2012; 7: e32589.
- 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.
- Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y, Hiramatsu K, *et al.* Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3862-6.
- Alatoom AA, Cunningham SA, 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.
- Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC. Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas: comparación de 2 procedimientos diagnósticos. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47 (3): 190-5.
- Rocca MF, Almuzara M, Barberis C, Vay C, Viñes MP, Prieto M. Presentation of the National Network for Microbiological Identification by Mass Spectrometry website. Guide for the identification of MALDI-TOF MS results. *Rev Argent Microbiol* Jan-Mar 2020; 52 (1): 83-4.
- Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (12): 3845-52.
- Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. 2017.
- 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.
- Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, *et al.* Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* 2010; 25: 5.

19. Paauw A, Caspers MP, Schuren FH, Leverstein-van Hall MA, Deletoile A, Montijn RC, *et al.* Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS One 2008; 21: e3018.
20. Pavlovic M, Konrad M, Azuka N, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. FEMS Microbiol 2012; 328: 46-53.
21. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. Rev Chilena Infectol 2012; 29 (3): 263-72.
22. Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Gómez González Á, Rodríguez-Sánchez B, *et al.* Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS. Front Microbiol 2017 April; 8: 698.
23. Angeletti S, Dicuozzo G, Avola A, Crea F, Dedej E, Vailati F, *et al.* Viridans group streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry *versus* gene sequence based identification. PLoS One 2015; 10 (3): e0120502.
24. Jensen CS, Dam-Nielsen C, Arpi M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of large colony beta-hemolytic streptococci containing Lancefield groups A, C, and G. Infect Dis (Lond) 2015; 47 (8): 575-9.
25. Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, Schorderet D, Schrenzel J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of beta-hemolytic streptococci. J Clin Microbiol 2011; 49 (8): 3004-5.
26. Almuhayawi M, Altun O, Abdulmajeed AD, Ullberg M, Özenci V. The performance of the four anaerobic blood culture bottles BacT/ALERT-FN, -FN Plus, BACTEC-Plus and -Lytic in detection of anaerobic bacteria and identification by direct MALDI-TOF MS. PLoS One 2015; 10 (11): e 0142398.
27. Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF Mass Spectrometry System and conventional phenotypic methods for identification of gram-positive rods. PLoS One 2014; 9 (9): e106303.
28. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2014 Apr; 52 (4): 1089-97.
29. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, 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.
30. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. J Clin Microbiol 2010; 48: 1584-91.
31. Pliakos E, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. The cost effectiveness of rapid diagnostic testing for the diagnosis of bloodstream infections with or without antimicrobial stewardship. Clin Microbiol Rev 2018 May 30; 31 (3): e00095-17.
32. Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2017; 64 (1): 15-23.
33. Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, *et al.* Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: success rate, economic analysis, and clinical outcome. J Microbiol Immunol Infect 2017; 50 (5): 662-8.
34. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, *et al.* Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. Clin Infect Dis 2013; 57 (9): 1237-45.