

Identificación directa con MALDI-TOF desde el frasco de hemocultivo a partir de subcultivos con incubación corta. Estudio multicéntrico

- Natalia Carrión^{1a}, Rolando Soloaga^{2b*}, Camila Asenzo^{3a}, Cynthia Carrizo^{4c}, Antonio Flores^{3c}, María Eva García^{3d}, María Alejandra Mastroianni^{4d}, Facundo Molina^{3a}, Adriana Procopio^{1c}, Vanesa Reijtman^{3d}, María Ratti^{3a}, Víctor Mamani^{3a}, Miryam Vázquez^{3c}, Diana Viale^{5d}

¹ Bioquímica. Especialista en Microbiología Clínica.

² Bioquímico. Doctor en Bioquímica. (ORCID: 0000-0003-2518-8727)

³ Bioquímica/o.

⁴ Técnica de laboratorio.

⁵ Bioquímica. Especialista en Gestión de la Calidad y Auditoría en Bioquímica Clínica.

^a Servicio de Microbiología, Hospital Naval Pedro Mallo. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Cátedra de Microbiología, Medicina, Universidad del Salvador. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Servicio de Bacteriología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^d Servicio de Microbiología Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

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)

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el rendimiento de la identificación realizada con MALDI-TOF a partir de la incubación de 3-5 h de subcultivos de hemocultivos positivos monomicrobianos que se comparó con la obtenida con la incubación de 24 h de los mismos. En dos hospitales se utilizó el sistema Vitek-MS (bioMérieux, Francia) y en uno el sistema Micro-Flex LT (Bruker, Daltonics). A partir de la incubación corta, MALDI-TOF identificó correctamente a 5/5 de las levaduras, a 91,1% (153/168) de las bacterias gram positivas, a 96,7% (119/123) de los bacilos gram negativos y a 93,6% (277/296) del total de cepas. La identificación por medio de MALDI-TOF a partir de una corta incubación de los subcultivos de los hemocultivos en medio sólidos es un método práctico, sencillo y confiable.

Palabras clave: MALDI-TOF; Hemocultivos; Bacteriemias

Direct identification with MALDI-TOF from the blood culture bottle from subcultures with short incubation. Multicenter study

Abstract

The objective of this work was to evaluate the performance of the identification carried out with MALDI-TOF from the 3-5 h incubation of subcultures of monomicrobial positive blood cultures that was compared with that obtained with the 24 h incubation of the same subcultures. The Vitek-MS system (bioMérieux, France) was used in two hospitals and the Micro-Flex LT system (Bruker, Daltonics) in one. With a short incubation, MALDI-TOF correctly identified 5/5 of the yeasts, 91.1% (153/168) of the gram-positive bacteria, 96.7% (119/123) of the gram-negative bacilli and 93.6% (277/296) of the total strains. Identification by means of MALDI-TOF with a short incubation of subcultures of blood cultures in solid media is a practical, simple and reliable method.

Keywords: MALDI-TOF; Blood cultures; Bacteremia

Identificação direta com MALDI-TOF do frasco de hemocultura de subculturas com incubação curta. Estudo multicêntrico

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da identificação realizada com MALDI-TOF a partir de 3 a 5 h de incubação de subculturas de hemoculturas positivas monomicrobianas que foi comparada com a obtida com a incubação de 24 h das mesmas. O sistema Vitek-MS (bioMérieux, França) foi utilizado em dois hospitais e o sistema Micro-Flex LT (Bruker, Daltonics) em um. A partir da incubação curta, o MALDI-TOF identificou corretamente 5/5 das leveduras, 91,1% (153/168) das bactérias gram positivas, 96,7% (119/123) dos bacilos gram-negativos e 93,6% (277/296) das cepas totais. A identificação por meio de MALDI-TOF a partir de uma incubação curta das subculturas das hemoculturas em meio sólido é um método prático, simples e confiável.

Palavras-chave: MALDI-TOF; Hemocultura; Bacteremias

Introducción

El tiempo para empezar y adecuar un tratamiento antimicrobiano juega un rol muy importante dentro del paquete de medidas a tomar para el manejo del paciente con sepsis (1); por otro lado, es importante reducir costos, toxicidad y presión de selección de cepas resistentes relacionados con tratamientos de amplio espectro innecesarios y, para ello, la identificación de los microorganismos responsables y la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de los mismos se deben lograr en el menor tiempo posible.

La espectrometría de masas con tiempo de vuelo o migración es una metodología descrita en el año 1975; sin embargo, su aplicación masiva rutinaria a la identificación de bacterias y de hongos empezó recién a partir de los años 2006-2007. Actualmente, existen dos protocolos con esta técnica para identificar a los microorganismos desde un frasco de hemocultivo positivo; una directamente desde la botella del mismo con diversos procedimientos de lavado con agua y/o saponina, centrifugación y concentrado; la segunda, mucho más simple, a partir de una pátina de un subcultivo en distintos medios sólidos con un período de incubación reducido de 3-5 h realizado desde el frasco (2).

El objetivo de este trabajo fue comparar el rendimiento de la identificación realizada a partir de la incubación de 3-5 h a 35 °C de subcultivos de hemocultivos positivos (IRP) con la obtenida a partir de la incubación por 24 h de los mismos, en ambos casos por medio de MALDI-TOF.

Materiales y Métodos

En el período comprendido entre septiembre de 2021 y febrero de 2022 se realizó un estudio prospectivo observacional analítico y colaborativo entre los Servicios de Microbiología de tres hospitales de la ciudad de Buenos Aires. Para los hemocultivos se utilizó el sistema auto-

matizado de hemocultivos BACT/ALERT (bioMérieux, Marcy, Francia). El promedio de botellas utilizadas por cultivo fue de 2 con un rango de 2-4 por episodio.

Todos los laboratorios de Microbiología realizaron las correspondientes pruebas los siete días a la semana, de 7,30 h a 19,30 h.

Cuando un hemocultivo se detectó como positivo se realizó coloración de Gram, subcultivo en agar sangre, agar chocolate y CLDE, y luego se identificó por medio de IRP y se comparó con el resultado a partir de la incubación de 24 h (método de referencia). En dos hospitales se usó el sistema Vitek-MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y en otro el sistema Micro-Flex LT (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania). Se estudiaron solo los cultivos monomicrobianos (n= 290; Bruker n=207 y Vitek-MS n=83).

Se consideró que la identificación era correcta cuando el resultado obtenido en cuanto a género y especie coincidió con el correspondiente al método de referencia.

Los resultados presentados provienen de proyectos aprobados por los Comités de Ética de las instituciones participantes.

Resultados

A partir de la incubación corta, MALDI-TOF identificó correctamente a 5/5 de las leveduras, a 91,1% (153/168) de las bacterias gram positivas, a 96,7% (119/123) de los bacilos gram negativos y a 93,6% (277/296) del total de cepas.

Respecto a IRP, el sistema Vitek-MS identificó correctamente a nivel de especie a 87,7% (43/49) de las bacterias gram positivas y a 97,4% (37/38) de los bacilos gram negativos; los correspondientes valores fueron 92,4% (110/119) y 96,5% (82/85) para el sistema Micro-Flex LT. Ambos equipos identificaron al total de las leveduras (3 *Candida albicans* por Vitek-MS y 2 *Candida parapsilosis* por Bruker).

En la Tabla I se muestra el rendimiento de Vitek MS para bacterias gram positivas y para gram negativas y en la Tabla II los correspondientes a Micro-Flex LT. No se identificaron 15 cepas de bacterias gram positivas (6 *Staphylococcus epidermidis*, 3 *Staphylococcus hominis*, 2 *Staphylococcus haemolyticus*, un *Staphylococcus carnosus*, un *Bacillus* sp., un *Streptococcus agalactiae* y un *Streptococcus pneumoniae*) ni cuatro de gram negativas (una *Escherichia coli*, un *Acinetobacter baumannii*, un *Herbaspirillum* y una *Pseudomonas oryzihabitans*).

Discusión y Conclusiones

El rendimiento promedio de la identificación con MALDI-TOF, cuando se hace desde un frasco positivo de hemocultivo, es del 80%; para ello existen diversos procedimientos que en general incluyen el tratamiento con un agente lítico como saponina o agua destilada en

primera instancia y luego realizar uno o más pasos de centrifugación; además, puede ser necesaria la confirmación a partir de las colonias aisladas (2). Otra posibilidad es a partir de IRP; esto es muy fácil de realizar, se integra con más facilidad al flujo de trabajo del laboratorio que el procedimiento anterior y los resultados en general no necesitan confirmación; es mejor para identificar bacilos gram negativos (82-99%) que para cocos gram positivos (67-93%) y puede fallar cuando se trata de microorganismos de lento crecimiento (2). Ambos métodos presentan problemas cuando el cultivo es mixto (2).

Moussaoui *et al.* (3) encontraron sobre 15 cultivos polimicrobianos de hemocultivos, que MALDI-TOF detectó un solo microorganismo en 12 y no identificó ninguno en tres. La Scola *et al.* (4) sobre 22 cultivos polimicrobianos hallaron un solo microorganismo en 18, en dos casos no se pudieron identificar y en un caso el resultado fue erróneo.

Ha *et al.* (5) demostraron la utilidad de la identificación con MALDI-TOF a partir de IRP. Sobre 254 hemo-

Tabla I. Identificación correcta de los microorganismos por medio de Vitek MS.

Microorganismo	Total n	Identificación	
		Correcta	Incorrecta
Bacilos gram negativos			
<i>Escherichia coli</i>	9	9	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	9	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4	0
<i>Serratia marcescens</i>	3	3	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	1	0
<i>Empedobacter brevis</i>	1	1	0
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1	1	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2	1	1
Subtotal gram negativos	38	37 (97,4%)	1 (2,6%)
Gram positivos			
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	18	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	11	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	5	0
<i>Enterococcus faecium</i>	3	3	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	0
<i>Streptococcus mitis</i>	2	2	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	1	1	0
Subtotal gram positivos	49	43 (87,7%)	6 (12,3%)
Total global	87	80 (92%)	7 (8,0%)

Tabla II. Identificación correcta de los microorganismos por medio de Micro-Flex LT.

Microorganismo	Total n	Identificación	
		Correcta	Incorrecta
Bacilos gram negativos			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20	0
<i>Serratia marcescens</i>	20	20	0
<i>Escherichia coli</i>	15	14	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	11	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	7	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	4	1
<i>Herbaspirillum</i>	3	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	0
<i>Achromobacter sp.</i>	1	1	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1	0
Subtotal gram negativos	85	82 (96,5%)	3 (3,5%)
Gram positivos			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40	38	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	30	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	19	17	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	6	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	4	0
<i>Enterococcus faecium</i>	3	3	0
<i>Bacillus spp.</i>	5	4	1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	2	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1	0
<i>Streptococcus mitis</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1	1	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	1	0
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1	0
Subtotal gram positivos	119	110 (92,4%)	9 (7,6%)
Total global	204	192 (94,1%)	12 (5,9%)

cultivos monomicrobianos la identificación fue correcta con Vitek MS en 79 y 86,6% a nivel de especie y de género respectivamente, en tanto que los valores para el sistema de Micro-Flex LT fueron de 82 y 87,4% respectivamente; si se considera el total de microorganismos la identificación fue correcta a nivel de especie en 82% para Micro-Flex LT y 78% para Vitek MS. Este protocolo representa una simplificación práctica considerable sin que aumente en forma significativa el tiempo de resultados a lo largo del día. Estos datos son comparables a los resultados obtenidos en el presente trabajo en el que se analizaron 299 cepas provenientes de hemocultivos monomicrobianos, dado que la identificación correcta a nivel de especie para bacilos gram negativos estuvo en el orden del 96-97% y para gram positivos en

88-92% y en 92-94% para el global de las cepas. Del total de cepas no identificadas por ambos equipos (n=19), la mayoría (n=12) correspondió a estafilococos coagulasa negativos y solo cinco a bacilos gram negativos, de los cuales dos son microorganismos infrecuentes de bacteriemia (*Herbaspirillum* y *Pseudomonas oryzihabitans*), en tanto que otros patógenos importantes como *S. aureus* (n=48), levaduras (n=5) y enterococos (n=13) se identificaron correctamente a nivel de especie en el 100% de los casos; no se obtuvieron identificaciones erróneas, lo que resulta importante porque podría conducir a tratamientos antimicrobianos erróneos. En el trabajo de Ha *et al.* (5), las principales fallas también se dieron en estafilococos coagulasa negativos y en cocobacilos gram positivos.

En una revisión publicada por Idelevich *et al.* (6) que abarcó a 25 países de Europa y 209 laboratorios, se halló que la técnica rápida más usada (37%) fue la de IRP, en tanto que la identificación con MALDI-TOF directamente desde el frasco se utilizó en 21% de los laboratorios.

Pliakos *et al.* (7) emplearon dos modelos estadísticos (probabilístico con la simulación de Montecarlo y otro basado en casos) y encontraron que las técnicas rápidas tenían un 85% de probabilidad de ser costo-efectivas en comparación a la microbiología tradicional sin un programa de uso racional de antibióticos (PROA). Dentro de las técnicas rápidas, MALDI-TOF con PROA demostró mayor costo-efectividad dado que evitaba una muerte cada 14 pacientes y luego las técnicas de PCR con o sin PROA que evitaron una muerte cada 25 pacientes. En ese trabajo, sin embargo, no se analizaron los distintos protocolos de identificación con MALDI-TOF a partir del frasco de hemocultivo positivo.

En conclusión, la identificación por medio de MALDI-TOF a partir de IRP es un método práctico, sencillo, confiable y brinda una orientación rápida que comunicada en forma inmediata al médico responsable del paciente, puede servir para optimizar la terapia antimicrobiana a la vez que se identifica sin demora a microorganismos potencialmente contaminantes.

Fuentes de financiación

No se contó con financiamiento externo.

Conflictos de intereses

Rolando Soloaga se desempeña como *Medical Science Liason* de bioMérieux, Argentina.

Correspondencia

Dr. ROLANDO NOEL SOLOAGA
Correo electrónico: msoloaga@yahoo.com

Referencias bibliográficas

1. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Cooper-smith CM, French C, *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021 Nov; 47 (11): 1181-247.
2. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA, ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2020 Feb; 26 (2): 142-50.
3. Moussaoui W, Jauliac B, Hoffman AM, Ludes B, Kostorzewa M, Riegel P, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood cultures vials. *Clin Microbiol Infect* 2010 Nov; 16 (11): 1631-8.
4. La Scola G, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009 Nov; 4 (11): e8041.
5. Ha J, Hong SK, Han GH, Kim M, Yong D, Lee K. Susceptibility testing of bacteria in positive blood culture broths using short-term incubation on solid medium with the MicroFlex LT, Vitek-MS, and Vitek 2 Systems. *Ann Lab Med* 2018 May; 38 (3): 235-41.
6. Idelevich EA, Seifert H, Sundqvist M, Scudeller L, Amit S, Balode A, *et al.* Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-an ESGBIES survey. *Clin Microbiol Infect* 2019 Nov; 25 (11): 1399-407.
7. Pliakos EE, 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; 31 (3): e00095-17.

Recibido: 19 de octubre 2022

Aceptado: 30 de octubre de 2023