



---

**Universidad de Valladolid**

Aplicación de la técnica MALDI-TOF en la  
identificación microbiana a partir de  
muestra directa de orina y de frasco  
de hemocultivo crecido

**Gabriel Alberto March Rosselló**

**Máster en Ciencias de la Salud: Farmacología, Neurobiología y Nutrición**

**Julio 2012**

**Manuel José Gayoso Rodríguez**, Doctor en Medicina, Catedrático de Histología de la Universidad de Valladolid y **Miguel Ángel Bratos Pérez**, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Valladolid

CERTIFICAN QUE

Don **Gabriel Alberto March Rosselló** ha realizado bajo su tutela y dirección el trabajo titulado: *Aplicación de la técnica MALDI-TOF en la identificación microbiana a partir de muestra directa de orina y de frasco de hemocultivo crecido*, que consideran satisfactorio para ser presentado como trabajo de investigación tutelado ante la Comisión correspondiente con el objetivo de complementar la formación académica del Máster en Ciencias de la Salud: Farmacología, Neurobiología y Nutrición de la Universidad de Valladolid.

Y para que así conste donde convenga, firman la presente certificación

Two handwritten signatures in blue ink, one on the left and one on the right, representing the certifying professors.

Valladolid, 21 de Junio de 2012

## INTRODUCCIÓN

La introducción de la identificación microbiana basada en el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (de su nombre en inglés que describe el tipo de ionización y el analizador utilizado: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) ha permitido mejoras importantes en la rutina de trabajo de los laboratorios de Microbiología Clínica. Entre estas mejoras cabe destacar un ahorro significativo del tiempo necesario para llevar a cabo las identificaciones microbianas a partir de colonias. En este sentido, una de las posibles aplicaciones de la técnica MALDI-TOF en la rutina de trabajo del laboratorio es lograr identificaciones microbianas a partir de diferentes muestras, como pueden ser las orinas y los frascos de hemocultivo crecidos, adelantando en 48/72 horas el resultado de la identificación microbiana si se compara con la identificación bioquímica clásica y en 24 horas si se compara con la identificación mediante MALDI-TOF a partir de colonias.

Clínicamente este acortamiento del tiempo necesario para llevar a cabo el diagnóstico microbiológico a nivel de especie se traduce en un aumento de la supervivencia de pacientes con sepsis que presentan bacteriemia documentada, ya que, en estos pacientes, la administración adecuada de antibióticos es esencial para una evolución favorable (Kumar, Ellis et al. 2009) y cada hora de retraso en el inicio del tratamiento está asociado con una disminución de la supervivencia de casi el 8% (Kumar, Roberts et al. 2006). En las orinas se ha demostrado que, aparte de los criterios clásicos de infección urinaria, las levaduras pueden ser agentes etiológicos de ésta (Behzadi, Behzadi et al. 2010; Chang, Greene et al. 2011; Kim, Kim et al. 2011) y que recuentos bacterianos  $<1 \cdot 10^5$  UFC/ml pueden ser indicativos de infección urinaria en ciertas condiciones (Arav-Boger, Leibovici et al. 1994; Rushton 1997; Hummers-Pradier, Ohse et al. 2004) de tal forma que sería interesante estudiar la identificación directa mediante MALDI-TOF en estos tipos de muestras.

De las diversas publicaciones recientes sobre la identificación microbiana mediante MALDI-TOF a partir de orinas y de frascos de hemocultivo crecidos se desprende que hay dos puntos clave que condicionan el éxito de tal identificación. El primer punto consiste en eliminar las interferencias analíticas generadas por células, proteínas, cristales, etc. que pueden estar presentes en la muestra. El segundo consiste en conseguir un extracto suficientemente enriquecido en el microorganismo ya que, como demostraron Christner et al (Christner, Rohde et al. 2010), la cantidad de microorganismo que se deposita sobre la placa, que a su vez depende de la concentración microbiana de la muestra, condiciona la calidad y el éxito de las identificaciones directas.

Como consecuencia de los hechos indicados, los protocolos de preparación de las diferentes muestras (orinas, frascos de hemocultivo crecidos, etc.) aplicados con el fin de lograr la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF comprenden dos pasos:

1. Eliminación de las células presentes en la muestra que impiden un correcto análisis espectrométrico (hematíes, leucocitos, etc).
2. Obtención de un sedimento rico en microorganismos.

Hasta el momento se han publicado varios métodos para lograr la eliminación de las células presentes en los hemocultivos. Uno de éstos se basa en la inducción de la lisis celular, que puede llevarse a cabo mediante el tratamiento de la muestra con un detergente, como puede ser el dodecilsulfato de sodio (Marinach-Patrice, Fekkar et al. 2010), la saponina (Ferroni, Suarez et al. 2010) o el Tween 80 (Juiz, Almela et al. 2011), con sales como cloruro de amonio (Prod'hom, Bizzini et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010) y finalmente mediante el uso de un kit comercial (MALDI sepsityper, Bruker Daltonik) (Juiz, Almela et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011; Yan, He et al. 2011). Otro método para lograr la eliminación de las células consiste en usar un tubo con gel separador de suero y con activador de la coagulación (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010). Finalmente, el último método consiste en aplicar un protocolo de centrifugación diferencial; es decir, realizar una centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células y otros cuerpos más densos que los microorganismos, y así obtener un sobrenadante más limpio que seguidamente se centrifuga a alta velocidad con el fin de forzar la sedimentación de los microorganismos que se pretenden identificar (La Scola and Raoult 2009; Christner, Rohde et al. 2010; Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011; Juiz, Almela et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011; Schmidt, Jarosch et al. 2012).

Con referencia a las muestras de orina, menos estudiadas, para la eliminación de las células presentes en éstas, únicamente se han publicado dos protocolos de centrifugación diferencial (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2010; Kohling, Bittner et al. 2012).

Una vez el microorganismo ha sido concentrado, el análisis se puede continuar de dos formas, bien utilizando parte del sedimento para realizar la identificación, y en el caso de que ésta resulte inválida, el análisis puede mejorarse realizando la precipitación y extracción de proteínas (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2010; Prod'hom, Bizzini et al. 2010; Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011; Juiz, Almela et al. 2011; Schmidt, Jarosch et al. 2012), o bien efectuando directamente la precipitación y extracción de las proteínas utilizando todo el sedimento y seguidamente realizar su análisis (La Scola and Raoult

2009; Christner, Rohde et al. 2010; Marinach-Patrice, Fekkar et al. 2010; Moussaoui, Jaulhac et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010; Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011; Yan, He et al. 2011).

Realizado el análisis de proteínas el software del fabricante proporciona un listado de microorganismos como identificaciones más probables y una valoración numérica de las mismas. A título de ejemplo el software de Bruker, uno de los fabricantes, proporciona un listado de diez microorganismos ordenados de mayor a menor puntuación. Esta puntuación corresponde a un nivel de identificación de tal forma que:

- Una puntuación situada entre 0.000 y 1.699 indica una identificación poco fiable.
- Una puntuación situada entre 1.700 y 1.999 indica una identificación probable de género.
- Una puntuación situada entre 2.000 y 2.299 indica una identificación segura de género e identificación probable de especie.
- Una puntuación situada entre 2.300 y 3.000 indica una identificación segura de género y alta probabilidad de identificación de especie.

Teniendo en cuenta el grado de concordancia (de especie, de género o ausencia de la misma) que existe entre los diez microorganismos emitidos en cada muestra analizada el mismo software también elabora un índice de consistencia que es un dato meramente informativo sobre la calidad de la identificación que no afecta a la validación de los resultados.

Según estos criterios se pueden aceptar como identificaciones válidas aquellas en las que se obtiene, como mínimo, una puntuación  $\geq 2$  en el primer microorganismo del listado. No obstante, cuando se realizan las identificaciones microbianas mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa sin previo cultivo de la misma, pueden darse una serie de situaciones que disminuyen la calidad de los resultados de tal forma que si se aplicara el criterio de validación anterior muchas identificaciones se darían por fallidas, cuando en realidad, se podría rebajar el nivel de exigencia del criterio manteniendo la fiabilidad de las identificaciones. En este sentido se han publicado otros criterios de validación de los resultados que pueden ser de dos tipos, según se indica a continuación.

Uno tiene en cuenta la puntuación y el índice de consistencia que se obtiene en cada lectura. Incluidos en este tipo tenemos dos propuestas, la de Moussaoui et al (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010) que establece que una identificación es válida si se

obtiene una puntuación  $\geq 1,4$  en el primer microorganismo y la especie coincide en las primeras cuatro propuestas de identificación del listado que proporciona el software, y la de Schubert et al (Schubert, Weinert et al. 2011) que propone que una identificación es válida si se obtiene una puntuación  $\geq 1,5$  en el primer microorganismo y la especie coincide en las primeras tres propuestas de identificación del listado que nos proporciona el software. El otro tipo únicamente tiene en cuenta la puntuación del primer microorganismo del listado. Dentro de éste existen tres propuestas distintas de validación. En primer lugar está la de Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010) y utilizada posteriormente por Prod'hom et al (Prod'hom, Bizzini et al. 2010) y Juiz et al (Juiz, Almela et al. 2011), que establece que en una identificación una puntuación  $\geq 2$  indica una identificación a nivel de especie, una puntuación que va de 1,7 a 1,9 indica una identificación a nivel de género y una puntuación  $< 1,7$  indica una identificación fallida. En segundo lugar tenemos la propuesta de Van Herendael et al (Van Herendael, Bruynseels et al. 2011), la cual establece que en una identificación una puntuación  $< 1,7$  indica una identificación fallida y una puntuación  $\geq 1,7$  indica una identificación aceptable. Finalmente, la propuesta de La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009) establece que un microorganismo se identifica correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro identificaciones de una misma muestra la especie bacteriana con mayor puntuación (la primera de la lista) coincide en todas ellas y como mínimo en dos identificaciones se obtiene una puntuación  $\geq 1,9$ , o en cuatro se alcanza una puntuación  $\geq 1,2$ .

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo son:

1. Desarrollar un protocolo único de centrifugación diferencial que permita la identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF a partir de muestras de orina y hemocultivos.
2. Establecer un nuevo criterio de validación de los resultados obtenidos a partir de muestra directa con el fin de aumentar el número de identificaciones aceptables.
3. Determinar la sensibilidad del nuevo protocolo analítico en muestras de orina y hemocultivo.
4. Estudiar la influencia que ejerce la carga bacteriana de la orina en la calidad de la identificación mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Determinación del tamaño muestral**

*Número de muestras de orina procesadas.* Para la determinación del tamaño del grupo de estudio de orinas se asume que la población está formada por el número de orinas positivas durante el año 2010, que suponen un total de 3272 (datos del SIL del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid). Aceptando un riesgo alfa de 0,95 para una precisión de  $\pm 0,1$  unidades en un contraste bilateral para una proporción estimada de 0,5 para la validación del protocolo de centrifugación diferencial aplicado a muestras de orina se precisa una muestra aleatoria de 95 orinas positivas monobacterianas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml en las que se reflejen los porcentajes de aislamientos obtenidos en la población. Se estima una tasa de reposición del 0%. Con el fin de facilitar los cálculos posteriores este grupo se incrementa hasta alcanzar la cifra de 100 orinas.

Para estudiar la relación entre la concentración bacteriana en muestras de orina y la calidad de la identificación mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa se procesan adicionalmente 14 orinas con un recuento entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml, 17 orinas con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml y seis orinas con un recuento  $< 1 \cdot 10^4$  UFC/ml. Para estudiar la identificación directa de levaduras en orina se procesan cuatro muestras. Es decir, se procesan un total de 141 muestras de orina positivas monomicrobianas.

*Número de frascos de hemocultivo procesados.* Para la determinación del tamaño del grupo de estudio de los hemocultivos se asume que la población está formada por el número de hemocultivos en el año 2010 que suponen un total de 1718 (datos del SIL del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid). Aceptando un riesgo alfa de 0,95 para una precisión de 0,1 unidades en un contraste bilateral para una proporción estimada de 0,5 para la validación del protocolo de centrifugación diferencial aplicado a hemocultivos se precisa una muestra aleatoria de 92 sujetos. Se estima una tasa de reposición del 0%. En este caso, para facilitar los cálculos, también se procesan 100 frascos de hemocultivo de los cuales 50 son aerobios y 50 anaerobios y siempre un único frasco de hemocultivo por paciente.

### **Procedimiento de trabajo**

*Diseño del protocolo de centrifugación diferencial.* Este método propone la realización de dos centrifugaciones, una a baja velocidad (700 rpm) para sedimentar las células y partículas grandes, y otra a alta velocidad (6.000 rpm) para sedimentar las bacterias.

En las orinas se procesa una muestra de 5 ml. Para calcular el tiempo de centrifugación a baja velocidad se parte de la base de que éstas poseen menor concentración celular que los hemocultivos. Para estimar el tiempo de centrifugación a baja velocidad de las orinas con piuria y hematuria se procede a realizar centrifugaciones sucesivas de un minuto cada una seguidas de la observación de la turbidez del sobrenadante. En base a estas observaciones se concluye que un tiempo de cinco minutos es suficiente para obtener un sobrenadante transparente.

En los hemocultivos, debido a su elevada concentración de células, con el objetivo de optimizar el procedimiento, se separan tres alícuotas de 5 ml y se centrifuga cada alícuota, a 700 rpm, una durante cinco minutos, otra durante diez minutos y la tercera durante 15 minutos, y se determina el tiempo de centrifugación necesario para eliminar las células.

El tiempo de centrifugación a alta velocidad, tanto para las orinas como para los hemocultivos, se fija en 15 minutos, que es un tiempo suficiente para asegurar la sedimentación de los microorganismos.

*Tratamiento de las muestras de orina.* Las muestras de orina con un volumen superior a 5 ml se siembran en placas de agar Columbia suplementado con 5% sangre de carnero (bioMérieux), medio de MacConkey (bioMérieux) y agar Sabouraud + cloranfenicol (Difco) con un asa calibrada de 10 µl. Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas en atmósfera aerobia. Las orinas se guardan a 4°C hasta su procesamiento. Una vez hecha la lectura de las placas y la identificación mediante MALDI-TOF a partir del cultivo se rechazan todas las orinas que presentan más de un microorganismo aislado. Las orinas seleccionadas se procesan siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se transfirieren 5 ml de orina homogeneizada a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugan durante cinco minutos a 700 rpm para sedimentar las células.
2. El sobrenadante se transfiere a otro tubo de centrifuga estéril y se centrifuga 15 minutos a 6.000 rpm.
3. El sedimento obtenido se resuspende en 1 ml de agua de calidad HPLC mediante agitación. Se transfiere el volumen a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifuga nuevamente durante 15 minutos a 6.000 rpm.
4. El sobrenadante se descarta y con el sedimento obtenido se realiza la extracción etanol/ácido fórmico. Dicha extracción consta de los siguientes pasos:



- a. El sedimento se mezcla con 300 µl de agua de calidad HPLC y se agita en vórtex hasta tener una suspensión homogénea.
  - b. Se añaden 900 µl de etanol absoluto y se agita nuevamente.
  - c. Se centrifuga 2 minutos a 13.000 rpm.
  - d. Se elimina el sobrenadante volcando el tubo eppendorf conservando exclusivamente el sedimento.
  - e. Se centrifuga 1 minuto a 13.000 rpm para eliminar los restos de los disolventes retirando el sobrenadante con una pipeta.
  - f. Se añaden con una pipeta 25 µl de ácido fórmico al 70% (Fluka analytical Sigma-Aldrich) para resuspender el sedimento agitándose a continuación en vórtex.
  - g. Se añaden 25 µl de acetonitrilo (Fluka analytical Sigma-Aldrich), agitándose a continuación en vórtex.
  - h. Se centrifuga 1 minuto a 13.000 rpm.
5. Se realizan cuatro depósitos de 1 µl cada uno del sobrenadante obtenido en cuatro lugares distintos de la tarjeta de metal portamuestras (MSP 96 target polished steel de 96 pocillos Bruker).
  6. Se deja secar y se añade 1 µl de la solución de matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, Fluka analytical Sigma-Aldrich) sobre cada depósito a analizar.
  7. Se deja secar y se procede a la lectura de los cuatro depósitos de cada muestra a analizar.

*Tratamiento de los hemocultivos.* Los frascos de hemocultivo BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials y BACTEC™ Plus Anaerobic/F Culture Vials se incuban en el sistema Bactec (Becton Dickinson). En el mismo momento que el sistema proporciona una lectura positiva y se comprueba la presencia de un único tipo de microorganismo mediante técnicas microscópicas se procede a la realización de la identificación directa mediante MALDI-TOF. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

1. Se toman 3 alícuotas de 5 ml de cada frasco de hemocultivo y se transfieren a 3 tubos de centrifuga estériles. Se centrifuga cada alícuota, a 700 rpm, una durante 5 minutos, otra durante 10 minutos y la tercera durante 15 minutos.

2. Cada sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugan durante 15 minutos a 6.000 rpm.
3. Se descartan los sobrenadantes y el sedimento de cada tubo se resuspende en 1 ml de agua de calidad HPLC mediante agitación. Cada volumen se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugan nuevamente 15 minutos a 6.000 rpm.
4. Los sobrenadantes se descartan y con el sedimento obtenido de cada alícuota se realiza la extracción etanol/ácido fórmico tal como se describió anteriormente con la diferencia de que, en este caso, por la mayor cantidad de sedimento se añaden 45 µl de ácido fórmico y otros tantos de acetonitrilo. Finalmente se realiza la lectura de los doce depósitos de cada muestra a analizar.

A continuación los frascos de hemocultivos aerobios se siembran en placas de agar Columbia suplementado con 5% sangre de carnero (bioMérieux), medio de MacConkey (bioMérieux), agar chocolate PolyVitex (bioMérieux) y los frascos de hemocultivos anaerobios se siembran en placas de agar chocolate PolyVitex (bioMérieux) y medio de Schaedler (Difco). Las placas se incuban en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas excepto el medio de Schaedler que se incuba a 37°C en jarra de anaerobiosis durante 24 horas. Una vez crecidas las colonias se realiza la identificación mediante MALDI-TOF a partir del cultivo.

### **Equipo y condiciones**

El análisis de proteínas se lleva a cabo con el espectrómetro de masas MALDI Microflex LT (Bruker Daltonic) con el software FLEXControl (versión 3.0). El espectro es obtenido en modo positivo lineal (frecuencia del láser N<sub>2</sub>: 60 Hz, voltaje de la fuente de iones I: 20 kV, voltaje de la fuente de iones II: 16,7 kV; rango de masas del detector: 2000 – 20137 Da). Para realizar la identificación microbiana la huella de tamaños de péptidos obtenida, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente, mediante el programa Maldi Biotyper 3.0, con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo (Demirev, Ho et al. 1999; Keys, Dare et al. 2004).

### **Criterios de validación de los resultados MALDI-TOF**

Se estudian las diferentes posibilidades de combinaciones de las puntuaciones de las identificaciones realizadas a partir de muestra directa de orina considerando la

identificación de la muestra directa como correcta cuando coincide a nivel de especie con la obtenida a partir de la colonia y se define un criterio de validación.

Para estudiar la influencia que ejerce el criterio de validación adoptado sobre el porcentaje de identificación obtenido a partir de muestra directa se aplican los diferentes criterios empleando los resultados de las identificaciones directas obtenidos a partir de 100 frascos de hemocultivo crecidos y de 137 orinas positivas monobacterianas comparándose, mediante la prueba de McNemar, los porcentajes de identificación obtenidos con cada criterio publicado con los porcentajes de identificación obtenidos con el criterio propuesto en este trabajo. Para ello, las orinas se dividen en dos conjuntos, uno formado por el grupo de estudio y otro por 37 orinas con un recuento  $<1 \cdot 10^5$  UFC/ml. En aquellos casos en los que el criterio se basa en una sola lectura se elige la primera de las cuatro realizadas.

### **Cálculos estadísticos**

Todos los cálculos estadísticos se han realizado mediante el programa SPSS v. 15.0.

## **RESULTADOS**

*Resultados de las orinas.* Debido a la alta homología que existe entre los aislamientos obtenidos en los cultivos del grupo de estudio y los obtenidos en los de la población se puede afirmar que los primeros son representativos de los segundos (Tabla 1). Además, las cuatro especies más frecuentemente aisladas en la población lo han sido también en el grupo de estudio; éstas son, por orden de mayor a menor prevalencia, *E. coli* con porcentajes de aislamiento del 56% en la población y del 51% en la muestra, *E. faecalis* con porcentajes del 18% y 11% respectivamente, *K. pneumoniae* con porcentajes del 7,9% y 11% respectivamente y *P. mirabilis* con porcentajes del 4,5% y 4% respectivamente. De las 100 orinas que forman el grupo de estudio 63 procedieron de mujeres y 37 de varones, 23 de pacientes ingresados y 77 fueron remitidas desde consulta externa y centros de salud, con edades comprendidas entre 4 y 94 años y con una mediana de 69 años.

Tabla 1. Identificaciones realizadas mediante MALDI-TOF de los diferentes grupos bacterianos obtenidos en el año 2010 y en el grupo de estudio a partir del cultivo de las muestras.

Grupo bacteriano	Total orinas positivas año 2010 (N=3272)	Grupo de estudio (N=100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	68%	76%
BGNF	7,9%	4%
<i>Staphylococcus</i>	6,5%	4%
<i>Streptococcus</i>	3,9%	5%
<i>Enterococcus</i>	13,2%	11%
Otros microorganismos	0,5%	0%

Las orinas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml proporcionaron elevadas puntuaciones de identificación (próximas o superiores a 2) en la gran mayoría de los casos. En cambio, las puntuaciones de las identificaciones directas de las orinas con un recuento  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml fueron más bajas, de tal forma que las identificaciones con puntuaciones  $< 1,4$  se correspondían con microorganismos raramente causantes de infección urinaria. En numerosas ocasiones en una o más determinaciones de las cuatro realizadas a partir de una misma muestra no se obtuvieron picos. En cambio, cuando las puntuaciones eran  $\geq 1,4$ , aunque los microorganismos propuestos fueran distintos, al menos una de las cuatro identificaciones coincidía con el obtenido en el cultivo. En estos casos, aunque los microorganismos se incluyeran entre los frecuentemente causantes de infección urinaria, si las identificaciones eran diferentes, la valoración de la puntuación no fue un criterio suficiente ya que en muchas ocasiones no coincidía con el cultivo. De esta forma, se observó que tomando como válida la identificación repetida como mínimo en dos de las cuatro realizadas se obtenía una concordancia del 100% con respecto a las identificaciones realizadas a partir del cultivo. En base a estos datos se propone el siguiente criterio de validación: un microorganismo es correctamente identificado mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen como mínimo dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado y ambas con una puntuación  $\geq 1,4$ .

Los resultados de la identificación directa obtenidos en el grupo de estudio de las orinas en función del criterio de validación adoptado se exponen en la Tabla 2. No ha habido diferencias estadísticamente significativas cuando se han comparado los distintos criterios de validación con el criterio propuesto ( $p > 0,05$ ) ya que los porcentajes de identificación obtenidos a partir de orina directa han sido muy similares en todos los casos.

Tabla 2. Resultados de la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de 100 orinas monobacterianas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml en función del criterio de validación adoptado.

Autor (referencia), tipo de criterio	Identificación directa en el grupo de estudio
Moussaoui et al (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010), puntuación más índice de consistencia	84%
Schubert et al (Schubert, Weinert et al. 2011), puntuación más índice de consistencia	84%
Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010), puntuación	84%
Van Herendael et al (Van Herendael, Bruynseels et al. 2011), puntuación	84%
La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009), puntuación	86%
Criterio propuesto, puntuación	90%

De las 37 orinas procesadas con un recuento  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml, las seis orinas con un recuento  $< 1 \cdot 10^4$  UFC/ml no proporcionaron una identificación válida con ninguno de los criterios de validación utilizados. Sin embargo las 14 orinas con un recuento de  $5 \cdot 10^4$  a  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml y las 17 orinas con un recuento de  $1 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml proporcionaron bajas puntuaciones de identificación. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de estas 31 orinas con un recuento  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml aplicando los diferentes criterios de validación.

Tabla 3. Resultados de la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de 31 orinas con un recuento  $<1 \cdot 10^5$  UFC/ml en función del criterio de validación adoptado.

Autor (referencia), tipo de criterio	Identificaciones directas válidas n (%)	Significación estadística
Moussaoui et al (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010), puntuación más índice de consistencia	1 (3,2)	p<0,05
Schubert et al (Schubert, Weinert et al. 2011), puntuación más índice de consistencia	1 (3,2)	p<0,05
Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010), puntuación	1 (3,2)	p<0,05
Van Herendael et al (Van Herendael, Bruynseels et al. 2011), puntuación	1 (3,2)	p<0,05
La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009), puntuación	2 (6,5)	p=0,06
Criterio propuesto, puntuación	7 (22,6)	

Los resultados obtenidos utilizando el criterio propuesto muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a los criterios de Moussaoui et al (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010), Schubert et al (Schubert, Weinert et al. 2011), Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010) y van Herendael et al (Van Herendael, Bruynseels et al. 2011). Cuando se comparó el criterio propuesto en este trabajo con el de La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009) no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). En cualquier caso, el criterio propuesto es el que ha proporcionado mayor porcentaje de identificación sin disminuir la calidad de los resultados porque todas las identificaciones realizadas a partir de muestra directa validadas con este criterio han coincidido en género y especie con las identificaciones realizadas a partir del cultivo de la orina.

Para exponer los resultados de las identificaciones directas de las orinas las 137 muestras procesadas también se han dividido en dos conjuntos, uno formado por el grupo de estudio y otro por 37 orinas con un recuento  $<1 \cdot 10^5$  UFC/ml. Los resultados

de las identificaciones directas realizadas a partir del grupo de estudio se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las identificaciones bacterianas obtenidos mediante MALDI-TOF a partir del cultivo y a partir muestra directa de 100 orinas monomicrobianas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml.

Grupo bacteriano	Identificación en el cultivo N=100	Identificaciones directas válidas n/N (%)
Gram negativos	80%	77/80 (96,3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	76%	74/76 (97,4)
BGNMF	4%	3/4 (75)
Gram positivos	20%	13/20 (65)
<i>Staphylococcus</i>	4%	1/4 (25)
<i>Streptococcus</i>	5%	2/5 (40)
<i>Enterococcus</i>	11%	10/11 (90,9)
Total	100%	90/100 (90)

En el grupo de estudio formado por 100 orinas monobacterianas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml se han obtenido 76 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. De estos 76 aislamientos, los 51 que fueron identificados como *E. coli* a partir del cultivo proporcionaron sólo una identificación fallida a partir de orina directa. Los aislados de *K. pneumoniae* (11 casos), los de *P. mirabilis* (cuatro casos), los de *K. oxytoca* (cuatro casos), los de *C. freundii* (tres casos), el de *E. aerogenes* y el de *S. marcescens* identificados a partir del cultivo han sido correctamente identificados a partir de orina directa. Finalmente, de las dos orinas en las que se ha aislado *E. cloacae* se ha logrado la identificación correcta a partir de muestra directa en una de ellas. De cuatro orinas en las que se han identificado BGNMF (dos orinas con aislamiento de *P. aeruginosa*, una con *A. baumannii* y una con *A. genomospecies 3*) sólo ha habido una identificación fallida de *P. aeruginosa* a partir

de orina directa y el resto de microorganismos han sido correctamente identificados de forma directa. En resumen, de 80 orinas en las que se han aislado bacterias gramnegativas, aplicando el protocolo de centrifugación diferencial junto con el criterio de validación propuestos en este trabajo, se ha logrado la identificación correcta a partir de muestra directa en 77 de ellas. En la identificación de bacterias grampositivas, de cuatro orinas en las que se han identificado microorganismos del género *Staphylococcus* (dos orinas con aislamiento de *S. aureus*, una con *S. epidermidis* y una con *S. saprophyticus*) sólo se ha logrado una identificación directa válida para *S. aureus*. De 11 orinas en las que se ha aislado *E. faecalis* se ha logrado la identificación directa en diez de ellas. De cinco orinas en las que se ha aislado *S. agalactiae* se ha logrado la identificación directa en dos de ellas. En resumen, de 20 orinas en las que se han identificado bacterias grampositivas, aplicando el protocolo propuesto en este trabajo se ha logrado la identificación correcta a partir de orina directa en 13 de ellas. Finalmente, de las 100 orinas que conforman el grupo de estudio se ha logrado la identificación a partir muestra directa en 90 de ellas obteniendo una sensibilidad del método analítico del 90% (intervalo de confianza del 95%: 81,96 - 94,84).

Para la exposición de los resultados de las identificaciones directas realizadas a partir del conjunto de 37 orinas monobacterianas con recuentos  $<1 \cdot 10^5$  UFC/ml, éstas se han dividido en tres conjuntos en función de su concentración bacteriana: uno formado por las orinas con un recuento entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml, otro formado por las orinas con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml y el último formado por las orinas con un recuento  $<1 \cdot 10^4$  UFC/ml.

Los resultados obtenidos con el procesamiento de 14 orinas con un recuento entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml se muestran en la Tabla 5. De las diez orinas con aislamientos de bacterias gramnegativas se ha conseguido la identificación correcta en tres de ellas, habiendo identificado dos aislados de *E. coli* y uno de *K. pneumoniae*. No se identificaron tres aislados de *E. coli*, uno de *P. mirabilis* y uno de *M. morganii*. Por otra parte, de las cuatro orinas con aislamientos de bacterias grampositivas (dos orinas con aislamiento de *E. faecalis*, una con *E. faecium* y una con *S. agalactiae*) sólo se ha logrado la identificación directa de un aislado de *E. faecalis*. Del mismo modo, de 14 orinas monobacterianas con un recuento entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml se ha logrado la identificación a partir de orina directa en cuatro de ellas.



Tabla 5. Resultados de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF a partir del cultivo y a partir de 14 orinas con un recuento entre  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^5$  UFC/ml.

Grupo bacteriano	Identificación en el cultivo n (%)	Identificaciones directas válidas n/N (%)
Gram negativos	10 (71,4)	3/10 (30)
<i>Enterobacteriaceae</i>	8 (57,1)	3/8 (37,5)
BGNF	2 (14,3)	0/2 (0)
Gram positivos	4 (28,5)	1/4 (25)
<i>Streptococcus</i>	1 (7,1)	0/1 (0)
<i>Enterococcus</i>	3 (21,4)	1/3 (33,3)
Total	14 (100)	4/14 (28,6)

Las 17 orinas con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  proporcionaron los resultados que se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF a partir del cultivo y a partir de 17 orinas con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml.

Grupo bacteriano	Identificación en el cultivo n (%)	Identificaciones directas válidas n/N (%)
Gram negativos	11 (64,7)	3/11 (27,3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	8 (47,1)	3/8 (37,5)
BGNF	3 (17,6)	0/3 (0)
Gram positivos	6 (35,3)	0/6 (0)
<i>Staphylococcus</i>	1 (5,9)	0/1 (0)
<i>Streptococcus</i>	1 (5,9)	0/1 (0)
<i>Enterococcus</i>	4 (29,4)	0/4 (0)
Total	17 (100)	3/17 (17,6)

De las 11 orinas con aislamientos de bacterias gramnegativas se ha conseguido la identificación correcta en tres de ellas identificándose en todas *E. coli*, no se identificaron tres aislados de *E. coli*, dos de *P. mirabilis* y tres de *P. aeruginosa*. De las seis orinas con aislamientos de bacterias grampositivas no se obtuvo ninguna identificación a partir de orina directa. Las cepas identificadas a partir del cultivo fueron una de *S. aureus*, cuatro de *E. faecalis* y una de *S. agalactiae*. En resumen, de 17 orinas con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml sólo se ha logrado la identificación directa en 3 de ellas.

De las seis orinas procesadas con un recuento  $<1 \cdot 10^4$  UFC/ml no se ha obtenido ninguna identificación directa válida. Se identificaron a partir del cultivo cinco cepas de *E. coli* y una de *P. mirabilis*.

En la identificación de levaduras mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa de cuatro orinas, la especie identificada a partir del cultivo ha sido *Candida albicans*. En las dos orinas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml se ha logrado la identificación correcta con una puntuación media de 1,989 y en las dos con un recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml no se obtuvo ninguna identificación válida.

En la Tabla 7 se exponen el porcentaje de identificación y la puntuación media obtenida en el total de orinas procesadas. Como se puede observar, a medida que disminuye la concentración bacteriana de la muestra el porcentaje de identificación y la puntuación media obtenida también disminuyen. Para cada concentración bacteriana el grupo de las enterobacterias ha sido el que ha presentado mayor porcentaje de identificación y mayor puntuación media. Finalmente, para cada concentración bacteriana el porcentaje de identificación y la puntuación media en bacterias gramnegativas han sido superiores a los de las bacterias grampositivas.

Tabla 7. Resultados de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF a partir de orina directa en función de la concentración bacteriana.

Grupo bacteriano	100 orinas $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml		14 orinas $5 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^5$ UFC/ml		17 orinas $1 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^4$ UFC/ml		6 orinas $< 1 \cdot 10^4$ UFC/ml	
	Resultados identificación directa n/N (%)	Puntuación media	Resultados identificación directa n/N (%)	Puntuación media	Resultados identificación directa n/N (%)	Puntuación media	Resultados identificación directa n/N (%)	Puntuación media
Gram negativos	77/80 (96,3)	2,063	3/10 (30)	1,65	3/11 (27,3)	1,456	0/6 (0)	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	74/76 (97,4)	2,07	3/8 (37,5)	1,65	3/8 (37,5)	1,456	-	-
BGNF	3/4 (75)	1,809	0/2 (0)	-	0/3 (0)	-	-	-
Gram positivos	13/20 (65)	1,885	1/4 (25)	1,608	0/6 (0)	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	1/4 (25)	1,528	-	-	0/1 (0)	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	2/5 (40)	1,536	0/1 (0)	-	0/4 (0)	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	10/11 (90,9)	1,985	1/3 (33,3)	1,608	0/1 (0)	-	-	-
Total	90/100 (90)	2,037	4/14 (28,6)	1,64	3/17 (17,6%)	1,456	0/6 (0)	-

*Resultados de los hemocultivos.* Los aislamientos obtenidos en el grupo de estudio son representativos de los de la población debido a la alta homología que existe entre ambos (Tabla 8).

Tabla 8. Identificaciones realizadas mediante MALDI-TOF de los diferentes grupos bacterianos obtenidos en el año 2010 y en 100 frascos de hemocultivo a partir del cultivo.

Grupo bacteriano	Total hemocultivos positivos año 2010 (N=1718)	Grupo de estudio (N=100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	25,5%	27%
BGNF	9,8%	8%
Otros BGN	1,8%	2%
<i>Staphylococcus</i>	52,3%	49%
<i>Streptococcus</i>	5,8%	7%
<i>Enterococcus</i>	4%	6%
Bacilos gram positivos	0,8%	1%

Cada frasco de hemocultivo ha sido procesado mediante la aplicación de tres procedimientos diferentes que se diferencian únicamente en el tiempo de la centrifugación a bajas revoluciones (5, 10 y 15 minutos). En los tres procedimientos se ha aplicado el criterio de validación de los resultados propuesto en este trabajo. En la Tabla 9 se representan los resultados de las identificaciones obtenidos mediante MALDI-TOF a partir del cultivo y a partir de 100 frascos de hemocultivo en función del procedimiento aplicado de tal forma que realizando una centrifugación a 700 rpm durante cinco minutos se ha obtenido una sensibilidad analítica del 42% (intervalo de confianza del 95%: 32,3% - 51,7%). Tanto para la centrifugación de diez minutos como para la de 15 se han obtenido las mismas identificaciones para cada muestra hallando una sensibilidad del 98% (intervalo de confianza del 95%: 95,2% - 100%). Así, los resultados alcanzados con un tiempo de centrifugación de cinco minutos son significativamente distintos ( $p < 0,05$ ) de los obtenidos con tiempos de diez y 15 minutos.

Tabla 9. Resultados de las identificaciones bacterianas mediante MALDI-TOF a partir del cultivo y a partir de 100 frascos de hemocultivo en función del procedimiento aplicado.

Grupo bacteriano	Identificación en el cultivo (N=100)	Identificaciones directas válidas		
		Centrifugación 5 minutos n/N (%)	Centrifugación 10 minutos n/N (%)	Centrifugación 15 minutos n/N (%)
Gram negativos	37%	14/37 (37,8)	36/37 (97,3)	36/37 (97,3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	27%	12/27 (44,4)	27/27 (100)	27/27 (100)
BGNMF	8%	2/8 (25)	7/8 (87,5)	7/8 (87,5)
Otros BGN	2%	0/2 (0)	2/2 (100)	2/2 (100)
Gram positivos	63%	28/63 (44,4)	62/63 (98,4)	62/63 (98,4)
<i>Staphylococcus</i>	49%	23/49 (46,9)	48/49 (98)	48/49 (98)
<i>Streptococcus</i>	7%	2/7 (28,6)	7/7 (100)	7/7 (100)
<i>Enterococcus</i>	6%	2/6 (33,3)	6/6 (100)	6/6 (100)
BGP	1%	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
Total	100%	42/100 (42)	98/100 (100)	98/100 (100)

En el estudio de la influencia del criterio de validación de los resultados en las identificaciones obtenidas a partir de los frascos de hemocultivos se han utilizado los que se han obtenido con una centrifugación de 10 minutos. Aplicando los criterios de Moussaoui et al (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010) y de Schubert et al (Schubert, Weinert et al. 2011) se obtuvo un 89% de identificaciones directas válidas; con los de Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010) y de Van Herendael et al (Van Herendael, Bruynseels et al. 2011) se obtuvo un 91% y con el de La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009) se obtuvo un 92%. No ha habido diferencias estadísticamente significativas cuando se han comparado los distintos criterios de validación ( $p>0,05$ ) ya que los porcentajes de identificaciones obtenidos a partir del frasco de hemocultivo crecido han sido muy similares en todos los casos.

Aplicando el criterio de validación propuesto en este trabajo en el grupo de estudio formado por 100 frascos de hemocultivo se han obtenido 27 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que han sido correctamente

identificados mediante MALDI-TOF de forma directa. Se aislaron 12 cepas de *E. coli*, cuatro de *K. oxytoca*, tres de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *E. asburiae*, y una de *Salmonella sp.* y una de *S. liquefaciens*. De ocho frascos de hemocultivo con aislamientos de BGNNF (tres con aislamiento de *A. baumannii* y cinco con *P. aeruginosa*) sólo ha habido una identificación directa discordante de un aislado de *A. baumannii* en un frasco aerobio. Dentro del grupo de otros bacilos gramnegativos se han incluido dos aislamientos de dos especies anaerobias *B. uniformis* y *B. tethaiotaomicron* que fueron correctamente identificados a partir del frasco de hemocultivo. En resumen, de 37 aislamientos de bacterias gramnegativas identificadas mediante cultivo, 36 lo fueron correctamente de forma directa.

En las bacterias grampositivas, de 49 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* identificadas a partir del cultivo (16 cepas de *S. epidermidis*, 15 de *S. hominis*, 13 de *S. aureus*, tres de *S. capitis* y dos de *S. haemolyticus*) sólo hubo una cepa de *S. epidermidis* que no fue identificada de forma directa en un frasco anaerobio. En el género *Enterococcus* hubo cuatro aislamientos de *E. faecalis* y dos de *E. faecium* que fueron correctamente identificados a partir del frasco de hemocultivo y en el género *Streptococcus* hubo seis aislamientos de *S. pneumoniae* y uno de *S. parasanguinis* que también fueron correctamente identificados a partir del frasco de hemocultivo. El único aislamiento de un bacilo grampositivo, *Corynebacterium argentoratense*, también fue identificado de forma directa. Resumiendo, de 63 aislamientos pertenecientes a bacterias grampositivas identificados mediante cultivo, 62 lo fueron de forma correcta a partir del frasco de hemocultivo. Por lo tanto, de 100 frascos de hemocultivo que forman el grupo de estudio se ha logrado la identificación de forma directa en 98 de ellos.

Para estudiar la posible influencia del tiempo de centrifugación y del tipo de frasco de hemocultivo en la calidad de la identificación se han considerado las puntuaciones medias obtenidas (Tabla 10). Se ha observado que las puntuaciones medias obtenidas en las identificaciones directas de cada grupo bacteriano han sido prácticamente las mismas en los dos protocolos de centrifugación (10 y 15 minutos). Sólo se han observado pequeñas diferencias en las puntuaciones medias de las identificaciones directas en el grupo de BGNNF y de los *Enterococcus* en función del tipo de frasco, siendo mayor la puntuación media obtenida a partir de los frascos aerobios. En los dos protocolos el grupo de las enterobacterias ha sido el que ha presentado mayor puntuación media de identificación directa. Finalmente, la puntuación media de identificación directa de bacterias gramnegativas ha sido superior al de bacterias grampositivas con independencia del procedimiento aplicado y del tipo de frasco.

Tabla 10. Puntuaciones medias obtenidas en las identificaciones directas a partir de 50 frascos aerobios y 50 anaerobios para cada grupo bacteriano aplicando las centrifugaciones de 10 y 15 minutos a 700 rpm.

Grupo bacteriano	Puntuación media centrifugación 10 minutos		Puntuación media centrifugación 15 minutos	
	Frasco aerobio	Frasco anaerobio	Frasco aerobio	Frasco anaerobio
Gram negativos	2,082	2,048	2,137	2,065
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,108	2,107	2,149	2,121
BGNF	2,031	1,553	2,113	1,589
Gram positivos	1,874	1,828	1,841	1,848
<i>Staphylococcus</i>	1,876	1,851	1,822	1,883
<i>Streptococcus</i>	1,757	1,746	1,836	1,706
<i>Enterococcus</i>	1,930	1,650	1,944	1,656
Total	1,938	1,919	1,931	1,937

En la Tabla 11 se exponen las puntuaciones medias y los porcentajes de identificación directa obtenidos en los grupos de estudio de las orinas y de los hemocultivos. Cuando se comparan los resultados de las identificaciones directas de orinas con los resultados de los hemocultivos se observa que las identificaciones de las cepas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* en hemocultivos presentan mayor puntuación media y mayor porcentaje de identificación que las identificaciones realizadas a partir de orinas. El resto de grupos bacterianos han presentado resultados muy similares.

Tabla 11. Puntuaciones medias obtenidas en las identificaciones directas en los grupos de estudio de las orinas y de los hemocultivos.

Grupo bacteriano	Puntuación media en orinas	Puntuación media en hemocultivos	Identificaciones directas válidas en orinas n/N (%)	Identificaciones directas válidas en hemocultivos n/N (%)
Gram negativos	2,063	2,038	77/80 (96,3)	36/37 (97,3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,070	2,108	74/76 (97,4)	27/27 (100)
BGNMF	1,809	1,888	3/4 (75)	7/8 (87,5)
Gram positivos	1,885	1,869	13/20 (65)	62/63 (98,4)
<i>Staphylococcus</i>	1,528	1,882	1/4 (25)	48/49 (98)
<i>Streptococcus</i>	1,536	1,749	2/5 (40)	7/7 (100)
<i>Enterococcus</i>	1,985	1,884	10/11 (90,9)	6/6 (100)
Total	2,037	1,931	90/100 (90)	98/100 (100)

## DISCUSIÓN

Para la preparación de la muestra se han descrito diversos métodos. En los hemocultivos estos métodos incluyen la centrifugación diferencial (La Scola and Raoult 2009; Christner, Rohde et al. 2010; Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011; Juiz, Almela et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011; Schmidt, Jarosch et al. 2012), el uso de detergentes (Ferroni, Suarez et al. 2010; Marinach-Patrice, Fekkar et al. 2010; Juiz, Almela et al. 2011), de sales inorgánicas (Prod'hom, Bizzini et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010), el kit comercial Maldi sepsityper (Juiz, Almela et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011; Yan, He et al. 2011), y el uso de un tubo de con gel separador y activador de la coagulación (Moussaoui, Jaulhac et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010) mientras que en las orinas sólo se ha aplicado la centrifugación diferencial (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2010; Kohling, Bittner et al. 2012). Uno de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de un protocolo único para hemocultivos y orinas; por ello se ha elegido la centrifugación diferencial como método para la preparación de la muestra al ser ésta la única técnica descrita previamente en ambos casos. Con este mismo objetivo, se partió del máximo volumen de muestra disponible en el



laboratorio, 5 ml tanto de la muestra de orina como del hemocultivo crecido con el fin de poder recoger la máxima cantidad de bacterias quedando así la variable analítica de volumen de muestra de partida igual en ambos casos.

Se ha decidido realizar la precipitación y extracción de las proteínas previa al análisis porque requiere un tiempo de realización corto (15 minutos) y su complejidad es escasa. Aunque sin duda, el motivo más importante es que, realizando la extracción, se asegura obtener el máximo porcentaje de identificaciones directas válidas, ya que está descrito que este procedimiento consigue incrementar tanto las identificaciones realizadas a partir del cultivo (Steensels, Verhaegen et al. 2011) como las realizadas a partir de muestra directa de orina y hemocultivo (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011).

Cuando se estudiaron las identificaciones a partir de muestra directa de orina con bajas puntuaciones, se observó que había ausencia de concordancia en el listado de los diez microorganismos propuestos por el software del fabricante, lo cual demuestra que los criterios que tienen en cuenta la puntuación y el índice de consistencia proporcionan muchas identificaciones fallidas pese a que la primera opción del listado sí que podría coincidir con la identificación obtenida a partir del cultivo. El criterio de La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009), el que utiliza puntuaciones más bajas de todos los publicados hasta la fecha, propone sustituir el índice de consistencia que se obtiene en una lectura por la concordancia a nivel de especie que se obtiene en la primera identificación de las cuatro lecturas realizadas a partir de una muestra; es decir, este criterio se basa en la puntuación y en la reproducibilidad del equipo. Una limitación de este criterio consiste en que, al proponer identificaciones válidas a partir de 1,2, no puede ser aplicado para la validación de los resultados obtenidos a partir de muestra directa de orina con baja carga bacteriana ya que, como se ha dicho antes, se observó que puntuaciones <1,4 se correspondían con microorganismos que rara vez son agentes etiológicos de infección urinaria.

Con el criterio propuesto en este trabajo, según el cual un microorganismo es correctamente identificado mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen como mínimo dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado y ambas con una puntuación  $\geq 1,4$ , la mayor puntuación de identificación obtenida en una de las cuatro lecturas realizadas de una misma muestra no es determinante para decidir cuál es la válida ya que si hubiese una identificación con mayor puntuación que cualquiera de las repetidas ésta sería descartada. De esta forma, se reduce al máximo el peso de la puntuación de la identificación a la hora de validar los resultados obteniendo así un número de identificaciones válidas 3,5 veces superior al obtenido con el criterio de La Scola y Raoult (La Scola and Raoult 2009) (Tabla 3). Con el fin de conseguir un mayor

número de identificaciones directas válidas en las muestras que se obtuvieron identificaciones con baja puntuación, o que no proporcionaron picos, se depositaron, con el fin de acumular más cantidad de proteína, 3  $\mu$ l de muestra sobre la placa de identificación de la siguiente forma: primero 1  $\mu$ l de muestra y se dejó secar, después otro y se dejó secar y por último 1  $\mu$ l más y después 1  $\mu$ l de matriz. Lamentablemente ello no implicó ninguna mejora obteniéndose los mismos resultados que con 1  $\mu$ l de muestra.

Por otra parte, cuando la concentración bacteriana en la muestra de orina es alta,  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml, se han obtenido porcentajes de identificación directa elevados y muy similares entre sí con independencia del criterio de validación aplicado (Tabla 2). Esto mismo sucede cuando se han estudiado los resultados de las identificaciones obtenidos a partir del frasco de hemocultivo crecido (Tabla 9).

Los resultados de las identificaciones realizadas a partir de muestra directa de orina obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Ferreira et al (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2010) y con los de Kohling et al (Kohling, Bittner et al. 2012) que también observaron un mayor porcentaje de identificaciones de microorganismos gramnegativos que de grampositivos y que concentraciones  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml proporcionaron bajas puntuaciones de identificación.

No existen publicaciones en las que se estudie la identificación de levaduras a partir de muestra directa de orina. Aunque el número de muestras analizado es muy pequeño los resultados obtenidos coinciden con los de las orinas positivas para bacterias; es decir, las dos cepas de *C. albicans* presentes en dos orinas con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml fueron correctamente identificadas a partir de muestra directa y las dos cepas aisladas en dos orinas con un recuento  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml no fueron identificadas a partir de muestra directa de orina.

Hasta el momento se han publicado cifras muy variables en la identificación a partir de los frascos de hemocultivo crecidos, oscilando entre el 76,4% obtenido por Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010) y el 92% de Christner et al (Christner, Rohde et al. 2010). La variabilidad de estas cifras se debe a la aplicación de diferentes protocolos que además parten de diferentes volúmenes de muestra (La Scola and Raoult 2009; Christner, Rohde et al. 2010; Moussaoui, Jaulhac et al. 2010; Prod'hom, Bizzini et al. 2010; Stevenson, Drake et al. 2010; Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011; Schubert, Weinert et al. 2011). Nuestros resultados son mejores que los anteriormente citados, con un porcentaje de identificación del 98%. Este incremento en la identificación directa se debe a que aplicando el protocolo de centrifugación diferencial junto con el criterio de validación de los resultados propuestos en este trabajo se ha logrado una

mayor identificación de bacterias grampositivas. Este hecho puede ser debido a que se han recogido las bacterias presentes en 5 ml de muestra mientras que en todos los trabajos publicados siempre se ha partido de un volumen inferior de muestra recogiendo así una menor cantidad de bacterias y obteniendo por tanto una peor puntuación. Es interesante señalar que en nuestro caso la identificación a partir del frasco de hemocultivo se realizó en el momento en el que el sistema Bactec proporcionó una lectura positiva mientras que otros autores como Stevenson et al (Stevenson, Drake et al. 2010) mantuvieron los frascos positivos durante tres a diez horas a temperatura ambiente para aumentar el número de bacterias y poder obtener mejores resultados; aún así, los resultados presentados en este trabajo suponen una mejora en el porcentaje de identificaciones correctas (un 98% frente a un 76,4%).

De 100 identificaciones realizadas a partir de los frascos de hemocultivo sólo ha habido dos de ellas que no han coincidido con la realizada a partir del cultivo de la muestra. Un aislado de *A. baumannii* identificado a partir del cultivo fue reconocido como *A. genomospecies 3* a partir del frasco de hemocultivo. Esta discordancia posiblemente fuera debida a la presencia en el cultivo de *S. aureus* que no se observó en el frasco de hemocultivo mediante técnicas microscópicas, o a una limitación del equipo ya que éste, en el caso de realizar una identificación de una especie perteneciente al género *Acinetobacter*, emite la siguiente advertencia: “los perfiles de las especies de este género son muy semejantes: la diferenciación a nivel de especie es por lo tanto muy difícil”. Esta cepa de *A. baumannii* también fue identificada como tal mediante los métodos bioquímicos tradicionales, como los sistemas comerciales API (BioMerieux), Wider (Soria Melguizo) y Microscan (Siemens). El otro resultado discordante fue una cepa de *S. epidermidis* que no fue identificada a partir del frasco de hemocultivo probablemente debido a un error técnico durante el procesamiento de la muestra o a un fenómeno que se observa en la rutina de trabajo del laboratorio que consiste en que algunas especies del género *Staphylococcus* no se identifican mediante MALDI-TOF a partir de la colonia, aunque se repita la identificación; en cambio, si se hace un subcultivo y se incuba durante 24 horas se forman nuevas colonias a partir de las que se obtiene una identificación correcta (datos no publicados).

Por otra parte las puntuaciones medias de las identificaciones directas de BGNNF obtenidas a partir de frascos de hemocultivo aerobio han sido muy superiores a las obtenidas a partir de frascos anaerobios debido a que estos microorganismos crecen mucho mejor en condiciones aerobias (Tabla 10).

El mayor porcentaje de identificación directa a partir de hemocultivos en comparación con el de orinas puede explicarse por el mayor número de bacterias presentes en el hemocultivo ya que cuando el sistema Bactec da una lectura positiva la concentración

bacteriana media es de  $5 \cdot 10^8$  UFC/ml (Christner, Rohde et al. 2010), que es una carga bacteriana más que suficiente para que pueda realizarse una correcta identificación de bacterias grampositivas y gramnegativas mediante MALDI-TOF y que raramente se encuentra en las muestras de orina. Si se comparan los porcentajes de identificación directa de bacterias gramnegativas a partir de frascos de hemocultivo y a partir de orinas se obtienen valores muy parecidos (97,3% en hemocultivos y 96,3% en orinas). En cambio, si se comparan los porcentajes de identificación directa de bacterias grampositivas a partir de frascos de hemocultivo y a partir de orinas se obtienen valores sustancialmente diferentes (98,4% en hemocultivos y 65% en orinas). Estas diferencias se deben a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* de tal forma que en los hemocultivos el 98% de las cepas de *Staphylococcus* y el 100% de las cepas de *Streptococcus* se identificaron correctamente a partir del frasco, mientras que en las orinas sólo lo fueron a partir de muestra directa el 25% de las cepas de *Staphylococcus* y el 40% de las cepas de *Streptococcus*. Por otra parte, en los *Enterococcus* se ha observado un porcentaje de identificación directa muy semejante en ambos tipos de muestra (100% en hemocultivos y 90,9% en orinas). Estos datos vienen a confirmar lo expresado por otros autores que afirman que la capacidad de identificación del sistema MALDI-TOF de bacterias gramnegativas es superior a la de bacterias grampositivas (Schubert, Weinert et al. 2011).

## CONCLUSIONES

1. El protocolo de centrifugación diferencial propuesto en este trabajo se puede aplicar tanto a muestras de orina como a frascos de hemocultivo crecidos para lograr la identificación a partir de muestra directa mediante MALDI-TOF con la salvedad de que la centrifugación a baja velocidad en las muestras de orina debe ser de cinco minutos y en los hemocultivos de diez.
2. Si la puntuación de identificación directa es baja (cercana a 1,4) los porcentajes de identificación aceptables dependen en gran medida del criterio de validación; si la puntuación es alta (próxima a 2) el criterio de validación apenas influye en los porcentajes de identificaciones aceptables.
3. El criterio de validación de los resultados propuesto en este trabajo proporciona un mayor número de identificaciones aceptables que otros criterios publicados.
4. Aplicando el protocolo de centrifugación diferencial al frasco de hemocultivo en el momento en el que el sistema Bactec da una lectura positiva junto con el

criterio de validación propuesto en este trabajo se puede lograr la identificación mediante MALDI-TOF de las bacterias grampositivas y gramnegativas más frecuentemente productoras de bacteriemia.

5. Aplicando el protocolo de centrifugación diferencial junto con el criterio de validación propuesto en este trabajo se puede lograr la identificación mediante MALDI-TOF de los microorganismos más prevalentes en la infección urinaria (gramnegativos y *Enterococcus*) a partir de muestra directa de orina con un recuento  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml. Sin embargo, esta carga bacteriana es insuficiente para lograr la identificación de *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*
6. Orinas monomicrobianas con recuentos en placa  $< 1 \cdot 10^5$  UFC/ml proporcionan porcentajes de identificación directa mediante MALDI-TOF inaceptablemente bajos. El mayor grado de fiabilidad de identificación a partir de muestra directa de orina se obtiene con bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y recuentos  $\geq 1 \cdot 10^5$  UFC/ml.
7. Para los hemocultivos, 5 ml de muestra son suficientes para realizar la identificación directa ya que partiendo de este volumen se consigue un elevado porcentaje de identificación mientras que, para las orinas se recomienda partir de todo el volumen de muestra que se disponga en el laboratorio para así poder procesar la máxima cantidad de bacterias.

## Bibliografía

- Arav-Boger, R., L. Leibovici, et al. (1994). "Urinary tract infections with low and high colony counts in young women. Spontaneous remission and single-dose vs multiple-day treatment." Arch Intern Med **154**(3): 300-304.
- Behzadi, P., E. Behzadi, et al. (2010). "Urinary Tract Infections Associated with *Candida albicans*." Maedica (Buchar) **5**(4): 277-279.
- Chang, R., M. T. Greene, et al. (2011). "Epidemiology of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection at a university hospital." Infect Control Hosp Epidemiol **32**(11): 1127-1129.
- Christner, M., H. Rohde, et al. (2010). "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 **48**(5): 1584-1591.
- Demirev, P. A., Y. P. Ho, et al. (1999). "Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches." Anal Chem **71**(14): 2732-2738.
- Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, et al. (2010). "Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." J Clin Microbiol **48**(6): 2110-2115.
- Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, et al. (2011). "Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method." Clin Microbiol Infect **17**(7): 1007-1012.
- Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, et al. (2011). "Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Clin Microbiol Infect **17**(4): 546-551.
- Ferroni, A., S. Suarez, et al. (2010). "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 **48**(5): 1542-1548.
- Hummers-Pradier, E., A. M. Ohse, et al. (2004). "Urinary tract infection in men." Int J Clin Pharmacol Ther **42**(7): 360-366.
- Juiz, P. M., M. Almela, et al. (2011). "A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
- Keys, C. J., D. J. Dare, et al. (2004). "Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases." Infect Genet Evol **4**(3): 221-242.
- Kim, J., D. S. Kim, et al. (2011). "Fungal urinary tract infection in burn patients with long-term foley catheterization." Korean J Urol **52**(9): 626-631.
- Kohling, H. L., A. Bittner, et al. (2012). "Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors." J Med Microbiol **61**(Pt 3): 339-344.
- Kumar, A., P. Ellis, et al. (2009). "Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock." Chest **136**(5): 1237-1248.
- Kumar, A., D. Roberts, et al. (2006). "Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock." Crit Care Med **34**(6): 1589-1596.
- La Scola, B. and D. Raoult (2009). "Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry." PLoS One **4**(11): e8041.

- Marinach-Patrice, C., A. Fekkar, et al. (2010). "Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry." PLoS One **5**(1): e8862.
- Moussaoui, W., B. Jaulhac, et al. (2010). "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials." Clin Microbiol Infect **16**(11): 1631-1638.
- Prod'hom, G., A. Bizzini, et al. (2010). "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets." J Clin Microbiol **48**(4): 1481-1483.
- Rushton, H. G. (1997). "Urinary tract infections in children. Epidemiology, evaluation, and management." Pediatr Clin North Am **44**(5): 1133-1169.
- Schmidt, V., A. Jarosch, et al. (2012). "Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(3): 311-317.
- Schubert, S., K. Weinert, et al. (2011). "Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry." J Mol Diagn **13**(6): 701-706.
- Steensels, D., J. Verhaegen, et al. (2011). "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review." Acta Clin Belg **66**(4): 267-273.
- Stevenson, L. G., S. K. Drake, et al. (2010). "Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." J Clin Microbiol **48**(2): 444-447.
- Van Herendael, B. H., P. Bruynseels, et al. (2011). "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.
- Yan, Y., Y. He, et al. (2011). "Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system." J Clin Microbiol **49**(7): 2528-2532.