



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA / ESCUELA DE
MEDICINA

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA CELULAR,
HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

TRABAJO FIN DE MASTER:

**COMPARACIÓN DE 4 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO
DE FRASCOS DE HEMOCULTIVO PARA SU ANÁLISIS
POR MALDI-TOF**

Presentado por: LICENCIADA LISBETH GONÇALVES DE FREITAS

para optar al título de Máster en Investigación en
Ciencias de la Salud: Farmacología, Neurobiología y
Nutrición de la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Manuel José Gayoso Rodríguez
Dr. Miguel Ángel Bratos Pérez

28 de junio de 2012

Manuel José Gayoso Rodríguez, Doctor en Medicina, Catedrático de Histología de la Universidad de Valladolid

Miguel Ángel Bratos Pérez, Doctor en Medicina, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valladolid

Certifican que

Doña **Lisbeth Gonçalves De Freitas** ha realizado bajo su tutela y dirección el trabajo titulado: “COMPARACIÓN DE 4 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DE FRASCOS DE HEMOCULTIVO PARA SU ANÁLISIS POR MALDI-TOF” que consideran satisfactorio para ser presentado como trabajo de investigación tutelado ante la Comisión correspondiente con el objetivo de completar la formación académica del Máster en Investigación 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
Valladolid, a 28 de junio de 2012

Miguel Ángel Bratos Pérez

Manuel José Gayoso Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu, Jefe de Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su constante apoyo en la formación académica y profesional.

A los adjuntos del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid: Dra. Carmen Gobernado a cargo de la Unidad de Hemocultivos, Dra. María Dolores Tejero, Dra. Elena Álvarez, Dr. Antonio Orduña, Dra. Cristina Merino, Dr. José María Eiros, Dra. Mercedes Nocito, especialista en Microbiología Laurentina Barrio, especialista en Microbiología Silvia Rojo y especialista en Microbiología Begoña Nogueira por sus buenos consejos, comentarios y enseñanzas. Al Dr. Jesús Francisco Bermejo Martín, Inmunólogo y jefe de la Unidad de Infección, Inmunidad y Genómica por su apoyo en la formación y permitirme conocer el dinámico mundo de la investigación.

A la enfermera Ana Montoya, Supervisora del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid por su apoyo durante estos años en la formación académica y actividad asistencial. Gracias por tener siempre una repuesta a todas las necesidades y dudas surgidas.

A los técnicos y enfermeras del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid por su atención y apoyo en el aprendizaje de las técnicas microbiológicas. Sus experiencias enriquecen mis futuros pasos.

A mis compañeros de residencia: Gabriel March Rosselló, Mar Justel Álvarez, Cristina López Mestanza, Ana Fernández, Ana Ávila y Eleda Coleta cuyo apoyo, ánimo y sacrificio han sido muy importantes para seguir adelante con la formación.

A mi tutor el Dr. Manuel José Gayoso Rodríguez por todo su apoyo en la formación académica y enriquecer mis conocimientos con sus experiencias en el mundo científico. En especial al Dr. Miguel Angel Bratos Pérez por su apoyo incondicional en todos los procesos de este trabajo y en la formación como residente y futuro profesional académico y en investigación.

A mis padres Rosa y Joao, excelentes testimonios de vida y lucha. A mis hermanos y familiares más cercanos: Isabel, Joao Bento, Rosa, Mariela, Gabriel, Eduardo, Yusvelis, Juan José, Zoila, Ángel, Vanessa, Mariangel y Miguelangel Gabriel. Gracias por sus testimonios de vida.

En especial a mis dos tesoros: Mauricio mi esposo y compañero y nuestra hija Rosa Isabel, por todos sus sacrificios y entregas día a día. Este trabajo va dedicado a ustedes.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
Muestras.....	15
Técnicas de procesamiento de los hemocultivos.....	15
Extracción de proteínas por el método de etanol-ác. Fórmico.....	18
Espectrómetro y Software.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	35
• Ficha técnica de Recogida de datos 1.....	36
• Ficha técnica de Recogida de datos 2.....	37
• Ficha técnica de Recogida de datos 3.....	38
• Índice de Kappa: Valores de referencia.....	39

INTRODUCCIÓN

La bacteriemia es una entidad clínica que ocasiona una importante y creciente morbimortalidad (14). Diversas patologías como neumonía, infección urinaria, peritonitis, endocarditis entre otras cursan con bacteriemia. El hemocultivo constituye una muestra valiosa para el diagnóstico de procesos infecciosos con compromiso sistémico. Existen en el mercado diversos métodos para el manejo y procesamiento de estas muestras. Uno de ellos es el sistema automático de incubación Bactec (Becton Dickinson) (19) (13), el cual consiste en inocular aproximadamente 8-10 ml de sangre en frascos de vidrio que contienen un medio de cultivo líquido. Existen diversos frascos apropiados para el crecimiento de bacterias aerobias, anaerobias, hongos y micobacterias o frascos para pacientes pediátricos los cuales se incuban a 37°C en constante agitación. Los frascos de cultivo para aerobios contienen resina adsorbente no iónica, resina de intercambio catiónico y un sensor químico que detecta los incrementos de CO₂ producidos por el crecimiento de microorganismos. El instrumento monitoriza cada frasco cada 10 minutos. Una lectura positiva indica la posible presencia de microorganismos viables dentro del frasco. La detección se limita a los microorganismos capaces de crecer en un tipo de medio determinado (7). El frasco positivo es extraído del sistema automático y sembrado en medios de cultivo sólidos para la posterior identificación microbiana y estudio de sensibilidad a los antibióticos.

Con la introducción en los laboratorios clínicos de la espectrometría de masas [matriz assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF)], la identificación microbiana se realiza en forma más rápida y ayuda al clínico a modificar sus conductas terapéuticas y dirigirlas más eficazmente. La técnica consiste en reconocer el patrón de las proteínas ribosomales y compararlas con la base de datos existente y a través de cálculos estadísticos informatizados establecer el microorganismo correspondiente (2). La identificación a partir de las colonias aporta entre un 84.5-95.2% de identificaciones correctas (18) (15) (4). El medio sólido utilizado para el crecimiento de las colonias presenta baja interferencia en la lectura por MALDI-TOF (17). Una muestra de un frasco de hemocultivo positivo presenta alta interferencia en la lectura por MALDI-TOF y dificulta una correcta identificación del microorganismo debido a que en estos frascos hay medio de cultivo líquido, restos eritrocitarios, leucocitos y proteínas séricas. Se han publicado múltiples técnicas de procesamiento para la eliminación de éstos restos en los hemocultivos positivos. Éstas técnicas se pueden agrupar en diferentes estrategias: sólo centrifugaciones (8),

centrifugaciones sucesivas y lavados con agua destilada (9), (3), (5) y centrifugaciones, lavados con agua y sustancias detergentes (6), (16), (11), (10), (12). Finalmente, existe una técnica comercial: Sepsityper®, Bruker (1).

Juiz *et al* en 2011 (8) describen una técnica que utiliza 10 ml del frasco de hemocultivo y realiza 2 centrifugaciones a baja y alta velocidad. Sus resultados fueron que identificó el 84.1% de las enterobacterias, el 100% de las *P. aeruginosa*, el 44.4% de los estafilococos y el 28.6% de los enterococos.

La Scola *et al* (9) utilizan 2 protocolos de procesamiento con 1 ml del frasco de hemocultivo basados en centrifugaciones a baja o alta velocidad durante corto o largo tiempo y lavados con agua destilada. Posteriormente realizan extracción de proteínas con acetonitrilo y trifluoroacético. En su trabajo encontraron que con el protocolo de largas centrifugaciones identificaban el 94% de los gramnegativos y sólo el 37% de los grampositivos. Con el protocolo de cortas centrifugaciones encontraron que los porcentajes de identificación eran inferiores en los gramnegativos y se mejoraba la identificación de los grampositivos (67%).

Christner *et al* (3) publican otra técnica que consiste en utilizar 6 ml del frasco de hemocultivo positivo, centrifugar a baja y alta velocidad y lavar con agua destilada. En este trabajo procesaron hemocultivos de 147 pacientes e identificaron los microorganismos presentes en el 75% a nivel de género y especie.

Ferreira *et al* (5) publican una técnica semejante a La Scola *et al* que consiste en centrifugaciones a diferentes revoluciones y luego extracción de proteínas con la que identificaron 76% de los microorganismos aislados.

Ferroni *et al* (6) publican otra técnica diferente a las anteriores en las que utilizan 200 µL del frasco de hemocultivo positivo y se le añade saponina al 5% y lo incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añade agua destilada y centrifugan a alta velocidad durante un minuto. Posteriormente realiza una técnica de extracción de proteínas con ácido trifluoroacético al 10% y etanol directamente en la tarjeta metálica portamuestras. La saponina es un glucósido de esteroides, cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide) y un elemento soluble en

agua (glucósido). Gracias a ésta estructura la saponina es capaz de alterar la tensión superficial de la membrana celular separándola. Con esta técnica los autores identificaron en sus muestras el 91% de los microorganismos en género y especie.

Stevenson *et al* (16) describen otra forma diferente de procesar los frascos de hemocultivo utilizando tubos con un activador de la coagulación y un gel separador (Vacuette®, Becton Dickinson) y realizando cinco pasos de centrifugación /lavado de 1 a 2 minutos a alta velocidad y resuspensión en caldo tripticasa soja y solución de lisis. Luego se realizan otras centrifugaciones y lavados antes de la extracción de proteínas con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. Una técnica compleja, laboriosa y no viable para laboratorios con gran demanda asistencial. Los autores identificaron en sus muestras el 75.8% con un score mayor o igual a 1.7.

Moussaoui *et al* (11) publicaron otra técnica muy semejante a la de Stevenson *et al* y sin usar solución de lisis o caldo tripticasa soja. Los autores identificaron el 89.66% de los microorganismos presentes en sus frascos de hemocultivo positivos con un score > 1.7.

Marinach-Patrice *et al* (10) realizan una técnica que consiste en centrifugaciones, lavados con agua y dodecilsulfato sódico al 0.1%. El dodecilsulfato sódico es un compuesto tensoactivo iónico, que actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas y provocando que estas moléculas pierdan su conformación nativa. La extracción de proteínas se realiza con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. Los autores inocularon cepas conocidas de *Candida* sp en frascos para hongos, incubaron y luego realizaron identificación habitual y su técnica para identificación por MALDI-TOF. Proponen que su técnica puede ser complementaria a otras existentes para identificar mediante espectrometría de masas, hongos en frascos de hemocultivo.

Prod'hom *et al* (12) utilizan 5 ml del frasco de hemocultivo positivo, le añaden agua destilada y lo centrifugan a baja velocidad durante 10 minutos. Luego lo resuspenden en 1 ml de solución de lisis de cloruro de amonio y lo centrifugan a baja velocidad durante 10 minutos. Para la extracción de proteínas utilizan etanol, ácido fórmico y acetonitrilo.

Los autores identificaron el 78.7% de los microorganismos presentes en sus muestras con un score > 1.7.

Después del procesamiento del frasco de hemocultivo se obtiene un sedimento con el que se realiza una extracción de proteínas para mejorar la identificación por MALDI-TOF. Uno de los más mencionados en la literatura es el método de extracción con etanol/ácido fórmico.

OBJETIVOS

Objetivos:

Los objetivos de este trabajo son:

1. Comparar varias técnicas descritas previamente para el procesamiento de los frascos de hemocultivo con el fin de realizar mediante la espectrometría de masas una identificación rápida de los microorganismos crecidos.
2. Comparar los resultados de la identificación bacteriana mediante espectrometría de masas cuando se estudian los sedimentos de los hemocultivos antes y después de ser sometidos a una extracción de proteínas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

Entre febrero y abril de 2012 se han procesado 112 frascos aerobios de hemocultivo (BACTEC Plus +Aerobic/F) remitidos al laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Se incubaron en el sistema Bactec 9240 de Becton Dickinson durante 5 días. Cuando el sistema informó de un positivo se confirmó la presencia de bacterias mediante examen microscópico y se sembraron 100 µL en los medios sólidos habituales (agar sangre, Mc Conkey y agar Chocolate). Se incubaron los medios sólidos para aerobios a 37 °C en 5% de CO₂ durante 24 horas. Las colonias obtenidas fueron identificadas por espectrometría de masas utilizando el espectrómetro Bruker Daltonics.

TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS

La técnica descrita por Ferreira *et al* (5) consiste en colocar 4 ml del frasco de hemocultivo positivo en un tubo estéril y centrifugar a 2000xg durante 30 segundos para sedimentar restos celulares de la sangre luego separar sobrenadante y centrifugar a 15500xg durante 5 minutos para recolectar bacterias. El sedimento se lava una sola vez con agua destilada. (Ver Figura 1)

La técnica descrita por Marinach-Patrice *et al* (10) consiste en extraer 2 ml de los frascos de hemocultivos positivos y centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos. Descartar sobrenadante y lavar sedimento con 1.5 ml de agua destilada. Se vuelve a centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos y el sedimento se resuspende en 1.5 ml de dodecilsulfato sódico al 0.1% e incubado durante 2 minutos. Centrifugar nuevamente a 10000 rpm durante 2 minutos y lavar el sedimento 2 veces en 1.5 ml de agua destilada. (Ver figura 2).

La técnica descrita por Juiz *et al* (8) consiste en colocar 10 ml del frasco de hemocultivo positivo en un tubo estéril y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos. Tomar 1.5 ml de sobrenadante y pasar a tubo de eppendorf de 2 ml. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y desechar sobrenadante (Ver figura 3).

La técnica Sepsityper® (8) consiste en extraer 1 ml del frasco de hemocultivo, añadir 200 µL de solución de lisis y mezclar por pipeteo, luego centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y descartar sobrenadante por pipeteo, añadir 1 ml de agua, mezclar por

pipeteo, centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y descartar sobrenadante por pipeteo.
(Ver figura 4)

Figura 1: Algoritmo de la técnica descrita por Ferreira *et al.*

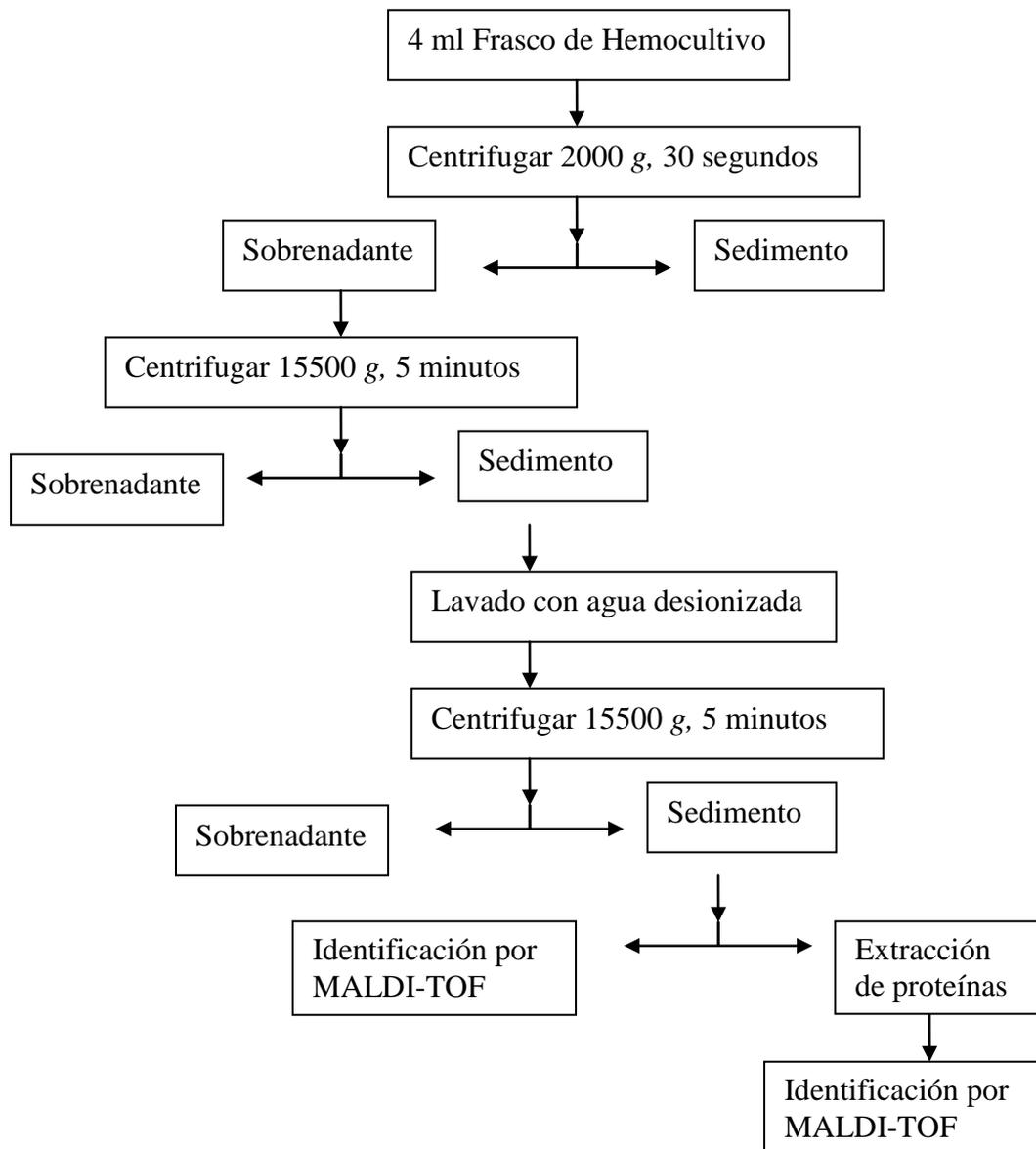


Figura 2: Algoritmo de la técnica descrita por Marinach-Patrice *et al.*

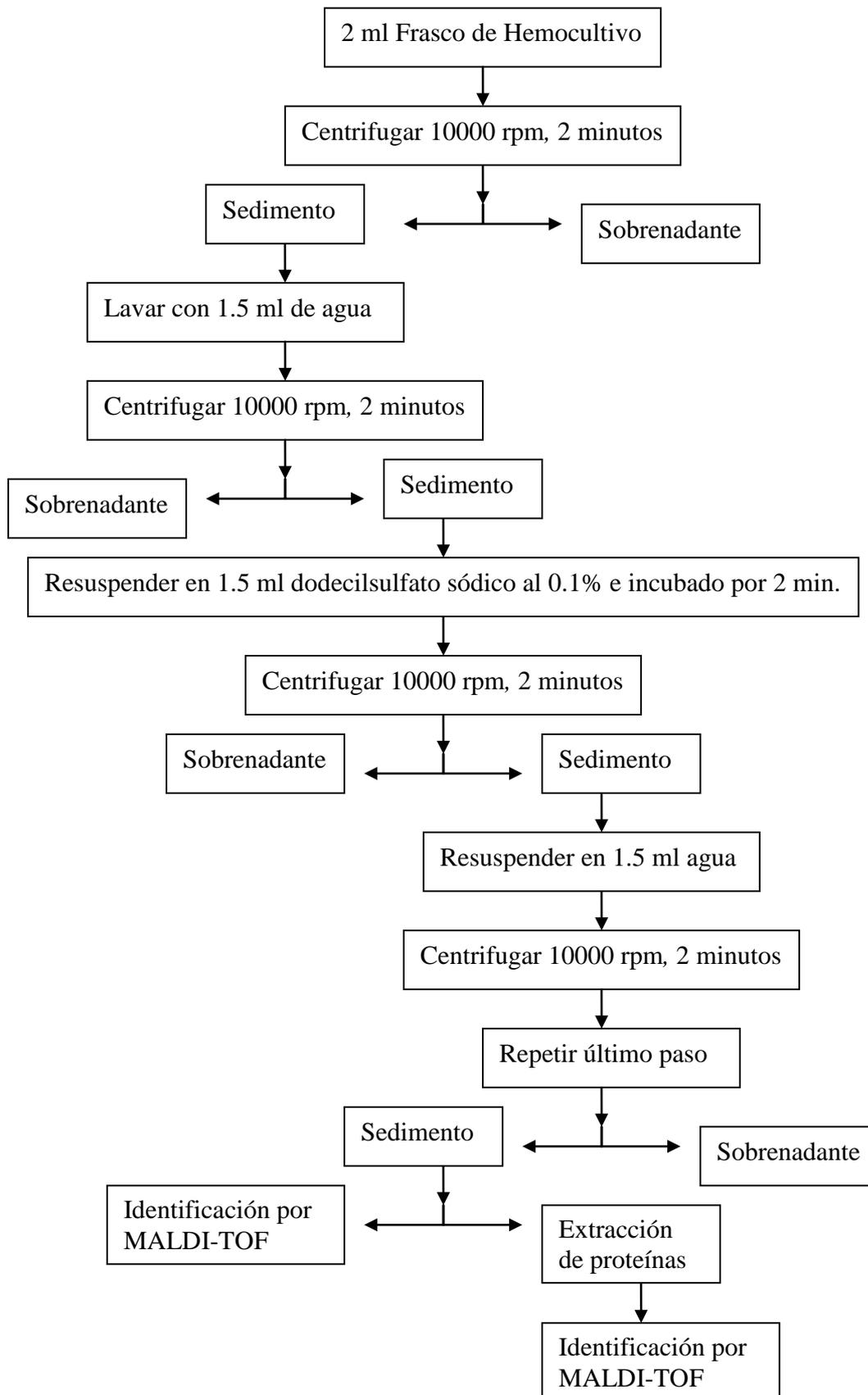
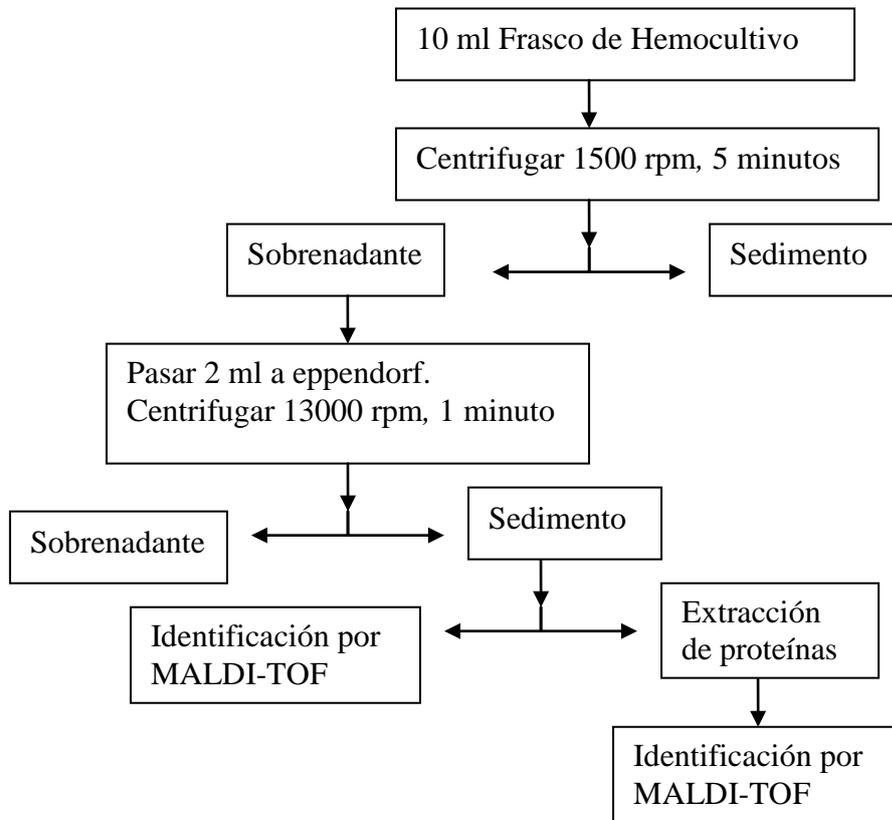


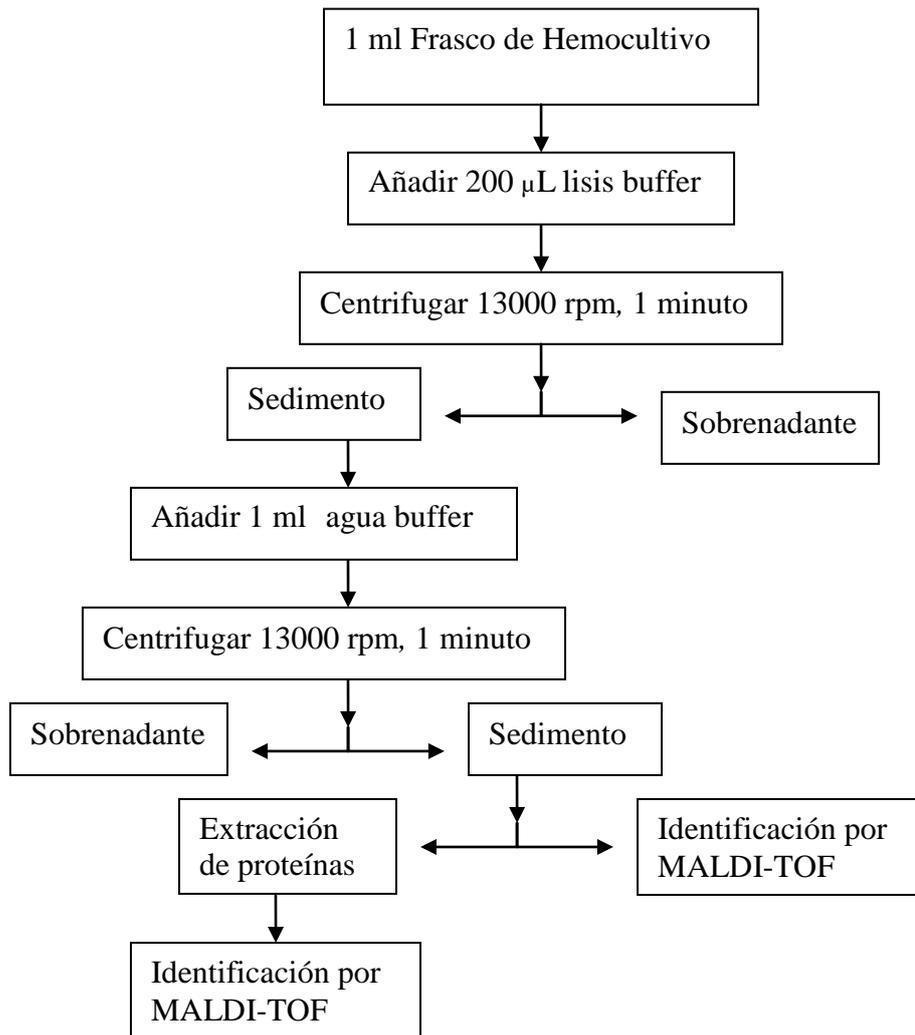
Figura 3: Algoritmo de la técnica descrita por: Juiz *et al.*



EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE ETANOL-ÁC. FÓRMICO

En nuestro trabajo se realizó el procesamiento de frascos de hemocultivo como esta descrito originalmente en las 4 técnicas y se le realizó una lectura por MALDI-TOF al sedimento obtenido. Luego a los sedimentos se les realizó un único método de extracción de proteínas y se hizo otra lectura por MALDI-TOF al sobrenadante. La extracción de proteínas consiste en resuspender el sedimento en 300 μ L de agua para HPLC, agregar 900 μ L de etanol absoluto y mezclar. Luego centrifugar a 15500xg durante 2 minutos y descartar el sobrenadante. Resuspender el sedimento con 50 μ L de ácido fórmico (70% v/v), añadir 50 μ L de acetonitrilo y mezclar. Luego centrifugar a 15500xg durante 2 minutos. (Ver figura 5).

Figura 4: Algoritmo de la técnica descrita por Sepsityper®.



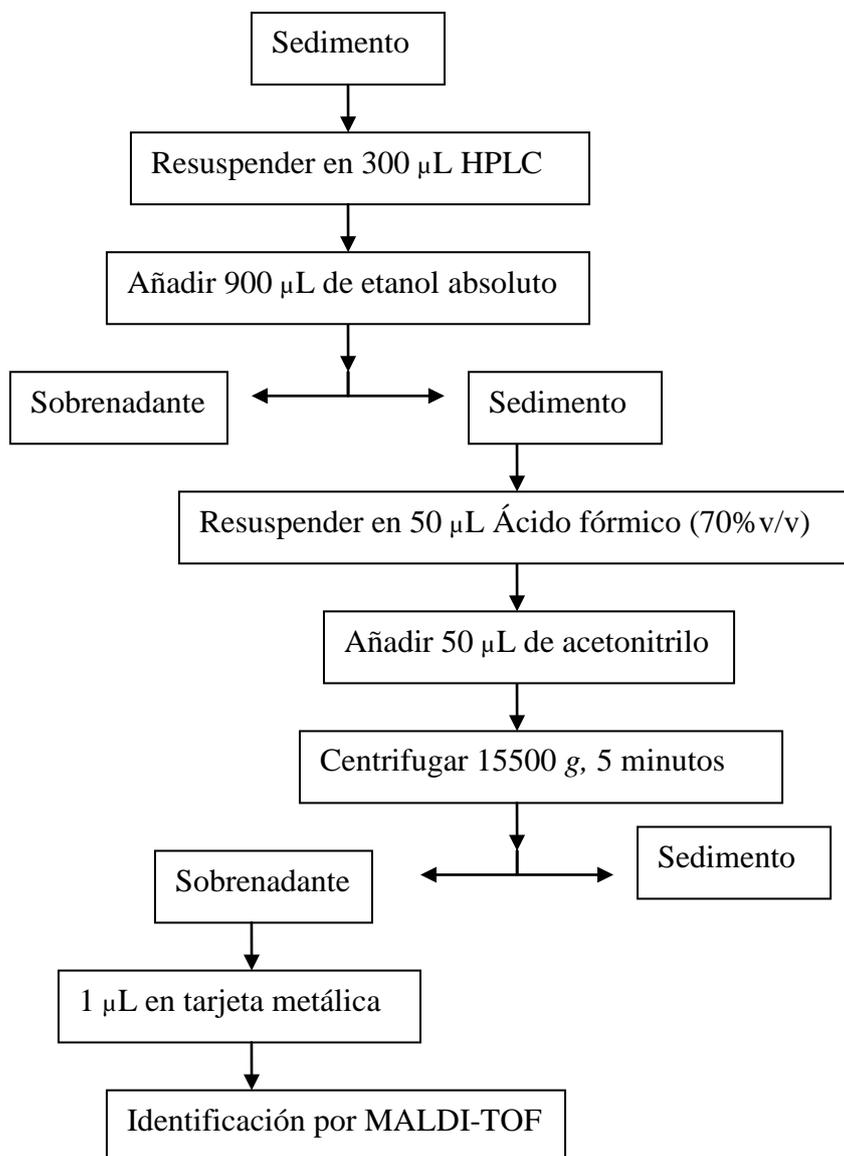
ESPECTRÓMETRO Y SOFTWARE

Tanto con las células intactas de los microorganismos obtenidos siguiendo las técnicas antes mencionadas como con la solución de proteínas extraídas se colocó 1 µL en un lugar de la tarjeta metálica y se dejó secar, se añadió 1 µL de matriz (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 50% acetonitrilo y 2.5% ácido trifluoroacético), se dejó secar y se procedió a la lectura por MALDI-TOF.

Se utilizó el espectrómetro Bruker Daltonics equipado con un láser de N₂ a 335 nm y 200-Hz. Los espectros correspondieron a un rango de masa entre 2000 y 20000 Dalton. Para cada espectro se realizó 500 disparos del láser: 50 en 10 posiciones de cada muestra. Los espectros fueron calibrados externamente usando una mezcla de proteínas:

RL36, 4364.3 Dalton; RS22, 5095.8 Dalton; RL34, 5380.4 Dalton; RLMeth, 6254.4 Dalton; RL32, 6315.2 Dalton; RL29, 7273.5 Dalton; RS19, 10229.1 Dalton; RNase A, 13682.2 Dalton; mioglobina, 16952.5 Dalton.

Figura 5: Algoritmo del método de extracción etanol/ácido fórmico



Los espectros fueron analizados automáticamente usando MALDI Biotyper RTC versión 3.0 (Bruker Daltonics). El software realiza la normalización, suavizado de la línea base y crea una lista de los picos más significativos del espectro. Para identificar las bacterias se compara la lista de los picos generados con la biblioteca de referencia de 3995 especies y utilizando patrones de algoritmo de coincidencia integrado en el

software se hace un score que va de 0 a 3. El rango entre 0.000 y 1.699 significa identificación no posible, entre 1.700 y 1.999 significa probable identificación de género, entre 2.000 y 2.299 significa segura identificación de género y probable identificación de especie y entre 2.300 y 3.000 significa alta probabilidad de identificación de especie.

Los resultados aportados por el software se agruparon en microorganismos grampositivos y gramnegativos. Se incluyó en cada grupo lo siguiente: los resultados que reportaron identificación no posible con score < 1.7 como fallo en la identificación y los que reportaron microorganismos en género y especie con score ≥ 1.7 se consideró correcta identificación de la técnica.

Los resultados y datos clínicos se recogieron en una base de datos de excel anonimizada correspondientes a las muestras procesadas. También se recogieron los tiempos de incubación de cada frasco de hemocultivo en el sistema Bactec. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 15 y se calculó el índice de Kappa para comparar las técnicas con el gold standard y entre ellas. Los valores de referencia del índice de Kappa se encuentran en anexos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron 112 frascos de hemocultivos aerobios positivos de 81 pacientes. La edad media fue 36,08 años provenientes de todos los grupos etarios. El 21.43% mujeres y el 78.57% varones.

Los frascos de hemocultivo estuvieron en promedio 19 horas de incubación en el sistema Bactec antes de reportar posible crecimiento bacteriano.

Como se observa en la tabla 1, los resultados en conjunto son mejores con extracción de proteínas que sin ella. Para identificar microorganismos grampositivos los resultados son mejores con extracción de proteínas. Para identificar microorganismos gramnegativos hay variedad de resultados: las técnicas de Ferreira *et al* y Marinach-Patrice *et al* presentaron mejores resultados que las otras dos técnicas sin necesidad de extraer las proteínas ribosomales. Los resultados para identificar gramnegativos fueron mejores en todas las técnicas con y sin extracción de proteínas. La técnica descrita por Marinach-Patrice *et al* presentó los mejores resultados con y sin extracción de proteínas tanto para identificar grampositivos como gramnegativos.

En la tabla 2 se observa el índice de Kappa que nos muestra la fuerza de concordancia de cada técnica para identificar grampositivos y/o gramnegativos. Los resultados de todas las técnicas tienen pobre o débil concordancia para identificar grampositivos en las células intactas y sólo la técnica de Marinach-Patrice *et al* mejora con la extracción de proteínas. Las técnicas de Ferreira *et al* y Marinach-Patrice *et al* tienen muy buena concordancia para identificar gramnegativos en las células intactas y con la extracción de proteínas.

Como se observa en la tabla 3, en general la identificación de bacilos gramnegativos es adecuada con todas las técnicas, en cambio la identificación de *Moraxella sg Branhamella catarrhalis* no fue posible en 2 muestras con las técnicas de Ferreira *et al*, Juiz *et al* y Sepsityper®, mientras que con la técnica de Marinach-Patrice *et al* se pudo identificar una de ellas. La identificación de *S. pneumoniae* fue superior con las técnicas de Ferreira *et al* y Juiz *et al*. La identificación de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* y *E. faecalis* fue superior con la técnica de Marinach-Patrice *et al*.

Tabla 1: Comparación de la sensibilidad de las técnicas descritas por Ferreira *et al*, Marinach-Patrice *et al*, Juiz *et al* y Sepsityper®Bruker.

	Sin extracción de proteínas			Con extracción de proteínas		
	Gram + n/N (%) (IC 95%)	Gram – n/N (%) (IC 95%)	Total n/N (%) (IC 95%)	Gram + n/N (%) (IC 95%)	Gram – n/N (%) (IC 95%)	Total n/N (%) (IC 95%)
Ferreira, <i>et al</i>	18/78 (23.08) (14.60-34.25)	27/34 (79.41) (61.59-90.66)	45/112 (40.18) (31.15-49.89)	29/78 (37.18) (26.72-48.91)	25/34 (73.53) (55.35-86.49)	54/112 (48.21) (38.75-57.81)
Marinach-Patrice, <i>et al</i>	32/78 (41.03) (30.20-52.75)	31/34 (91.18) (75.19-97.69)	63/112 (56.25) (46.57-65.50)	55/78 (70.51) (58.95-80.03)	28/34 (82.35) (64.83-92.61)	83/112 (74.11) (64.82-81.71)
Juiz, <i>et al</i>	0/41 (0) (0.21-10.21)	3/13 (23.08) (6.16-54.02)	3/54 (5.56) (1.45-16.34)	13/41 (31.71) (18.58-48.22)	6/13 (46.15) (20.40-73.88)	19/54 (35.19) (23.03-49.45)
Sepsityper® Bruker	3/37 (8.11) (2.12-23.02)	7/9 (33.33) (15.48-56.90)	10/58 (17.24) (9.01-29.88)	14/37 (37.84) (22.94-55.21)	16/21 (76.19) (52.45-90.88)	30/58 (51.72) (38.35-64.87)

Tabla 2: Concordancia (Índice de Kappa) de las técnicas estudiadas.

	Sin extracción de proteínas			Con extracción de proteínas		
	Gram +	Gram –	Total	Gram +	Gram –	Total
Ferreira <i>et al</i>	0.148	0.864	0.506	0.255	0.815	0.535
Marinach-Patrice <i>et al</i>	0.286	0.956	0.621	0.575	0.888	0.732
Juiz <i>et al</i>	N.c.*	0.341	0.1705	0.166	0.609	0.387
Sepsityper® Bruker	0.06	0.389	0.449	0.306	0.803	0.555

* N.c: No calculable

Ferreira *et al* describieron su técnica utilizando muestras de orina y frascos de hemocultivos, además compararon los resultados sin extracción (células intactas) y con extracción de proteínas. Sus resultados antes de la extracción de proteínas fue 47,69% y con la extracción de proteínas fue 81.53%. En nuestro trabajo sólo hemos utilizado frascos de hemocultivos. Nuestros resultados procesando un número mayor de frascos de hemocultivos fueron semejantes antes de la extracción de proteínas pero son inferiores al 50% con la extracción de proteínas.

Marinach-Patrice *et al* describieron su técnica para procesar frascos de hongos positivos. En nuestro trabajo aplicamos su técnica en frascos de hemocultivos aerobios y encontramos resultados satisfactorios. Durante el periodo de estudio no hubo ningún frasco para hongos positivo que pudiera ser analizado. Una diferencia entre ambos es que nuestros frascos proceden de pacientes ingresados mientras que sus frascos fueron inoculados en forma experimental con cepas conocidas. Otra diferencia es que no realizan una lectura con el MALDI-TOF al finalizar el procesamiento de la muestra como se hace en nuestro trabajo.

Tabla 3: Microorganismos identificados posterior a la extracción de proteínas por las técnicas descritas por Ferreira *et al*, Marinach-Patrice *et al*, Juiz *et al* y Sepsityper®.

Identificación de la colonia por MALDI-TOF	Ferreira <i>et al</i>		Marinach-Patrice <i>et al</i>		Juiz <i>et al</i>		Sepsityper®	
	Score < 1.7	Score ≥ 1.7	Score < 1.7	Score ≥ 1.7	Score < 1.7	Score ≥ 1.7	Score < 1.7	Score ≥ 1.7
<i>E coli</i>	1/15	14/15		15/15	2/5	3/5		10/10
<i>E. cloacae</i>	2/5	3/5	2/5	3/5	1/2	1/2	2/3	1/3
<i>K. pneumoniae</i>		3/3		3/3			1/3	2/3
<i>K. oxytoca</i>		1/1		1/1				1/1
<i>P. mirabilis</i>	1/2	1/2		2/2	1/2	1/2		
<i>P. aeruginosa</i>	2/5	3/5	2/5	3/5	2/3	1/3		2/2
<i>Moraxella sg Branhamella catarrhalis</i>	2/2		1/2	1/2			2/2	
<i>S pneumoniae</i>	4/9	5/9	7/9	2/9	1/5	4/5	4/4	
<i>S. salivarius</i>	1/1			1/1			1/1	
<i>S. aureus</i>	8/12	4/12	1/12	11/12	4/6	2/6	1/6	5/6
<i>S. epidermidis</i>	20/24	4/24	6*/24	18/24	8/9	1/9	13/15	2/15
<i>S. hominis</i>	13/22	9/22	4/22	18/22	9/13	4/13	4/9	5/9
<i>S. capitis</i>		2/2	1/2	1/2	1/1			1/1
<i>E. faecalis</i>	2/6	4/6		6/6	3/5	2/5		1/1
<i>C. striatum</i>		1/1		1/1	1/1			
<i>M. luteus</i>	1/1		1/1		1/1			
<i>R. mucilaginoso</i>	1/1		1/1		1/1			

* Una cepa de *S. epidermidis* se identificó como *Staphylococcus. pettenkoferi* con un score de 1,763.

El trabajo descrito por Juiz *et al* compara un método casero de procesamiento de frascos de hemocultivo con el descrito para la técnica comercial Sepsityper®. A diferencia de ellos, en nuestro trabajo posterior a la lectura después del procesamiento se le realizó extracción de proteínas. Aunque mejoró la identificación de positivos fue insuficiente en comparación con los otros métodos de procesamiento analizados. En nuestros resultados como se observa en la tabla 1 la técnica descrita por Juiz *et al* tuvo una baja sensibilidad incluso posterior a la extracción de proteínas (35.19%) tanto en la identificación de grampositivos y gramnegativos, ello contrasta con lo reportado por los autores.

Tanto la técnica de Marinach-Patrice *et al* como Ferreira *et al* presentaron mejores porcentajes de identificación de gramnegativos con respecto a los grampositivos antes de la extracción de proteínas. Cuando se comparan los resultados antes de la extracción y después de la extracción de proteínas llama la atención que los porcentajes de identificación de gramnegativos descienden un 5.88% en la técnica de Ferreira *et al* y un 8.83% en la técnica de Marinach-Patrice *et al*. Una posible explicación es que las bacterias gramnegativas presentan una capa delgada de peptidoglicano en su pared y el procesamiento con dodecil sulfato sódico pueden ser suficiente para lisar las bacterias y liberar las proteínas ribosomales para la identificación por espectrometría de masas. En cambio, las bacterias grampositivas tienen una pared bacteriana más gruesa y se necesita la lisis con etanol y ácido fórmico.

La técnica comercial Sepsityper® presenta antes de la extracción de proteínas un porcentaje de identificación muy bajo (17.24%) y mejora después de la extracción de proteínas a un 51.72%. Ello implica el uso de reactivos no incluidos en el kit comercial aumentando los costes. A diferencia de ésta, la técnica de Marinach-Patrice *et al* identifica más del 50% de los frascos de hemocultivos sólo con el uso de lavados, centrifugación y dodecil sulfato sódico y el coste en reactivos es inferior al comercial. Sin embargo, la técnica de Marinach-Patrice *et al* utiliza reactivos no estandarizados que precisan su preparación previa en el laboratorio.

La concordancia microbiológica entre identificación directa de la colonia por MALDI-TOF e identificación de los frascos de hemocultivo con score > 1.7 es de 100% con la técnicas de Ferreira. *et al*, Juiz *et* y Sepsityper® y es del 98.61% con la técnica de

Marinach-Patrice *et al*, ésta disminución se debe a que un frasco de hemocultivo se identificó como *Staphylococcus pettenkoferi* una cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

Otro aspecto a comparar es el tiempo que lleva la realización de cada técnica. La técnica de procesamiento de proteínas de Juiz *et al* es la más rápida en tan sólo 10 minutos pero su rendimiento es muy bajo y si se le realiza la extracción aumenta unos 5 a 10 minutos más. La técnica de Ferreira *et al* y Sepsityper® se realiza entre 15 y 20 minutos. La más laboriosa es la de Marinach-Patrice *et al* que precisa entre 20 y 25 minutos debido a los múltiples lavados y centrifugaciones, sin embargo su mejor rendimiento y el hecho de que un 50% con el procesamiento ofrecen una identificación con score superior a 1.7 se puede evitar los pasos de extracción y consumo de reactivos.

Un aspecto destacable de la técnica comercial Sepsityper® es que en sus instrucciones indica que para eliminar el sobrenadante se realice por pipeteo. Ello evita que en el decantado se pierda el sedimento. Por tanto es un elemento a tomar en consideración para una posible modificación de las otras técnicas estudiadas.

Se hace necesario realizar otras comparaciones con éstas y otras técnicas aumentando el número de frascos de hemocultivos para ir perfilando las mejores técnicas para su uso cotidiano en los laboratorios de Microbiología. El trabajo realizado nos muestra que es útil el manejo de varias técnicas ya que cada una tiene algún aspecto destacable sobre las demás.

CONCLUSIONES

1. El método de Marinach-Patrice *et al* en nuestro estudio presenta mejor rendimiento para el procesamiento de frascos de hemocultivos que las otras técnicas.
2. El método de Marinach-Patrice *et al* es aplicable a frascos de hemocultivo para bacterias.
3. La extracción de proteínas mejora la identificación de los microorganismos en la espectrometría de masas.
4. Para la identificación de microorganismos grampositivos es preferible utilizar una técnica con extracción de proteínas.
5. Para la identificación de microorganismos gramnegativos se pueden identificar sin necesidad de extraer las proteínas.
6. Si se sospecha que el microorganismo sea *S pneumoniae* es recomendable utilizar las técnicas de Ferreira *et al* y Juiz *et al*.
7. En el mejor de los escenarios, sería necesario repetir el procesamiento y/o extracción de proteínas en una cuarta parte de las muestras para aumentar las posibilidades de identificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Buchan, B. W., K. M. Riebe, and N. A. Ledeboer.** Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* **50**:346-52.
2. **Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub.** Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* **36**:380-407.
3. **Christner, M., H. Rohde, M. Wolters, I. Sobottka, K. Wegscheider, and M. Aepfelbacher.** 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**:1584-91.
4. **Eigner, U., M. Holfelder, K. Oberdorfer, U. Betz-Wild, D. Bertsch, and A. M. Fahr.** 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab* **55**:289-96.
5. **Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, J. L. Munoz-Bellido, and J. M. Gonzalez-Buitrago.** 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**:1007-12.
6. **Ferroni, A., S. Suarez, J. L. Beretti, B. Dauphin, E. Bille, J. Meyer, M. E. Bougnoux, A. Alanio, P. Berche, and X. Nassif.** 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**:1542-8.
7. **Jorgensen, J. H., S. Mirrett, L. C. McDonald, P. R. Murray, M. P. Weinstein, J. Fune, C. W. Trippy, M. Masterson, and L. B. Reller.** 1997. Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC plus aerobic/F resin medium with BacT/Alert aerobic FAN medium for detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol* **35**:53-8.
8. **Juiz, P. M., M. Almela, C. Melcion, I. Campo, C. Esteban, C. Pitart, F. Marco, and J. Vila.** 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* **31**:1353-8.

9. **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**:e8041.
10. **Marinach-Patrice, C., A. Fekkar, R. Atanasova, J. Gomes, L. Djamdjian, J. Y. Brossas, I. Meyer, P. Buffet, G. Snounou, A. Datry, C. Hennequin, J. L. Golmard, and D. Mazier.** Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* **5**:e8862.
11. **Moussaoui, W., B. Jaulhac, A. M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewa, P. Riegel, and G. Prevost.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* **16**:1631-8.
12. **Prod'hom, G., A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, and G. Greub.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* **48**:1481-3.
13. **Roh, K. H., J. Y. Kim, H. N. Kim, H. J. Lee, J. W. Sohn, M. J. Kim, Y. Cho, Y. K. Kim, and C. K. Lee.** Evaluation of BACTEC Plus aerobic and anaerobic blood culture bottles and BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia in ICU patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**:239-42.
14. **Sabatier, C., R. Peredo, and J. Valles.** 2009. [Bacterial bloodstream infections in critical patients]. *Med Intensiva* **33**:336-45.
15. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* **49**:543-51.
16. **Stevenson, L. G., S. K. Drake, and P. R. Murray.** Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **48**:444-7.
17. **Walker, J., A. J. Fox, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon.** 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods* **48**:117-26.

18. **Wieser, A., L. Schneider, J. Jung, and S. Schubert.** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:965-74.
19. **Wilson, M. L., M. P. Weinstein, and L. B. Reller.** 1994. Automated blood culture systems. *Clin Lab Med* **14**:149-69.

ANEXOS

FICHA TÉCNICA DE RECOGIDA DE DATOS 1

PROTOCOLO DEL ESTUDIO: COMPARACIÓN DE 4 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS
PARA SU ANÁLISIS POR MALDI-TOF -2012: SIN EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Muestra	<i>Ferreira et al</i>		<i>Marinach-Patrice et al</i>		<i>Juiz et al</i>		Sepsityper®	
	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score

FICHA TÉCNICA DE RECOGIDA DE DATOS 2

PROTOCOLO DEL ESTUDIO: COMPARACIÓN DE 4 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS PARA SU ANÁLISIS POR MALDI-TOF -2012: CON EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Muestra	<i>Ferreira et al</i>		<i>Marinach-Patrice et al</i>		<i>Juiz et al</i>		Sepsityper®	
	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score	Microorganismo	Score

FICHA TÉCNICA DE RECOGIDA DE DATOS 3

PROTOCOLO DEL ESTUDIO: COMPARACIÓN DE 4 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS PARA SU ANÁLISIS POR MALDI-TOF 2012

N^a muestra	Edad	Sexo	Tiempo de incubación	Resultado convencional

Índice de Kappa: Valores de referencia

Índice de Kappa	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena