



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias

Álvaro Pascual Hernández<sup>a,b,\*</sup>, Mónica Ballester-Téllez<sup>a</sup>, Fátima Galán-Sánchez<sup>c,d</sup> y Manuel Rodríguez Iglesias<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Virgen Macarena-Virgen del Rocío, Sevilla, España

<sup>b</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

<sup>c</sup>Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospitales Universitarios Puerta del Mar y Puerto Real, Cádiz, España

<sup>d</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Cádiz, Cádiz, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Espectrometría de masas  
Identificación  
MALDI-TOF  
Grampositivos  
Gramnegativos

Una identificación correcta y rápida de las bacterias es esencial para un diagnóstico y un tratamiento adecuado de los pacientes con infecciones. Hasta hace pocos años se utilizaban pruebas bioquímicas, colorimétricas o incluso de sensibilidad antibiótica para la identificación a niveles de género y especie. Las principales limitaciones de estos métodos son el tiempo necesario para su realización y la dificultad para diferenciar microorganismos poco reactivos, muy parecidos entre ellos o de difícil crecimiento. Desde la introducción en el laboratorio de la espectrometría de masas (EM) con el uso de MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), muchos de estos problemas se han solventado. Para poder sacar el máximo rendimiento a esta tecnología se han de conocer sus puntos fuertes y sus limitaciones. No todos los microorganismos se identifican con la misma facilidad o fiabilidad mediante MALDI-TOF y es obligación del microbiólogo saber cómo interpretar los resultados que de este se obtienen y las alternativas disponibles para lograr identificar los microorganismos que generan más problemas. Este trabajo pretende hacer una recopilación de la información disponible sobre la correcta identificación de las principales bacterias patógenas humanas mediante el uso de la EM MALDI-TOF, centrándose en gramnegativos, grampositivos y microorganismos anaerobios. Las condiciones del cultivo, la preparación de la extensión con el método de extracción idóneo y, sobre todo, el uso de una correcta y actualizada base de datos son los principales factores que hay que tener en cuenta para la identificación fiable de cualquier bacteria.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Application of mass spectrometry to bacterial identification

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Mass spectrometry  
Identification  
MALDI-TOF  
Gram-positive  
Gram-negative

Correct and rapid identification of bacteria is essential for the correct diagnosis and treatment of infected patients. Until a few years ago, biochemical, colorimetric or even antibiotic sensitivity tests were used to identify genera and species. The main limitations of these methods were the time needed for their performance and the difficulty of distinguishing between microorganisms that were little reactive, highly similar, or difficult to culture. Many of these problems have been solved by the introduction of mass spectrometry (MS) in the laboratory with the use of MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*). Knowledge of the strengths and weaknesses of this technology is essential to be able to take maximum advantage of this technique. Not all microorganisms can be identified with the same ease and reliability by MALDI-TOF and microbiologists need to know how to interpret the results obtained with this technique and the available alternatives in order to identify the microorganisms causing the most problems. This article aims to summarise the available information on the correct identification of the main human pathogenic bacteria through the use of MALDI-TOF MS, focusing on Gram-negative, Gram-positive and anaerobic microorganisms. The main factors that must be taken into account for the reliable identification of any bacterium are the conditions for culture, sample preparation with the ideal extraction method and especially the use of a correct and updated database.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: apascual@us.es (A. Pascual Hernández).

## Bacilos gramnegativos: introducción

Los bacilos gramnegativos (BGN) pueden encontrarse en prácticamente la totalidad de las muestras que se reciben en el laboratorio de microbiología clínica ya que forman parte de la flora normal de los seres humanos y son causantes de numerosas infecciones. Clásicamente eran identificados mediante pruebas bioquímicas basadas en características típicas de cada género y especie como su morfología, el crecimiento selectivo según el medio de cultivo, la composición de su pared o la utilización de rutas metabólicas y sustratos. Mediante el uso de la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se identifican directamente desde una colonia en placa o incluso, en algunos casos, directamente desde la muestra. Por sus características, la pared de los BGN es fácilmente desintegrada mediante el láser del espectrómetro de masas y las proteínas contenidas en estas bacterias quedan liberadas con mayor facilidad que en otro tipo de bacterias con paredes más gruesas o complejas, permitiendo una identificación más fiable.

## Preparación de la muestra para la identificación de bacilos gramnegativos

A pesar de que la identificación de la mayoría de los BGN no suele suponer un problema siguiendo los protocolos que facilitan los fabricantes, hay ciertos aspectos en la preparación de la muestra que pueden interferir en la fiabilidad de esta. Se han evaluado diferentes variables en la preparación de las colonias bacterianas (la densidad de la extensión del microorganismo, el uso de ácido fórmico previo a la dispensación de la matriz, la temperatura de incubación del cultivo o el tipo de medio de cultivo utilizado), llegando a la conclusión de que tanto la temperatura como el medio de cultivo empleado no afectan a la calidad de la identificación<sup>1</sup>.

## Enterobacterias

Ya en 1999 Lynn et al<sup>2</sup> utilizaron la EM para poder diferenciar *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* y *Providencia rettgeri* tras un ciclo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estos autores lograron obtener espectros específicos para el género *Enterobacteriaceae*, específicos de especie para los 2 serovares de *Salmonella* y específicos de cepa para los *E. coli* estudiados.

Una de las limitaciones más conocidas del uso de MALDI-TOF con las bases de datos comerciales disponibles hasta la fecha es la imposibilidad de diferenciar de manera correcta entre *E. coli* y *Shigella* spp. En 2010 se evaluó la eficacia de MALDI-TOF para la identificación de 304 colonias de aislados de heces y se llegó a la conclusión de que el sistema Biotyper 2.0 identifica de manera correcta los enteropatógenos más comunes, pero falla a la hora de diferenciar entre 36 aislados de *Shigella* spp. y 3 *E. coli* enterohemorrágicos<sup>3</sup>. Otros estudios corroboran esta limitación recomendando el uso de pruebas complementarias para una adecuada diferenciación de estas especies<sup>4,5</sup>.

*K. pneumoniae* no presenta habitualmente problemas para su identificación mediante MALDI-TOF. Incluso en estudios donde se realizan las identificaciones de los microorganismos causantes de bacteriemia directamente desde frascos de hemocultivos positivos se consigue una tasa de identificación correcta en esta especie próxima al 90%. *K. oxytoca* es un patógeno habitualmente nosocomial, íntimamente relacionado con *K. pneumoniae*, que se distingue fenotípicamente de este por ser indol positivo. Los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* son genéticamente muy parecidos. En un estudio para verificar la identificación de *K. oxytoca* obtenida por MALDI-TOF (base de datos Bruker Biotyper 3.0) se analizaron 99 supuestas *K. oxytoca* de las que 8 fueron identificadas como *Raoultella*. Al realizar la secuenciación genómica del ARNr 16S de estas 8 discordantes, 5 fueron realmente *Raoultella* mientras que las otras 3 fueron *K. oxytoca*. En este

mismo estudio también se apuntó la importancia de verificar la diferencia entre las puntuaciones de las identificaciones (*score*) que genera MALDI-TOF. Para poder distinguir entre especies muy parecidas se recomienda una diferencia entre la mejor puntuación y la segunda de como mínimo el 10%. Aplicando esta regla, aumentaría considerablemente la discriminación entre *Raoultella* y *K. oxytoca*<sup>7</sup>.

Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* se encuentran en el medio ambiente, aunque también pueden actuar como patógenos humanos. Estudios bioquímicos y moleculares han demostrado su heterogeneidad genómica, por lo que se divide en 6 especies diferentes: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*. *E. cloacae* y *E. hormaechei* son las más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. La diferenciación fenotípica de los miembros del complejo es muy complicada, por lo que para ello suelen usarse técnicas moleculares<sup>8</sup>. Pavlovic et al<sup>9</sup> evalúan la capacidad de MALDI-TOF para generar identificaciones a nivel de especie de miembros del complejo *E. cloacae* junto con el uso de una PCR (*polymerase chain reaction*) multiplex casera. Mientras que la PCR no tiene ningún problema para la identificación, la técnica MALDI-TOF resultó no ser capaz de diferenciar *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* y *E. ludwigii* de *E. cloacae*. Sería necesario mejorar las bases de datos de MALDI-TOF para llegar a diferenciar los miembros del complejo *E. cloacae* de manera inequívoca y sin necesidad de pruebas moleculares confirmatorias.

*Cronobacter* spp. está muy estrechamente relacionado con el género *Enterobacter* y hasta hace pocos años se denominaba *Enterobacter sakazakii*. En la base de datos Biotyper de Bruker actual solamente se encuentran espectros para la especie *Cronobacter sakazakii*. La secuenciación del ARN 16S tampoco es útil para diferenciar todas las especies de este género, especialmente entre *C. sakazakii* y *C. amalonaticus*, y en las bases de datos de las pruebas bioquímicas como API 20E y API ID32E encontramos aún *Enterobacter sakazakii*. Para la identificación a nivel de género y especie se recomienda la secuenciación del gen *fusA* y MLST (*multilocus sequence typing*)<sup>10,11</sup>.

En un estudio de 2013 en el que se evaluaron un total de 965 aislados de enterobacterias de 17 géneros y 40 especies diferentes se consiguieron mediante espectrometría de masas unos porcentajes de identificación del 96,7 y el 83,8%, respectivamente. Analizando los resultados pormenorizadamente, se identificó correctamente a nivel de especie el 100% de los siguientes aislados: *Serratia marcescens* (57), *Morganella morganii* (52), *E. aerogenes* (52), *E. gergoviae* (10), *Serratia odorifera* (30), *Providencia stuartii* (31), *Citrobacter koseri* (31), *Ewingella americana* (6), *K. oxytoca* (49), *K. pneumoniae* (58), *Yersinia enterocolitica* (14) y *Y. pseudotuberculosis*. Cinco microorganismos tuvieron una identificación correcta de especie en, como mínimo, un 90% de los aislados: *Citrobacter amalonaticus*, *Leclercia adecarboxylata*, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Salmonella enterica* y *Serratia liquefaciens*. Los fallos más frecuentes en la identificación a nivel de género se encuentran en *Pantoea agglomerans* ya que el 13,6% se identifica como especies del género *Enterobacter*. En cambio, a nivel de especie, encuentran mayor problema en el género *Citrobacter*, por lo que proponen el término "complejo *Citrobacter freundii*" para *C. freundii*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii* y *C. sedlakii*. *C. koseri* y *C. amalonaticus* sí presentan una correcta identificación de género y especie<sup>12</sup>.

*Salmonella* es un microorganismo relacionado con toxoinfección alimentaria que produce patología gastrointestinal. Para su identificación de forma clásica se necesita un cultivo de heces sembrado en diferentes medios y una sucesión de subcultivos en medios selectivos, pruebas bioquímicas y tests serológicos para la identificación de serotipos. Todo esto puede llegar a retrasar el diagnóstico de 2 a 3 días. Con la incorporación de MALDI-TOF al laboratorio de microbiología clínica se esperaba poder tener toda esta información en el mismo día que se observaran las colonias, por lo que rápidamente empezaron a aparecer publicaciones que sugerían su uso para determinar la especie y la tipificación de subespecies. Hay varios trabajos que intentan encontrar picos consenso en los espectros que

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3400577>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3400577>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)