

UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DIRECTAMENTE DESDE HEMOCULTIVOS POSITIVOS UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF Y EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2 COMPACT

Elizabeth Sierra^{1,2}, Julián Galvis^{1,3}, Aleyda Montaña¹, Cristina Luna¹, Natalia Castaño¹, Carlos Robledo^{1,3}, Jaime Robledo^{1,3,4}

¹Laboratorio Médico Referencia, Medellín, Colombia.

²Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Grupo GERMEN, Medellín, Colombia.

⁴Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: Las infecciones del torrente sanguíneo (ITS) se relacionan con altas tasas de morbilidad y mortalidad hospitalaria. El diagnóstico rápido es un aspecto fundamental para la elección adecuada del tratamiento antimicrobiano. **Objetivos:** evaluar la utilidad diagnóstica de un método rápido basado en la identificación y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana directamente de hemocultivos positivos utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF y el sistema automatizado Vitek 2 Compact. **Materiales y métodos:** estudio descriptivo prospectivo, seleccionados a conveniencia hemocultivos positivos provenientes de pacientes hospitalizados en Clínica El Rosario, Medellín. Se evaluaron las metodologías directa y convencional utilizando el MALDI-TOF MS para la identificación bacteriana y el sistema automatizado Vitek® 2 Compact para la susceptibilidad antimicrobiana. **Resultados:** El uso de metodologías de identificación y pruebas de susceptibilidad, realizadas directamente desde las botellas de hemocultivos, permite reducir sustancialmente los tiempos de reporte de identificación y antibiograma, lo cual podría contribuir mejorando la oportunidad en la decisión de la terapia antibiótica.

Palabras clave: MALDI-TOF, espectrometría de masas, hemocultivos.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del torrente sanguíneo (ITS) se relacionan con altas tasas de morbilidad y mortalidad hospitalaria. El diagnóstico rápido es un aspecto fundamental en el manejo adecuado y la elección de un tratamiento antimicrobiano efectivo que mejore los desenlaces clínicos de los individuos (1).

En la actualidad el hemocultivo es la prueba de referencia para el diagnóstico de las ITS. Sin embargo, los métodos convencionales que se utilizan para la identificación (pruebas fenotípicas manuales o automatizadas) y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana pueden tardar hasta 48-72 horas después de detectado el hemocultivo como positivo (1).

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) ha sido utilizada para la identificación rápida de microorganismos a partir de colonias y se han propuesto estrategias para la identificación microbiana directamente de muestras clínicas (2, 3, 4, 5, 6).

Por otro lado, diferentes estudios han evaluado métodos rápidos basados en la implementación de herramientas de biología molecular, proteómica, e inclusive el uso del sistema automatizado Vitek 2 Compact para establecer el perfil susceptibilidad antimicrobiana de manera rápida y directamente de hemocultivos positivos (7, 8).

El uso combinado de estas dos tecnologías puede contribuir con el mejoramiento del tiempo de respuesta en la identificación y la susceptibilidad antimicrobiana, impactando sobre el diagnóstico clínico y la administración de la terapia antimicrobiana temprana y adecuada. Este estudio tiene como objetivo evaluar la utilidad de un método rápido basado en la identificación y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana directamente de hemocultivos positivos utilizando la tecnología MALDI-TOF y el sistema automatizado Vitek 2 Compact.

MATERIALES Y MÉTODOS

Coloración de gram: A los hemocultivos positivos se les realizó tinción de gram automatizada utilizando el PREVI® Color (bioMérieux), con el fin de establecer un algoritmo secuencial.

Método directo para la identificación y susceptibilidad antimicrobiana: Para los hemocultivos positivos se implementó un protocolo de centrifugaciones diferenciales para obtener un sedimento bacteriano puro. Se utilizó una porción del sedimento para realizar el McFarland de 0.5 a 0.63 con solución salina estéril para el montaje del antibiograma utilizando el Vitek® 2 Compact, y con la otra porción del sedimento se realizó extracción de proteínas para la identificación bacteriana utilizando el sistema MALDI-TOF, Vitek® MS.

Método convencional para identificación + Antibiograma: A partir del hemocultivo positivo se realizó subcultivo convencional en agar chocolate con incubación a 35 °C con CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de obtener un crecimiento bacteriano se procedió al montaje de identificación y antibiograma a partir de las colonias puras, utilizando los sistemas MALDI-TOF (Vitek® MS) y Vitek® 2 Compact, respectivamente.

Análisis estadístico: Se estableció un acuerdo categórico entre la metodología directa y convencional. Para establecer el acuerdo en los perfiles de susceptibilidad se clasificaron los casos discordantes como: discrepancias menores (estándar tiene resultado resistente o sensible y el directo intermedio o el estándar es intermedio y el directo resistente o sensible), discrepancia mayor (estándar sensible y directo resistente), discrepancia superior (estándar resistente y directo sensible).

RESULTADOS

En total se evaluaron 154 hemocultivos monomicrobianos por ambos métodos (86 Gram negativos y 68 Gram positivos). La concordancia global entre ambas metodologías fue del 83,1%, sólo 3 microorganismos fueron discordantes en la identificación a nivel de especie y el 15,6% de los microorganismos evaluados no se identificaron por la metodología directa.

En la evaluación del método directo en bacterias Gram negativas se obtuvo una concordancia del 93%, donde no se presentaron errores en cuanto a la identificación de género y especie. Respecto a la identificación de las bacterias Gram positivas, se evidenció una concordancia del 73,6% a nivel de género, y del 69,1% a nivel de especie (3 casos discordantes a nivel de especie), y el 26,5 % no pudieron ser identificados por el método directo (ver tabla 1).

Tabla 1. Acuerdo entre la identificación de aislamientos Gram negativos y Gram positivos por metodología directa comparado con la metodología convencional

Microorganismo	ID correcta	No identificados	Microorganismo	ID correcta	No identificados	Discordantes
Aislamientos Gram negativos			Aislamientos Gram positivos			
<i>Escherichia coli</i>	43	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	5	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	0	<i>Staphylococcus hominis</i>	8	2	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	0	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	5	0
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	1	0
<i>Morganella morganii</i>	3	0	<i>Staphylococcus lentus</i>	0	0	1
<i>Salmonella enterica</i>	2	1	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	0	0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	0	<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0	0
<i>Fusobacterium</i>	1	0	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	0	2	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0	<i>Listeria monocytogenes</i>	0	2	0
<i>Sphingomonas</i>	0	1				
Total	80 (93%)	6 (7%)	Total	47 (69,1%)	18 (26,5%)	3 (4,4%)

En cuanto a la valoración de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST), en total se evaluaron 77 aislamientos (45 Gram negativos y 32 Gram positivos) por la metodología directa y convencional.

El perfil de sensibilidad por metodología directa mostró un acuerdo categórico del 98,6% para los gram negativos al compararlo con la metodología convencional, y se evidenciaron discrepancias, menor: 0,7%, mayor: 0,2% y superior: 0,4%. En contraste, la concordancia para los gram positivos con el método directo fue del 97,1%, con una discrepancia menor y mayor del 0,8% y 1,9%, respectivamente (tabla 2 y 3).

Tabla 2. Acuerdo entre las pruebas de susceptibilidad a antibióticos evaluada por la metodología directa y convencional en Gram negativos (*Enterobacteriaceae*).

<i>Enterobacteriaceae</i> (45)	Acuerdo Categórico n (%)	Discrepancias categóricas n		
		Menor	Mayor	Superior
Prueba BLEES	34 (100%)			
Amikacina	48 (100%)	0	0	0
Ampicilina/Sulbactam	37 (97,4%)	0	1	0
Aztreonam	37 (97,4%)	0	0	1
Ceftazidime	44 (97,7%)	0	0	1
Cefepime	44 (97,7%)	1	0	0
Imipenem	37 (97,4%)	1	0	0
Ertapenem	45 (100%)	0	0	0
Meropenem	45 (100%)	0	0	0
Ceftazidime/Avibactam	38 (100%)	0	0	0
Ceftolozano/Tazobactam	38 (100%)	0	0	0
Ciprofloxacino	44 (97,7%)	1	0	0
Piperacilina/Tazobactam	36 (100%)	0	0	0
Tigeciclina	37 (97,4%)	1	0	0
	(98,7%)	4 (0,7%)	1 (0,2%)	2 (0,4%)
	*Discrepancia Menor: Estándar es Resistente o Sensible y Directo es Intermedio			
	*Discrepancia Menor: Estándar es Intermedio y Directo es Resistente o Sensible			
	*Discrepancia mayor: Estándar Sensible y directo Resistente			
	*Discrepancia superior: Estándar Resistente y Directo Sensible			

Tabla 3. Acuerdo entre las pruebas de susceptibilidad a antibióticos evaluada por la metodología directa y convencional en Gram positivos

Cocos Gram Positivos (32)	Acuerdo Categórico n (%)	Discrepancias categóricas n		
		Menor	Mayor	Superior
Test D	26 (100%)			0
Cefoxitin	26 (100%)			
Penicilina	30 (96,8%)	1	0	0
Oxacilina	24 (96%)	0	1	0
Ciprofloxacino	27 (96,4%)	0	1	0
Levofloxacino	31 (96,8%)	1	0	0
Eritromicina	30 (96,8%)	1	0	0
Clindamicina	24 (85,7%)	0	4	0
Linezolid	32 (100%)	0	0	0
Daptomicina	28 (100%)	0	0	0
Vancomicina	29 (96,6%)	0	1	0
Tetraciclina	32 (100%)	0	0	0
Rifampicina	28 (100%)	0	0	0
Trimetoprim/Sulfametoxazol	28 (100%)	0	0	0
	(97,1%)	3 (0,8%)	7 (1,9%)	0

	*Discrepancia Menor: Estándar es Resistente o Sensible y Directo es Intermedio
	*Discrepancia Menor: Estándar es Intermedio y Directo es Resistente o Sensible
	*Discrepancia mayor: Estándar Sensible y directo Resistente
	*Discrepancia superior: Estándar Resistente y Directo Sensible

DISCUSIÓN

El uso de metodologías basadas en la realización de pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana, directamente desde hemocultivos positivos, puede tener un impacto positivo sobre los desenlaces clínicos de los individuos con bacteriemias, aportando en el establecimiento o ajuste de una terapia antibiótica dirigida (8).

En el presente estudio se proponen dos métodos directos estandarizados para la identificación y antibiograma realizados directamente desde hemocultivos positivos, que podrían contribuir con el mejoramiento de la oportunidad en el diagnóstico microbiológico de las bacteriemias.

En un estudio realizado en el norte de Israel donde se identificaron por MS 186 aislamientos directamente desde hemocultivos, se obtuvo un acuerdo global del 90 % (168/186) respecto al método convencional (9). Por otro lado,

Maria Goreth Barberino y col, reportan un porcentaje de acierto en la identificación de bacilos Gram negativos directamente desde hemocultivos por MS del 93,4%, mientras que en Gram positivos del 78,9% (6). Aspecto que se contrasta con nuestros hallazgos donde obtuvimos un acuerdo del 83,1% respecto al método convencional. Siendo menor en Gram positivos respecto a los Gram negativos (con un acuerdo del 69,1% y del 93% respectivamente).

En la investigación realizada por Sze DTT y col, donde se evaluaron un total de 141 aislamientos por métodos convencionales (MALDI-TOF y Antibiograma por microdilución en caldo) y directas (Pheno system, AST direct y BCID2) para la identificación y perfiles de sensibilidad, se observó una sensibilidad y especificidad por encima del 95 % (10). Respecto a los perfiles de sensibilidad en Gram negativos el acuerdo categórico global fue de 97,2 % para el método Pheno, del 90,3% para el uso las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) directo en el VITEK 2 92,6% y desde el subcultivo 94,4%. Mientras que en Gram positivos el acuerdo presentado fue del 97,2 % para cada una de las metodologías evaluadas (10).

De manera similar, Sung Jin Jo, y colaboradores, encontraron que la AST directa mostraba una concordancia del 97,9% al compararlo con el método estándar, con un error muy mayor del 0,25%, un error mayor del 0,05% y un error menor del 1,8% (7).

Lo anterior, se relaciona con los resultados obtenidos en este estudio, donde se presentó un acuerdo categórico del 98,6% y de 97,1% para las bacterias gram negativas y gram positivas, respectivamente; en el grupo de Gram negativos, se presentaron 7 casos erróneos (4 discrepancias menores y 3 mayores y superiores), mientras que en los Gram positivos evaluados se presentaron en total 7 discrepancias mayores.

Este estudio tiene algunas limitaciones, en primer lugar, la estandarización de métodos directos puede ser complejo y costoso para los laboratorios de microbiología. Adicional, estos procesos requieren contar con personal capacitado para el montaje e interpretación de resultados.

CONCLUSIÓN

En conclusión, la metodología directa, genera resultados más rápidos, lo que contribuye al mejoramiento en la oportunidad del diagnóstico microbiológico, generando un escenario idóneo para la terapia antibiótica en el contexto de las infecciones del torrente sanguíneo, mejorando la progresión clínica del paciente y evitando la aparición de desenlaces graves o mortales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yoo IY, Han J, Ha SI, Cha YJ, Pil SD, Park Y. Clinical performance of ASTA Sepsiprep kit in direct bacterial identification and antimicrobial susceptibility test using MicroIDSys Elite and VITEK-2 system. *J Clin Lab Anal.* 2021;35:e23744.
2. Rodríguez B, Sánchez C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, RodríguezCréixems M, Bouza E. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 20(7):O421-7 (2014).
3. Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., Muñoz-Bellido, J. L, González-Buitrago J. M. 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, 1007-1012 (2011).
4. Tian Y, Zheng B, Wang B, Lin Y, Li M. Rapid Identification and Multiple Susceptibility Testing of Pathogens from Positive-Culture Sterile Body Fluids by a Combined MALDI-TOF Mass Spectrometry and Vitek Susceptibility System. *Front Microbiol.* 2016 Apr 20; 7:523.
5. French K., Evans. J, Tanner H., Gossai S., Hussain A. The Clinical Impact of Rapid, Direct MALDI-ToF Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures. *PLoS ONE*;201611(12): e0169332.
6. Barberino M. G., et al. Brief communication Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Braz J Infect Dis.* 2017 mayo - junio; 21 (3): 339-342.
7. Jo SJ, Park KG, Han K, Park DJ, Park Y. Direct Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and the Vitek 2 System. *Ann Lab Med* 2016; 36:117-123.
8. Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O, Belkhir L, Laterre P-F, Delmée M, et al. (2016) Clinical Impact of MALDI-TOF MS Identification and Rapid Susceptibility Testing on Adequate Antimicrobial Treatment in Sepsis with Positive Blood Cultures. *PLoS ONE* 11(5): e0156299.
9. Azrad, M., Keness, Y., Nitzan, O. et al. Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis* 19, 72 (2019).
10. Sze DTT, Lau CCY, Chan TM, Ma ESK, Tang BSF. Comparison of novel rapid diagnostic of blood culture identification and antimicrobial susceptibility testing by Accelerate Pheno system and BioFire FilmArray Blood Culture Identification and BioFire FilmArray Blood Culture Identification 2 panels. *BMC Microbiol.* 2021 Dec 18;21(1):350.