ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y LAS METODOLOGÍAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Gabriela Tovar[1], Claudia Parra[2], Beatriz Ariza[3]

[1]Lcda. Bioanálisis Universidad Central de Venezuela. Esp. Microbiología Médica, Pontificia Universidad Javeriana.
[2]Bacterióloga Pontificia Universidad Javeriana, MSc. Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana, PhD Microbiología y parasitología Universidad Complutense de Madrid. [3] Bacterióloga Pontificia Universidad Javeriana. MSc. Microbiología Médica, Universidad Nacional de Colombia.

Recibido para publicación 29 de junio 2015. Aprobado para publicación 30 de julio 2015.

RESUMEN:

Actualmente la identificación microbiológica en los laboratorios clínicos depende de las metodologías convencionales como técnicas de identificación fenotípica y pruebas bioquímicas en conjunto con la biología molecular, lo que se traduce en un dilatado tiempo de respuesta de aproximadamente 48 a 72 horas para emitir un informe con la identificación del agente etiológico de la infección. Debido a esto, los científicos han buscado nuevas metodologías que puedan ser estandarizados y de alcance universal, capaz de identificar microorganismos patógenos de manera confiable, en tiempos muy cortos, con buena reproducibilidad y optimizando el flujo de trabajo con un mínimo costo; es aquí donde sale a relucir el sistema MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry). Desde 1975 la tecnología MALDI-TOF o la espectrometría de masas se introdujo en el campo de la microbiología, con la cual se ha logrado la identificación de microorganismos como bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras y hongos filamentosos a partir de cultivos puros, sin embargo, el reto continua en lograr minimizar aún más los tiempos de respuesta en el laboratorio, y es por eso que las investigaciones recientes están volcadas en la búsqueda de la aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas tales como hemocultivos, orina y otros líquidos estériles principalmente líquido cefalorraquídeo.

Palabras Clave: Espectrometría de masas, MALDITOF MS, hemocultivo, orinas, diagnostico microbiológico, líquido cefalorraquídeo.

COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN MASS SPECTROMETRY AND CONVENTIONAL METHODOLOGIES FOR THE IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS FROM BIOLOGICAL SAMPLES

SUMMARY

Currently, microbiological identification in clinical laboratories relies on conventional methodology as phenotypic identification techniques and biochemical tests in conjunction with molecular biology, leading to increment in turnaround time of approximately 48 to 72 hours to report the correct pathogen. Scientists have sought new methodologies that can be standardized, capable of identifying pathogens reliably in short times, with good reproducibility and optimizing workflow with minimum cost; It is at this point where MALDI-TOF MS system (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) comes into place. Since 1975 MALDI-TOF or mass spectrometry was introduced into the field of microbiology, it have achieved the identification of microorganisms such as gram-positive bacteria, gram negative, yeast and filamentous fungi from pure cultures, however, the challenge continues to find the way to reduce time and generate potentially beneficial impacts on the patients, that is why recent research is overturned in the search for the application of mass spectrometry for identifying microorganisms from biological samples such as blood cultures , urine and other fluids as cerebrospinal fluid.

Key words: Mass Spectrofotometry, MALDI-TOF MS, blood culture, urine, microbial diagnostic, cerebrospinal fluid.

Introducción

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que genera características de espectros de masas como huellas espectrales, que son únicas para cada microorganismo y por ende ideales para una precisa identificación en niveles de género y especie. Un espectrómetro de masas se compone de tres unidades funcionales, (a) una fuente de iones para ionizar y transferir de la muestra moléculas de iones en una fase gaseosa, (b) un analizador de masas que separa los iones en función de su relación masa-carga (m / z), y (c) un dispositivo de detección para realizar la lectura de iones

Solicitar copia a: Gabriela Tovar (e-mail: gath1990@hotmail.com, tovarh1990@gmail.com)

separados. MALDI-TOF es una técnica de ionización suave que permite ionización de grandes biomoléculas no volátiles tales como proteínas intactas (1).

Los resultados obtenidos se generan cuando el detector de iones que mide la masa y carga, genera espectros los cuales el software del instrumento los compara con una base de datos de referencia definida, lo que conduce a la identificación del microorganismo arrojando los resultados a través de un puntaje (SCORE) o porcentaje de probabilidad del espectro que indica el grado de confianza en el resultado emitido, el cual puede ser identificación correcta de género y especie (score ≥2), identificación correcta de solo de género (score 1.7-1.9) o una identificación incorrecta del microorganismo en género y especie (<1.7). La identificación de los microorganismos lo hace a través del análisis de las proteínas ribosomales y chaperonas de los mismos; como las composiciones de proteínas difieren entre especies bacterianas, incluso entre variedades, especies y subespecies, se generaran diferentes espectros, lo que permite la discriminación entre organismos estrechamente relacionados (2).

Numerosos reportes (3) han demostrado un excelente desempeño de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias y levaduras a partir de cultivos. En todos los estudios, esta tecnología ha resultado superior o equivalente con los métodos actuales usados para la identificación de microorganismos, sin embargo, la reducción del tiempo y disminución de los costos en cuanto a reactivos es lo que hace pensar en la superioridad de la técnica. Estas características hacen que la aplicación del MALDI-TOF MS a partir de muestras biológicas, principalmente hemocultivos y líquidos estériles, sea una llamativa opción para obtener una mayor rapidez en la entrega del resultado.

A continuación se presenta una revisión del tema realizada a partir de artículos de revistas indexadas en bases de datos como Pubmed, Clinical Key, Science Direct, publicados en los últimos 5 años, en los cuales se analizan las posibles variables que puedan influir en los resultados de identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas, las diferencias entre los protocolos pre analíticos establecidos por los investigadores y la oportunidad ofrecida por esta tecnología en comparación con las metodologías convencionales.

Revisión de Tema

El sistema MALDI-TOF surge en la microbiología como una opción que permite llevar a cabo la identificación rápida de microorganismos. En la literatura científica se observan reportes de las diferentes limitaciones y dificultades encontradas en los experimentos realizados para la identificación de los microorganismos a partir de muestras biológicas, dentro de las cuales se pueden citar la cantidad de bacterias que pueda estar presente en la muestra (Limite de detección del MALDI-TOF para lograr un buen Score), el volumen necesario de la muestra, la pureza de las mismas (monomicrobianos y polimicrobianas), interferencias propias de la muestra y protocolos previos a la identificación de los microorganismos, entre otros.

Hemocultivos:

Los estudios más notables para identificación de microorganismos en muestras son a partir de hemocultivos. Las bacteriemias se han convertido en una causa importante de morbimortalidad; European Antimicrobial Resistance Surveillance System muestra un incremento anual del 6,4 % de los episodios de bacteriemia en Europa durante los últimos años, además de un preocupante aumento del aislamiento de bacterias resistentes en la sangre, hecho que limita las opciones terapéuticas de estas infecciones. Agency for Healthcare Research and Quality observa que la tasa de mortalidad en pacientes con bacteriemia es ocho veces mayor que la de pacientes sin esta patología, pudiendo alcanzar hasta el 80 % de los casos. Por otro lado los pacientes que se complican con sepsis suelen requerir el ingreso en unidades de cuidados intensivos y frecuentemente presentan bacteriemia, ésta asciende hasta el 11% de los casos en ICI, y en general en el hospital las tasas de mortalidad por bacteriemia oscilan entre 25 y 80%. El diagnóstico precoz y tratamiento de la sepsis bacteriana es esencial para un resultado favorable del paciente. Kumar et al, informan un descenso promedio del 7,6% en la supervivencia del paciente por cada hora de retraso en la identificación del agente causal y por lo tanto en el reporte del tratamiento antibiótico, después de la aparición de la hipotensión, relacionada con la sepsis (4).

No obstante las candidemias también pueden llevar a complicaciones devastadoras y generar un marcado incremento en el costo de hospitalización. La mortalidad sigue siendo elevada, al igual que las bacteriemias, sobre todo cuando la terapia con medicamentos antimicóticos no se administra de inmediato. La prevalencia de las diferentes especies de *Candida* varía de región a región, y los patrones de susceptibilidad son especie específicos. En consecuencia la rápida y precisa identificación del agente causal es fundamental para el éxito del tratamiento (5).

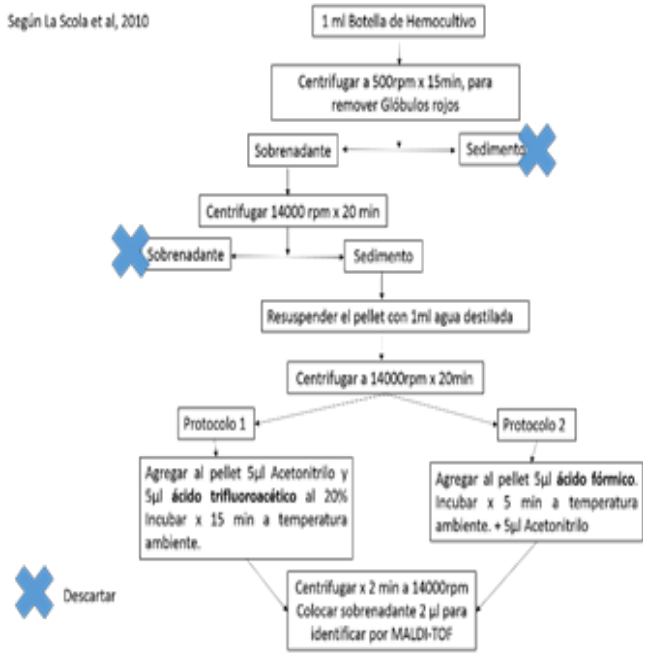


Figura 1: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de La Scola y col, 2010 (6).

Gramnegativos

En gramnegativos, los resultados reportados han sido constantes en cuanto al buen score y al mayor grado de concordancia con los métodos convencionales. Este hecho se ha visto repetidamente; en el caso de La Scola y col. en el 2010, ellos realizan un estudio con 599 hemocultivos positivos, a partir de los cuales reportan la aplicación de dos protocolos pre analíticos (ácido tricloroacético y ácido fórmico) para tratar las muestras (Figura 1), con los cuales obtuvieron un porcentaje de concordancia con la metodología convencional a nivel de especies de un 94%; hecho similar que reporta Kok y col en el 2011 (7), teniendo una cantidad de muestra de 507 análogo a La Scola (6). Juiz y col en el 2012 (8) a pesar de contar con una muestra mucho menor que la de los investigadores anteriores (n=85), logra comparar dos protocolos pre analíticos, un método casero y el método comercial sepsityper (Figuras 2 y 3 respectivamente), obteniendo en ambos un buen score de concordancia y un alto porcentaje de identificación para microorganismos gramnegativos, (por el método casero 94.74% para género y 84,21% para especie y por el kit Sepsityper 94.74% tanto para género como para especie). Resultados similares reportan Buchan(4), Foster(9) y Schubert(10).

Una ventaja que los investigadores han observado

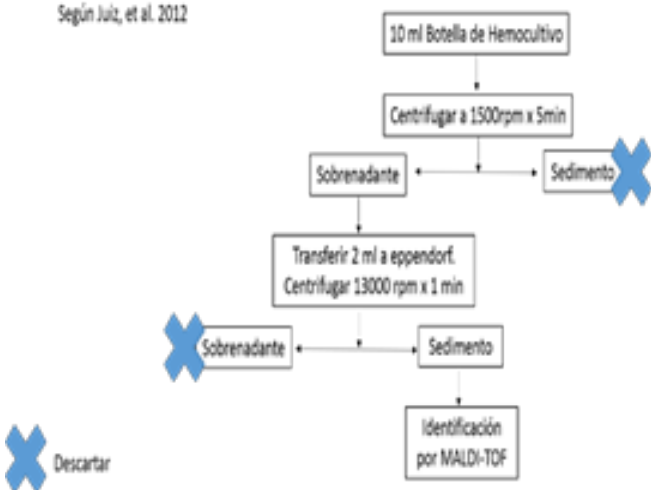


Figura 2: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Juiz y col 2012 (8).

en la tecnología MALDI con respecto a los procesos convencionales, es que estos últimos no tiene la capacidad de disgregar complejos de microorganismos. El caso puntual y más visto en los estudios corresponde al complejo *Enterobacter Cloacae*; Buchan(4) y Ferreira (11) coinciden en encontrar casos en los que por microbiología convencional la identificación fue *Enterobacter cloacae,* mientras que por MALDI-TOF fue *E. asburice*.

Pese a que la mayoría de estudios muestran la correcta

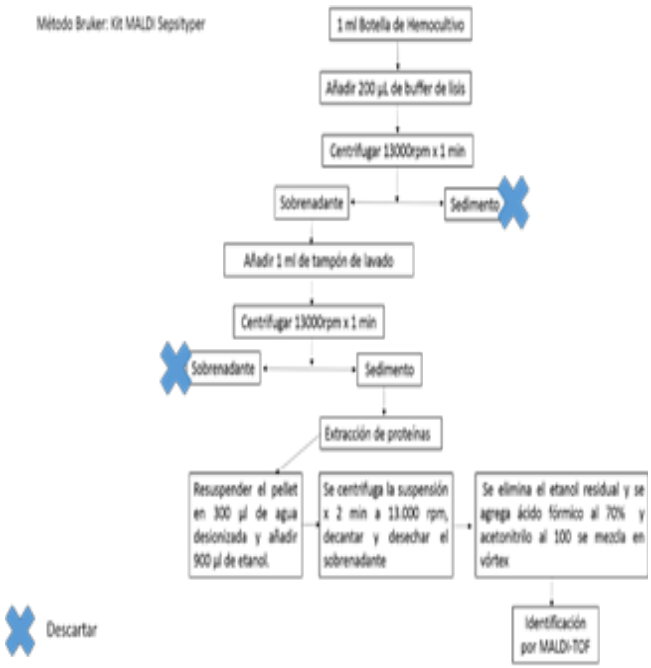


Figura 3: Método Sepsityper ®, Casa Bruker (7)

identificación a nivel de género y especie de las bacterias gramnegativas por MALDI-TOF, otros investigadores han reportado ciertos errores, como es el caso de Prod´hom y col en el 2010; este grupo obtuvo en su investigación (n= 126), cinco identificaciones erradas en gramnegativos con scores bajos, la mayoría debido a la presencia de cápsula, la cual generó interferencia en la identificación del perfil proteómico del microorganismo (2 *K. pneumoniae* y 2 *Haemophilus influenzae*)(12). Este mismo fenómeno también fue observado por Foster en el 2013, con identificaciones erróneas de *Klebsiella pneumoniae* que registraban como falso resultado *Enterobacter aerogenes* (9). Otro fenómeno negativo visto en la metodología MALDI-TOF son aquellos casos en los que existe homología entre las proteínas ribosomales de los microorganismos; caso puntual de *E. coli vs. Shiguella* spp, en donde el sistema MALDI-TOF identifica erradamente *E.coli* como *Shiguella* spp.(13).

Grampositivos

En grampositivos la concordancia entre las metodologías convencionales y la tecnología MALDI-TOF, fue mucho más baja que en el caso de gramnegativos. La Scola, en sus dos protocolos de extracción de proteínas, (Imagen 1) obtuvo muy bajo desempeño del MALDI-TOF para la identificación de grampositivos, teniendo como resultado para el protocolo con ácido trifluoroacético un 37% de concordancia y aunque mejoró en un 30% más con el segundo protocolo (Acido fórmico), la concordancia permaneció baja, de 67% (6). Resultados similares se encuentran en el estudio de Ferreira (11), obteniendo una concordancia de apenas 64,8% a nivel de género, y mucho menor a nivel de especies 31.8%.

En otros estudios, en los cuales el protocolo pre analítico utilizado fue el kit comercial sepsityper, los resultados para grampositivos, mejoraron enormemente; Buchan y col en el 2011 reportan una concordancia a nivel de genero un 98,1% y para especies de un 93,3%, en este mismo año (4), Schubert reporta un 86,3% a nivel de especies (10); pero a pesar de la buena correlación que se observó en estos dos estudios, Kok y col en 2011, utilizando igualmente el Kit sepsityper reportan para grampositivos apenas un 67% de identificación correcta (7); lo que hace pensar que aunque efectivamente el sepsityper podría ser un buen protocolo pre analítico para identificación de microorganismos grampositivos a partir de hemocultivos, éste presenta ciertas deficiencias que afectan los resultados, posiblemente porque no se realizaron lavados previos de las células ya que este paso no se encuentra dentro de su protocolo o insuficiente cantidad de muestra utilizada (14).

Las principales limitaciones que han visto los investigadores para lograr una identificación precisa de los grampositivos son a) la composición de la pared celular de las bacterias gram-positivas que confieren mayor resistencia a la lisis, b) posible presencia de proteínas residuales de la sangre que produzcan interferencia.

Tomando en cuenta la regular experiencia de trabajar espectrometría a partir de hemocultivos para grampositivos, Foster en 2013, aplica un protocolo pre analítico (Figura 4), basado no solo en procesos de lavados y centrifugación, sino que agregó una sustancia detergente para poder destruir las paredes de los grampositivos, obteniendo excelentes resultados de concordancia con la metodología convencional, tanto a nivel de género (95,1%) como a nivel de especies (88.1%), por lo que se puede decir que la teoría de utilizar protocolos pre analíticos con sustancias más fuertes y capaces de destruir la pared bacteriana gruesa de los grampositivos, pueda mejorar el rendimiento del MALDI-TOF con respecto a los mismos (9).

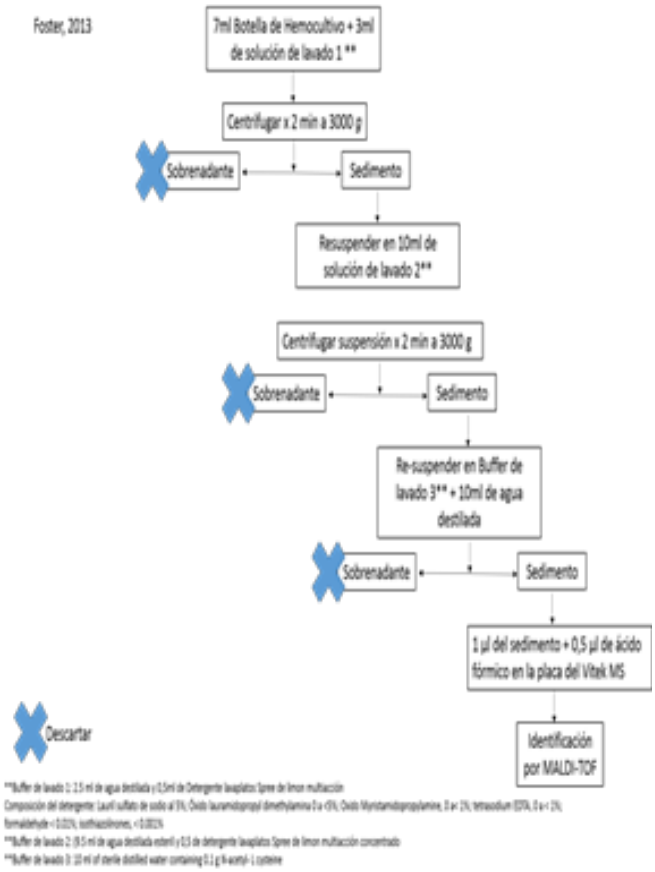


Figura 4: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Foster, 2013(9).

Además del bajo rendimiento observado en las diversas investigaciones revisadas, todas en su mayoría coinciden en el hecho de la identificación discordante del género *Streptococcus* a nivel de especies. Se ha visto en varios estudios, como es en el caso de Stevenson y col 2010, discordancias en la identificación de 8 botellas de hemocultivos con *Streptococcus,* los cuales fueron identificados como *Streptococcus pneumoniae* por MALDI-TOF Bruker, siendo *Streptococcus mitis/oralis* por metodología convencional (15); resultados similares fueron obtenidos por Kok (7), Ferroni (16), Buchan (4) y Schubert (10).

Foster, en 2013 en un estudio similar a los anteriores, en el cual utiliza el espectrómetro de masas de Biomerieux (Vitek-MS), encuentra un mejor rendimiento en los *Streptococcus*, habiendo obtenido un 80,1% de identificación correcta del total de los *Streptococcus* encontrados en su investigación (18/21), lo que sugiere que la base de datos que utiliza el Vitek MS, pudiese ser un poco más robusta que la de MALDI-TOF Bruker, o que el protocolo pre analítico empleado por este investigador, permitió una mejor diferenciación a nivel de especies de este género (9).

Este error recurrentemente reportado por los investigadores se ha justificado a través de la incapacidad que tiene el sistema MALDI-TOF de diferenciar entre las especies de los *Streptococcus*, debido a la estrecha relación filogenética existente entre las diversas especies de este género; no obstante el sistema MALDI-TOF es capaz de equivocarse en la identificación de *Streptococcus mitis/oralis* como *Streptococcus pneumoniae*, pero no viceversa, ya que el software no permite escapar microorganismos de tanta relevancia (10).

Debido a esta limitante del MALDI-TOF, los autores sugieren que ante la identificación de *Streptococcus*, se recurra a métodos convencionales rápidos como pruebas adicionales, por ejemplo, el uso de métodos inmunológicos para la detección de antígenos en látex como el Slidex pneumo kit, el cual fue usado en el estudio de Ferroni y col en el 2010, dando una excelente sensibilidad y especificidad del 100% y 95% respectivamente (16) o el uso de la optoquina y la solubilidad en bilis para diferenciar otras especies de *Streptococcus pneumoniae* (7)

Con respecto al género *Staphylococcus*, los reportes de los diferentes investigadores son variados; Se han obtenido un 100% de concordancia entre los métodos convencionales y MALDI-TOF, para lograr diferenciar con alta precisión los *Staphylococcus aureus*, de los *Staphylococcus* coagulasa negativo (S. CoNS) estableciendo un protocolo pre analítico bastante efectivo para grampositivos, como es el uso de un detergente Saponina al 5% (Figura 5), hecho de gran relevancia, por la importancia de diferenciar entre una bacteriemia por *Staphylococcus aureus* o por *Staphylococcus coagulasa* negativos, siendo estos últimos usualmente contaminantes en la toma de muestra (16). En ocasiones se observa, un porcentaje relativamente alto de identificación de genero *Staphylococcus*, pero sumamente baja la concordancia a nivel de especies, e incluso no se logra ningún espectro de identificación (11) las posibles causas de esto no son discutidas por los investigadores en sus ensayos.

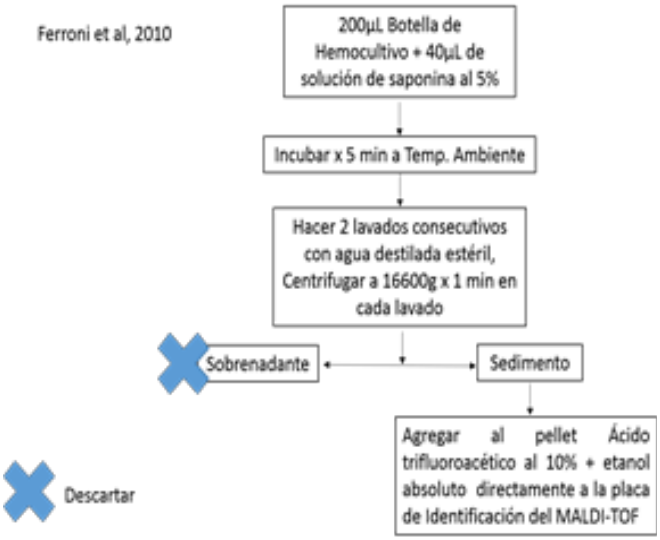


Figura 5: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Ferroni y col 2010 (16).

Levaduras

Con respecto a levaduras, los resultados son mucho más deficientes que para bacterias, hecho que se adjudica a las características propias de las levaduras (membranas abundantes de lípidos como el ergosterol, y pared celular rica en quitina) lo que convierte en una tarea muy difícil la identificación de las levaduras a partir de hemocultivos; es por esto que se debe encontrar un protocolo lo suficientemente efectivo que destruya la estructura de la levadura y de esta manera lograr una confiable identificación de las mismas a nivel de especies a partir de MALDI-TOF. En los artículos revisados se ha evidenciado el impacto que tienen los protocolos pre analíticos, donde repetidamente se observa la necesidad de utilizar agentes detergentes fuertes que puedan disolver su estructura.

Hoy en día hay numerosos estudios únicamente enfocados a la identificación de candidemias, como es el caso de Marinach-Patrice y col en 2010 los cuales

obtuvieron excelentes resultados, aplicando un protocolo pre analítico basado en SDS al 0.1% (Figura 6), sustancia detergente capaz de disolver las membranas y paredes de la levadura. La identificación por MALDI-TOF correspondió en un 100% con la identificación realizada por metodología convencional (17). El estudio de Spanu y colaboradores, también utiliza una sustancia detergente en su protocolo pre analítico en este caso Tween 80 al 0.1% (Figura 7), logrando la identificación de 91.3% a nivel de especies de los 346 hemocultivos positivos (5). A pesar de la buena identificación de levaduras, estos investigadores encontraron deficiencias en la identificación de una especie en específico, Candida guillermondi, al parecer por características propias de pared de la especie o de la base de datos que no permite establecer una comparación de huellas espectrales, hecho que reportan también otros autores, los cuales encontraron problemas incluso en la identificación de la levadura a partir de colonia pura.

Como se ha venido discutiendo, es mucho más complicada la identificación de las levaduras a partir de hemocultivos, que gramnegativos e incluso que grampositivos, por lo que se deben establecer protocolos mucho más eficientes que incluyan sustancias tensioactivas como los detergentes, para lograr identificaciones correctas a nivel de especie, ya que sabemos que el tratamiento de estas infecciones es especie-dependiente.

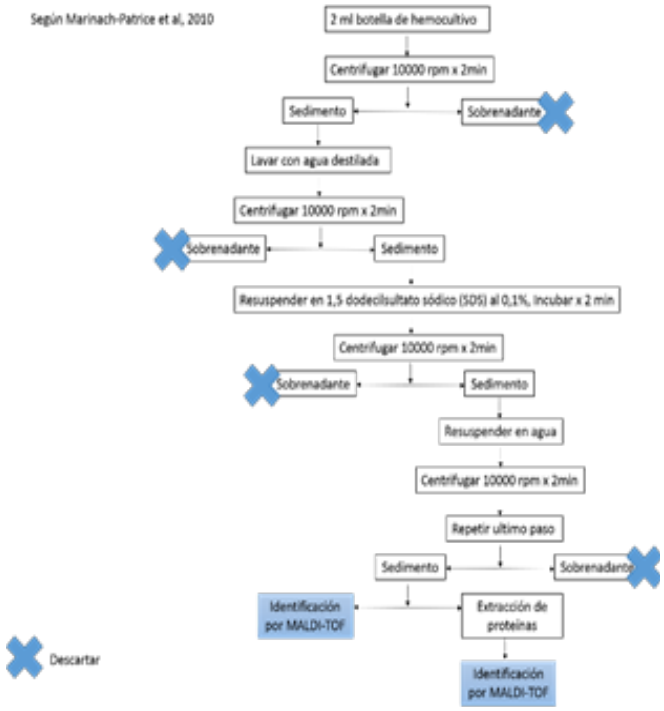


Figura 6: Protocolo pre analítico para levaduras a partir hemocultivos. Tomado de Marinach-Patrice y col 2010 (17).

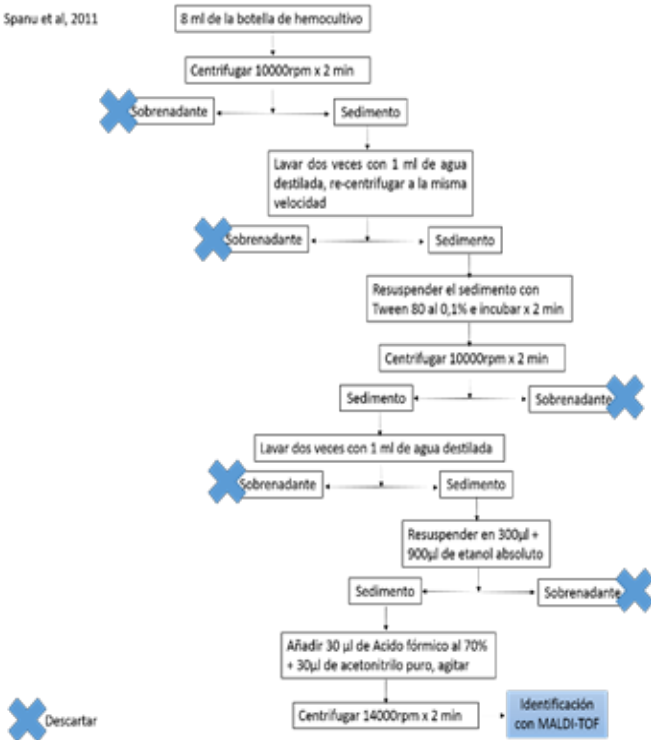


Figura 7: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Spanu y col 2011 (5).

identificable en la base de datos, debido a que se solapan los perfiles de los microorganismos implicados (18) otros estudio evidencian que solo es capaz de identificar a aquel microorganismo que se encuentra en mayor concentración e incluso reportando muy buenos scores (4,10). Estos datos son un poco desalentadores ya que estudios previos calculan alrededor de un 5% de los hemocultivos tienen más de un microorganismo. Según los investigadores, se deben realizar ajustes en los software de los espectrómetros de masas, para lograr la diferenciación en cultivos mixtos, es por esto que nunca se podrá dejar de lado la tinción de gram, ya que además de proveer un informe preliminar para el médico, orienta al analista en si la infección en mono o polimicrobiana.

Límite inferior de detección

Reportan algunos investigadores que la concentración de los microorganismos en la botella de hemocultivos, es crucial ya que dependiendo de la concentración del microorganismo los resultados darán con mayor o menor puntaje de concordancia con los espectros de la base de datos. Stevenson y col determinaron que la concentración idónea de bacterias para obtener un buen score de concordancia con la base de datos, es de 106UFC/ml (15), datos que coinciden con los de Christner y col la cual indica que la concentración para tener un buen score (≥ 2) debe ser de 106 a 109

UFC/ml (18). Yan y col, reportan como límite inferior de detección para el MALDI-TOF en identificación de levaduras 5.9x105UFC/ml, el cual realizó este estudio inoculando a las botellas de hemocultivos Candida parapsilosis a distintas concentraciones, hasta encontrar la concentración a la que fue detectada por MALDI-TOF correctamente (14).

Tipo de Botella de Hemocultivo para análisis por Espectrometría

Finalmente, algunos estudios han sugerido diferencias significativas en la eficacia de la identificación mediante MALDI-TOF MS entre los diferentes sistemas de hemocultivos disponibles comercialmente. Así mientras la mayor parte de los estudios realizados usan el sistema BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU) y obtiene identificaciones correctas en más del 85% de los casos, otros estudios realizados mediante el sistema Bact/Alert (bioMérieux, Francia) obtienen resultados muy inferiores, en torno al 30% (19). Sin embargo la mayoría de los estudios se realizan con el sistema BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU) y muy pocos con el sistema Bact/Alert (bioMérieux, Francia), se recomienda que se hagan más estudios comparativos entre estos sistemas de hemocultivos. Para el 2011, Romero-Gómez compara tres sistemas de hemocultivos (BACTEC, Bact/Alert y VERSATREK (TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher, EE.UU) muestra diferencias a favor de BACTEC 76.1% (32/42), frente a Bact/Alert 61.5% (32/52) y VERSATREK con un 68.57% (24/35), sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas; a su vez este estudio reveló que los sistemas de hemocultivo con carbón, no dan buenos scores de identificación en equipos de espectrometría (20).

Orinas

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. La confirmación microbiológica de las ITU toman entre 24-48 horas por métodos convencionales, durante este tiempo los pacientes se encuentran con terapia empírica, para algunos innecesarias o inadecuadas. Tradicionalmente el rápido diagnóstico de ITU se basa en el gram de orina, el cual provee un rápido resultado, confiable y económico para la identificación de bacteriuria. Siendo el urocultivo el gold standar en el diagnóstico de las ITU sigue siendo demorado en su resultado. De este modo tratando de minimizar costos y tiempo, se ha intentado emplear el uso del sistema MALDI-TOF para la identificación microbiana a partir de las muestras de orinas, utilizando igualmente como en los hemocultivos, protocolos pre analíticos para lograr la disminución o eliminación de interferencias analíticas propias de las muestras y tratar de concentrar al máximo los microorganismos.

Actualmente la mayoría de las investigaciones orientadas a la identificación de microorganismos a partir de muestras de orinas, buscan determinar el límite inferior de detección por el sistema MALDI-TOF, ya que a pesar de que el contaje considerado por la mayoría de los médicos es ≥ 105 UFC/ml en ciertos pacientes, como mujeres embarazadas, niños, pacientes con sondas o catéteres, pacientes inmunocomprometidos, o con enfermedades de bases como la diabetes mellitus, o cáncer, una infección del tracto urinario puede ser considerada hasta con un contaje de 102, y es en estos pacientes donde se necesitaría el resultado con mayor prontitud.

Con la idea de poder identificar la mínima concentración de bacterias en orinas que pueda detectar el sistema MALDI-TOF MS, en 2013 Wang y col, establecen diferentes diluciones de los microorganismos más comunes implicados en infecciones urinarias, para determinar la mínima concentración a la que podían ser identificados por MALDI-TOF MS, teniendo como resultado más bajo requerido para la identificación para *Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae y Pseudomona aeruginosa* 3.0×104 UFC/ml, lo que significa se necesita un contaje bastante alto (21). Kohling y col en el 2014 evidencian que el sistema MALDI-TOF MS logra identificar correctamente el uropatógeno cuando éste se encuentra en un contaje más bajo que el reportado por Wang, de 103UFC/ml (22). Ferreira en 2011 determinó que los resultados para límite inferior de detección del MALDI-TOF, dieron similares a sus resultados de las muestras clínicas, ya que todas las muestras que tenían un contaje bacteriano entre 5x104 y 9x104 UFC/ml dieron una correcta identificación con un alto score, mientras que las que tenían un contaje <5x104 UFC/ml, no generaron una identificación confiable (Score <1.7) (23). Esto revela junto con los dos estudios anteriormente nombrados que uno de los factores más influentes en la identificación correcta de los microorganismos a partir de muestras de orinas, es la concentración a la cual se encuentra la bacteria en la muestra; MALDI-TOF no es capaz de identificar correctamente la bacteria en muestras en que ésta se encuentre por debajo de 103UFC/ml.

Los resultados correctos de identificación también están influenciados por el protocolo preestablecido por los investigadores, este paso al igual que en los hemocultivos,

es fundamental para lograr una identificación correcta. Una posible causa que permitió que los estudios de Kohling en 2014, pudieran detectar hasta 103UFC/ml, pudo haber sido el protocolo establecido por estos investigadores.

Como técnica rápida y de apoyo al MALDI-TOF, en 2014 Burillo y col, toman la tinción de gram como guía en la identificación del uropatógeno, concluyendo que la tinción de gram si ayuda a predecir ausencia o presencia de bacteriuria y conjuntamente con el resultado del MALDI-TOF MS pueden ayudar a la instauración de la terapia adecuada en tan solo una hora (24). Con respecto a dificultades encontradas en la identificación de microorganismos a partir de muestras de orina, Burillo, en su trabajo, demuestra que al igual que ocurre con los hemocultivos la identificación de levaduras no es fácil y que se deben establecer protocolos pre analíticos más fuertes que logren destruir la pared de la levadura para lograr la identificación no solo a nivel de genero sino también a nivel de especies.

En el caso de infecciones mixtas, los estudios de Wang (21) demuestran que la identificación de los microorganismos dependerá de su relación en cuanto a cantidad en la muestra; éste grupo realizó diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:9 y viceversa de *E.coli* con *P.aeruginosa y de E.coli* con *E. faecium*, determinando que si la relación es 1:1 o 1:2, MALDI-TOF MS será capaz de identificar ambos, pero si la relación es 1:4 en ocasiones si se logra identificar ambos, pero definitivamente en 1:9 sólo se podrá identificar al que se encuentra en mayor proporción.

En las investigaciones de Kohling (22) y Burillo (24), detectaron un triplete de picos proteicos de alta intensidad con m/z de 3371.0 3342.5 y 3486.5 Da propios de la muestra del paciente, que correspondían a proteínas α defensinas las cuales se han visto que aumentan en aquellos pacientes con pielonefritis, o cáncer de vejiga; en ambos estudios, las defensinas suprimieron los picos péptidicos generados por el microorganismo en la muestra, por lo que no se logra identificar el mismo. De acuerdo con Kohling y col, es necesario establecer un protocolo que permita separar correctamente estas proteínas de las bacterias, pero resulta bastante difícil, ya que estas moléculas son anfipáticas e interactúan con la membrana bacteriana, por atracción electrostática (22). Ferreira y colaboradores igualmente detectaron estos picos de m/z pero no indican a que se deben si no que son probablemente de proteínas del paciente (23).

El uso del sistema MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos en orina disminuye el tiempo de diagnóstico enormemente, pudiendo dar resultados confiables en tan solo una hora, variando este tiempo de acuerdo al protocolo pre analítico empleado, sin embargo, en infecciones del tracto urinario vale la pena reevaluar su utilidad, debido a que los resultados fiables son obtenidos cuando se tiene un contaje ≥ 105 UFC/ml, y no todas las infecciones cursan con este contaje tan alto, de hecho en pacientes que llegan de emergencia, que estén hospitalizados con enfermedades de base, o que se encuentren inmunocomprometidos, se deben considerar múltiples factores y en estos casos el punto de corte del contaje puede disminuir, por lo que MALDI-TOF no sería de gran utilidad en estos pacientes a pesar de ofrecer oportunidad en el resultado. MALDI-TOF efectivamente es capaz de identificar microorganismos, pero su utilidad real debe ser lograr la detección de infección urinaria, por lo que se debe buscar un algoritmo que permita diagnosticar infecciones del tracto urinario por este sistema, como el que recomienda el estudio de Burillo (24), sin olvidar relacionarlo con los factores propios del paciente.

Líquidos estériles (liquido cefalorraquideo)

La meningitis bacteriana representa una de los tipos de infecciones más serias e importantes debido a la alta tasa de mortalidad y morbilidad en los pacientes, por lo que se necesita de rapidez y precisión en la identificación del agente causal. Debido a la inmediatez que se necesita para este tipo de infecciones, el sistema MALDI-TOF puede ser de gran utilidad, sin embargo, en la literatura científica hay muy pocos artículos que hablan sobre su uso para la identificación directa de microorganismos a partir de LCR. Nyvang y col en 2010 presentan un caso de un hombre de 46 años con sintomatología meníngea, el LCR es procesado de la siguiente manera: Centrifugación a baja velocidad para remover leucocitos, seguido por centrifugación a alta velocidad, para obtención del pellet bacteriano. El pellet fue solubilizado con ácido fórmico y acetonitrilo, centrifugado y analizado por MALDI-TOF MS. La identificación generada por MALDITOF MS fue Streptococcus pneumoniae la cual se interpretó como válida a nivel de especies después de la manipulación manual de los datos, aunque el análisis automático habría permitido sólo una identificación a nivel de género (25).

El uso de esta técnica en combinación con tinción de Gram y cultivo tradicional podría mejorar el diagnóstico de meningitis bacteriana, mejorando el tiempo de diagnóstico, lo que permitiría instaurar una terapia antimicrobiana adecuada y agresiva para la población que se encuentra en estado crítico, y de esta manera

tratar de disminuir las tasas de morbi-mortalidad. Sin embargo se requiere de más estudios para poder generar conclusiones con respecto a la identificación de microorganismos en otros líquidos estériles por MALDI-TOF MS, ya que el único articulo encontrado únicamente habla de líquidos cefalorraquídeo.

Protocolos pre analíticos aplicados a muestras biológicas para la identificación de microorganismos por espectrometría de masas.

La etapa crucial que garantiza resultados fiables con el sistema MALDI-TOF MS, es el protocolo pre analítico que se establece para poder lograr obtener el microorganismo lo más puro posible a partir del hemocultivo, sin necesidad de cultivos previos en agar. En todos los artículos discutidos, se ha evidenciado que para los microorganismos gramnegativos, cualquiera de los protocolos son válidos para obtener excelentes scores de identificación, ya que por sus características morfológicas con respecto a grampositivos y levaduras, con un simple proceso de centrifugación a diferentes velocidades y varios lavados, se puede lograr una identificación con scores altos, garantizando fiabilidad en el resultado. Estos hechos que se han evidenciado en diversos estudios, en especial el de Juiz y col (8), que comparó dos protocolos uno simple casero, basado en diferencial de centrifugación, y el otro fue el kit comercial de sepsityper, obtuvo tanto para el primero como para el segundo protocolo, excelentes resultados. Para el protocolo casero obtuvo un nivel de concordancia con respecto a la metodología convencional, para gramnegativos del 94,7% a nivel de género, y 84,62% a nivel de especies, y con protocolo del kit Sepsityper de Bruker, obtuvo un mayor porcentaje de concordancia tanto a nivel en género como de especies de 94,74%; esto debido a que sepsityper incluye más pasos en los cuales se agregan buffer de lisis celular, además de un proceso de extracción de proteínas, por lo que se logra eliminar o disminuir los posibles interferentes relacionados con la muestra. Ha quedado evidenciado que si se utilizan protocolos pre analíticos más agresivos con buffer de lisis, diferencial de centrifugación, múltiples lavados, se logra la eliminación de los interferentes y se obtienen resultados más precisos y con altos score.

En el caso de grampositivos y las levaduras, se demostró que protocolos sencillos basados en procesos de centrifugación a diferentes velocidades y lavados, no generan un buen rendimiento del MALDI-TOF MS incluso aplicando protocolos de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico o trifluoroacético (La Scola 37% (6), Juiz 44.3% (8), Ferreira 31.8% (26)) por lo que es necesario agregar sustancias detergentes o tensioactivas como lo son el SDS, Tween 80, saponina, entre otros (4,9,16,17) que sean capaces de romper la pared bacteriana gruesa del grampositivo y la pared y la quitina de las levaduras de manera tal que se liberen las proteínas y pueda generarse un espectro de identificación a nivel de especies.

Igualmente que en los gramnegativos el kit sepsityper arroja buenos resultados con los grampositivos, de acuerdo con Buchan y col el porcentaje de concordancia con metodología convencional a nivel de género y especies fue de 98.1% y 93.3% respectivamente (4) y Schubert, arrojó un porcentaje de concordancia del 86.3% a nivel de especies, utilizando este kit y para levaduras de 70.6%(10). Yan y col realizó un pretratamiento a los hemocultivos con levaduras de dos lavados previos y centrifugación antes de utilizar el kit sepsityper, con lo que obtuvo una identificación correcta de todas las especies de levaduras en su estudio, que generó resultados reproducibles y confiables (14).

En el caso de las orinas se ha evidenciado lo mismo con respecto al uso de sustancias detergentes como el SDS; en 2014 Juanes-Sánchez (27), realiza un pretratamiento con SDS al 10% en 71 muestras que habían dado en estudios anteriores scores < 2 pero que tenían un contaje ≥105 UFC/ml en estudios anteriores a los que se le había aplicado el protocolo pre analítico de Ferreira y col (26), (Figura 8) obteniendo una mejora del 46.5% en el score de aquellos que habían sido identificados correctamente, y logrando la identificación del 31%

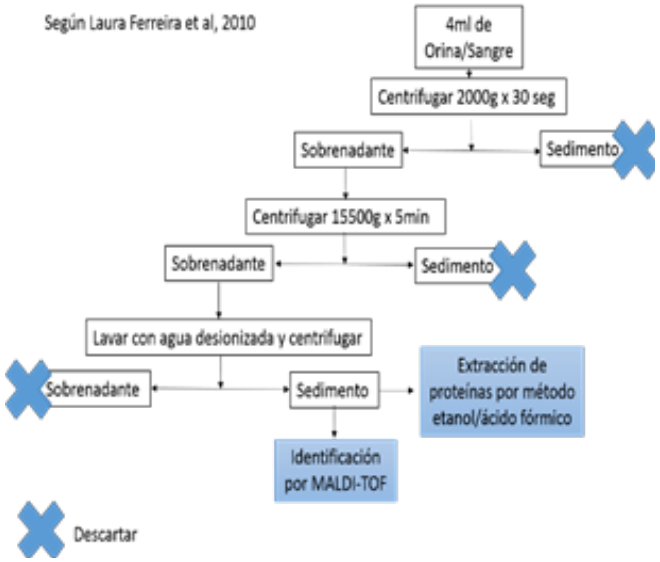


Figura 8: Protocolo pre analítico para hemocultivos y orina. Tomado de Ferreira y col 2010 (26)

de las muestras que en el estudio anterior no habían logrado ser identificadas, con lo que demuestra que el pretratamiento al igual que en hemocultivos, puede mejorar enormemente los resultados de identificación debido a que este detergente es capaz de lisar las células bacterianas y demás células propias de las muestras de orinas (leucocitos, eritrocitos), logrando eliminar la mayoría de los interferentes y mejorando el rendimiento del MALDI-TOF (27). Budillo y col, (Figura 9) en su estudio tienen un proceso de incubación con Tween 80 al 0.1% con lo cual obtuvo muy buenos resultados de concordancia a nivel de especies con la metodología convencional (93.8%)(24).

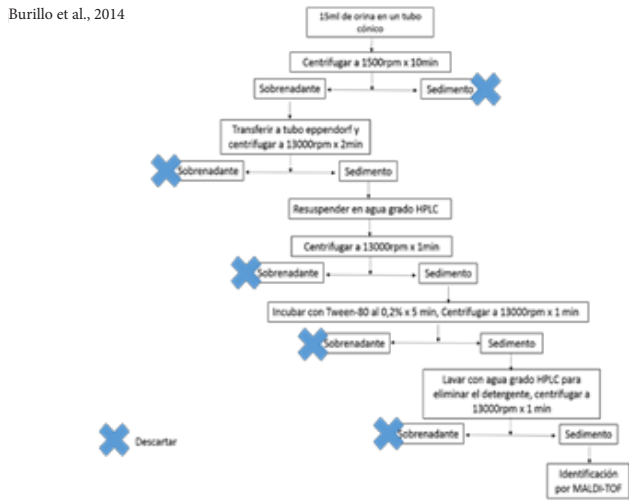


Figura 9: Protocolo pre analítico para orinas. Tomado de Burillo y col 2014 (24).

Oportunidad de la espectrometría de masas

En 2012 Lagacé-Wiens y col (28), realizan un análisis de desempeño, costo y tiempo de respuesta del MALDI-TOF cuando es utilizado para identificación de microorganismos a partir de hemocultivos comparado con metodología convencional. El tiempo de respuesta fue determinado por dos enfoques, el primero reflejando una situación ideal, en la cual una vez que el hemocultivo marcara positivo por el equipo automatizado, éste fuera procesado por MALDI-TOF y un segundo enfoque, en donde se evalúa el tiempo en aquellos microorganismos que dan un score insuficiente para lograr una identificación definitiva o que el microorganismo requiera confirmación (como en el caso de los Streptococcus del grupo mitis) con metodología convencional. Los resultados obtenidos, refieren una reducción en el tiempo de respuesta de 34.3 horas, asumiendo la situación ideal, y de 26,5 horas en la segunda situación ya que se requiere de identificación por sub cultivos (28). Estas observaciones fueron similares en el trabajo de Buchan y col en 2011 el cual reporta un rango de 23-83 horas más rápido para aislamientos de grampositivos y de 34-51 horas para aislamientos de gramnegativos (4). Igualmente estudios como el de Stevenson y col (15), Kok y col (7), Christner y col (18), entre muchos otros reportan resultados fiables con un alto desempeño del MALDI-TOF, entre 1 y 2 horas, dependiendo del protocolo pre analítico establecido, por lo que se reduce el tiempo de respuesta de 24-48 horas.

Con respecto a las muestras de orinas, no se encontró ningún artículo que evalúe la reducción del tiempo en horas, como en el caso de los hemocultivos, únicamente indican que se disminuye el tiempo entre 30 y 1 hora para dar el resultado (21).

Conclusiones

Existen múltiples variables que interfieren en la obtención de un resultado correcto por espectrometría de masas a partir de muestras biológicas, como lo son la concentración del microorganismo en la muestra, volumen necesario de muestra, el protocolo pre analítico establecido por el investigador, el tipo de microorganismo y su estructura, si es grampositivos, gramnegativo o levaduras, pureza de las muestras (monomicrobianas y polimicrobianas); Todas deben ser consideradas en conjunto para lograr resultados que brinden oportunidad al paciente y confiabilidad al médico.

La falta de protocolos estandarizados contribuye a las diferencias reportadas en el desempeño de MALDI-TOF MS en la identificación directa de patógenos a partir de muestras biológicas. Actualmente el único kit pre analítico patentado y estandarizado es el de la casa Bruker, que se denomina Sepsityper® y puede ser utilizado únicamente a partir de hemocultivos.

Microorganismos con proteínas ribosomales homologas o correlación filogenética, el sistema MALDI-TOF tiende a identificarlos erróneas a partir de hemocultivos, por lo que se debe recurrir a pruebas confirmatorias.

Una de las variables más importantes a tomar en cuenta para trabajar espectrometría de masas a partir de muestras biológica es el tipo de microorganismo (gramnegativos, grampositivos y levaduras) y a partir de esto establecer el protocolo pre analítico, ya que de esto depende el éxito del resultado.

Los estudios realizados a partir de muestra de orina

buscan la disminución del tiempo de respuesta ante una infección pero no han logrado identificar microorganismos con un buen score, cuando hay contajes bacterianos menores a 103UFC/ml.

Se requieren más estudios a partir de otros líquidos estériles como líquido cefalorraquídeo, liquido pleural o sinovial, para poder generar conclusiones sobre estos.

Finalmente la emisión de resultados empleando el sistema MALDI-TOF MS, a partir de muestras biológicas, disminuye el tiempo de respuesta en días, cuando se compara con la metodología convencional implementada actualmente en nuestros laboratorios.

Referencias

1. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A and Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. Clinical Microbiology and Infection. 2010;16(11):1604-1613. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x
2. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A and Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews 2013;26(3):547-603. Disponible en: doi:10.1128/CMR.00072-12.
3. Neville SA, LeCordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW and Van Hal SJUtility of matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. Journal of Clinical Microbiology 2011;49(8):2980-2984. Disponible en: doi:10.1128/JCM.00431-11
4. Buchan BW, Riebe KM and Ledeboer NA. 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 Microb 2012;50(2):346-352. Disponible en: doi:10.1128/JCM.05021-11
5. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, Fadda G. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of candida species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2012;50(1):176-179. Disponible en: doi:10.1128/JCM.05742-11
6. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by MatrixAssisted Laser Desorption Ionisation TimeofFlight Mass Spectrometry. PLoS One 2009;4(11):e8041. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0008041
7. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass Spectrometry. PLoS One 2011;6(8):e23285. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0023285
8. Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, Marco F, Vila JA. 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 Infec Dis 2012;31(7): Disponible en: 1353-1358doi:- 10.1007/s10096-011-1449-
9. Foster AG. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry system. J Clin Microbiol 2013;51(11):3717-3719. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01679-13
10. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T and Kostrzewa M. 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 2011;13(6):701-706. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.07.004
11. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM and Muñoz-Bellido JL. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2011;17(4):546-551. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x
12. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J and Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. J Clin Microbiol 2010; 48(4):1481-1483. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01780-09
13. Machen A, Drake T, Wang YF. Same Day Identification and Full Panel Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles Made Possible by a Combined Lysis-Filtration Method with MALDI-TOF VITEK Mass Spectrometry and the VITEK2 System. PLoS One 2014;9(2):e87870. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0087870
14. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton CW, Kostrzewa M, et al. 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 2011;49(7):2528-2532. Disponible en: doi:10.1128/JCM.00339-11
15. Stevenson LG, Drake SK and Murray PR. Rapid

identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010;48(2):444-447. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01541-09

16. Ferroni A, Suarez S, Beretti J, Dauphin B, Bille E, Meyer J, Bougnoux ME, Alanio A et al. 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 2010;48(5):1542-1548. Disponible en: doi:10.1128/JCM.02485-09
17. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, Meyer I, Buffet P, et al. Rapid Species Diagnosis for Invasive Candidiasis Using Mass Spectrometry. PLoS One 2010;5(1):e8862. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0008862
18. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K and Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology 2010;48(5):1584-1591. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01831-09
19. Szabados F, Michels M, Kaase M and Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. Clin Microbiol Infec 2011;17(2):192-195. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03229.x
20. Romero-Gomez MP, Mingorance J. The effect of the blood culture bottle type in the rate of direct identification from positive cultures by matrix-assited laser desorption/ionization time – of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. J Infect 2011;62(3):251-253.
21. Wang X, Zhang G, Fan Y, Yang X, Sui W and Lu X. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. J Microbiol Methods 2013;92(3):231-235. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.016
22. Kohling H, Bittner A, Muller K, Buer J, Becker M, Rubben H, Rettenmeier AW, Mosel F. 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 2012;61(3):339-344. Disponible en: DOI 10.1099/jmm.0.032284-0
23. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM and Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010;48(6):2110-2115. doi:10.1128/JCM.02215-09
24. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Gram-Stain Plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infection. PLoS One 2014;9(1):e86915. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0086915.
25. Nyvang G, Kvistholm A, Böcher S, Damkjaer M, Pedersen M, Engell M, Abdul-Redha R, Dargis R. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verifi ed and Brucella species identified in less than half an hour. Scand J Infect Dis 2010;42(9):716–718. Disponible en: DOI: 10.3109/00365541003754493.
26. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, and González-Buitrago JM. 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 Microb Infect 2011;17(7):1007-1012. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x
27. Sánchez-Juanes F, Siller M, Moreno F, Criado M, Hernández S, de Frutos Serna M, González-Buitrago JM Muñoz-Bellido JL. Pretreatment of Urine Samples with SDS Improves Direct Identification of Urinary Tract Pathogens with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol 2014; 52(1):335–338. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01881-13
28. Lagacé-Wiens P, Adam H, Karlowsky J, Nichol K, Pang P, Guenther J, Webb A, Miller C., et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. J Clin Microbiol 2012;50(10):3324-3328. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01479-12