

Carlos Ruiz de Alegría-Puig¹
Amaia Aguirre-Quñonero¹
Jesús Agüero-Balbín^{1,2}
M^a Pia Roiz-Mesones¹
Luis Martínez-Martínez^{1,2}

Correlación entre el sistema de MALDI-TOF Vitek-MSTM y los métodos convencionales de identificación de bacterias causantes de infección gastrointestinal

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, España

²Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, España.

RESUMEN

Introducción. La identificación rápida de patógenos es esencial para el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales. La espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) ha demostrado ser eficaz y rápida en la identificación de microorganismos. El objetivo de este estudio fue evaluar la correlación entre Vitek-MSTM y los métodos convencionales para la identificación de bacterias causantes de infección gastrointestinal.

Material y métodos. Se han identificado un total de 329 patógenos gastrointestinales empleando, simultáneamente, Vitek-MSTM (v2 SARAMIS MS-ID, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y métodos diagnósticos convencionales. En los casos de discrepancia se realizó secuenciación del gen 16SrRNA.

Resultados. La correlación entre Vitek-MSTM y los métodos diagnósticos convencionales fue del 100% excepto para *Yersinia enterocolitica* (94,1%), *Helicobacter pylori* (10%) y *Aeromonas veronii* (0%).

Conclusiones. Vitek-MSTM es un método rápido y útil en la identificación de bacterias enteropatógenas. Es necesario mejorar las prestaciones del sistema para *H. pylori* y *A. veronii*.

Palabras clave: Maldí-tof; *Yersinia*; *Aeromonas*; *Helicobacter*; *Salmonella*

Correlation between MALDI-TOF Vitek-MSTM system and conventional identification methods of gastrointestinal infection causing bacteria

ABSTRACT

Introduction. Rapid identification of pathogens is essential for the diagnosis of gastrointestinal infections. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry has shown to be effective and fast for the identification of microorganisms. The objective of this study was to evaluate the correlation between Vitek-MSTM and conventional methods for bacterial identification causing gastrointestinal infection.

Material and methods. A total of 329 gastrointestinal pathogens were identified using Vitek-MSTM (v2 SARAMIS MS-ID, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and routine diagnostic methods simultaneously. In cases of discrepancy 16SrRNA gene sequencing was performed.

Results. The correlation between Vitek-MSTM and diagnostic methods was 100% except for *Yersinia enterocolitica* (94.1%), *Helicobacter pylori* (10%) and *Aeromonas veronii* (0%).

Conclusions. Vitek-MSTM is a quick and useful method for identification of enteropathogenic bacteria. It is necessary to improve the performance of the system for the identification of *H. pylori* and *A. veronii*.

Key words: Maldí-tof; *Yersinia*; *Aeromonas*; *Helicobacter*; *Salmonella*

INTRODUCCIÓN

La identificación rápida y certera de patógenos gastrointestinales en el laboratorio clínico es esencial para el diagnóstico y tratamiento correctos de las infecciones causadas por estos agentes¹. Incluso cuando se estudian meticulosamente, en casi la mitad de los casos de diarrea el agente patógeno no puede ser identificado con métodos convencionales tales como

Correspondencia:
Carlos Ruiz de Alegría-Puig
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL (Servicio de Microbiología)
Avda. Valdecilla s/n Cp: 39008. Santander, España.
Tfno: 942 202520.
Fax: 942 203462.
E-mail: carlosrdap@hotmail.com

el cultivo, el inmunoensayo enzimático o la microscopía². En la actualidad disponemos de métodos rápidos para la detección de los virus enteropatógenos, mientras que para la identificación bacteriana los métodos convencionales son más lentos, algo que resulta contraproducente para el manejo de este tipo de enfermedades agudas. MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) es un sistema por el cual al incidir un rayo láser sobre un microorganismo, embebido en una matriz, se consigue ionizar una serie de proteínas del mismo, que tras ser sometidas a un campo eléctrico, migran por un tubo de vacío hasta un detector. Según la masa de cada proteína, calculada por el tiempo de vuelo (*time of flight*) por el tubo de vacío, se genera un espectro que se enfrenta a una base de datos permitiendo identificar la bacteria a estudio. La espectrometría de masas ha sido presentada como un método rápido y fiable para la identificación de bacterias y hongos^{3,4}. Sin embargo, la precisión analítica varía en función de las especies aisladas y los diferentes espectrómetros de masas, y se ha sugerido que las identificaciones erróneas de algunas cepas se relacionan principalmente con las bases de datos o con limitaciones de la propia técnica⁵. En este sentido, hasta el momento son pocos los datos publicados sobre su rendimiento en el estudio de bacterias enteropatógenas⁶, en particular los referidos al sistema MALDI-TOF Vitek-MS™ (v2 SARAMIS MS-ID, BioMérieux, Francia).

El objetivo de este estudio fue evaluar la correlación entre el sistema Vitek-MS™ y los métodos convencionales en la identificación de bacterias enteropatógenas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en el laboratorio de microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander. Se han incluido un total de 329 patógenos gastrointestinales obtenidos tanto del cepario del servicio de microbiología como de la rutina diaria en el año de duración del estudio: 110 *Campylobacter jejuni*, 81 *Salmonella enterica*, 58 *Yersinia enterocolitica*, 39 *Aeromonas hydrophila*, 20 *Helicobacter pylori*, 12 *Campylobacter coli*, 7 *Aeromonas sobria* y 2 *Aeromonas veronii*. Se ha llevado a cabo la identificación empleando, simultáneamente, Vitek-MS™ y métodos diagnósticos convencionales.

Identificación convencional. Para la identificación de *Y. enterocolitica*, *S. enterica* y *Aeromonas* spp. se emplearon los sistemas Microscan Walkaway-96 (Dade Behring, West Sacramento, USA), con paneles combo NC53 (Método 3), y Vitek2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) usando tarjetas N243 (Método 2). En el caso de *C. jejuni* y *C. coli* se llevó a cabo la identificación considerando el crecimiento en medio selectivo para *Campylobacter* (Oxoid, Wesel, Germany), la tinción de Gram, la prueba de oxidasa y la hidrólisis de hipurato siendo ésta última la que diferenció *C. jejuni* de *Campylobacter* spp. Para *H. pylori*, se empleó el cultivo en medios selectivos para *Helicobacter* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), la hidrólisis de urea, la prueba de oxidasa y la tinción de Gram.

Identificación genotípica. Las discrepancias resultantes entre la identificación convencional y la obtenida por el sistema Vitek-MS™ se resolvió mediante la realización de una PCR multiplex, en el caso de *Campylobacter* spp.⁷, o por secuenciación del gen 16S rRNA en los demás casos. Además, se secuenció el gen que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) como método adicional en la identificación genotípica de *Aeromonas* spp.⁸. El producto de PCR se purificó con el kit comercial NucleoSpin®Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Duren, Alemania) y se secuenció con el secuenciador ABI PRISM™ 377 (Applied Biosystems). Las secuencias de los aislamientos fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank usando el programa BLAST.

Identificación mediante espectrometría de masas. Los aislados se subcultivaron en agar sangre y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Las bacterias fueron depositadas en los pocillos correspondientes del portaobjetos con un asa estéril de 1 µl. Posteriormente se añadió 1 µl de la solución matriz (VITEK MS-CHCA: mezcla de 3,10 gr de ácido 2.5-dihidroxi benzoico disuelto en 100 ml de agua-etanol-acetonitrilo en proporción 1/1/1) a cada pocillo y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros de masas fueron generados con el sistema Axima Assurance (Shimadzu Corporation), usando el programa Shimadzu Launchpad software y la aplicación de la base de datos SARAMIS MS-ID v3.0 (AnagnosTee GmbH) para la medición automática e identificación (Método 1). Cada aislado se analizó por duplicado y únicamente fueron aceptadas como válidas puntuaciones del 99,9%.

RESULTADOS

La correlación entre los resultados obtenidos con el Vitek-MS™ y la identificación convencional fue del 100% en el caso de *C. jejuni* y *C. coli*. Para *S. enterica* y *A. hydrophila* se obtuvo una correlación del 100% entre el Vitek-MS™ y el sistema Microscan Walkaway y Vitek2, aunque con distintos porcentajes de identificación media (99,99% y 99,99%; 99% y 92,46%; 97,39% y 98,08% respectivamente (tabla1). Se encontraron discrepancias en el estudio de *Y. enterocolitica* con un 94,10% de concordancia entre Vitek-MS™ y el sistema de Microscan Walkaway, obteniéndose en este último tres muestras con bajo porcentaje de identificación, mientras que la concordancia del primero con Vitek2 resultó del 100% y con un porcentaje de identificación media del 97,00%, algo mayor que con Microscan Walkaway (96,93%). El sistema Vitek-MS™ únicamente identificó 2 cepas de *H. pylori*, y para las 18 cepas restantes el sistema mostró: 3 identificaciones erróneas, con el 99,9% de puntuación para *Bifidobacterium* spp., *Raoultella planticola* y *Aeromonas hydrophila/caviae*; 3 identificados como microorganismos distintos al *Helicobacter* (*Comamonas testosteroni*, *Lactobacillus delmeckii*, *Mycoplasma hominis*), con baja puntuación; en los 12 casos restantes el sistema asignó un error P150, referido a la ausencia del espectro en la base de datos (en este caso el fabricante recomienda repetir la adquisición, se repitió y el resultado fue el mismo). Por último, Vitek-MS™ tampoco identificó ninguna de las dos cepas de *A. veronii*,

Tabla 1 Correlación entre los resultados obtenidos por Vitek-MS™ y métodos de identificación convencionales.

	Vitek-MS™ Método 1 n	% de identificación media Método 1	Vitek2 Método 2 n	% de identificación media Método 2	Correlación (%) Método 1 + Método 2	Microscan Método 3 n	% de identificación media Método 3	Correlación Método 1 + Método 3
<i>Campylobacter jejuni</i>	110	99,99	110 ^c	NV	100			
<i>Campylobacter coli</i>	12	99,99	12 ^c	NV	100			
Grupo <i>Salmonella</i>	81	99,99	41	97,39	100	40	99	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	58	99,99	7	97	100	51	96,93	94,1% (42)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	39	99,99	23	98,08	100	16	92,46	100%
<i>Aeromonas sobria</i>	7	99,99	7	96,42	100			
<i>Aeromonas veronii</i>	2	0 ^a	2	0 ^b	0			
<i>Helicobacter pylori</i>	20	99,99 (5)	20 ^d	NV	10 (2)			

Entre paréntesis el número de identificaciones que han coincidido entre los diferentes métodos.

NV: no valorable

^aVitek-MS™ no identificó ninguna de las dos cepas de *A. veronii*, confundiéndolas con *A. hydrophila*, con porcentajes de identificación del 99,99% en ambos casos.

^bVitek2 no identificó adecuadamente estas dos cepas: no se obtuvo identificación en un caso y en el otro hubo una identificación errónea como *A. sobria* (97% en porcentaje de identificación).

^cMultiplex PCR

^dSecuenciación.

confundiéndolas con *A. hydrophila*, con porcentajes de identificación del 99,99% en ambos casos. Vitek2 tampoco identificó adecuadamente estas dos cepas: no se obtuvo identificación en un caso y en el otro hubo una identificación errónea como *A. sobria* (97% en porcentaje de identificación).

DISCUSIÓN

Un elevado porcentaje de cuadros de gastroenteritis aguda quedan sin diagnosticar. Del 60% de casos diagnosticados el 80% son de causa infecciosa y de éstos se calcula que un 15% son de origen bacteriano. A pesar de que un gran número de cuadros clínicos se resuelven con medidas de soporte sin necesidad de administrar tratamiento antibiótico, el conocimiento del agente causal es de gran importancia cuando la evolución clínica del proceso o los factores de riesgo del paciente indican la necesidad de instaurar tratamiento antibiótico debido a la etiología bacteriana y también por cuestiones epidemiológicas. *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son los géneros bacterianos que con más frecuencia causan gastroenteritis bacteriana. En este estudio se han demostrado los buenos resultados obtenidos con Vitek-MS™ con un 100% de identificación de ambos géneros. Los mismos porcentajes de identificación se han obtenido para *Y. enterocolitica* y aunque en el caso del género *Aeromonas* spp. se han producido errores en la discriminación de especie en *A. veronii*, éstas fueron incluidas dentro de su género y por lo tanto identificadas como patógeno intestinal.

Microscan Walkaway comporta dificultad en la identificación de algunas cepas de *Y. enterocolitica* tal como ya se apunta en la bibliografía⁹.

Este estudio muestra que Vitek-MS™ es una herramienta útil para una identificación rápida y precisa de bacterias gastrointestinales patógenas y podría, por tanto, reemplazar a los métodos tradicionales al permitir identificar estos microorganismos en cuestión de minutos tras su crecimiento en los medios de cultivo y además, lo hace con gran fiabilidad. Sería necesario ampliar este estudio con un mayor número de aislamientos de *H. pylori* y, en particular, de *A. veronii* y otras especies de *Aeromonas*. Estudios previos han indicado la dificultad de la identificación de *Aeromonas* spp. con MALDI-TOF, incluso con otros equipos de otros fabricantes distintos al Vitek-MS™^{10,11}. No obstante, la ampliación en el análisis de espectros es, con toda probabilidad, una de las mejoras a implementar.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización del estudio

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004;15:155-168.

2. de Wit MA, Kortbeek LM, Koopmans MP, de Jager CJ, Wannet WJ, Bartelds AI, et al. A comparison of gastroenteritis in a general practice-based study and a community-based study. *Epidemiol Infect* 2001;127:389-397.
3. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:547-603.
4. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, et al. Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33:372-8.
5. Martiny D, Visscher A, Catry B, Chatellier S, Vandenberg O. Optimization of *Campylobacter* growth conditions for further identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Microbiol Methods* 2013;94:221-3.
6. Denq J, Fu L, Wang R, Yu N, Ding X, Jiang L, et al. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *J Thorac Dis* 2014;6:539-44.
7. Persson S, Olsen KEP. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples *J Med Microbiol* 2005;54:1043-1047.
8. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997;26:1005-1011.
9. Rhoden DL, Smith PB, Baker CN, Schable B. AutoSCAN-4 system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1985;22:915-8.
10. Vávrová A, Balážová T, Sedláček I, Tvrzová L, Šedo O. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. *Folia Microbiol (Praha)* 2015;60:375-83.
11. Shin HB, Yoon J, Lee Y, Kim MS, Lee K. Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Med J* 2015;56(2):550-5.