

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

Evaluación del sistema MALDI-TOF VITEK MSTM para la identificación rápida de microorganismos de interés clínico

Realizada por: Carlos Ruiz de Alegría Puig

Dirigida por: Jesús Navas Méndez

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander, 5 Mayo 2021

Jesús Navas Méndez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Responsable del grupo Grupo de Biomedicina y Envejecimiento de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Evaluación del sistema MALDI-TOF VITEK MS™ para la identificación rápida de microorganismos de interés clínico”** que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía Carlos Ruiz de Alegría Puig, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Cantabria.

De acuerdo con la normativa vigente autorizo su presentación como director de la mencionada Tesis Doctoral.

Santander, 5 Mayo 2021

Fdo: Jesús Navas Méndez

AGRADECIMIENTOS

A Sara, por todo.

A mis hijos, que aunque no lo sepan, son mi acicate.

A mi familia, mis hermanos y sobre todo mis padres, porque ellos me enseñaron que “la constancia es la madre de todos los triunfos”.

Al servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla porque sin quererlo ya formáis parte de mí.

Al Doctor Jesús Navas, gracias a sus correcciones y enseñanzas culminó este trabajo.

Al Doctor Luis Martínez Martínez mi mentor, mi guía, mi maestro. Sin su paciencia y sabiduría este proyecto no habría llegado nunca a puerto, pero sobre todo por la bondad, su mejor emblema.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La identificación de los microorganismos.....	1
1.1.1. Introducción histórica	1
1.1.2. Introducción a la taxonomía bacteriana.....	3
1.1.3. Importancia de la identificación de los microorganismos patógenos ..	4
1.2. Métodos de identificación de microorganismos.....	5
1.2.1. Métodos fenotípicos de identificación.....	5
1.2.2. Métodos moleculares de identificación.....	10
1.2.2.1. Métodos genéticos.....	10
1.2.2.2. Métodos proteómicos.....	13
1.3. Aplicaciones de la espectrometría de masas	16
1.3.1. Complejo <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
1.3.2. <i>Rhodococcus equi</i> y <i>Dietzia</i> spp	28
1.3.3. <i>Candida</i> spp.....	30
1.4. Otras aplicaciones de la espectrometría de masas.....	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1. Evaluación inicial de la tecnología	34
3.1.1. Cepas bacterianas	34
3.1.2. Identificación mediante métodos clásicos	34
3.1.3. Identificación molecular.....	35
3.1.4. Identificación mediante MALDI-TOF	35
3.2. Identificación de cepas clínicas del complejo <i>Acinetobacter baumannii</i> ...	37
3.2.1. Cepas analizadas	38
3.2.2. Identificación mediante ARDRA	38
3.2.3. Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoB</i>	38
3.2.4. Identificación mediante EM MALDI-TOF	39
3.2.4.1. MALDI-TOF Vitek MS™	39
3.2.4.2. EM MALDI-TOF Biotyper.....	39
3.2.5. Tipificación de las cepas	41
3.3. Identificación de <i>Rhodococcus equi</i> y <i>Dietzia</i> spp.....	41
3.3.1. Cepas incluidas en el estudio.....	41
3.3.2. Identificación mediante EM MALDI-TOF	42
3.3.2.1. MALDI-TOF Vitek MS™.....	42
3.3.2.2. MALDI-TOF Bruker Biotyper.....	43

3.3.3. Método de referencia en la identificación	44
3.4. Identificación de <i>Candida</i> spp	44
3.4.1. Cepas de levaduras incluidas en el estudio	45
3.4.2. Identificación por métodos convencionales	45
3.4.3. Identificación mediante MALDI-TOF ViteK MS™	46
3.4.4. Método de referencia en la identificación	46
3.4.4.1. Identificación mediante PCR multiplex.....	46
3.4.4.2. Identificación mediante análisis de la región ITS	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Evaluación inicial de la plataforma Vitek MS™	48
4.2. Identificación de cepas clínicas del complejo <i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>calcoaceticus</i> (ABC)	50
4.2.1. Asignación previa de las cepas.....	50
4.2.2. Aplicación de la tecnología EM MALDI-TOF a la identificación de cepas clínicas del complejo ABC	50
4.3. Identificación de <i>R. equi</i> y <i>Dietzia</i> spp	54
4.3.1. Asignación previa de las cepas.....	54
4.3.2. Aplicación de la tecnología EM MALDI-TOF a la identificación de <i>R. equi</i> y <i>Dietzia</i> spp	55
4.3.2.1. Identificación mediante la plataforma Vitek MS™	55
4.3.2.2. Identificación mediante la plataforma Biotyper.....	56
4.4. Identificación de <i>Candida</i> spp	60
5. DISCUSIÓN	64
6. CONCLUSIONES.....	72
7. BIBLIOGRAFÍA	74
8. PUBLICACIONES	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la identificación microbiológica mediante tres sistemas comerciales automatizados según bibliografía.....	9
Tabla 2. Correlación del sistema MALDI-TOF con los sistemas tradicionales de identificación en microbiología clínica	49
Tabla 3. Resultados de identificación por los dos sistemas MALDI-TOF evaluados	52
Tabla 4. Comparación de los resultados de identificación de las especies de <i>Acinetobacter</i> pertenecientes al complejo ABC mediante distintas versiones de bases de datos de los sistemas Vitek MS TM y Biotyper	53
Tabla 5. Identificación de <i>R. equi</i> (n=144) y <i>Dietzia</i> spp. (n=10) mediante Vitek MS TM versus Bruker Biotyper.....	58
Tabla 6. Comparación de los resultados de identificación de los 154 aislamientos de <i>R. equi</i> y <i>Dietzia</i> spp. con los sistemas Vitek MS TM y Biotyper MALDI-TOF MS utilizando dos métodos para la preparación de las muestras	59
Tabla 7. Identificación de <i>Candida</i> spp. mediante API 32C y Vitek MS TM	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacciones enzimáticas para la identificación de microorganismos	2
Figura 2: Galerías API para la identificación microbiana	5
Figura 3: Sistema de identificación automática microbiana Vitek 2	7
Figura 4: Sistema de identificación automática microbiana MicroScan	8
Figura 5: Sistema de identificación por espectrometría de masas Vitek MS™....	20
Figura 6: Sistema de identificación por espectrometría de masas MALDI Biotyper	22
Figura 7: Esquema general para la identificación de bacterias y hongos usando el MALDI-TOF MS	36
Figura 8: Esquema general para el análisis de MS de los aislamientos microbiológicos ionizados.....	37

ABREVIATURAS

ABC	<i>Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
16S rDNA	Gen codificante del ácido ribonucleico ribosómico 16S
API	índice de perfil analítico
ARDRA	Restricción de ADN ribosómico amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
16S rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico 16S
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
AUC	Área bajo la curva
CAMP	Test de Christie, Atkins y Munch-Petersen
<i>choE</i>	Gen que codifica una colesterol oxidasa
<i>cols.</i>	Colaboradores
Da	Dalton
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
FAB	Bombardeo rápido de átomos
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxycinámico
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
IC	Intervalo de confianza
IGS	Región espaciadora intergénica
ITS	Región espaciadora de transcripción
IVD	Uso para diagnóstico <i>in vitro</i>
K	Coeficiente kappa
kDa	Kilodalton
MALDI	Laser de desorción/Ionización asistido por matriz
MALDI-TOF	Laser de desorción/Ionización asistido por matriz con tiempo de vuelo
MSP	Listado de espectros principales
Ne	Neón
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
REP-PCR	PCR extragénica palindrómica repetitiva
<i>rpoB</i>	Gen codificante para la subunidad β de la ARN polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RUO	Únicamente para uso en investigación

SIMS	Espectrometría de masas de iones secundarios
TOF	Tiempo de vuelo
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La identificación de los microorganismos

1.1.1. Introducción histórica

La identificación de los microorganismos ha sido una de las principales tareas del microbiólogo a través de los tiempos. Desde Antoni van Leeuwenhoek, uno de los pioneros en la construcción y utilización del microscopio, pasando por Robert Koch hasta Louis Pasteur, todos han buscado descubrir y clasificar los microorganismos. La asociación de características organolépticas a algunos grupos de microorganismos fue una primera aproximación a su identificación. Más tarde, con la asociación de características fenotípicas, entraríamos en el principio de lo que podemos considerar una auténtica taxonomía de los microorganismos. La observación de que diferentes microorganismos expresaban diferentes actividades enzimáticas, como la hidrólisis de urea o la producción de indol, fue utilizada para agruparlos, estableciendo diferentes grupos.

Tradicionalmente, al observar el paisaje cotidiano de un laboratorio de microbiología clínica, se podían contemplar filas interminables de tubos en los que se desarrollaban diferentes reacciones, cuyos productos con frecuencia mostraban vistosos colores.

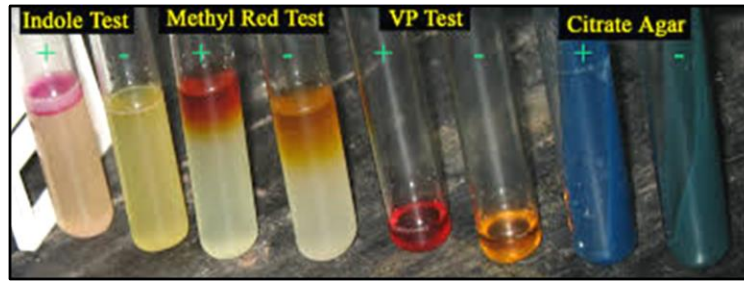


Figura 1: Reacciones enzimáticas para la identificación de microorganismos.
<https://es.wikipedia.org/wiki/IMVIC>

La ejecución de las reacciones enzimáticas en esos tubos, de 10-20ml de volumen, limitaba el número de análisis que se podían realizar, por lo que la tecnología evolucionó hacia la miniaturización, produciéndose las reacciones en pequeñas galerías que concentraban en unos cuantos pocillos todas las pruebas, lo que condujo a menor necesidad de espacio y, por tanto, a la realización de un mayor número de identificaciones¹. Todo esto, siempre acompañado por cultivos selectivos que ayudaban en la caracterización de muchos géneros y algunas especies.

Y finalmente llegó la automatización. Durante muchos años las bacterias se han identificado por procedimientos básicamente manuales, pero la necesidad de aumentar tanto la calidad como el número de identificaciones ha hecho de la automatización un gran aliado en el laboratorio de microbiología clínica². La posibilidad de realizar cientos de pruebas bioquímicas mediante procedimientos automatizados ha permitido responder con eficiencia a la necesidad de realizar más pruebas con una disponibilidad presupuestaria limitada, además de mejorar la trazabilidad y la estandarización, lo que ha concluido en una respuesta eficiente a la presión asistencial y económica³. Las técnicas fluorométricas realizadas en microplacas han perdurado hasta nuestros días, pero el concomitante uso de tarjetas y cassetes generaba

muchos residuos y, en ocasiones, los equipos se averiaban paralizando el funcionamiento habitual del laboratorio.

Una gran evolución en la identificación ha sido la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los laboratorios^{4,5} y, sobre todo, la implementación de la secuenciación del ARN ribosómico (ARN_r) 16S^{6,7}. La secuenciación del gen codificante para el 16S rRNA es la técnica de referencia para la identificación de las bacterias a nivel de especie. Sin embargo, no forma parte de la rutina de la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, debido a su alto coste, y a la necesidad de personal especializado.

1.1.2. Introducción a la taxonomía bacteriana

La taxonomía (taxis=orden, rango) es la ciencia que se encarga de agrupar y organizar la gran cantidad de organismos existentes en una estructura jerárquica sin superposiciones, en función de sus características, asignándoles una nomenclatura o asignación de nombres, estableciendo taxones (grupos de organismos semejantes) según unas normas preestablecidas e identificándolos asociando un microorganismo a un determinado taxón⁸.

Los primeros microbiólogos intentaron realizar una clasificación similar a la realizada por los botánicos, como Carl von Linneo, configurando una sistemática filogenética para los metazoos. Sin embargo, los microorganismos eran más simples morfológicamente y con un desarrollo muy diferente, lo cual les hizo desistir. La introducción del microscopio en los laboratorios hizo posible

la clasificación de los microorganismos sin núcleo en el reino de las Procariotae, tal y como propuso Murray en 1968. Con las nuevas técnicas de biología molecular se clasificaron las estructuras celulares en los tres dominios conocidos actualmente, por encima del reino: Bacteria, Archaea y Eukarya⁹.

1.1.3. Importancia de la identificación de los microorganismos patógenos

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología clínica es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones que tienen relación con el ser humano. Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica hasta finales del siglo pasado lo constituye la identificación a nivel de especie de un aislamiento microbiano¹⁰. Por ejemplo, en el campo de los hongos patógenos que causan infecciones sistémicas, la identificación a nivel de especie se consideraba como un mero asunto académico sin demasiada importancia práctica. Pero en las dos últimas décadas esta situación ha cambiado. Por un lado, aumenta la población susceptible de adquirir una infección sistémica causada por hongos, lo que conlleva un aumento de la incidencia de esta patología, y por otro, aparecen nuevos antifúngicos. Estos dos hechos, entre otros aspectos, conducen a la introducción de nuevas especies patógenas que conviven o desplazan a las habituales. Actualmente la resistencia secundaria a los antifúngicos no es un problema tan grave como el que ocurre con los antibacterianos. Esto significa que las especies patógenas

de hongos que causan infección con más frecuencia tienen un patrón de sensibilidad o resistencia bastante presumible. Sin embargo, es sólo cuestión de tiempo que este panorama cambie. Por tanto, es necesario concienciar a todos los profesionales involucrados de la necesidad de aislar, e identificar al nivel de especie, el hongo causante de la infección. Esta información ayuda, de forma indudable, a elegir el tratamiento más adecuado y nos prepara para asumir la siguiente fase, en la que la detección individualizada de las cepas resistentes será una necesidad^{11,12}.

1.2. Métodos de identificación de microorganismos

1.2.1. Métodos fenotípicos de identificación

Los métodos de identificación bacteriana fenotípica se pueden clasificar en dos grandes grupos: manuales y automatizados. Entre los primeros encontramos los sistemas API, que consisten en una serie de pocillos dispuestos en una galería, en los que se desarrollan varias reacciones enzimáticas o la asimilación de sustratos, producidas por el microorganismo inoculado. El resultado de estas reacciones permite generar un código que se relaciona con un determinado género, e incluso especie, de bacterias. Estos sistemas son baratos pero lentos en su mayoría y poco específicos^{13,14}.



Figura 2: Sistemas API para la identificación microbiana.

(<http://www.ganbaro.com.ve/productos/microbiologia-industrial/identificacion-microbiana/>)

La automatización, como hemos mencionado anteriormente, permitió aumentar la productividad, a pesar de la escasez en recursos humanos y materiales¹⁵. Algunos de los sistemas automatizados, comercializados, de identificación bacteriana más utilizados han sido: BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, EEUU), Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) o MicroScan (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU)¹⁶.

- El sistema BD Phoenix, junto con los paneles de identificación, determina el crecimiento utilizando una reacción de oxidación-reducción y un desarrollo de turbidez, proporcionando resultados precisos y rápidos de identificación y sensibilidad para la mayoría de las bacterias gramnegativas y grampositivas, aerobias y anaerobias facultativas, clínicamente significativas, así como la identificación de levaduras y organismos similares a las levaduras. Comparando este sistema con los métodos convencionales de identificación la concordancia es alta, oscilando entre el 100% para los cocos grampositivos o el 96.0% para los no fermentadores gramnegativos, y el 92.5% para los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*¹⁷, además del 97,3% para levaduras¹⁸. Si esta comparación se hace con los modernos sistemas basados en proteómica, éstos pueden llegar a identificar correctamente el 85% de los aislados de bacilos gramnegativos poco frecuentes a nivel de género y en el 56% también la especie, mientras que con el BD Phoenix solamente se alcanza el 52% a nivel de género y el 34% de las especies¹⁹. Sin embargo, en el terreno de las levaduras, esa misma comparación entre sistemas revela una concordancia de hasta el 95%²⁰.

- Vitek 2 es un sistema que utiliza tarjetas con sustratos, las cuales son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y donde el perfil de desarrollo fluorométrico es interpretado de forma automática. Los sustratos de las tarjetas reactivas miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. Están descritos porcentajes de identificación del 79,8% en cocos grampositivos, aislamientos caracterizados utilizando métodos de identificación de referencia y pruebas de sensibilidad antimicrobiana, aunque la identificación de algunos *Enterococcus* y especies relacionadas presenta dificultades²¹. El 97,8% de las enterobacterias²² y 88,4% de las levaduras se han identificado correctamente con este sistema²³. Pero también, como otros métodos fenotípicos convencionales, tiene dificultades para discriminar el complejo *Burkholderia cepacia*²⁴, o identificar *Acinetobacter* sp. a nivel de especie²⁵.



Figura 3: Sistema de identificación automática microbiana Vitek 2.
(<https://spanish.alibaba.com/product-detail/biomerieux-vitek-2-microbiology-analyzer-and-reagents-62013044368.html>)

- MicroScan es otro sistema automatizado que se basa en la fluorimetría, en el que se realizan pruebas bioquímicas y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos con sustratos deshidratados. Están descritos porcentajes de identificación del 88,8% en enterobacterias y bacterias

gramnegativas no fermentadoras²⁶, 94,6% de los *Staphylococcus* coagulasa negativa²⁷, 98,5% para *Enterococcus*²⁸ y 85,9% para las levaduras²³.

Un trabajo interesante, en el que se comparan los tres sistemas, sería el publicado por Jin y cols.²⁹, en el que se concluye que el mejor de los tres sería Vitek 2, con un 93,7% de identificaciones precisas a nivel de especie, seguido muy de cerca por Phoenix (93,0%) y algo más alejado se encontraría MicroScan, con un 82,4% de identificaciones correctas²⁹. Pero son muchos los trabajos que avalan la validez de los tres sistemas y que se resumen con una pequeña muestra en la tabla 1.

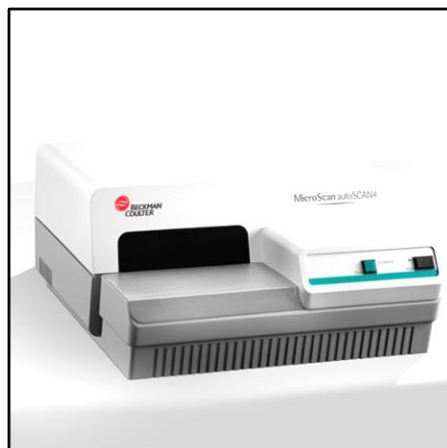


Figura 4: Sistema de identificación automática microbiana
MicroScan.

(<http://dikysa.com.mx/index.php/producto/microscan-autoscan-4-system-beckman-coulter/>)

Tabla 1: Resultados de la identificación microbiológica mediante tres sistemas comerciales automatizados, según bibliografía

	Cocos grampositivos		Enterobacterias		Levaduras		General	
Phoenix	Stefaniuk E. y cols. ¹⁷ Brigante G y cols. ³⁰ Fahr AM y cols. ³¹ Layer F y cols. ³²	100% 90,5% 97,9% 66,7%	Stefaniuk E. y cols. ¹⁷ Snyder JW y cols. ³⁷ Park BY y cols. ³⁸ Gherardi G y cols. ³⁹	92,5% 98,7% 97,2% 96%	Grant ML. y cols. ¹⁸ Er H y cols. ⁴³ Kanesaka I y cols. ⁴⁴	97,3% 99,2% 96,2%	Jin WY. y cols. ²⁹	93,00%
Vitek 2	d'Azevedo PA. y cols. ²¹ Kim M y cols. ³³ Layer F y cols. ³² Galvão da Silva y cols. ³⁴	79,8% 87,5% 74,1% 77,9%	Pérez-Vázquez M. y cols. ²² Guo L y cols. ⁴⁰ Gherardi G y cols. ³⁹ Quesada MD y cols. ⁴¹	97,8% 93,1% 98% 96,5%	Ferrara G. y cols. ²³ Riddle DL y cols. ⁴⁵ Ochiuzzi ME y cols. ⁴⁶	88,4% 95% 98,3%	Jin WY. y cols. ²⁹	93,70%
MicroScan	Iwen PC. y cols. ²⁸ Patteet L y cols. ³⁵ Kim M y cols. ³³ Grant CE y cols. ³⁶	98,5% 94,6% 82,5% 79%	O'Hara CM. y cols. ²⁶ Quesada MD y cols. ⁴¹ Snyder JW y cols. ³⁷ Gavini F y cols. ⁴²	88,8% 93,8% 97,7% 95,4%	Ferrara G. y cols. ²³ Riddle DL y cols. ⁴⁵ Germain GSt y cols. ⁴⁷	85,9% 82% 96,6%	Jin WY. y cols. ²⁹	82,40%

Están claras las ventajas de los métodos automatizados respecto a los manuales, como son la rapidez de identificación, estandarización o disminución de errores post-analíticos, pero aún quedarían desventajas por mejorar, como son el alto coste, y el tiempo de respuesta⁴⁸.

1.2.2. Métodos moleculares de identificación.

1.2.2.1. Métodos genéticos

Las técnicas moleculares permiten la detección de material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN), o de otras moléculas que forman parte de la célula bacteriana. Las más utilizadas se basan en la detección de ácidos nucleicos, principalmente del ADN. Entre ellas, la PCR es la que ha adquirido un mayor valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes infecciosos, además de caracterizar sus genotipos de virulencia y de resistencia. A partir del material genético se realiza un proceso de amplificación de una región específica, delimitada por los llamados cebadores o iniciadores, que consiste en 3 fases: (i) desnaturalización del ADN por calentamiento a 95°C, (ii) hibridación de los cebadores a temperatura entre 50 y 60°C -en función de la longitud y composición de los cebadores- y (iii) extensión catalizada por una polimerasa termoestable. La repetición de este proceso durante 20-40 ciclos permite obtener millones de copias de la región delimitada por los cebadores, lo que le confiere una elevada sensibilidad⁴⁹. Aunque una versión primitiva de la PCR se había puesto en práctica con anterioridad⁵⁰, su descubrimiento se materializó en 1985 por K. Mullis (premio Nobel de Química en 1993), gracias a avances previos como la síntesis in vitro

de oligonucleótidos (nucleósidos trifosfato) desarrollada por H. Kornberg (premio Nobel de Medicina en 1958), y la introducción de las polimerasas termoestables.

La PCR puede complementarse con la secuenciación de los productos de esta reacción. Si se amplifican determinadas secuencias, como la región hipervariable del gen ADN ribosómico (ADNr) 16S, donde se concentran la mayoría de diferencias nucleotídicas entre especies, su secuenciación posterior permite obtener información clave para la identificación de cepas bacterianas, como mínimo a nivel de género, y muchas veces a nivel de especie. Esta técnica combinaría la realización de una PCR, con cebadores universales, con posterior lectura de los fragmentos mediante un secuenciador y final análisis de las secuencias utilizando herramientas como EzTaxon⁵¹ y BLAST⁵². El resultado obtenido se presenta recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el número de acceso de la secuencia de la cepa tipo de la especie que presenta el mayor grado de identidad.

En el caso de los hongos se utilizan, con el mismo objetivo, las regiones inter-espaciadoras o ITS (Internal Transcribed Spacer). En el genoma de las levaduras se encuentran varias copias de los genes 5,8S, 18S y 23S repetidas en tándem, que se denominan unidades de transcripción. Las secuencias de estos genes están separadas por dos espaciadores internos, llamados ITS-1 e ITS-2, de una longitud de entre 200 y 400 bases. Entre las unidades de transcripción hay un espaciador intergénico que no se transcribe, llamado IGS (non-transcribed intergenic spacer). Las zonas no codificantes del ADNr nuclear

(ITS-1, ITS-2 e IGS) son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas.

La introducción de estos sistemas de identificación basados en la PCR supuso un importante avance, que permitía identificar de forma precisa una bacteria crecida en placa e incluso directamente a partir de la muestra biológica. La PCR básica o convencional evolucionó hacia la PCR a tiempo real (RT-PCR), que ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de ensayos moleculares para una amplia gama de agentes infecciosos con interés clínico, debido a sus ventajas, como simplicidad, precisión, reproducibilidad, exactitud, procesos de control de calidad, rapidez y menor riesgo de contaminación⁵³. Se han descrito varias técnicas basadas en la PCR, y entre ellas mencionamos por su gran utilidad en el diagnóstico microbiológico la PCR multiplex⁵⁴, que utiliza cebadores específicos para hasta 15-20 microorganismos diferentes, permitiendo incluir a bacterias y hongos en la misma reacción. Estas aplicaciones han sido mejoradas y comercializadas, en muchas ocasiones por la industria. Entre ellas se puede mencionar, a modo de ejemplo, el sistema FilmArray (FA; Idaho Technology, Salt Lake City, UT, USA), que consiste en una PCR múltiple que permite detectar 11 especies bacterianas y 5 de levaduras en una hora. Su sensibilidad es del 83-100% y la especificidad es >99%, dependiendo del patógeno estudiado⁵⁵. A pesar de todos estos avances en tecnologías moleculares, siguen existiendo microbiólogos que los compatibilizan con algunos métodos convencionales para la identificación, sobre todo, de algunas subespecies de bacterias y hongos^{56,57}.

Finalmente, un nuevo sistema en el diagnóstico microbiológico que se está introduciendo en los laboratorios de microbiología, es la secuenciación masiva. La continua mejora y desarrollo de los métodos de secuenciación ha permitido la accesibilidad del genoma completo a los laboratorios, lo cual implica gestionar una gran cantidad de información con nuevas herramientas bioinformáticas. Una de las grandes ventajas de la secuenciación masiva es la universalidad con la posibilidad de obtener el genoma completo de cualquier especie microbiana. A pesar de esto, casi todos los esfuerzos se han dirigido a las bacterias, pero hay muchos campos dentro de la microbiología, especialmente la virología, donde se está descubriendo su relevancia⁵⁸.

1.2.2.2. Métodos proteómicos

La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis que permite caracterizar muestras midiendo las masas (estrictamente la relación masa/carga) de las moléculas componentes. Cuenta con más de un siglo de historia y evolución tecnológica y a lo largo de los años ha ampliado su alcance desde los isótopos a moléculas pequeñas, moléculas orgánicas más complejas y, en las últimas décadas, macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). Los tubos de Crookes, o tubos de rayos catódicos, fueron los primeros dispositivos que se utilizaron para estudiar las propiedades de la materia. Eran tubos de cristal que contenían gases muy rarificados a través de los que se hacían pasar descargas eléctricas. Arthur Schuster y posteriormente J.J. Thomson —ambos en el Laboratorio Cavendish de la Universidad de Cambridge— los utilizaron para estudiar la desviación (deflexión) de las trayectorias de los rayos producida por campos eléctricos y magnéticos. En 1897, Thomson, Premio

Nobel de Física en 1906, llegó a la conclusión de que los rayos catódicos estaban formados por partículas muy ligeras con carga negativa (los electrones), determinando su relación masa-carga. F.W. Aston, junto con Thomson, observó que el gas neón está formado por dos isótopos que pueden separarse y diferenciarse por su masa (Ne^{20} y Ne^{22}). Durante los años siguientes, Aston desarrolló el equipo para conseguir mayor resolución y lo aplicó al estudio de los isótopos no radioactivos, trabajos por los que recibió el Premio Nobel de Química en 1922. Durante las décadas siguientes se introdujeron en los equipos modificaciones para enfocar las partículas desviadas y mejorar la resolución. Se introdujeron también sistemas de ionización que ampliaban el rango de materiales que podían analizarse. Durante este período las principales aplicaciones de la EM fueron el análisis y la obtención de isótopos. Para esta última aplicación se construyeron grandes equipos preparativos, como el Calutron, que se utilizó para producir el uranio-235 de las primeras bombas atómicas. Los equipos basados en la deflexión producida por un campo magnético, o por combinaciones de campos eléctricos y magnéticos con diversas geometrías, fueron los más utilizados durante la segunda mitad del siglo XX. Sin embargo, ya en los años cuarenta y cincuenta del siglo XX aparecieron esquemas de separación de masas diferentes, como el tiempo de vuelo (TOF), los cuadrupolos o las trampas de iones. El sistema TOF, fue diseñado en 1946 por W.E. Stephens, entonces en la Universidad de Pensilvania. En este sistema, la separación de los iones se produce al acelerarlos en un campo eléctrico; todos los iones sometidos al campo adquieren la misma energía cinética, lo que implica que los de menor relación masa-carga alcanzan mayor velocidad. En el diseño más básico, los iones

siguen una trayectoria rectilínea de longitud conocida entre el campo eléctrico y el detector, y lo que se mide es el tiempo que tardan en llegar de un punto a otro. Aunque inicialmente no podían competir en resolución con los equipos de deflexión, estos sistemas han resultado ser más rápidos y más baratos, y con el tiempo han incorporado mejoras que les han permitido ser muy competitivos en diversas áreas. La ionización de la muestra es otro aspecto de la tecnología que ha evolucionado para ampliar el rango de muestras analizables. Las descargas eléctricas utilizadas en los primeros equipos eran demasiado energéticas para permitir el análisis de moléculas complejas. En 1959, la introducción de la ionización por impacto de electrones permitió acoplar la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas de tipo TOF y abrió la puerta al análisis de moléculas orgánicas. Durante las décadas siguientes se desarrollaron métodos de ionización más suaves (soft ionization), como la ionización por haces de iones (SIMS, secondary ion mass spectrometry) en 1950, la ionización química en 1966, los diferentes métodos de desorción (de campo en 1969, por plasma o por láser en 1974, MALDI en 1985), la ionización por electrospray (ESI, electrospray ionization) en 1968, o de átomos (FAB, fast atom bombardment) en 1981, permitiendo el análisis de moléculas no volátiles, frágiles, o de alto peso molecular. Hasta los años 80 del siglo XX no se ionizaban moléculas mayores de 1.500 Da, y no se creía posible ionizarlas, ya que son muy frágiles y se creía que se fragmentarían al intentar ionizarlas. En 1988 Koichi Tanaka demostró que se podía ionizar la lisozima (14.300 Da), mezclándola con una solución compuesta por polvo metálico muy fino y glicerol⁵⁹. En el mismo año Michael Karas y Franz Hillenkamp consiguieron ionizar la albúmina (66.600 Da)⁶⁰. Estos tres científicos recibieron el premio

Nobel de Química de 2002 por la aplicación de la espectrometría de masas al análisis de moléculas biológicas.

Finalmente, hay que recordar que, durante el último cuarto del siglo XX, el desarrollo de los componentes electrónicos y de la informática (hardware y software) ha dado un enorme impulso a todo este conjunto de tecnologías proporcionando detectores más rápidos y más sensibles, mayor potencia de computación y almacenamiento de datos, equipos más pequeños, más baratos y más robustos y, en definitiva, sacando la EM del laboratorio especializado y convirtiéndola en una herramienta accesible para muchos otros laboratorios^{61,62}.

1.3. Aplicaciones de la espectrometría de masas

La primera descripción sobre el uso de la EM en bacteriología fue en 1975⁶³. La tecnología se desarrolló para estudiar los perfiles de marcadores de algunas especies bacterianas, y utilizó la ionización por bombardeo de átomos rápidos y la asociación de cromatografía de gases y EM. La dificultad radicaba en detectar las proteínas ribosómicas y de membrana sin destruirlas para analizar sus perfiles y obtener espectros de patrones de masas. Este alentador estudio no fue seguido por ningún otro desarrollo hasta 1996. En ese año, el primer experimento de EM en el que se utilizó el laser de ionización/desorción asistido por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) logró identificar bacterias directamente de colonias completas basadas en su contenido de proteínas^{64,65}. Sin embargo, la novedad más importante correspondió al sistema de detección por técnicas de ionización blanda como el MALDI y la ionización por

electropulverización (ESI), que permiten el análisis de biomoléculas y moléculas orgánicas grandes, que tienden a ser frágiles cuando son ionizadas por los antiguos métodos de ionización⁶⁶. El desarrollo continuo del hardware proporcionó precisión y resolución crecientes en la identificación de las diferentes proteínas, y el MALDI-TOF empezó a utilizarse de facto para la identificación de bacterias en laboratorios de investigación⁶⁴. Después de este período, se desarrollaron los nuevos enfoques para la identificación de especies que implicaban el uso de una matriz diferente. Las matrices utilizadas en la espectrometría de masas MALDI-TOF son compuestos que contienen en su estructura un anillo bencénico conjugado que absorbe la energía UV irradiada por el láser y que se volatilizan fácilmente formando iones en una cámara de alto vacío. La matriz permite la producción de iones intactos en fase gaseosa de biomoléculas de gran tamaño, no volátiles y termolábiles, como las proteínas. La matriz más utilizada en microbiología clínica es el ácido alfa-ciano-3,4-hidroxicinámico (HCCA).

El cambio de matriz permitió la ionización de las proteínas ribosómicas, que están más conservadas que las proteínas de superficie⁶⁷. Esto se consideró más fiable para la identificación de rutina de especies bacterianas, ya que las condiciones de cultivo no afectan a los resultados de la identificación⁶⁸. Por tanto, la EM se convirtió en una herramienta revolucionaria para los laboratorios de bacteriología.

EM MALDI-TOF permite obtener en unos minutos la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y

hongos filamentosos⁶⁹. La denominación «MALDI» proviene de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, y «TOF» alude al analizador de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (*time of flight*)⁷⁰. Para realizar el análisis mediante MALDI-TOF es necesario que las proteínas de los microorganismos se ionicen. Para ello, las colonias de microorganismos se depositan sobre una placa, y a continuación sobre esa muestra se deposita una solución matriz. Después, la placa es introducida en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de un láser de 337 nm de longitud de onda en la zona ultravioleta del espectro, con lo que la matriz absorbe la energía del láser produciéndose la sublimación del analito y de la matriz. La irradiación tiene lugar en forma de pulsos cortos, para evitar un calentamiento excesivo y la degradación de la muestra. El láser, además, se centra en una porción mínima del pocillo y se va moviendo a través del mismo con una trayectoria definida, que normalmente viene programada por el fabricante, dependiendo del propósito de lectura de la muestra.

La interacción entre los fotones del láser y la muestra provoca que la matriz sublime al estado gaseoso, arrastrando consigo la muestra problema y produciéndose inmediatamente la ionización. Además, como la mayor parte de la energía es absorbida por la matriz, la muestra se ionizará sufriendo fragmentaciones mínimas. Ya en fase gaseosa, la estabilización de la matriz tiene lugar mediante la liberación de protones que, en parte, son captados por las proteínas de las bacterias, generándose fragmentos de proteínas con carga positiva, pero también un ión sodio o potasio, lo cual tendrá que ser tomado en cuenta en la relación de masas final de la muestra a analizar. Por otro lado, hay

que tener en cuenta que es despreciable el porcentaje de moléculas cargadas con una carga superior a 1 por lo que, en realidad, los fragmentos se separan en función de su masa. Mediante un electrodo se genera un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas. De esta forma, los iones entran en un tubo (de 1 a 4 m de longitud) con la misma energía cinética y siguiendo una trayectoria lineal. Así, el tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a la relación masa/carga (m/z) de los mismos. En última instancia está el detector de los iones previamente separados. Si la carga (z) es igual a uno, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI-TOF, el espectro de masas es la representación de la intensidad frente a la masa de los iones formados^{71,72}.

Entre todos los sistemas basados en proteómica, EM MALDI-TOF se ha convertido, en la última década, en una herramienta fundamental para la identificación microbiana en los laboratorios de microbiología clínica, ya que resulta más rápido y fiable que los sistemas tradicionales de identificación⁷³. El rango de masas de interés está entre los 2.000 y los 20.000 Da. La mayoría de los picos de masas obtenidos en este rango representan proteínas ribosómicas. El conjunto de estos picos de masas constituye el espectro del microorganismo, o huella peptídica, concepto que hace alusión a la singularidad del espectro generado para cada especie microbiana. La identificación de los microorganismos se realiza en base a su huella peptídica. En este método, las proteínas del microorganismo a identificar son hidrolizadas en pequeños péptidos y se obtiene el correspondiente espectro de masas del

hidrolizado. Esta huella, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos, de tal forma que la huella problema se puede asociar con la huella más semejante y obtener así la identificación del microorganismo^{74,75}.

En el mercado existen en la actualidad básicamente dos plataformas comerciales de espectrometría de masas para el análisis de microorganismos: VITEK®MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EEUU)⁷⁶. Aunque los principios técnicos de los sistemas VITEK®MS y MALDI Biotyper® son similares, existen diferencias en las bases de datos de espectros de referencia, en los sistemas operativos y en los algoritmos empleados para la identificación, por lo que los resultados numéricos de ambos sistemas no son directamente comparables⁷⁷.

- Sistema VITEK®MS: La base de datos SARAMIS fue creada por Anagnostec GmbH (Zossen, Alemania) y comercializada por Shimadzu junto con los espectrómetros de masas Axima (Shimadzu, Columbia, MD), antes de ser adquirida por bioMérieux en el año 2010 para su incorporación a la plataforma VITEK®MS⁷⁸.



Figura 5: Sistema de identificación por espectrometría de masas Vitek MS™.

(<https://www.biomerieux-industry.com/es/products/vitek-ms-rapid-identification-microorganisms-mass-spectrometry>)

En la actualidad el sistema VITEK®MS posee dos configuraciones: In Vitro Diagnostic (IVD) y Research Use Only (RUO), completamente separadas. El módulo RUO está avalado para uso en investigación y posee una base de datos abierta de espectros de referencia y “super espectros”, siendo éstos últimos conglomerados de espectros de al menos 15 aislamientos, obtenidos bajo diferentes condiciones de crecimiento e identificados por métodos ampliamente aceptados, como fenotipificación bioquímica o genotipificación. Este módulo permite determinar la relación de los diferentes aislamientos y llevar a cabo una agrupación jerárquica de los mismos, representando los resultados en dendrogramas. Permite también la creación de nuevos “super espectros” que sean representativos de un entorno particular⁷⁶. Para la configuración IVD del sistema VITEK®MS, el software compara el espectro obtenido con el espectro esperado de cada organismo o grupo de organismos contenido en la base de datos, obteniendo una identificación con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad y el número de opciones de microorganismos posibles. El porcentaje de probabilidad o similitud se refiere al tanto por ciento en que el espectro observado se asemeja al espectro típico de cada organismo (índice poblacional). El rango de

porcentajes para una identificación correcta es 60-99% y valores cercanos a 99,9% indican una aproximación más exacta. Cuando el porcentaje de probabilidad es menor del 60% el microorganismo se considera como no identificado⁷⁸. La base de datos tiene un total de 1.046 especies en IVD, con un 5% de especies consideradas no patógenas.

- Sistema MALDI Biotyper®: fue creado y comercializado por Bruker Daltonics (Billerica, MA). El paquete del software Biotyper®, acoplado a los espectrómetros de masas de la línea Flex, es una plataforma abierta que permite guardar los espectros analizados para expandir la base de datos.



Figura 6: Sistema de identificación por espectrometría de masas MALDI Biotyper.

(<https://www.directindustry.es/prod/bruker-daltonics/product-30029-1572777.html>)

También posee dos configuraciones (IVD y RUO) pero no están separadas y se obtiene la información del tipo de configuración, de donde se

ha obtenido el espectro tipo, en el resultado impreso. En el sistema MALDI Biotyper® el espectro del microorganismo es traducido electrónicamente a una lista de picos que es comparada, mediante el uso de un algoritmo estadístico, con las listas de picos de los microorganismos contenidos en la base de datos de referencia según una cepa tipo (índice de tipicidad). El sistema emplea un valor de puntuación que oscila entre 0,000 y 3,000, que correlaciona la similitud del microorganismo de prueba, a nivel del género y de la especie, dentro de la base de datos. Una puntuación que oscila entre 2,300 y 3,000 es interpretada por el software como una identificación altamente probable a nivel de especie. Las puntuaciones de registro entre 2,000 y 2,299 representan la identificación segura del género y la identificación probable a nivel de especie. En ambos casos, los resultados suelen liberarse como una identificación positiva. Las puntuaciones de registro que van desde 1,700 a 1,999 representan una probable identificación de género, que requiere pruebas adicionales para identificar la especie. Las puntuaciones de registro que van desde 0,000 a 1,699 no se consideran una identificación fiable^{79,80}. La base de datos en la v4.0.0.0, a modo de ejemplo, tenía un total de 2.428 especies en IVD y 2.509 en RUO, con un 15% de especies no patógenas. Respecto a las micobacterias, la base de datos disponía de un número idéntico en IVD y RUO: 164 especies. Para hongos solo había en RUO y contaba con 127 especies (datos aportados por la empresa en fecha 22/09/2017).

Ya desde su introducción, se señaló que esta tecnología cambiaría la práctica rutinaria de la microbiología clínica. Esta percepción fue confirmada por numerosos estudios, que han justificado su asentamiento en la rutina

diaria⁷⁶. Seng y cols. fueron los primeros en informar de la viabilidad del MALDI-TOF como el sistema de primera línea para la identificación bacteriana rutinaria en laboratorios de microbiología clínica a partir de colonias bacterianas que crecen en placas de agar⁸¹. En su trabajo se identificaron un total de 1.660 aislados bacterianos, y se verificaron las discrepancias entre los resultados del MALDI-TOF y la identificación fenotípica convencional, mediante la secuenciación del gen *rpoB* y el gen codificante para el 16S rRNA. En ese momento, los autores identificaron correctamente sólo el 84,1% de los aislados a nivel de especie mediante un análisis directo de colonias sin extracción adicional de proteínas. Los errores más frecuentes se observaron en los casos de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Shigella sonnei*, que fueron frecuentemente identificadas de forma errónea (7/10 [70%] y 5/5 [100%] de los aislados, respectivamente). En el caso de *S. maltophilia*, la identificación errónea fue debida a que las referencias de *Pseudomonas hibiscicola* y *Pseudomonas beteli*, incluidas en la base de datos Biotyper, eran en realidad *S. maltophilia*. La mayoría de las otras especies no identificadas estaban ausentes de la base de datos en el momento del estudio. En la primera comparación de las dos plataformas disponibles comercialmente, Cherkaoui y cols. compararon los sistemas Bruker Biotyper y bioMérieux con sus respectivas bases de datos, Biotyper y una versión temprana de SARAMIS⁸², utilizando la secuenciación del 16S rRNA como referencia. Se identificaron 720 aislados clínicos a nivel de especie, siendo el 99,1% identificado con el espectrómetro Bruker EM MALDI-TOF y el 88,8% con el espectrómetro Shimadzu EM MALDI-TOF. No es de extrañar que la mayoría de las especies no identificadas fueran anaerobios, debido a la escasa presencia de espectros de referencia en las bases de datos.

Como en casi todos los demás estudios, se observó una mala identificación de *Streptococcus*, con una tasa de identificación del 41% con ambos sistemas. Mellmann y cols. identificaron 1.116 aislados clínicos por EM MALDI-TOF mediante el paquete de software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Alemania) y la base de datos MALDI Biotyper, en comparación con los métodos fenotípicos manuales y automatizados y utilizando la secuenciación del 16S rRNA para resolver las discrepancias como estándar de referencia. Para *Enterobacteriaceae*, bacterias gramnegativas no fermentadoras, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, lograron identificaciones correctas a nivel de especie para el 95,5, 79,7, 99,5, 100 y 93,7% de los aislados, respectivamente⁸³. Los 7 aislados de *Shigella* spp. y los 6 de *Streptococcus mitis*/*Streptococcus oralis* fueron identificados erróneamente por EM MALDI-TOF. Por el contrario, en otro estudio, se obtuvieron identificaciones correctas a nivel de especie para la totalidad de los *Staphylococcus* y la mayoría de los *Enterococcus* (95,7%) y *Enterobacteriaceae* (83,2%)⁸⁴. van Veen et al. publicaron resultados similares para 980 aislados microbianos clínicos, incluyendo 61 aislados de levaduras, siendo la tasa global de identificación a nivel de especie del 92%. Después de resolver las discrepancias entre la identificación basada en MALDI-TOF y la identificación bioquímica mediante la secuenciación del 16S rRNA, se obtuvieron identificaciones correctas a nivel de especie para *Enterobacteriaceae*, bacterias gramnegativas no fermentadoras, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y levaduras para el 97,7, 92, 94,3, 84,8 y 85,2% de los aislados, respectivamente⁸⁵. Las identificaciones erróneas se justificaron por la falta de espectros para algunas especies raras en la base de datos y problemas en la identificación de

Streptococcus del grupo viridans (VGS) y *Streptococcus pneumoniae*: 12/21 (57,1%) aislados de *Streptococcus* del grupo viridans fueron falsamente identificados como *S. pneumoniae*. En otro estudio, Prod'hom y cols. informaron de la identificación correcta de 1.278/1.371 aislados clínicos (93,2%) a nivel de especie⁸⁶. Los resultados discordantes fueron analizados, y la mayoría de los errores se debieron a la identificación falsa de *Enterobacter cloacae* como *Enterobacter hormaechei* y *S. maltophilia* como *P. hibiscicola* y *P. beteli*. También se observaron problemas con la identificación de *Shigella* spp. y *Propionibacterium acnes*. En otro estudio, también se observaron las mismas limitaciones de la base de datos para la identificación de algunas especies, incluidas las bacterias anaeróbicas; los autores propusieron que podría ser necesaria una etapa de extracción previa para mejorar la identificación de algunas especies⁸⁷. El nivel de identificación mejoró del 82,6 al 97,3% cuando se realizó un paso de extracción. Por último, Martin y otros compararon las tres bases de datos comerciales en un estudio en el que se examinaron 1.129 aislados, incluidos 73 anaerobios. Las bases de datos Bruker Biotyper y Vitek MS proporcionaron una identificación correcta del 93% de los aislados⁸⁸.

En el contexto de un dramático aumento de la resistencias bacterianas y teniendo en cuenta el coste ecológico de las terapias antimicrobianas de amplio espectro, la identificación rápida y precisa de las bacterias es esencial para el control de las infecciones. Los métodos de identificación convencionales requieren al menos de 4 a 12 horas, y los métodos moleculares no son adecuados para la identificación de rutina a gran escala. La conclusión

es que los sistemas basados en EM, rápidos y rentables, están reemplazando a los métodos fenotípicos convencionales para la identificación rutinaria de bacterias⁸⁹.

1.3.1. Complejo *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii pertenece al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ABC), que incluye los patógenos nosocomiales más relevantes del género *Acinetobacter*, causantes de infecciones graves en pacientes con enfermedades críticas e inmunocomprometidos⁹⁰. *A. baumannii* representa un problema importante de salud por ser responsable de infecciones con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), debido a su capacidad para persistir en el medio ambiente y desarrollar resistencia a múltiples antibióticos^{91,92,93}. *Acinetobacter nosocomialis* y *Acinetobacter pittii*, otras dos especies importantes del complejo ABC, también son capaces de causar infecciones nosocomiales, pero se asocian más raramente con situaciones de brotes y, generalmente, muestran una mayor sensibilidad a los agentes antimicrobianos. Por lo tanto, una identificación precisa de estos microorganismos a nivel de especie es esencial para minimizar el fracaso en el tratamiento o implementar medidas para el control de las infecciones^{94,95}.

Dado que todas las especies de *Acinetobacter* incluidas en el complejo ABC son muy similares desde el punto de vista fenotípico y genómico (no se diferencian por hibridación de ADN⁹⁶), las pruebas fenotípicas sencillas y otros

sistemas de identificación bioquímica automatizados que se utilizan habitualmente en los laboratorios clínicos no pueden diferenciarlos^{97,98}. En este contexto, el MALDI-TOF es una herramienta que ha sido adaptada para la identificación de diferentes microorganismos a nivel de género, especie o subespecie, con alta fiabilidad^{89,99}. Sin embargo, algunos estudios han destacado la dificultad del MALDI-TOF para la discriminación entre miembros del complejo ABC, así como otras especies de *Acinetobacter*, particularmente porque muchas especies nuevas han sido recientemente incluidas en este taxón^{100,101,102}. El MALDI-TOF puede ser una herramienta precisa para la identificación de estos microorganismos a nivel de especie, siempre que las bases de datos estén actualizadas¹⁰³.

1.3.2. *Rhodococcus equi* y *Dietzia* spp.

El actinomiceto saprofita *Rhodococcus equi*, que habita en el suelo, es un patógeno intracelular facultativo de los macrófagos que causa infecciones piogranulomatosas en varias especies de animales domésticos, en particular, en potros jóvenes y cerdos¹⁰⁴. Además, *R. equi* infecta a los humanos¹⁰⁵, siendo los grupos de riesgo las personas inmunodeprimidas, como los pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con cáncer, y los pacientes receptores de órganos trasplantados. La infección por *R. equi* en estos pacientes da como resultado una forma granulomatosa de neumonía, cuyos síntomas se asemejan a los signos clínicos y patológicos de la tuberculosis pulmonar y que tiene una alta tasa de mortalidad.

Dietzia spp. son bacterias ambientales que se han asociado con infecciones humanas en un pequeño número de casos¹⁰⁶. La morfología con la tinción de Gram y el aspecto de las colonias de las especies del género *Dietzia* son notablemente similares a las observadas con *R. equi*. En los laboratorios de microbiología clínica, *R. equi* se identifica de forma rutinaria mediante un enfoque convencional basado en las características de crecimiento, la morfología de las colonias, la reacción CAMP (acrónimo para Christie, Atkins y Munch Petersen, test de hemólisis sinérgica o cooperativa, en el que se analiza la lisis de los eritrocitos de sangre de caballo por la acción de enzimas producidas por dos bacterias que destruyen la estructura de su membrana) y las pruebas bioquímicas. Estas últimas se realizan con frecuencia utilizando el sistema API Coryne (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile , Francia), un kit comercial multi-sustrato que incluye *R. equi* en su base de datos¹⁰⁷. Sin embargo, este método requiere mucho tiempo y su fiabilidad para la identificación de *Rhodococcus* a nivel de especie es baja, lo que puede dar lugar a una identificación errónea de *R. equi* como otra especie de rodococo o incluso como otros actinomicetos¹⁰⁸. A partir de 1995 se inició el desarrollo de las aplicaciones de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos a la identificación de microorganismos. Algunos métodos y aplicaciones fueron patentados, y la incipiente industria biotecnológica puso en el mercado kits para la detección e identificación de los principales patógenos microbianos. En el caso de *R. equi*, en 1995 se habían publicado dos métodos de PCR que utilizaban cebadores complementarios al gen 16S rDNA, pero no se habían validado con un número suficiente de especímenes clínicos. A partir del clonado y la secuenciación del gen *choE* de la estirpe *R. equi* 103, codificante

de una colesterol oxidasa¹⁰⁹, se diseñaron cebadores complementarios a este gen resultando un método de identificación de *R. equi* por PCR que fue validado con un grupo numeroso de cepas que incluía aislados de origen humano, animal y ambiental¹¹⁰. Todavía en la actualidad el método de PCR *choE* es la técnica de referencia a nivel mundial (“gold standard”) para identificar *R. equi*, gracias a su alta especificidad. Sin embargo, otros actinomicetos albergan en sus genomas genes codificantes para colesterol oxidasas, por lo que existe un pequeño riesgo de que se produzcan identificaciones incorrectas. En este sentido, EM MALDI-TOF podría representar un método alternativo, rápido y útil para una identificación fiable de *R. equi* y *Dietzia* spp.¹¹¹.

1.3.3. *Candida* spp.

La candidemia es la presentación clínica más común de candidiasis invasiva, pero más del 30% de estas infecciones no se manifiestan con hemocultivos positivos. El manejo de la candidemia es un desafío debido a la dificultad de su diagnóstico y la complejidad de pautar un tratamiento eficaz adaptado a cada paciente. *Candida albicans* sigue siendo la etiología predominante y representa en torno al 50% de todos los casos. Sin embargo, ha habido un cambio epidemiológico en las últimas décadas. Algunas especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* han surgido como una causa importante de candidemia grave, ya que pueden presentar resistencia al fluconazol y otros agentes antifúngicos¹¹². La creciente incidencia de las especies de *Candida* más resistentes como *Candida glabrata* y *Candida krusei* hace precisamente necesaria una identificación precoz y certera de estas cepas¹¹³.

La alta precisión, el procedimiento simple de extracción, que permite la identificación de levaduras en el mismo flujo de trabajo que la identificación bacteriana, la posibilidad de evitar subcultivos y la alta calidad de las bases de datos integradas, subrayan el claro potencial de los sistemas MALDI-TOF-MS para realizar una mejora importante en la identificación de levaduras en laboratorios de microbiología clínica con un alto rendimiento de muestras, tanto en cuanto a eficiencia como precisión¹¹⁴.

1.4. Otras aplicaciones de la espectrometría de masas

Existen otras aplicaciones para la espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica además de la identificación de bacterias y hongos. Una aplicación que se está desarrollando actualmente es la identificación a partir de muestra directa, como la orina o de botellas de hemocultivos positivas^{115,116}, lo que ha acortado el tiempo de diagnóstico para los pacientes a los que se les realiza este tipo de pruebas. También se ha puesto en marcha la tipificación de cepas individuales, pudiendo realizarse dendrogramas o árboles de tipificación^{117,118}. Actualmente las investigaciones se están centrando en la resistencia antibiótica, con el fin de acelerar el diagnóstico. En este sentido, tres enfoques principales están muy avanzados para el uso clínico: la detección de modificaciones de antibióticos debido a la actividad enzimática de las bacterias, la detección de resistencia a los antimicrobianos mediante el análisis de los patrones máximos de las bacterias o perfiles de picos de masa, y la detección de resistencia por semi-

cuantificación del crecimiento bacteriano en presencia de un antibiótico determinado^{119,120}.

El futuro nos deparará la expansión de la espectrometría en otros campos de la microbiología, como así lo demuestran diversos estudios sobre la identificación de parásitos como *Leishmania*, *Giardia*, *Cryptosporidium* o *Entamoeba*¹²¹. También en el campo de la virología el uso experimental es muy prometedor, tanto para la identificación a partir de muestra clínica directa, como de su crecimiento en líneas celulares¹²²⁻¹²⁶.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada fue que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica fiable, rápida y precisa que permite identificar a nivel de especie la mayor parte de los microorganismos presentes en muestras de origen humano clínicamente relevantes, de manera que puede utilizarse en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología clínica como alternativa o complemento a las técnicas tradicionales.

Para validar esta hipótesis se planteó el objetivo inicial de evaluar la técnica en una colección de cepas que incluía una variedad de especies representativa de las aisladas con más frecuencia en nuestro laboratorio. A continuación, nos planteamos evaluar la aplicación de la técnica para resolver la identificación a nivel de especie de 3 grupos de microorganismos que habían planteado problemas de identificación en nuestro laboratorio:

- El complejo *Acinetobacter baumannii*.
- *Rhodococcus equi* y *Dietzia* spp.
- *Candida* spp. procedente de hemocultivos

3. MATERIAL Y METODOS

Se ha dividido esta sección en 4 apartados, correspondientes a los 4 objetivos planteados, para mostrar con mayor claridad las colecciones de cepas estudiadas y los procedimientos utilizados, asumiendo que lo descrito en algunas secciones resultará reiterativo para el lector.

3.1. Evaluación inicial de la tecnología:

3.1.1. Cepas bacterianas: Se analizaron 950 aislamientos clínicos [699 (73,6%) bacterias gramnegativas, 233 (24,5%) grampositivas y 18 (1,9%) levaduras] recogidos entre los meses de noviembre de 2011 a enero de 2012 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) de Santander, que es un hospital terciario con algunas especialidades médico/quirúrgicas referentes de otras áreas sanitarias de su entorno y que tiene asignada una población de alrededor de 300.000 habitantes. Las cepas estudiadas procedían de muestras de orina (54,1%), exudados de herida (24,9%), esputo (5,6%), hemocultivos (3%), otros orígenes (12,3%) (abscesos pulmonares, lavados broncoalveolares, exudados vaginales, otros fluidos orgánicos).

3.1.2. Identificación mediante métodos clásicos: Los microorganismos fueron identificados con el sistema bioquímico VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) para bacterias gramnegativas y *Enterococcus*, con galerías API 20 Strep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)¹²⁷ para *Streptococcus* y con galerías API 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)¹²⁷ para levaduras. Los resultados del API 20 Strep y API 32C se obtuvieron después de 24-48 horas

de incubación a 35-37° C como un perfil numérico generado por lectura visual, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los resultados de identificación se obtuvieron introduciendo los códigos en el software apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

3.1.3. Identificación molecular: La identificación molecular de los aislados con resultados no concordantes se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en el caso de bacterias¹²⁸ y de la región ITS en el caso de levaduras¹²⁹. Los productos de PCR se purificaron mediante un kit NucleoSpin®Gel (Macherey-Nagel, Duren, Alemania), y la secuenciación bidireccional de ADN fue realizada por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las búsquedas de homología se realizaron con la herramienta BLAST en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.1.4. Identificación mediante MALDI-TOF: Se obtuvieron colonias tras 16-24 horas de crecimiento, en placas de agar sangre (Oxoid, Wesel, Alemania) en el caso de bacterias, y CHROMagar (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) en el caso de las levaduras. Además, se utilizó como control de calidad una cepa *Escherichia coli* (ATCC®8739™) de cultivo reciente para el equilibrio del aparato.

MALDI-TOF VITEK MS™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia): Los portaobjetos fueron inoculados con un asa estéril de 1µL. Se añadió 1µL de la solución matriz (VITEK MS-CHCA: mezcla de 3,10g de ácido 2,5-dihydroxi

benzoico disuelto en 100mL de agua-etanol-acetonitrilo en proporción 1/1/1) a cada pocillo y se dejó secar a temperatura ambiente. En el caso de las cándidas se añadieron primero 0,5µL de ácido fórmico (VITEK MS-FA) y después la solución matriz (Figura 7).

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 v1 (Anagnoste GmbH) para la medición automática e identificación (Figura 8).

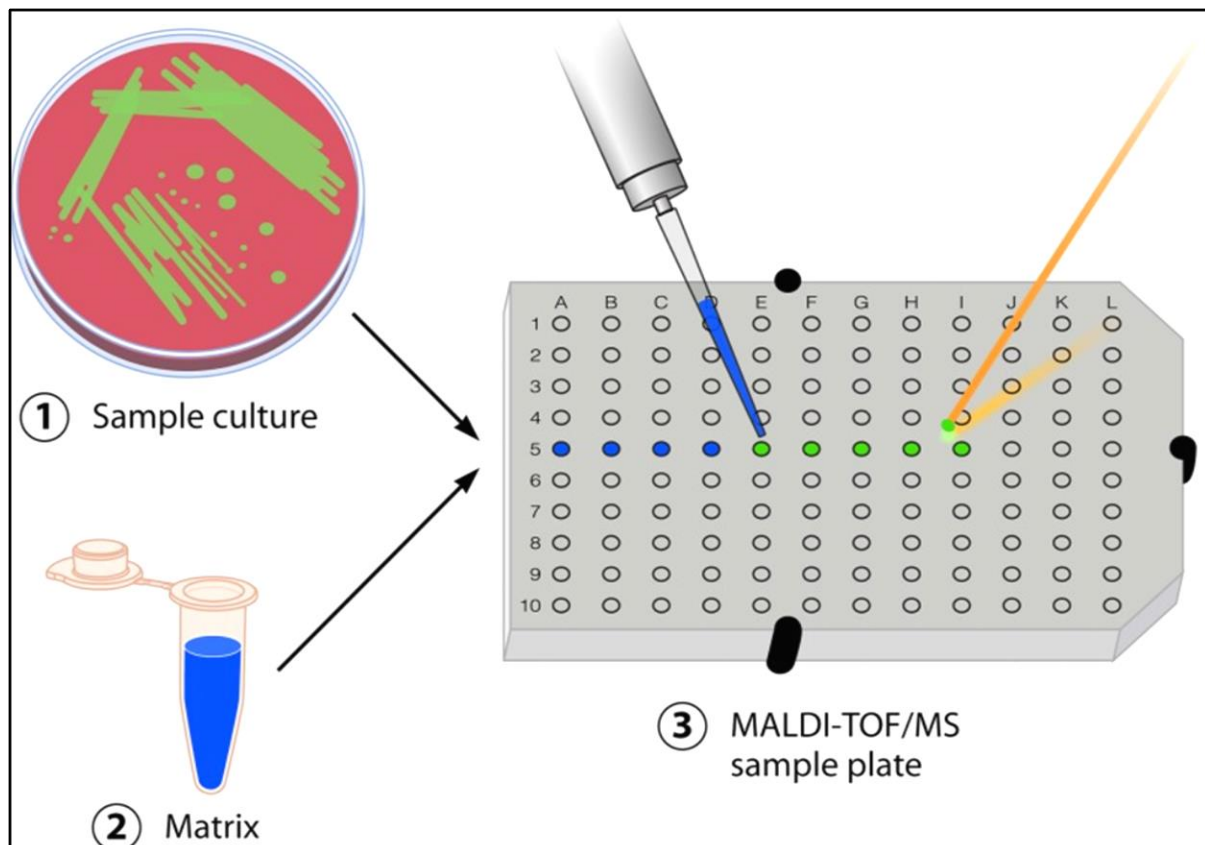


Figura 7: Esquema general para la identificación de bacterias y hongos usando el MALDI-TOF MS, tomado de Clark AE, et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26(3): 547-603.

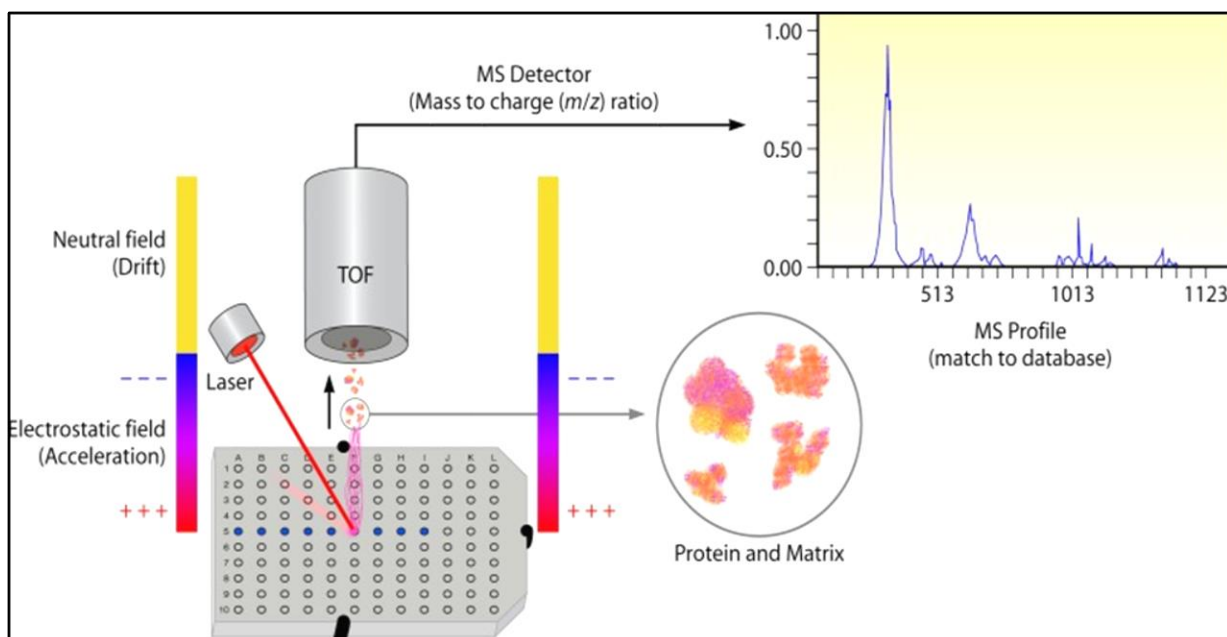


Figura 8: Esquema general para el análisis de MS de los aislamientos microbiológicos ionizados, tomado de Clark AE, et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26(3): 547-603.

Todas las cepas se analizaron por duplicado y sólo se repitieron aquellos pocillos en los que se detectó error en la preparación de la muestra. No se utilizó ningún tipo de pre-tratamiento a las cepas antes de su inoculación en el portaobjetos. Cuando la puntuación era igual o superior a 97% se consideró la identificación de alta confianza. Si no discriminaba entre dos especies se aceptaba el género. Se caracterizaron como “no leídos” aquellos resultados obtenidos con una mala adquisición (error P201) en ambas muestras, así como las especies no incluidas en la base de datos y que no pudieron ser identificadas. En estos casos el equipo VITEK MS informa de error tipificado como P150.

3.2. Identificación de cepas clínicas del complejo *Acinetobacter baumannii*:

3.2.1. Cepas analizadas: Para el estudio se utilizaron 84 cepas clínicas de *Acinetobacter* spp., aisladas entre 2004 y 2008 en el Servicio de Microbiología del HUMV. La relación clonal entre las cepas pertenecientes a la misma especie de *Acinetobacter* se evaluó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)¹³⁰.

3.2.2. Identificación de especies mediante el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA). La metodología ARDRA se utilizó como identificación de referencia para confirmar la especie de *Acinetobacter*¹³¹. Para ello el ADN fue extraído utilizando resina Chelex comercial, mediante el kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). El 16S rRNA se amplificó en todas las cepas utilizando cebadores universales. Posteriormente se digirió por separado con las enzimas de restricción *CfoI*, *AluI*, *MboI*, *RsaI*, *MspI* y *BfaI* (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España). La discordancia en la identificación de la especie entre los sistemas ARDRA y MALDI-TOF se resolvió mediante la secuenciación parcial del gen *rpoB*¹³².

3.2.3. Identificación mediante secuenciación del gen *rpoB*: El gen *rpoB* se amplificó con cebadores específicos y el resultado de la amplificación fue secuenciado, previa purificación mediante el kit NucleoSpin®Gel (Macherey-Nagel, Duren, Alemania). Las secuencias parciales obtenidas de los genes *rpoB* se compararon con las secuencias de referencia disponibles en la base de datos de GenBank, siguiendo la metodología descrita para el gen 16S rDNA. Para establecer la identificación correcta, se seleccionaron como

especies más probables secuencias de una alineación de paridad con el valor E más bajo y el número más alto de identidades (>98%). El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS Versión 20.0 incluyendo el análisis de curvas ROC y el cálculo del índice kappa de concordancia de Pearson.

3.2.4. Identificación por MALDI-TOF:

3.2.4.1. MALDI-TOF VITEK MS™: La identificación por Vitek MS™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) se realizó según las recomendaciones del fabricante, ya explicado en el apartado 3.1.

En este caso los espectros capturados se analizaron con el software de identificación Shimadzu Launchpad pero con distintas bases de datos SARAMIS MS-IVD v1.0, v2.0 v3.0 y v3.2 (Anagnos Tee GmbH).

3.2.4.2. EM MALDI-TOF Biotyper. Todas las cepas se analizaron con el sistema MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación: las colonias fueron aplicadas a una placa metálica MALDI-TOF MSP de 96 pocillos (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y cubiertas con 1µL de una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico al 50% y ácido trifluoroacético-acetonitrilo al 2,5%. La placa MSP de 96 pocillos se secó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cuando el primer intento de identificación no facilitó resultados con un alto grado de confianza, las cepas se identificaron usando una extracción con ácido fórmico-acetonitrilo.

Brevemente: dos o tres colonias bacterianas se transfirieron a un tubo de 1,5mL que contenía 300µL de agua destilada y se mezcló con 900µL de etanol absoluto. Esta suspensión se centrifugó a 11.400 *g* durante 2 minutos, dejándose evaporar hasta quedar seco el precipitado, y se reconstituyó con 50µL de ácido fórmico al 70% (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). Después de incubar durante 30 segundos, se añadieron 50µL de acetonitrilo (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), y la suspensión se centrifugó a 11.400 *g* durante 2 minutos. Seguidamente, 1µL del sobrenadante se aplicó a la placa metálica de 96 pocillos (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y se dejó secar a temperatura ambiente. Se aplicó 1µL de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico [HCCA]; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) a cada muestra y se dejó secar a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron con MALDI-TOF Bruker usando el software FlexControl con Compass Flex Series versión 1.3 y un láser de nitrógeno de 60-Hz (longitud de onda 337 nm). El rango del espectro de proteínas de 2 a 20 kDa fue analizado con el software Bruker Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) con la configuración predeterminada y comparando con los espectros de referencia presentes en la base de datos, mostrando los 10 patrones más similares para cada aislado. Las bases de datos utilizadas fueron la de Biotyper con las versiones v4.0 y v8.0 5,627 MSP (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), La similitud en los espectros se representa con un valor numérico (>2,000, identificación a nivel de especie; de 1,700 a 1,999, identificación a nivel de género; <1,700, no hay identificación de confianza). Como control para la calibración y como referencia para el control de calidad se usó la cepa *E. coli* ATCC 25922 ^{133,134}.

3.2.5. Tipificación de las cepas. Las relaciones clonales de las cepas pertenecientes a la misma especie de *Acinetobacter* fueron estudiadas mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), utilizando la enzima de restricción *Apal* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa al 1% (wt/vol), en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) al 0,5%, en un sistema de electroforesis CHEF-DR (campo eléctrico homogéneo con pinzas de contorno y regulado dinámicamente) III Mapper (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), durante 19 h a 14°C, utilizando una velocidad de rampa de pulso que cambia de 5 a 20 s a 6 V/cm. Los patrones de ADN fueron interpretados según lo recomendado por Tenover y cols¹³⁵. Las cepas de referencia *A. baumannii* RUH-875 y RUH-134, representantes de los principales clones internacionales I y II, respectivamente, también se utilizaron como comparadores de referencia¹³⁰.

3.3. Identificación de *R. equi* y *Dietzia* spp.:

3.3.1. Cepas incluidas en el estudio: Se incluyeron en el estudio un total de 154 aislamientos identificados originalmente como *R. equi*. La colección incluyó cepas aisladas de pacientes infectados por el VIH de diferentes hospitales españoles (n=71), aislados de potros neumónicos (n=34), y cepas aisladas de muestras de suelo recolectadas del medio ambiente (n=49). Se cultivaron en placas de medio Columbia con sangre de caballo a 37°C y se almacenaron en viales criogénicos a -80°C en caldo de infusión cerebro-corazón con glicerol al 20%. Un total de 129 de los 154 aislamientos habían sido previamente identificados como *R. equi* mediante amplificación por PCR del gen *choE*, que

codifica una colesterol oxidasa de *R. equi*¹¹⁰. Ocho de los 154 aislamientos fueron negativos para el gen *choE* y se identificaron como especies del género *Dietzia* mediante secuenciación del gen 16S rRNA¹³⁶. Las 17 cepas restantes (15 *R. equi* y 2 *Dietzia* sp.) fueron aislados en el laboratorio de microbiología clínica del HUMV, durante el período 2010 a 2014, a partir de muestras clínicas.

3.3.2. Identificación mediante MALDI-TOF:

3.3.2.1. MALDI-TOF VITEK MS™: Se utilizaron dos protocolos de extracción diferentes para la preparación de las muestras: (i) extracción directa de colonias, como recomienda el fabricante, ya explicado en apartados anteriores, y (ii) extracción con etanol. Para el procedimiento de extracción con etanol se transfirió una colonia a un tubo Eppendorf de 1,5mL que contenía 300µL de medio de suspensión API (bioMérieux) y se mezcló minuciosamente usando un agitador tipo vórtex. Se añadió etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania) (900µL) y la mezcla se homogeneizó completamente de nuevo. Después de una centrifugación a 11.400 *g* durante 2 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se disolvió en el etanol residual. Se cargó un volumen de 1µL del sedimento disuelto en la placa de acero, se secó, se añadió 1µL de matriz Vitek MS-CHCA (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxycinámico [HCCA] - acetonitrilo / etanol / agua [1: 1: 1] acidificada con ácido trifluoroacético al 3% [vol / vol]) y de nuevo se dejó secar al aire.

Cada cepa analizada se colocó por duplicado en el mismo portaobjetos. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de masas Vitek MS con la

configuración sugerida por el fabricante, utilizando espectros recopilados automáticamente. Los espectros capturados se analizaron con el software de identificación Shimadzu Launchpad que incluía la base de datos SARAMIS MS-ID versión 2.0 (Anagnos Tee GmbH). El sistema proporciona los resultados de identificación expresados en porcentaje de confianza, en el rango 0-100%. Para una identificación fiable a nivel de especie, solo se aceptaron aquellos resultados con puntuaciones del 99,9%. Las coincidencias de picos que arrojaron resultados de identificación con valores de confianza entre 50% y 99,8% se consideraron como aceptables a nivel de género, pero requirieron el análisis mediante secuenciación del 16S rRNA para asignar la especie. Cuando no se obtuvo una buena identificación con el método de extracción directa de colonias, se realizó un análisis posterior con el método de extracción con etanol.

3.3.2.2. MALDI-TOF Bruker Biotyper: Todas las cepas se sometieron a análisis con el sistema Bruker Biotyper mediante el procedimiento recomendado por el fabricante y ya explicado en apartados anteriores. Las mediciones se realizaron con un sistema Bruker MALDI-TOF MS utilizando el software FlexControl, para el ulterior procesamiento de los espectros, con el software Compass Flex Series versión 1.3 y un láser de nitrógeno de 60 Hz (longitud de onda de 337 nm). Los espectros de proteínas con relaciones de masa a carga (m/z) que van de 2 a 20 kDa se exploraron con el paquete de software Bruker Biotyper 3.1 con la configuración predeterminada y se compararon con los espectros de referencia presentes en la base de datos, mostrando los 10 patrones más similares para cada aislamiento. La base de

datos para la identificación fue la de Biotyper, de referencia v4.0 5.627 MSP (Bruker Daltonic), que incluía 5.627 especies. La similitud de patrones se expresó con un valor en unos rangos ya indicados en el apartado 3.2.4.2.¹³⁷.

3.3.3. Método de referencia en la identificación: Consideramos que la PCR basada en la amplificación del gen *choE* es el método de referencia para la identificación de *R. equi*, y en todas las cepas se llevó a cabo dicha PCR, siguiendo métodos descritos¹¹⁰. Los aislados *choE* negativos se identificaron mediante la secuenciación de una región del 16S rRNA¹²⁸. Los productos de la PCR se secuenciaron siguiendo la metodología expuesta en el apartado 3.1.

3.4. Identificación de *Candida* spp.:

Es importante destacar que el presente estudio se desarrolló en el HUMV, que cuenta con un programa de trasplante de órganos que le posiciona como líder a nivel nacional en materia de donación de órganos, con una tasa récord de 86,2 donantes por millón de personas alcanzada en 2018, cifra que casi duplica la registrada en España con 47,9 donantes por millón de personas. Además, el HUMV está acreditado como centro de referencia (CSUR) para trasplante de pulmón, páncreas, renal cruzado y progenitores hematopoyéticos infantiles; asimismo dispone de la acreditación de calidad ISO 9001 en todos los programas de trasplante y tiene capacidad para realizar trasplantes renales de alta complejidad (combinados, retransplantes y a testigos de Jehová) a pacientes que son remitidos de otras comunidades autónomas a pesar de disponer de un programa de trasplante propio. Todo esto supone una población hospitalaria inmunodeprimida muy elevada con gran riesgo para la infección

fúngica invasora (IFI) que constituye una amenaza para este tipo de pacientes. La identificación precoz de la especie de *Candida* causante de la infección mejoraría el tratamiento y la profilaxis aplicada a dichos pacientes.

3.4.1. Cepas de levaduras incluidas en el estudio: Se incluyeron 298 aislados de *Candida* spp. de hemocultivos que se recibieron entre el 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2011. El grupo de pacientes incluía desde neonatos hasta ancianos, con una edad media de 61,35 años. Se analizó una cepa por paciente, excepto cuando se produjo un positivo nuevo, por candidiasis en el mismo paciente, un mes después del brote inicial.

3.4.2. identificación por métodos convencionales: Los cultivos de sangre se procesaron utilizando el sistema Bactec 9240 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.). Los aislamientos de *C. albicans* fueron identificados de forma preliminar por el crecimiento de la muestra en agar Sabouraud con cloranfenicol y agar Sabouraud con cloranfenicol-actidiona (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y en CHROMagar Candida (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Además, para los aislamientos de *Candida* spp. diferentes a *C. albicans*, se utilizó el sistema de identificación API-ID32C (bioMérieux)¹²⁷. Se incubaron las galerías API-ID32C a 30°C y los resultados se leyeron después de 24 horas, prolongando la incubación hasta 48 horas cuando se recomendaba, según la información recogida en la apiweb™. Se utilizaron como controles negativos 10 cepas de *Cryptococcus neoformans* y 40 de *Rhodotorula mucilaginosa*, de la colección de cepas del servicio de Microbiología del HUMV.

3.4.3. Identificación mediante MALDI-TOF Vitek MS™: La identificación de los microorganismos con el equipo Vitek MS™ se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante: las células de una sola colonia aislada en una placa CHROMagar Candida, incubadas durante 24 horas a 37°C, se colocaron directamente en el portaobjetos, se lisaron por suspensión en 0,6µL de ácido fórmico al 28,9% (VITEK MS-FA) y se secaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1µL de matriz (alfa-ciano-4-hidroxicinámico) VITEK®MS-CHCA y nuevamente se dejó secar al aire. La identificación se realizó con la base de datos SARAMIS MS-IVD v2 (Anagnos Tee GMBH, bioMérieux), en modo lineal positivo (no en modo reflector), que incluye proteínas con un rango de masa de 2–20 kDa, utilizando la cepa ATCC®8739™ de *E. coli* como referencia. La intensidad del láser de nitrógeno de 50 Hz estaba bajo el control del software de adquisición en los ajustes recomendados por el fabricante. Se aplicaron dos muestras de cada cepa y solo se aceptaron puntuaciones del 99,9% para validar la identificación a nivel de especie. Cuando la cepa analizada pertenecía a un taxón no incluido en la base de datos, el equipo comunicó el resultado como erróneo (error P150).

3.4.4. Método de referencia en la identificación:

3.4.4.1. Identificación mediante PCR específica: También se utilizó un método molecular (PCR) con cebadores específicos para *C. albicans*. Los pares de cebadores específicos de cada especie fueron diseñados a partir de los datos de secuencia para la región del espaciador transcrito interno (ITS) en la base de datos de GenBank para amplificar específicamente *C. albicans*. Los

cebadores de avance fueron diseñados dentro de la región ITS1, y los cebadores de retroceso fueron diseñados de la región ITS2¹³⁸.

3.4.4.2. Identificación mediante el análisis de la región ITS: Para la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADN ribosómico, el ADN se extrajo de colonias individuales cultivadas en placas CHROMagar utilizando la resina Chelex-100 en formato comercial (matriz Instagene, Bio-Rad). La región ITS fue amplificada con los cebadores ITS1 e ITS4, descritos anteriormente por White y cols.¹²⁹. El producto de PCR fue purificado con el kit NucleoSpin®Gel (Macherey-Nagel, Duren, Alemania) y la secuenciación bidireccional de ADN fue realizada por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank usando la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se asignó la especie con mayor porcentaje de identidad, por encima del 97%. Para determinar la concordancia entre las dos técnicas de identificación (una convencional y la otra basada en el sistema Maldi-TOF), se calculó el coeficiente Kappa (K), correspondiente a la proporción de concordancias observadas entre el número total de observaciones, habiendo excluido la concordancia producida por azar¹³⁹. Los resultados de los parámetros de diagnóstico se obtuvieron con el programa Stata®v.14.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación inicial de la plataforma Vitek MS™

De los 950 aislamientos clínicos incluidos en el estudio [*E.coli* 372 (39.1%), *Pseudomonas aeruginosa* 101 (10,6%), *Staphylococcus aureus* 83 (8,7%), *Proteus mirabilis* 51 (5,3%), *Klebsiella pneumoniae* 39 (4.1%), *Staphylococcus epidermidis* 39 (4,1%), *Enterococcus faecalis* 37 (3,8%), *Enterococcus faecium* 24 (2,5%), *Morganella morganii* 12 (1,2%), *Klebsiella oxytoca* 12 (1,2%), *Enterobacter cloacae complex* 10 (1,05%) y otros 170 (17,8%)] en 913 se obtuvo un espectro interpretable. VITEK MS™ identificó correctamente el 95,3% de las bacterias gramnegativas, el 97,8% de las bacterias grampositivas y el 100% de las levaduras. Treinta y siete no pudieron ser identificados, debido a que no se obtuvo un espectro de calidad suficiente para su identificación (n=25, 2,6%; incluyendo 23 bacterias gramnegativas, 1 bacteria grampositiva y 1 levadura), o correspondían a taxones no incluidos en la base de datos SARAMIS MS-ID v1 del equipo VITEK MS™ (n=12, 1,3%). En los casos en los que la secuenciación permitió resolver las discrepancias entre ambos sistemas, ésta confirmó en un 81,2% la identificación obtenida con VITEK MS™ frente a los sistemas VITEK 2 y API 32C (Tabla 2).

Si bien el número de grampositivos analizados ha sido menor que el de los gramnegativos, no se obtuvieron discordancias entre las identificaciones obtenidas por VITEK MS™ y los métodos de referencia. Las corinebacterias, en general, fueron identificadas correctamente, pero no se discriminó entre las especies *Corynebacterium xerosis* y *Corynebacterium amycolatum*. De las

bacterias gramnegativas las especies más frecuentes fueron *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. Se encontraron dificultades al preparar las muestras de cepas mucosas de *K. pneumoniae* y *E. coli*. En el género *Enterobacter* hemos apreciado que no distingue entre las especies *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter asburiae*, como tampoco diferencia a nivel de especie las pertenecientes al complejo ABC. En el grupo de bacilos gramnegativos no fermentadores, la técnica fue muy eficiente en los casos de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, pero en otros géneros, como *Burkholderia*, es necesaria la aplicación de algún tipo de pre-tratamiento. Las levaduras fueron identificadas con gran fiabilidad.

Tabla 2: Correlación del sistema MALDI-TOF con los sistemas tradicionales de identificación en microbiología clínica

	Número de aislamientos			Espectro interpretable	
	Totales	P150*	P2/P201**	Totales	Concordantes
Bacterias gramnegativas.	699	8	23	668 (95,5%)	637 (95,3%)
Bacterias grampositivas.	233	4	1	228 (97,8%)	223 (97,8%)
Levaduras	18	0	1	17 (94,4%)	17 (100%)
Totales	950	12	25	913 (96,1%)	877 (92,3%)

*P150: el espectro no se encuentra en la base de datos.**P2: picos insuficientes en el espectro.

**P201: mal espectro durante la adquisición. Totales: eliminados los espectros incorrectos y los que no están en la base de datos. Concordantes: de los espectros interpretables los que coincidieron en la identificación por los dos métodos.

4.2. Identificación de cepas clínicas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC)

4.2.1. **Asignación previa de las cepas:**

De las 84 cepas clínicas estudiadas de *Acinetobacter* spp., 72 fueron identificadas por la técnica de ARDRA como pertenecientes al complejo ABC: *A. pittii* (n=36), *A. baumannii* (n=33), *A. calcoaceticus* (n=1) y *Acinetobacter dijkshoorniae* (n=2). Adicionalmente, fueron identificadas otras 12 cepas no incluidas en el complejo: *Acinetobacter bereziniae* (n=5), *A. gen. sp. 16* (n=1), *Acinetobacter gyllenbergii* (formalmente denominada *A. phenon 3* por ARDRA; n=2), *Acinetobacter haemolyticus* (n=2) y *Acinetobacter vivianii* (n=2), como controles negativos. En el caso de la cepa identificada por ARDRA como *A. phenon 5*, fue identificada como *A. dijkshoorniae* mediante secuenciación del gen *rpoB*.

4.2.2. **Aplicación de la tecnología MALDI-TOF MS a la identificación de cepas clínicas del complejo ABC.**

Los sistemas Vitek MSTM y Biotyper, respectivamente, identificaron de forma correcta a nivel de especie 70 (97,22%) y 71 (98,61%) de las 72 cepas pertenecientes al complejo ABC identificadas por ARDRA. Sólo dos cepas de *A. baumannii* fueron identificadas erróneamente como *A. nosocomialis* por Biotyper v4.0, y como *A. pittii* por Biotyper v8.0.

En el grupo control, Vitek MSTM v3.2 identificó erróneamente una cepa como *A. bereziniae* y un *A. gen. sp. 16* como *A. pittii* y *A. gyllenbergii*,

respectivamente. No hubo resultados para los espectros obtenidos en ocho cepas del grupo control, por no encontrarse en la base de datos. Por otra parte, el equipo Biotyper v8.0 identificó erróneamente un *A. bereziniae* como *A. pittii* (n=1), dos *A. vivianii* como *A. haemolyticus* y *A. haemolyticus/parvus*, dos *A. gyllenbergii* como *Acinetobacter proteolyticus* y *A. proteolyticus/haemolyticus*, y un *A. gen. sp. 16* como *A. proteolyticus/haemolyticus* (Tabla 3).

Vitek MSTM. v3.2 y Biotyper presentaron una alta sensibilidad (> 80%) y un área bajo la curva ROC (AUC)> 0,8, demostrando que ambos sistemas son eficaces discriminando el complejo ABC de aquellas especies que no pertenecen al mismo. Por otra parte, de acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por Landis y Koch, el alto valor del índice de Pearson Kappa positivo (> 0,75) refleja una correlación excelente con los datos de identificación obtenidos por la técnica ARDRA. Merece la pena señalar que el equipo Biotyper v 8.0.0.0 obtuvo los mejores resultados (Tabla 4).

Tabla 3. Resultados de identificación por los dos sistemas EM MALDI-TOF evaluados.

ARDRA/ <i>rpoB</i> seq		Vitek MS™ v3.2		Biotyper v8.0.0.0	
36	<i>A. pittii</i>	37	+1(<i>A. bereziniae</i>)	39	+3(n=1/ <i>A. bereziniae</i> , n=1/ <i>A. baumannii</i> , n=1/ <i>A. pittii/dijkshoorniae</i>)
33	<i>A. baumannii</i>	33	<i>A. baumannii</i>	32	-1(<i>A. pittii</i>)
1	<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. calcoaceticus</i>
2	<i>A. dijkshoorniae</i>	0	n=2/P150*	2	<i>A. dijkshoorniae</i>
5	<i>A. bereziniae</i>	0	n=4/P150*	4	n=4/ <i>A. bereziniae</i>
1	<i>A. genomic species 16</i>	0	-1(<i>A. gyllenbergii</i>)	0	n=1/ <i>A. proteolyticus/haemolyticus</i>
2	<i>A. gyllenbergii</i>	3	+1(<i>A. genomic species 16</i>)	0	n=2/ <i>A. proteolyticus</i> , <i>A. proteolyticus/haemolyticus</i>
2	<i>A. haemolyticus</i>	2	<i>A. haemolyticus</i>	2	<i>A. haemolyticus</i>
2	<i>A. vivianii</i>	0	n=2/P150	0	n=2/ <i>A. haemolyticus</i> , <i>A. haemolyticus/parvus</i>
		8	P150*		

P150: No hay resultados en la base de datos para este espectro. En negrita marcadas especies identificadas por ARDRA o por secuenciación del gen *rpoB* pertenecientes al complejo ABC

Tabla 4: Comparación de los resultados de identificación de las especies de *Acinetobacter* pertenecientes al complejo ABC mediante distintas versiones de bases de datos de los sistemas Vitek MS™ y Biotyper.

Identificación	Vitek MS™				Biotyper	
	v.1.0	v.2.0	v.3.0	v.3.2	v4.0.0.0	v8.0.0.0
Complejo ABC	76	76	75	ni	ni	ni
<i>A. baumannii</i>	ni	ni	ni	33	32	32
<i>A. calcoaceticus</i>	ni	ni	ni	1	1	1
<i>A. nosocomialis</i>	-	-	-	-	1	0
<i>A. pittii</i>	ni	ni	ni	37	39	39
<i>A. dijkshoorniae</i>	ni	ni	ni	ni	ni	2
Total	76	76	75	71	73	74
Indice Kappa	-	-	-	0.78	0.77	0.81
Sensibilidad	97.3%	96.1%	92.4%	98.6%	98.6%	100%
AUC	0.89 (0.74-1)	0.84 (0.67-1)	0.69 (0.48-0.9)	0.94 (0.83-1)	0.94 (0.83-1)	0.99 (0.97-1)

Abreviaturas: ni: no identificado; AUC: área bajo la curva

4.3. Identificación de *R. equi* y *Dietzia* spp.

4.3.1. **Asignación previa de las cepas:**

En el período 1995-2010 se recibieron 144 cepas bacterianas procedentes de laboratorios de centros universitarios y de centros hospitalarios, aislados de humanos y animales, que pasaron a formar parte de la colección de actinomicetos de Cantabria. Las 144 cepas habían sido identificadas en origen como *R. equi*, en su mayoría mediante el sistema API-Coryne. En algunos casos se informaba de la necesidad de confirmar la identificación inicial. En algunas cepas de origen animal se había confirmado la identificación mediante la prueba CAMP, ya descrita en el apartado 1.3.2.

Desde 2010 hasta 2014 se aislaron en el Servicio de Microbiología del HUMV 10 cepas que fueron identificadas como *R. equi* por el sistema API-Coryne, pero la morfología y color de las colonias sugerían que podría tratarse de especies diferentes.

Un total de 144 de los 154 aislamientos fueron positivos en el ensayo de amplificación por PCR dirigido a *choE* y, por lo tanto, se asignaron a *R. equi*. Los 10 aislados restantes obtuvieron un resultado de PCR *choE* negativo. Mediante secuenciación parcial del 16S rRNA, se identificaron como *D. maris* (n=5), *D. natronolimnaea* (n=3) y *D. cinnamomea* (n=2)¹³⁴. Esta identificación se consideró el método de referencia.

4.3.2. Aplicación de la tecnología MALDI-TOF MS a la identificación de *R. equi* y *Dietzia* spp.

Las cepas se estudiaron con un equipo VITEK MS™ del servicio de Microbiología del HUMV y con un sistema Biotyper del servicio de Microbiología del Hospital Clinic de Barcelona. De esta manera, pudieron compararse las prestaciones del VITEK MS con el sistema Biotyper.

4.3.2.1. Identificación mediante la plataforma VITEK MS™

En las pruebas directas de colonias bacterianas con Vitek MS™, el sistema identificó correctamente 35 (22,7%) de los 144 aislamientos a nivel de especie en su mejor rendimiento. En la mayoría de los casos, el fallo del sistema para dar una identificación precisa se debió a su incapacidad para leer las muestras. Cuando se extrajeron las proteínas con etanol, Vitek MS™ identificó correctamente a nivel de especie un total de 130 (84,4%) aislados: 124 se identificaron como *R. equi* y 6 como *Dietzia* spp. (Tabla 5). Dentro de la colección de 144 aislados de *R. equi*, Vitek MS™ identificó correctamente 124 (86,1%) aislados con la puntuación máxima (99,9%). Cuando la puntuación de confianza se redujo al 50%, se identificó correctamente un aislado adicional como *R. equi*.

Considerando el grupo de 10 aislados de *Dietzia* spp., Vitek MS™ identificó 6 (60%) cepas con la puntuación máxima (99,9%) y 2 (20%) cepas (*D. natronolimnaea* y *D. maris*) con una puntuación del 50%, mientras que las 2

cepas restantes (*D. natronolimnaea* y *D. cinnamea*) no se identificaron (Tabla 6).

4.3.2.2. Identificación mediante la plataforma Biotyper

El sistema Biotyper identificó 141 (91,6%) cepas a nivel de especie analizando directamente las colonias. Las 13 cepas restantes (10 *Dietzia* spp. y 3 *R. equi*) fueron identificadas cuando las colonias se extrajeron con acetonitrilo (Tabla 6). Considerando por separado las 144 cepas de *R. equi*, todas fueron identificadas correctamente a nivel de especie. Sin embargo, hay que precisar que 130 se identificaron cuando el punto de corte del sistema que marca el límite de confianza se estableció en >2 (como recomienda el fabricante), mientras que en 14 cepas no se pudo asignar la especie. Si el punto de corte se reducía a 1,750, todas las cepas de *R. equi* se identificaban correctamente. De las 10 *Dietzia* spp., solamente se identificó inicialmente una, *D. maris*, a nivel de especie. Cuando el punto de corte se redujo a 1,750, 7 más fueron identificadas: 4 como *D. maris* y 3 como *D. natronolimnaea*. De las dos cepas restantes, una se identificó a nivel de género, mientras que la última no pudo ser identificada.

El sistema Biotyper proporcionó identificaciones de alta confianza, sin extracción de las proteínas, para 141 (91,6%) aislamientos. Por el contrario, un grupo de 13 aislamientos, incluidos las 10 cepas de *Dietzia* spp. y las 3 de *R. equi*, requirieron extracción con acetonitrilo (Tabla 6). El sistema identificó correctamente a nivel de especie 131 (85%) aislamientos (130 *R. equi* y 1 *Dietzia* sp.), mostrando puntuaciones $\geq 2,000$ en todos los casos. Los 130

aislamientos identificados como *R. equi* fueron positivos para la PCR del gen *choE*, mientras que el aislado identificado como *Dietzia* sp. resultó negativo. Los restantes aislados de *R. equi* (n=14), que habían recibido puntuaciones en el rango de 1,700 a 1,900, se volvieron a analizar utilizando un valor de corte a nivel de especie de $\geq 1,750$. El resultado fue que todos ellos se identificaban como *R. equi*, resultado coincidente con la identificación obtenida por el método de referencia (PCR *choE*). Considerando el grupo de 10 cepas de *Dietzia* spp., Biotyper identificó 1 (10%) cepa (puntuación, $\geq 2,000$) a nivel de especie y 8 (80%) cepas a nivel de género (las puntuaciones oscilaron entre 1,700 y 1,999) y otra 1 (10%) no pudo ser identificada (puntuación $< 1,700$). Cuando el punto de corte del nivel de especie se redujo a una puntuación de $\geq 1,750$, 7 de 8 *Dietzia* spp. fueron también identificadas correctamente a nivel de especie, como se confirmó posteriormente mediante la secuenciación del 16S rRNA (Tabla 5).

Tabla 5: Identificación de *R. equi* (n=144) y *Dietzia* spp. (n=10) mediante Vitek MS™ versus Bruker Biotyper.

Microorganismo	Cepas	VITEK MS™				Bruker Biotyper			
		Identificación correcta a nivel de especie	Correcto con baja puntuación (50%)	No identificado	Identificación a nivel de género	Identificación correcta a nivel de especie	Correcto con baja puntuación (1.7-2)	No identificado	Identificación a nivel de género
<i>R. equi</i>	144	124 (86.1%)	1 (0.7%)	19 (13.2%)	0	130 (90.3%)	14 (9.7%)	0	0
<i>Dietzia</i> spp.	10	6 (60%)	2 (20%)	2 (20%)	0	1 (10%)	7 (70%)	1 (10%)	1 (10%)
<i>D. maris</i>	5	4	1	0	0	1	4	0	0
<i>D. natronolimnaea</i>	3	1	1	1	0	0	3	0	0
<i>D. cinnamea</i>	2	1	0	1	0	0	0	1	1
<i>Nº total de cepas</i>	154	130 (84.4%)	3 (1.9%)	21 (13.6%)	0	131 (85.1%)	21 (13.6 %)	1 (0.6%)	1 (0.6%)

Tabla 6: Comparación de los resultados de identificación de los 154 aislamientos de *R. equi* y *Dietzia* spp. con los sistemas Vitek MS™ y Biotyper MALDI-TOF MS utilizando dos métodos para la preparación de las muestras

Sistema MALDI-TOF MS	Número de aislamientos identificados por:							
	Análisis directo de colonias				Análisis de colonia por extracción			
	Total	<i>R. equi</i>	<i>Dietzia</i> spp.	No identificado	Total	<i>R. equi</i>	<i>Dietzia</i> spp.	No identificado
Vitek MS™	35	35	0	119	130 (35 + 95 *)	124 (35 + 89 *)	6 (0 + 6 *)	24
Bruker Biotyper	141	141	0	13	153 (141 + 12 *)	144 (141 + 3 *)	9 (0 + 9 *)	1

* El número de cepas que requirieron un segundo análisis sobre la misma preparación de la muestra para dar una identificación fiable.

4.4. Identificación de *Candida* spp.

Las identificaciones de las 298 cepas de *Candida* spp. incluidas en el estudio con los métodos convencionales fueron las siguientes: 114 *C. albicans*, 95 *Candida parapsilosis*, 41 *Candida tropicalis*, 29 *Candida glabrata*, 6 *Candida guilliermondii*, 5 *Candida krusei*, 4 *Candida lusitanae*, 3 *Candida lipolytica* y 1 *Candida haemulonii*. El sistema Vitek MS™ identificó correctamente a nivel de especie 279 cepas (93,62%). Diez (3,36%) se identificaron erróneamente y 9 (2,69%) no fueron identificadas (Tabla 7). El sistema Vitek MS™ identificó 109/114 (95,6%) *C. albicans*, con 5 aislamientos restantes erróneamente identificados como *Candida dubliniensis*. Estos 5 aislamientos fueron identificados como *C. albicans* por el sistema API ID32C, una PCR específica diseñada por Luo y colaboradores¹³⁸ además de por secuenciación de la región ITS. En el grupo “psilosis” el sistema Vitek MS™ identificó 89/95 (93,7%) de los aislamientos, con 88 (92,6%) identificados correctamente como *C. parapsilosis* y un aislamiento (1,05%) identificado erróneamente como *Candida dattila*. Las restantes 6 cepas (6,3%) no identificadas de este grupo fueron identificadas por métodos convencionales como *Candida metapsilosis* (n=4), *Candida orthopsilosis* (n=1) y *C. parapsilosis* (n=1). Las especies *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* no estaban incluidas en la versión de la base de datos (v2) utilizada para este estudio. Vitek MS™ identificó correctamente 37 de las 41 *C. tropicalis* (90,2%), 2 (4,8%) fueron identificadas erróneamente como *C. albicans* y *Geotrichum fermentans*, respectivamente, mientras que las dos restantes (2,4%) no pudieron ser identificadas. Cuando se crecieron en medio de cultivo CHROMagar Candida, 31 cepas de *C. tropicalis* (75,6%) presentaron un color azul característico a las 24 horas, las restantes 8 (19,5%) presentaron

color crema a las 24 horas y color azul a las 48 horas, y 2 (4,9%) presentaron un color violeta tanto a las 24 como a las 48 horas. Veinte y ocho aislamientos de *C. glabrata* (96,5%) fueron correctamente identificados, mientras que uno (3,5%) no fue identificado.

Todas las cepas de *C. guilliermondii* (n=6), *C. krusei* (n=5) y *C. lipolytica* (n=3) fueron identificadas correctamente mediante Vitek MS™. Dos de los cuatro aislamientos en el grupo de *C. lusitaniae* fueron correctamente identificados mediante Vitek MS™, mientras que las otras 2 fueron identificadas erróneamente como *C. tropicalis* y *Cryptococcus humicola*. La única cepa de *C. haemulonii* fue correctamente identificada por Vitek MS™. Sin embargo, el sistema API-ID32C la identificó erróneamente como *C. sake* (Tabla 7).

Tabla 7: Identificación de *Candida* sp. mediante API 32C y Vitek MS™

Métodos moleculares (seq/PCR)	API 32C	VITEK MS™ MALDI-TOF
109 <i>C. albicans</i>: PCR esp. 5 <i>C. albicans</i>	109 No realizado 5 <i>C. albicans</i>	109 <i>C. albicans</i> 5 <i>C. dubliniensis</i>
<i>C. parapsilosis</i> group (n=95) 90 <i>C. parapsilosis</i> 4 <i>C. metapsilosis</i> 1 <i>C. orthopsilosis</i>	95 <i>C. parapsilosis</i>	88 <i>C. parapsilosis</i> 6 No identificado(P150*) 1 Error de identificación [<i>C. dattila</i>]
<i>C. tropicalis</i> (n=41)	41 <i>C. tropicalis</i>	37 <i>C. tropicalis</i> 1 No identificado (P150*) 2 Error de identificación [<i>C. albicans</i> y <i>Geotrichum fermentans</i>] 1 No leído (P201**)
<i>C. glabrata</i> (n=29)	29 <i>C. glabrata</i>	28 <i>C. glabrata</i> 1 No identificado (P150*)
<i>C. guilliermondii</i> (n=6)	6 <i>C. guilliermondii</i>	6 <i>C. guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i> (n=5)	5 <i>C. krusei</i>	5 <i>C. krusei</i>
<i>C. lipolytica</i> (n=3)	3 <i>C. lipolytica</i>	3 <i>C. lipolytica</i>
<i>C. lusitaniae</i> (n=4)	4 <i>C. lusitaniae</i>	2 <i>C. lusitaniae</i> 2 Error de identificación [<i>C. tropicalis</i> y <i>Cryptococcus humicola</i>]
<i>C. haemulonii</i> (n=1)	1 <i>C. sake</i>	1 <i>C. haemulonii</i>

Entre las técnicas de identificación convencionales y el sistema MALDI-TOF MS, el coeficiente Kappa (k) resultó 0,855, valor que, de acuerdo con los índices establecidos por la escala de Landis y Koch, indica una muy buena concordancia. Si se calcula el coeficiente Kappa comparando cada uno de los dos métodos con el de referencia, el valor para Vitek MSTM (0,91) es bueno, mientras que el de los métodos convencionales se aproxima a 1 (0,97). La sensibilidad y especificidad del sistema Vitek MSTM alcanza el 82% (Intervalo de confianza [IC] 95%: 70–90,6%) y el 97.2% (IC 95%: 94,5–98,8%), respectivamente, con un valor predictivo positivo y negativo de 86,2% (IC 95%: 74,60–93,9%) y 96.1% (IC 95%: 93,2–98,1%), respectivamente. Por otra parte, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del sistema API resultaron del 100% (IC 95%: 92,9–100%), 98% (IC 95%: 95,6–99,2%), 89.3% (IC 95%: 78,1–96%), y 100% (IC 95%: 98,7–100%), respectivamente. La prevalencia de la candidiasis en el HUMV durante esos años alcanzó sólo el 2%. La prevalencia no influye sobre las propiedades intrínsecas de la prueba pero podría hacerlo sobre los valores predictivos.

5 DISCUSIÓN

En la actualidad, la EM MALDI-TOF es una de las técnicas más utilizadas en el trabajo diario en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de microorganismos, tanto de bacterias como de levaduras y hongos filamentosos. En este trabajo hemos querido reflejar una parte de nuestra experiencia con el equipo Vitek MS™ aplicado a resolver algunos de los problemas que surgen en nuestra rutina para identificar correctamente a nivel de especie los microorganismos patógenos para el ser humano. El sistema MALDI-TOF Vitek MS™ es un buen sistema de identificación para el trabajo diario de bacterias y levaduras, ya que hemos demostrado una alta correlación entre los resultados obtenidos mediante este sistema y los métodos de referencia. Y los resultados son satisfactorios, tanto en grampositivos como en gramnegativos, aunque el tamaño de la muestra de los primeros ha sido reducido. No hemos encontrado dificultades en la identificación de patógenos relevantes, como son *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*, pudiéndose diferenciar bien *S. pneumoniae* de otros *Streptococcus*, como los del grupo viridans, al contrario de lo que han reportado otros autores¹⁴⁰. También identifica bien las corinebacterias más relevantes que se presentan como patógenos (oportunistas) humanos, aunque no discrimina entre las especies *C. xerosis* y *C. amycolatum*⁸³, debido a que presentan un perfil proteómico muy similar, reflejado en el hecho de que en la base de datos se encuentran definidos como taxón *C. xerosis-amycolatum* (versión v1).

En cuanto a los gramnegativos se han experimentado también dificultades de preparación de la muestra en cepas mucosas de *K. pneumoniae*

o *E. coli*, dificultad también habitual para los sistemas de identificación automáticos y manuales. En el género *Enterobacter* hemos observado que no distingue entre las especies *E. cloacae* y *E. asburiae*, esto puede deberse a que la taxonomía de las *Enterobacteriaceae* es muy compleja y rápidamente cambiante desde el advenimiento de técnicas que miden la distancia evolutiva, por ejemplo, la hibridación de ácido nucleico y la secuenciación¹⁴¹. Tampoco identifica aquellas pertenecientes al complejo ABC por el mismo motivo, por estar filogenéticamente muy relacionadas¹⁴². En el grupo de bacilos gramnegativos no fermentadores ha sido muy eficiente en los casos de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, corroborando los datos de estudios previos¹³³, pero en otros géneros, como *Burkholderia*, sería necesario la aplicación de algún tipo de pre-tratamiento por la complejidad de obtener unos espectros adecuados, al igual que lo anteriormente comentado para las cepas mucosas, así como implementar las bases de datos con más especies de este género, conociendo la dificultad histórica a la hora de identificar este género¹⁴³.

Las levaduras han sido identificadas con gran efectividad, a pesar del reducido número de cepas incluidas en este trabajo, en consonancia con otros estudios publicados¹⁴⁴, si bien han aparecido dificultades en las tres especies del grupo psilosis.

En el estudio del complejo ABC, tanto Vitek MS™ como Biotyper han permitido una identificación aceptable de las especies del complejo. Como dato de interés, los resultados también han corroborado que la técnica ARDRA es un método muy resolutivo, de utilidad para aquellos laboratorios que carezcan del sistema MALDI-TOF, aunque por su complejidad es difícilmente implantable

en el día a día de los laboratorios de microbiología clínica. En estudios anteriores ya se habían comunicado algunas de las limitaciones que hemos encontrado nosotros, en particular la necesidad de actualizar permanentemente las bases de datos¹⁰⁰, incorporando las nuevas especies descritas, en especial las del ámbito clínico. También está descrita la dificultad en diferenciar especies de *Acinetobacter* spp. del clado hemolítico, con una relación filogenética muy estrecha, que podía resolverse utilizando una solución matriz alternativa (ácido ferúlico fuertemente acidificado)¹⁰¹. A pesar de todo esto, se recomienda la identificación a nivel de especie mediante EM MALDI-TOF, tanto por los sistemas Vitek MSTM como Biotyper para cepas de otros taxones menos comunes pertenecientes al género *Acinetobacter*, aunque con la debida precaución para este fin. En efecto, si bien las discrepancias de identificación halladas en Biotyper tienen un impacto clínico mínimo, o ningún impacto, en el tratamiento del paciente, las discrepancias encontradas en Vitek MSTM tendrían un enorme impacto clínico. La base de datos actual de Vitek MSTM v3.2 debe revisarse, como ya se ha hecho con versiones anteriores, para incluir las nuevas especies de *Acinetobacter*, de manera que se obtengan identificaciones al menos a nivel de género, lo que también es de interés en la práctica rutinaria.

La identificación de *R. equi* por métodos convencionales, basados en la morfología de la colonia y las reacciones bioquímicas, no es fiable y requiere métodos moleculares para diferenciarlo de *Dietzia* spp. Los resultados obtenidos en este trabajo, en que se han aplicado las dos plataformas más comunes de EM MALDI-TOF a la identificación de una colección de cepas de

estos actinomicetos estrechamente relacionados, indican que es una técnica fiable y rápida que permite diferenciarlos entre sí e identificar la mayoría de las cepas de *Dietzia* spp. Si bien el número de cepas de *R. equi* incluidas en el estudio permite calificar la colección como representativa, no puede afirmarse lo mismo sobre el tamaño del grupo de *Dietzia* spp., limitado a 10 cepas clínicas. El control de la pandemia debida al VIH hace que desde hace aproximadamente 10 años no se han vuelto a aislar *R. equi* en nuestro entorno hospitalario. Por otra parte, *Dietzia* spp. es una bacteria ambiental y en todo el mundo se han relacionado muy pocos casos con infecciones en humanos¹⁴⁵. Recientemente se ha propuesto la utilización de una estirpe de *Dietzia* spp. como probiótico para controlar infecciones por micobacterias en animales¹⁴⁶.

En general, con el método de extracción directa de colonias, Biotyper permitió la identificación del 91,6% de las cepas de *R. equi* y *Dietzia* spp analizadas, en contraste con solo el 22,7% para Vitek MSTM. Estudios previos reportaron que los resultados de identificación a nivel de especie con el sistema Biotyper mejoran si se disminuye el valor a partir del cual una identificación se considera como fiable, de 1,900¹⁴⁷ a 1,700¹⁴⁸, sin que aumenten los falsos positivos. En nuestro estudio, al reducir la puntuación de $\geq 2,000$ a $\geq 1,750$, pudimos identificar a nivel de especie prácticamente todas las cepas analizadas, 144 (100%) de *R. equi* y 8 (80%) de 10 de *Dietzia* spp, sin errores de identificación. Solo una cepa obtuvo una puntuación inferior a 1,700 y, por lo tanto, no pudo identificarse con Biotyper MS. Esta cepa fue identificada como *D. cinnamea* mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Si bien *D. cinnamea* se aisló por primera vez de un frotis perianal de un paciente

con un trasplante de médula ósea¹⁴⁹, es más conocida por su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos y rara vez por su potencial patógeno¹⁵⁰. El comportamiento del Biotyper en la identificación de *R. equi*, distinguiéndola de *Dietzia* spp., es comparable al observado entre la PCR del gen *choE* y la secuenciación del 16S rRNA. Cuando el valor de corte de la especie se redujo a una puntuación de $\geq 1,750$, Biotyper identificó correctamente todos los aislados de *R. equi*. La amplificación por PCR del gen *choE* es un método fiable para la identificación de *R. equi*, pero EM MALDI-TOF es más rápido y más rentable en términos de coste laboral y económico. No obstante, es una tecnología que no está disponible fuera del entorno hospitalario en nuestro país. Muchos países tampoco han podido implementar esta tecnología en la mayoría de sus hospitales, por motivos principalmente económicos. Aunque *Dietzia* spp. no se asocia comúnmente con infecciones humanas¹⁵¹, los casos esporádicos requieren una identificación precisa de *Dietzia* spp. a nivel de especie. La secuenciación del 16S rRNA es actualmente el único método que garantiza la identificación definitiva y concluyente del género *Dietzia* al rango de especie.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el pre-tratamiento de las colonias bacterianas con etanol mejora sustancialmente el número de identificaciones correctas obtenidas con el sistema Vitek MSTM. Actinomicetos como *R. equi* y *Dietzia* spp. contienen en sus paredes celulares ácidos micólicos de cadena larga, así como una gran cantidad de lipopolisacáridos, lo que impide la absorción completa de energía cuando se dispara el láser. En consecuencia, no se generan espectros de masas. Con el uso de etanol en el

método de extracción se elimina una cantidad sustancial de los ácidos micólicos y polisacáridos, mientras se conservan las proteínas diana, lo que permite la generación de espectros de alta calidad¹⁵². Gracias al uso del método de extracción, el sistema Vitek MSTM ha logrado alcanzar un 84,4% de muestras correctamente identificadas a nivel de especie. Sin embargo, no pudo identificar 20 aislamientos de *R. equi* ni distinguir adecuadamente 4 *Dietzia* spp. de *R. equi*, mientras que el análisis por PCR de gen *choE* identificó correctamente todos los aislamientos de *R. equi*. La base de datos SARAMIS 2.0 incluye tres especies del género *Dietzia*: *D. maris*, *D. natronolimnaea* y *D. cinnamea*. Sin embargo, Vitek MSTM identificó a nivel de especie solo 6 de los 10 aislamientos de *Dietzia* analizados.

En general, en las comparaciones de los dos sistemas, el sistema MALDI Biotyper proporcionó una mayor precisión que el sistema Vitek MSTM para la identificación de *R. equi*, así como para la diferenciación de *R. equi* de *Dietzia* spp.. Si bien es cierto que son necesarios más estudios, sobre todo en modo IVD que se adecua más al trabajo diario, para incrementar las bases de datos de los sistemas MALDI-TOF, ya sea mejorando la identificación de algunas especies, como *Rhodococcus* spp., *Dietzia* spp. o *Burkholderia* spp., que por la composición de su pared pudieran hacer difícil su identificación, como por la inclusión en las bases de datos de subespecies y especies crípticas que son importantes como patógenos emergentes nosocomiales capaces de adquirir genes de resistencia y ser necesaria su pronta identificación¹³⁰. Aunque los datos fueron limitados, porque solo se incluyeron 10 aislamientos de *Dietzia* spp. en el estudio, los resultados indicaron que la

identificación adecuada de las especies de este género requiere confirmación mediante secuenciación del 16S rRNA. Este es uno de los ejemplos que indican que los fabricantes deben actualizar periódicamente las bases de datos espectrales para mejorar las tasas de identificación.

Por último, hemos constatado que MALDI-TOF es un método más rápido y preciso que el sistema API para la identificación de *Candida* spp., permitiendo adelantar el diagnóstico en 24 o 48 horas. Nuestros resultados muestran una excelente concordancia entre las técnicas de identificación convencionales y el sistema EM MALDI-TOF. Vitek MS TM identificó correctamente el 89,9% cepas, pero no identificó los organismos a nivel de especie en el 10,1% casos. Nuestros resultados están en consonancia con otros trabajos de la literatura¹⁵³, quizás con resultados de concordancia algo más bajos, pero cuando el análisis se hace por complejos de levadura nuestros datos se igualan a los de la literatura¹⁵⁴. Esto se justifica porque en nuestro estudio el número de aislamientos de *C. albicans* es menor que el de otras especies del género, y no se realizaron nuevas pruebas cuando hubo fallos espectrales en la adquisición, (valores en bruto). De esta forma el trabajo ha aportado más realidad de la rutina diaria y se le ha otorgado un valor añadido, ya que algunas publicaciones no dejan claro si se llegó a sus valores por agotamiento en la muestra o por repeticiones.

Dentro de este apartado también añadir que el MALDI-TOF es una gran herramienta en los laboratorios de microbiología para la identificación de hongos filamentosos. Lo hace con gran éxito para la mayoría de los hongos

clínicamente relevantes, con tiempos de respuesta significativamente reducidos y con resultados de alta precisión. Aunque el rendimiento sigue dependiendo de las diferentes bases de datos y de los diferentes protocolos de preparación de las muestras^{155,156}.

6 CONCLUSIONES

1.- Hemos demostrado una alta correlación entre los resultados obtenidos mediante el sistema MALDI-TOF Vitek MS™ para la identificación de microorganismos de interés clínico y los métodos de referencia, lo que afianza a este sistema como una buena alternativa en el trabajo diario como método de identificación de bacterias y hongos.

2.- El análisis proteómico mediante MALDI-TOF, tanto a través de la plataforma Vitek MS como con el sistema Biotyper, es una tecnología rápida y precisa para la identificación de especies del complejo ABC, mostrando una buena correlación con el ARDRA, considerado como el “gold estándar” para la identificación del complejo.

3.- El MALDI-TOF es una herramienta alternativa a la PCR del gen *choE* para la identificación y diferenciación de cepas de *R. equi* y *Dietzia* spp., aunque, como hemos visto, la composición de la pared de estos microorganismos siga marcando alguna limitación para la aplicación de esta técnica.

4.- En el caso de *Candida* spp. MALDI-TOF también es un sistema válido de identificación, con una alta sensibilidad y especificidad, proporcionando resultados con rapidez, lo que permite anticipar el diagnóstico respecto a los sistemas habituales de identificación. Es necesario mejorar las bases de datos, para poder discriminar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

5.- Para los géneros *Acinetobacter* y *Rhodococcus* el sistema Biotyper se ha mostrado superior que el sistema Vitek MS en la identificación a nivel de especie.

6.- Como conclusión global final, la tecnología MALDI-TOF es una buena metodología para la actividad rutinaria en laboratorios de microbiología clínica, ya que identifica una amplia gama de especies bacterianas y levaduras de importancia clínica, con rapidez y precisión.

7 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Váradi L, Luo JL, Hibbs DE, Perry JD, Anderson RJ, Orenge S, Groundwater PW. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem Soc Rev.* 2017;46:4818-4832. doi: 10.1039/c6cs00693k.
- 2.-Mascart G, Martiny D, Miendje Y, Geoffrey Tummers G, Bhavna Mahadeb B, Vandenberg O, Hallin M. Automatisation en bactériologie: Quel avenir ? Un exemple concret dans le cadre d'une consolidation de laboratoires universitaires. *Annales De Biologie Clinique.* 2018;76:4. doi:10.1684/ABC.2018.1366.
- 3.- Novak SM, Marlowe EM. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Lab Med.* 2013;33:567-588. doi: 10.1016/j.cll.2013.03.002.
- 4.- Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, Schoske R, Crawford R. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. *Croat Med J.* 2005;46:522-529.
- 5.- Patel R. New Developments in clinical bacteriology laboratory. Affiliations expand. 2016;91:1448-1459. doi:10.1016/j.mayocp.2016.06.020.
- 6.- Rodicio MR, Mendoza MC. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:238-245. doi: 10.1157/13059055.
- 7.- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:908-934. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x.

- 8.- Schleifer KH. Classification of bacteria and archaea: past, present and future. Syst Appl Microbiol. 2009;32:533-542. doi: 10.1016/j.syapm.2009.09.002.
- 9.-Woese CR, Kandler O, Wheelis ML.Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4576-9. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576.
- 10.- Lewis K. New approaches to antimicrobial discovery. Biochem Pharmacol. 2017;134:87-98. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.002.
- 11.- Rodríguez Tudela J.L, Cuenca-Estrella M. Medical relevance of the identification of human pathogenic fungi to species level. Rev Clin Esp. 2001;201:188-190. doi: 10.1016/s0014-2565(01)70790-4.
- 12.- Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014;20:329-344. doi: 10.1111/odi.12123.
- 13.- Granjon V, Bollet C, Gulian C, Estrangin E, de Micco P. Identification of coagulase-negative *Staphylococci*. Significance of miniaturized systems. Ann Biol Clin. 1988;46:800-803.
- 14.- Reynaud AE, Coude Du Foresto B, Courtieu AL Comparative study of various API galleries for the identification of gram negative bacteria. Ann Biol Clin. 1988;46:259-262.
- 15.- Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y, Greub G. Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? Clin Microbiol Infect. 2016;22:217-235. doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.030.

- 16.- Kolenda C, Dupieux C, Decousser JW, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Bès M, Teale C, Dickson E, Hill R, Skov R, Kearns A, Laurent F. Comparison of automated antimicrobial susceptibility testing systems to detect mecC-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2017;55:3554-3556. doi: 10.1128/JCM.01150-17.
- 17.- Stefaniuk E, Baraniak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W . Evaluation of the BD Phoenix automated identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003;22:479-485. doi: 10.1007/s10096-003-0962-y.
- 18.- Grant ML, Parajuli S, Deleon-Gonsalves R, Potula R, Truant AL. Comparative Evaluation of the BD Phoenix YeastID panel and Remel RapID Yeast Plus system for yeast identification. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2016;2016:4094932. doi: 10.1155/2016/4094932.
- 19.- Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2011;49:887-892. doi: 10.1128/JCM.01890-10.
- 20.- Marucco AP, Minervini P, Snitman GV, Sorge A, Guelfand LI, Moral LL; Integrantes de la Red de Micología CABA. Comparison of the identification results of *Candida* species obtained by BD Phoenix™ and Maldi-TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1). Rev Argent Microbiol. 2018;50:337-340. doi: 10.1016/j.ram.2017.10.003.
- 21.- d'Azevedo PA, Siquiera I, Gugel J, Antunes AL, Secchi C, Pasternak J, Martino MD. Evaluation of the automated system Vitek2 for identification and

antimicrobial susceptibility testing of Brazilian Gram-positive cocci strains. J Infect Dis. 2009;13:107-110. doi: 10.1590/s1413-86702009000200007.

22.- Pérez-Vázquez M, Oliver A, Sánchez del Saz B, Loza E, Baquero F, Cantón R. Performance of the VITEK2 system for identification and susceptibility testing of routine Enterobacteriaceae clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 2001;17:371-376. doi: 10.1016/s0924-8579(01)00318-1.

23.- Ferrara G, Maria Panizol MM, Mazzone M, Maria Delia Pequeneze MD, Reviakina V. A Comparative study between the Vitek YBC and Microscan Walk Away RYID automated systems with conventional phenotypic methods for the Identification of yeasts of clinical interest. Invest Clin. 2014;55:297-310.

24.- Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019;18:7. doi: 10.1186/s12941-019-0306-0.

25.- Lee MJ, Jang SJ, Li XM, Park G, Kook JK, Kim MJ, Chang YH, Shin JH, Kim SH, Kim DM, Kang SH, Moon DS. Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78:29-34. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.013.

26.- O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the MicroScan rapid neg ID3 panel for identification of Enterobacteriaceae and some common gram-negative nonfermenters. J Clin Microbiol. 2000;38:3577-3580. doi: 10.1128 / JCM.38.10.3577-3580.2000.

27.- Patteet L, Goossens H, Ieven M. Validation of the MicroScan-96 for the species identification and methicillin susceptibility testing of clinical significant

- coagulase-negative *Staphylococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:747-751. doi: 10.1007/s10096-011-1368-x.
- 28.- Iwen PC, Rupp ME, Schreckenberger PC, Hinrichs SH. Evaluation of the revised MicroScan dried overnight gram-positive identification panel to identify *Enterococcus* species. J Clin Microbiol. 1999;37:3756-3758. doi: 10.1128 / JCM.37.11.3756-3758.1999.
- 29.- Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook JK, Kim DM, Moon DS, Park YJ. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70:442-447. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.013.
- 30.- Brigante G, Menozzi MG, Pini B, Porta R, Somenzi P, Sciacca A, Spanu T, Stefani S. Identification of coagulase-negative *Staphylococci* by using the BD phoenix system in the low-inoculum mode. J Clin Microbiol. 2008;46:3826-8. doi: 10.1128/JCM.00877-08.
- 31.- Fahr AM, Eigner U, Armbrust, Caganic A, Dettori G, Chezzi C, Bertoncini L, Benecchi M, Menozzi MG. Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. Multicenter Study. J Clin Microbiol. 2003;41:1135-42. doi: 10.1128/jcm.41.3.1135-1142.2003.
- 32.- Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, König W, König B. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2006;44:2824-30. doi: 10.1128/JCM.00226-06.

- 33.- Kim M, Heo SR, Choi SH, Kwon H, Park JS, Seong MW, Lee DH, Park KU, Song J, Kim EC. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci*. BMC Microbiol. 2008;23;8:233. doi: 10.1186/1471-2180-8-233.
- 34.- Galvão da Silva Paim T, Cantarelli VV, Alves d'Azevedo P. Performance of the Vitek 2 system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47:377-81. doi: 10.1590/0037-8682-0123-2013.
- 35.- Patteet L, Goossens H, Ieven M. Validation of the MicroScan-96 for the species identification and methicillin susceptibility testing of clinical significant coagulase-negative *staphylococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:747-51. doi: 10.1007/s10096-011-1368-x.
- 36.- Grant CE, Sewell DL, Pfaller M, Bumgardner RV, Williams JA. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative *staphylococci* to species level. Diagn Microbiol Infect Dis. 1994;18:1-5. doi: 10.1016/0732-8893(94)90126-0.
- 37.- Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. J Clin Microbiol. 2008;46:2327-33. doi: 10.1128/JCM.00075-08.
- 38.- Park BY, Mourad D, Hong JS, Yoon EJ, Kim D, Lee H, Jeong SH. Performance Evaluation of the Newly Developed BD Phoenix NMIC-500 Panel Using Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli. Ann Lab Med. 2019;39:470-477. doi: 10.3343/alm.2019.39.5.470.

- 39.- Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, Avola A, Fico L, Palazzo C, Sapia GF, Visaggio D, Dicuonzo G. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72:20-31.
- 40.- Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis.* 2014;6:534-8. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.18.
- 41.- Quesada MD, Giménez M, Molinos, Fernández G, Sánchez MD, Riveló R, Ramírez A, Banqué G, Ausina V. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:137-40. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02907.x.
- 42.- Gavini F, Husson MO, Izard D, Bernigaud A, Quiviger B. Evaluation of autoscan-4 for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 1988;26:1586-8. doi: 10.1128/JCM.26.8.1586-1588.1988.
- 43.- Er H, Koyuncu-Ozyurt O, Ozhak B, Yazisiz H, Eres-Saritas Z, Cetinkaya O, Ongut G, Ogunc D. Evaluation of an Automated Yeasts Identification System for Identification of Yeast Isolates. *Clin Lab.* 2020;66. doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190636.
- 44.- Kanesaka I, Kanayama A, Itou T, Uchino U, Koyama H, Matsuzaki K, Matsumoto S, Kobayashi I. Evaluation of the BD Phoenix ID Yeast System for the Species Identification of Clinical Yeast-Like Organisms. *Kansenshogaku Zasshi.* 2017;90:787-91.

- 45.- Riddle DL, Giger O, Miller L, Hall GS, Woods GL. Clinical comparison of the Baxter MicroScan Yeast Identification Panel and the Vitek Yeast Biochemical Card. Am J Clin Pathol. 1994;101:438-42. doi: 10.1093/ajcp/101.4.438.
- 46.- Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A. Evaluation of Vitek 2 for the identification of *Candida* yeasts. Rev Argent Microbiol. 2014;46:107-10. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70057-4.
- 47.- Germain GSt, Beauchesne D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. J Clin Microbiol. 1991;29:2296-9. doi: 10.1128/JCM.29.10.2296-2299.1991.
- 48.- García P. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad *in vitro*. Rev Chil Infect. 2002;19: S 96-100.
- 49.- G. Prats. Técnicas genéticas. Microbiología Clínica, 1ªed, pp. 187-202.
- 50.- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Biol. 1971;56:341-61. doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.
- 51.- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62:716-721. doi: 10.1099 / ijs.0.038075-0.
- 52.- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-3402. doi: 10.1093 / nar / 25.17.3389.

- 53.- Sales ML, Fonseca Júnior AA, Orzil L, Alencar AP, Silva MR, Issa MA, Soares Filho PM, Lage AP, Heinemann MB. Braz. Validation of a real-time PCR assay for the molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol. 2015;45:1363-1369. doi: 10.1590/s1517-83822014000400029.
- 54.- Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. J Infect Dev Ctries. 2014;15:461-468. doi: 10.3855/jidc.3856.
- 55.- Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, Thatcher SA, Pavia AT, Barney T, Alger GD, Daly JA, Ririe KM, Ota I, Poritz MA. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74:349-355. doi: 10.1016 / j.diagmicrobio.2012.08.013.
- 56.- Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, Amore R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanguinetti M. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. J Clin Microbiol. 2015;53:2439-2450. doi: 10.1128/JCM.00802-15.
- 57.- Tortone CA, Zumárraga MJ, Gioffr AK, Oriani DS. Utilization of molecular and conventional methods for the identification of nontuberculous mycobacteria isolated from different water sources. Int J Mycobacteriol. 2018;7:53-60. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_192_17.
- 58.- Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Nat Rev Genet. 2012; 13:601-612. doi: 10.1038/nrg3226.

- 59.- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1998;2:151-153.
- 60.- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionización of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem*. 1988;60:2299-2301.
- 61.- Griffiths J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem*. 2008;80:5678-83. doi: 10.1021 / ac8013065.
- 62.- Mingorance J, Regueiro B, Muñoz-Bellido JL. Historical perspective of mass spectrometry in microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:3-7. doi: 10.1016/S0213-005X(16)30184-7.
- 63.- Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Anal Chem*. 1975;47:219–225.
- 64.- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1584–1586. doi: 10.1038 / nbt1196-1584.
- 65.- Holland RD, Wilkes JG, Rafli F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay Jr JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10:1227–1232. doi: 10.1002 / (SICI) 1097-0231 (19960731) 10:10 <1227 :: AID-RCM659> 3.0.CO; 2-6.
- 66.- Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:74–82. doi: 10.1038 / nrmicro2243.

- 67.- Suh MJ, Limbach PA. Investigation of methods suitable for the matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur J Mass Spectrom*. 2004;10:89–99.
- 68.- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48:900–907. doi: 10.1128 / JCM.02071-09.
- 69.- March Rosselló GA, Bratos Pérez MA. Rapid antibiotic susceptibility test in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:61-68. doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.014.
- 70.- Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol*. 2010;71:149-184. doi: 10.1016 / S0065-2164 (10) 71006-6.
- 71.- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36: 380-407. doi: 10.1111 / j.1574-6976.2011.00298.x.
- 72.- Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2001;20:157-171. doi: 10.1002 / mas.10004.
- 73.- Ruiz de Alegría-Puig C, Aguirre-Quiñonero A, Agüero-Balbín J, Roiz-Mesones MP, Martínez-Martínez L Correlation between MALDI-TOF Vitek-MSTM system and conventional identification methods of gastrointestinal infection causing bacteria. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29:265-268.

- 74.- Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999;71:2732-2738. doi: 10.1021 / ac990165u.
- 75.- Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004;4:221-242. doi: 10.1016 / j.meegid.2004.02.004.
- 76.- Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio.* 2018;22:35-45.
- 77.- Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 2013;57:564–572. doi: 10.1093 / cid / cit247.
- 78.- Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;863–876. doi: 10.1007 / s10096-015-2322-0.
- 79.- 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. doi: 10.1128 / CMR.00072-12.
- 80.- Bilecen K, Yaman G, Ciftci U, Laleli YR. Performances and reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for

the Identification of clinical microorganisms. Biomed Res Int. 2015;2015:516410. doi: 10.1155/2015/516410.

81.- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Infect. Dis. 2009;49:543–551. doi: 10.1086 / 600885.

82.- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J. Clin. Microbiol. 2010;48:1169–1175.

83.- Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, Fahr AM, He Y, Ilina EN, Kostrzewa M, Maier T, Mancinelli L, Moussaoui W, Prevost G, Putignani L, Seachord CL, Tang YW, Harmsen D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. J Clin Microbiol. 2009;47:3732–3734. doi: 10.1128 / JCM.00921-09.

84.- Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. Pathol. Biol. 2010;58:55–57. doi: 10.1016 / j.patbio.2009.07.020.

85.- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48:900–907.

- 86.- Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, 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;48:1481–1483. doi: 10.1128 / JCM.01780-09.
- 87.- Bessède E, Angla-Gre M, Delagarde Y, Sep HS, Menard A, Megraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a university hospital. Clin Microbiol Infect. 2011;17:533–538.
- 88.- Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for the routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50:1313–1325. doi: 10.1128 / JCM.05971-11.
- 89.- Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. J Clin Microbiol. 2012;50:2568–2576. doi: 10.1128 / JCM.00343-12.
- 90.- Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis. 2008;46:1254–1263. doi: 10.1086 / 529198.
- 91.- Sood P, Seth T, Kapil A, Sharma V, Dayama A, Sharma S, Kumar S, Singh AK, Mishra P, Mahapatra M. Emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* blood stream infections in febrile neutropenia patients with haematological cancers and bone marrow failure syndromes. J Indian Med Assoc. 2012;110:439–444. PMID: 23520666.

- 92.- Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. Yonsei Med J. 2011;52:879–891. doi: 10.3349 / ymj.2011.52.6.879.
- 93.- Park SY, Choo JW, Kwon SH, Yu SN, Lee EJ, Kim TH. Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infect Chemother. 2013;45:325–330. doi: 10.3947 / ic.2013.45.3.325.
- 94.- Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC, Chang SC. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. Clin Infect Dis. 2011;52:352–360. doi: 10.1093 / cid / ciq154.
- 95.- Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. J Infect. 2012;64:282–290. doi: 10.1016 / j.jinf.2011.12.008.
- 96.- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5:939–951. doi: 10.1038 / nrmicro1789.
- 97.- Liu PY, Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997;29:19–28. doi: 10.1016 / s0732-8893 (97) 00080-1.
- 98.- Bernards AT, van der Toorn J, van Boven CP, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:303–308. doi: 10.1007 / BF01695662.

- 99.- Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebøer NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1008–1013. doi: 10.1128 / JCM.05209-11.
- 100.- Marí-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, Lievens B, Seifert H, Dijkshoorn L, Roca Y, Vila J. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23. doi: 10.1016 / j.cmi.2016.11.020.
- 101.- Sedo O, Radolfová-Krízová L, Nemec A, Zdráhal Z. Limitations of routine MALDI-TOF mass spectrometric identification of *Acinetobacter* species and remedial actions. *J Microbiol Methods.* 2018;154:79–85. doi: 10.1016 / j.mimet.2018.10.009.
- 102.- Li X, Tang Y, Lu X. Insight into identification of *Acinetobacter* species by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the clinical laboratory. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018;29:1546–1553. doi: 10.1007 / s13361-018-1911-4.
- 103.- Ruiz de Alegría-Puig C, De-Malet-Pintos-Fonseca A, Angulo-López I, Agüero-Balbín J, Marco F, Cayô R, Roca I, Vila J, Martínez-Martínez L. Evaluation of Vitek-MS™ and Microflex LT™ commercial systems for identification of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;S0213-005X(20)30164-6. doi: 10.1016/j.eimc.2020.02.028.

- 104.- Vázquez-Boland JA, Giguère S, Hapeshi A, MacArthur I, Anastasi E, Valero-Rello A. 2013. *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. Vet Microbiol. 167:9–33. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.016.
- 105.- Yamshchikov AV, Schuetz A, Lyon GM. *Rhodococcus equi* infection. Lancet Infect Dis. 2010;10:350–359. doi:10.1016/S1473-3099(10)70068-2.
- 106.- Sudhindra P, Wang G, Nadelman RB. Identification of *Dietzia* spp. from cardiac tissue by 16S rRNA PCR in a patient with culture-negative device-associated endocarditis: a case report and review of the literature. Case Rep Infect Dis. 2016;8935052. doi:10.1155/2016/8935052.
- 107.- Giguère S, Prescott JF. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infection in foals. Vet Microbiol. 1997;56:313–334. doi:10.1016/S0378-1135(97)00099-0.
- 108.- Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. J Clin Microbiol. 1997;35:3122–3126. doi: 10.1128 / JCM.35.12.3122-3126.1997.
- 109.- Navas J, González-Zorn B, Ladrón N, Garrido P, Vázquez-Boland JA. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. J Bacteriol. 2001;183:4796-4805. doi: 10.1128/JB.183.16.4796-4805.2001.
- 110.- Ladrón N, Fernández M, Agüero J, González Zörn B, Vázquez-Boland JA, Navas J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. J Clin Microbiol. 2003;41:3241–3245. doi:10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003.
- 111.- Ruiz de Alegría Puig C, Pilares L, Marco F, Vila J, Martínez-Martínez L, Navas J, Comparison of the Vitek MS and Bruker Matrix-Assisted Laser

Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of *Rhodococcus equi* and *Dietzia* spp. J Clin Microbiol. 2017;55:2255-2260. doi: 10.1128/JCM.00377-17.

112.- Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol. 2014;31:42-48. doi: 10.1016/j.riam.2013.10.001.

113.- Lausch KR, Søgaard M, Rosenvinge FS, Johansen HK, Boysen T, Røder BL, Mortensen KL, Nielsen L, Lemming L, Olesen B, Leitz C, Kristensen L, Dzajic E, Østergaard LJ, Schønheyder HC, Arendrup MC. Treatment of candidemia in a nationwide setting: increased survival with primary echinocandin treatment. Infect Drug Resist. 2018;23:2449-2459. doi: 10.2147/IDR.S176384.

114.- Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig A, Arendrup MC, Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Kemp M. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. Mycoses. 2013;56:229-235. doi: 10.1111/myc.12000.

115.- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. 2015;61:100-111. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.

116.- Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier JP, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. Expert Rev Proteomics. 2019;16:695-710. doi: 10.1080/14789450.2019.1645603.

- 117.- Alnakip MEA, Rhouma NR, Abd-Elfatah EN, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Bayoumi MA, Abdelhafez MM, Taboada-Rodríguez A, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Res Vet Sci.* 2020;132:426-438. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027
- 118.- Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications of MALDI-TOF technology in clinical microbiology. *Pathol Biol (Paris).* 2015;63:43-52. doi: 10.1016/j.patbio.2014.10.002.
- 119.- Oviaño M, Bou G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clin Microbiol Rev.* 2018;28;32:e00037-18. doi: 10.1128/CMR.00037-18.
- 120.- Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;23:17-20. doi: 10.21775/cimb.023.017.
- 121.- Singhal N, Kumar M, Virdi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology.* 2016;143:1491-1500. doi: 10.1017/S0031182016001189.
- 122.- Vila J, Zboromyrska Y, Burillo A, Bouza E. Future applications of mass spectrometry in microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:53-58. doi: 10.1016/S0213-005X(16)30192-6.
- 123.- Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser

desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2008;46:540-545. 24. doi: 10.1128 / JCM.01565-07.

124.- Cricca M, Marasco E, Alessandrini F, Fazio C, Prossomariti A, Savini C, Venturoli S, Chieco P, De Carolis S, Bonafè M, Re MC, Garagnani P, Mantovani V. Highthroughput genotyping of high-risk human papillomavirus by MALDI-TOF mass spectrometry-based method. *New Microbiol.* 2015;38:211-223. 25.

125.- Jurinke C, Zöllner B, Feucht HH, Jacob A, Kirchhübel J, Lüchow A, van den Boom D, Laufs R, Köster H. Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Genet Anal.* 1996;13:67-71. 26. doi: 10.1016 / 1050-3862 (95) 00151-4.

126.- Luan J, Yuan J, Li X, Jin S, Yu L, Liao M, Zhang H, Xu C, He Q, Wen B, Zhong X, Chen X, Chan HLY, Sung JJY, Zhou B, Ding C. Multiplex detection of 60 hepatitis B virus variants by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55:1503-1509. doi: 10.1373 / clinchem.2009.124859.

127.- Gutierrez J, Martín E, Lozano C, Coronilla J, Nogales C. Evaluation of the ATB 32C Automicrobic system and API 20C using clinical yeast isolates. *Ann BiolClin.*1994;50:443–446.

128.- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335–351. doi: 10.1128 / JCM.32.2.335-351.1994.

129.- White TJ, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, editors. PCR protocols, a guide to methods and applications. NY: Academic Press; 1990. p. 315–322.

- 130.-Cayô R, Rodríguez MC, Espinal P, Fernández-Cuenca F, Ocampo-Sosa AA, Pascual A, Ayala JA, Vila J, Martínez-Martínez L. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:5907-5913. doi: 10.1128 / AAC.00459-11
- 131.- Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, De Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:11–15. doi: 10.1128 / JCM.33.1.11-15.1995.
- 132.- Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. 2009. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. Microbiology. 2009;155:2333-2341. doi: 10.1099 / mic.0.026054-0.
- 133.- Vila J, Juiz P, Salas C, Almela M, de la Fuente CG, Zboromyrska Y, Navas J, Bosch J, Agüero J, de la Bellacasa JP, Martínez-Martínez L. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50:1745-1747. doi: 10.1128 / JCM.05821-11.
- 134.- Espinal P1, Seifert H, Dijkshoorn L, Villa J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1097-1103. doi: 10.1111 / j.1469-0691.2011.03696.x.
- 135.- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field

gel electrophoresis: criteria for bacterial straining. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233-2239. doi: 10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995.

136.- Pilares L, Agüero J, Vázquez-Boland JA, Martínez-Martínez L, Navas J. Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 2010;48:1904–1907. doi:10.1128/JCM.01730-09.

137.- Hsueh PR, Lee TF, Du SH, Teng SH, Llao CH, Sheng WH, Teng LJ. Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. J Clin Microbiol. 2014;52:2371–2379. doi:10.1128/JCM.00456-14.

138.- Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2860–2865. doi: 10.1128 / jcm.40.8.2860-2865.2002.

139.- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33:159–174.

140.- Stevenson LG, Drake SK, 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;48:444–447. doi: 10.1128 / JCM.01541-09.

141.- Gobernado M, López-Hontangas JL. Identificación bacteriana. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:54-60.

142.- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii*

complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011; 162:393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006.

143.- Lau SKP, Sridha S, Ho CC, Chow WN, Lee KC, Lam CW, Yuen KY, Woo PCY. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. xp Biol Med (Maywood). 2015;240:742-51. doi: 10.1177/1535370215583801.

144.- Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73:65-67. doi: 10.1016 / j.diagmicrobio.2012.01.013.

145.- Sudhindra P, Wang G, Nadelman RB. Identification of *Dietzia* spp. from cardiac tissue by 16S rRNA PCR in a patient with culture-negative device-associated endocarditis: A Case Report and Review of the Literature. Case Rep Infect Dis. 2016; 2016: 8935052. doi: 10.1155/2016/8935052.

146.- Robert E Click, Craig L Van Kampen. Assessment of *Dietzia* subsp. C79793-74 for treatment of cattle with evidence of paratuberculosis. Virulence. 2010;1:145–155. doi: 10.4161/viru.1.3.10897. doi: 10.4161 / viru.1.3.10897.

147.- Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. J Clin Microbiol. 2014;52:130–138. doi:10.1128/JCM.01996-13.

148.- Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time

of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2013;51:2875–2879. doi:10.1128/JCM.00819-13.

149.- Yassin AF, Hupfer H, Schaal KP. *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:641–645. doi:10.1099/ijls.0.63863-0.

150.- Procópio L, Alvarez VM, Jurelevicius DA, Hansen L, Sørensen SJ, Cardoso JS, Pádula M, Leitão AC, Seldin L, van Elsas JD. Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamea* P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential. Antonie Van Leeuwenhoek. 2012;101:289–302. doi:10.1007/s10482-011-9633-7.

151.- Koerner RJ, Goodfellow M, Jones AL. The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunistic pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55:296–305. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00513.x.

152.- Dunne WM, Dolng JK, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, Mailler S, Girard V, van Belkum A, Deol P. Rapid inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* species before identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2014;52:3654–3659. doi:10.1128/JCM.01728-14.

153.- Ceballos-Garzón A, Cortes G, Morio F, Zamora-Cruz EL, Linares MY, Ariza BE, Valderrama SL, Garzón JR, Alvarez-Moreno CA, Le Pape P, Parra-Giraldo CM. Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia. BMC Microbiol. 2019;19:106. doi:10.1186/s12866-019-1482-y.

- 154.- Yi Q, Xiao M, Fan X, Zhang G, Yang Y, Zhang JJ, Duan SM, Cheng JW, Li Y, Zhou ML, Yu SY, Huang JJ, Chen XF, Hou X, Kong F, Kudinha T, Xu YC. Evaluation of Autof MS 1000 and Vitek MS MALDI-TOF MS System in Identification of Closely-Related Yeasts Causing Invasive Fungal Diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:628828. doi: 10.3389/fcimb.2021.628828.
- 155.- Wilkendorf LS, Bowles E, Buil JB, van der Lee HAL, Posteraro B, Sanguinetti M, Verweij PE. Update on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol.* 2020;58:e01263-20. doi: 10.1128/JCM.01263-20.
- 156.- Sun Y, Guo J, Chen R, Hu L, Xia Q, Wu W, Wang J, Hu F. Multicenter evaluation of three different MALDI-TOF MS systems for identification of clinically relevant filamentous fungi. *Med Mycol.* 2021;59(1):81-86. doi: 10.1093/mmy/myaa037.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Evaluation of Vitek-MS™ and Microflex LT™ commercial systems for identification of *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* complex

Carlos Ruiz de Alegría-Puig^{a,*}, Ana De-Malet-Pintos-Fonseca^a, Itziar Angulo-López^a, Jesús Agüero-Balbín^{a,b}, Francesc Marco^{c,f}, Rodrigo Cayô^{d,e}, Ignasi Roca^c, Jordi Vila^{c,f}, Luis Martínez-Martínez^{g,h,i}

^a Microbiology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

^b Department of Molecular Biology, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

^c ISGlobal, Hospital Clinic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Laboratório de Imunologia e Bacteriologia (LIB), Setor de Biologia Molecular, Microbiologia e Imunologia – Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas (ICAQF), Diadema, SP, Brazil

^e Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Laboratório Alerta, Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina – EPM, São Paulo, SP, Brazil

^f Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic-Universitat de Barcelona, Spain

^g Unit of Microbiology, University Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain

^h Department of Microbiology, University of Córdoba, Córdoba, Spain

ⁱ Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2019

Accepted 27 February 2020

Available online xxx

Keywords:

MALDI-TOF MS

Mass spectrometry

Acinetobacter spp.

Non-fermenting Gram-negative bacilli

ABSTRACT

Introduction: *Acinetobacter* is a genus that comprises a group of opportunistic pathogens responsible for a variety of nosocomial infections. The *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* (Acb) complex includes some species of clinical importance, mainly *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*, which share phenotypic similarities that make it very difficult to distinguish between them using a phenotypic approach. The aim of this study was to evaluate two commercial matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of different *Acinetobacter* species, with a special focus among those belonging to the Acb complex.

Methods: One hundred and fifty-six *Acinetobacter* spp. clinical strains, identified by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and *rpoB* gene sequencing, were analysed by two different MALDI-TOF systems.

Results: Considering only the 144 strains of the Acb complex evaluated in this study, the Vitek-MS™ and Microflex LT™ systems correctly identified 129 (89.6%) and 143 (99.3%) strains, respectively.

Conclusion: After analysing 156 strains belonging to *Acinetobacter* spp., both Vitek-MS™ and Microflex LT™ proved to be rapid and accurate systems for the identification of Acb complex species showing a good correlation. However, both manufacturers should improve their databases to include new species in them.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Evaluación de los sistemas comerciales Vitek® MS y Microflex® LT para la identificación del complejo *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii*

RESUMEN

Introducción: *Acinetobacter* es un género que comprende un grupo de patógenos oportunistas responsables de varias infecciones nosocomiales. El complejo *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* (Acb) reúne algunas especies de importancia clínica, principalmente *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*, que comparten similitudes fenotípicas que hacen muy difícil poder discriminar entre ellas utilizando un enfoque fenotípico.

Palabras clave:

MALDI-TOF MS

Espectrometría de masas

Acinetobacter spp.

Bacilos gramnegativos no fermentadores

* Corresponding author.

E-mail address: carlosrdap@hotmail.com (C. Ruiz de Alegría-Puig).

El objetivo de este estudio fue evaluar 2 sistemas comerciales de espectrometría de masas de ionización por láser asistido con una matriz (MALDI-TOF MS) para la identificación de diferentes especies de *Acinetobacter*, con un enfoque especial entre los que pertenecen al complejo Acb.

Métodos: Analizamos 156 cepas clínicas de *Acinetobacter* spp., identificadas mediante análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) y secuenciación del gen *rpoB*, por 2 sistemas diferentes de MALDI-TOF.

Resultados: Teniendo en cuenta solo las 144 cepas del complejo Acb evaluadas en este estudio, los sistemas Vitek® MS y Microflex® LT identificaron correctamente 129 (89,6%) y 143 (99,3%) cepas, respectivamente.

Conclusión: Después de analizar 156 cepas pertenecientes a *Acinetobacter* spp., Vitek® MS y Microflex® LT demostraron ser sistemas rápidos y precisos para la identificación de especies del complejo Acb mostrando una buena correlación. Sin embargo, ambos fabricantes deberían mejorar sus bases de datos incluyendo nuevas especies en ellas.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Introduction

Acinetobacter baumannii belongs to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (Acb) complex that includes the most relevant nosocomial pathogens of genus *Acinetobacter*, which cause serious infections in critically ill and immunocompromised patients.¹ *A. baumannii* represents a major healthcare problem, being responsible for infections with high morbidity and mortality rates, particularly in intensive care units (ICU), because of its ability to persist in the environment and develop resistance to multiple antibiotics.^{2–4} *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*, two other important species of Acb complex, are also able to cause nosocomial infections, but they are more rarely associated with outbreak situations and usually display greater susceptibility to antimicrobial agents. An accurate identification of these microorganisms at the species level is, therefore, essential to minimize treatment failure or implement infection control measures.^{5,6}

Since all *Acinetobacter* species included in the Acb complex are highly similar from a phenotypic point of view, as well as by DNA-DNA hybridization,⁷ simple phenotypic tests and other available automated biochemical identification systems routinely used in clinical laboratories cannot distinguish among them.^{8,9} In this context, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a powerful tool that has been adapted for the identification of different microorganisms at the genus, species or subspecies level with high reliability.^{10,11} Nevertheless, some studies have also highlighted the struggles of MALDI-TOF MS for discrimination between members of the Acb complex as well as additional *Acinetobacter* species, particularly since many novel species have been recently included in this taxon.^{12–14}

There are several previous studies concerning identification, detection of antimicrobial resistance, and virulence among *Acinetobacter* species by MALDI-TOF MS. However, only a few of them have focused on determining the accuracy of this technique at the species level identification.^{12,15–17} In addition, none of such studies have focused on comparing the performance of the two commercial MALDI-TOF MS systems most commonly used in clinical laboratories for the identification of isolates included in the Acb complex.

Microflex LTTM distinguishes the different *Acinetobacter* genomic species of the Acb complex. Vitek-MSTM globally identifies the Acb complex by versions v1.0, v2.0, and v3.0, while v3.2 distinguishes some of the different *A.* genomic species of the Acb complex, according to the manufacture's specifications.

This study aimed to evaluate the reliability of two systems, Vitek-MSTM (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and Microflex LTTM (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) for the

identification of *Acinetobacter* spp. isolates belonging to the Acb complex. We have also compared four Vitek-MSTM database versions (v1.0, v2.0, v3.0, and v3.2), with two versions of Microflex LTTM (v6.0.0.0 and v8.0.0.0), to evaluate the evolution of such databases over time. In the case of Vitek-MSTM, the software was used in IVD (In Vitro Diagnostic) mode instead of RUO (Research Use Only) mode to resemble clinical practice.

Material and methods

Bacterial strains

Eighty-four *Acinetobacter* spp. clinical strains recovered between 2004 and 2008 in the Microbiology Service of the University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, were chosen. Clonal relatedness among those strains belonged to the same *Acinetobacter* species were evaluated by repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) and by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as reported previously.¹⁸ For the global study, a collection of 72 strains, from the Hospital Clinic in Barcelona, Spain, of less frequent species of the Acb complex, previously identified by *rpoB* gene sequencing,¹⁹ was also added in the analysis.

Species identification was performed by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and rpoB gene sequencing

ARDRA was used as the reference method to confirm the identification of *Acinetobacter* species. The 16S rRNA gene was amplified for all *Acinetobacter* spp. strains using universal primers, and further digested separately with the restriction enzymes CfoI, AluI, MboI, RsaI, MspI and BfaI (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), as previously described.^{18,20}

Any disagreements in the species identification results between ARDRA and MALDI-TOF MS systems, were analyzed by partial *rpoB* gene sequencing.¹⁹ In these cases, DNA from those strains showing discordant results was extracted by InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The *rpoB* gene was amplified using specific primers and purified using NucleoSpin[®] Gel Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and sequenced with ABI PRISMTM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The partial *rpoB* gene sequences obtained were compared to reference sequences available on GenBank database using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To establish the correct identification, sequences of a given pairwise alignment with the lowest *E*-value and the highest number of identities (>98%) were selected as the most likely species.

The statistical analysis was done with the IBM SPSS Version 20.0 software including the analysis of ROC curves and the calculation of Pearson's kappa index of concordance.

MALDI-TOF MS Microflex LT™ system

All strains were subjected to analysis with Microflex LT™ system (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) following the manufacturer's recommendations. The bacterial biomass was smeared onto a metallic MALDI-TOF MSP 96 plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and covered with 1 µL of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid–50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid. The MSP 96 plate was dried at room temperature for 5 min. Measurements were performed with the Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) using FlexControl software with Compass Flex Series version 1.3 software and a 60-Hz nitrogen laser (337 nm wavelength). The protein spectra ranging from the mass-to-charge ratio (m/z) 2 to 20 kDa were explored with the Bruker Biotyper 3.1 software package (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with default settings and compared with the reference spectra present in the database, showing the 10 most similar patterns for each isolate. The database for identification was the reference Biotyper library v6.0.0.0 and v8.0.0.0 MSP (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), which included 6.903 and 7.854 species, respectively. The similarity of patterns was represented as a score (2.3 to 3, identification at the species level; 2 to 2.3, identification at the genus level; <1.700, no reliable identification). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a standard for calibration and as a reference for quality control.^{17,21}

MALDI-TOF MS Vitek-MS™ system

Identification of strains with the Vitek-MS™ system (bioMérieux, France) was performed following manufacturer's recommendations. Cells from a single colony were directly applied onto the steel carrier overlaid with 1 µL of VITEK™ MS-CHCA ready-to-use-matrix solution (bioMérieux, France), and allowed to air-dry. Two samples of the same strain were applied and read in two rounds, as recommended. Measurement was performed with a Vitek-MS™ instrument supported by SARAMIS MS-IVD v1.0, v2.0, v3.0, and v3.2 databases (Anagnos Tee GMBH, BioMérieux) in positive linear mode, with a mass range of 2–20 kDa, using *E. coli* ATCC® 8739 as a molecular mass standard. The intensity of the 50-Hz nitrogen laser was under the control of the acquisition software. Only hits within the spectra with scores of 99.9% were accepted.

Results

A total of 144 *Acinetobacter* spp. strains belonging to Acb complex were evaluated, as follows: *A. pittii* ($n=54$), *A. baumannii* ($n=47$), *A. nosocomialis* ($n=16$), *Acinetobacter dijkschoorniae* (formerly *A. phenon 5* by ARDRA; $n=14$), *Acinetobacter seifertii* ($n=12$), and *Acinetobacter calcoaceticus* ($n=1$). In addition, other 12 *Acinetobacter* spp. strains identified as belonging to other *Acinetobacter* species or genomic species (gen. sp.) not belonging to the Acb complex were also evaluated: *Acinetobacter bereziniae* ($n=5$), *Acinetobacter* gen. sp. 16 ($n=1$), *Acinetobacter gyllenbergii* (formerly *Acinetobacter phenon 3* by ARDRA; $n=2$), *Acinetobacter haemolyticus* ($n=2$), and *Acinetobacter vivianii* ($n=2$). In the case of the strains identified as *Acinetobacter phenon 5* by ARDRA, they were reclassified as *A. dijkschoorniae* by *rpoB* gene sequencing.

Considering the 144 strains of the Acb complex evaluated in this study [*A. pittii* ($n=54$), *A. baumannii* ($n=47$), *A. nosocomialis* ($n=16$), *A. dijkschoorniae* ($n=14$), *A. seifertii* ($n=12$) and *A. calcoaceticus* ($n=1$)], Vitek-MS™ and Microflex LT™ systems correctly identified 129 (89.6%) and 143 (99.3%) strains, respectively. Two *A. baumannii* strains were misidentified as *A. nosocomialis* and *A. pittii* by Microflex LT™ v6.0 and v8.0, respectively. Since there is no reference spectrum for *A. dijkschoorniae* in the Vitek-MS™ v3.2 library, one of the strains of this species was misidentified as *Corynebacterium aurimucosum*, as well as one *A. nosocomialis* strain as *Burkholderia cenocepacia*.

In the non-Acb complex group, Vitek-MS™ v3.2 misidentified one *A. bereziniae* and one *Acinetobacter* gen. sp. 16 strains as *A. pittii* and *A. gyllenbergii*, respectively. In addition, for six strains of the control group (non-Acb complex), the obtained spectra were not included in the databases. Meanwhile, Microflex LT™ v8.0.0 misidentified one *A. bereziniae* as *A. pittii* ($n=1$), two *A. vivianii* as *A. haemolyticus* and *A. haemolyticus/parvus* ($n=2$), two *A. gyllenbergii* as *Acinetobacter proteolyticus* and *A. proteolyticus/haemolyticus* ($n=2$), and one *Acinetobacter* gen. sp. 16 as *A. proteolyticus/haemolyticus* (Table 1). Vitek-MS™ v3.2 and Microflex LT™ showed a high sensitivity (>80%) and an area under the ROC curve (AUC) > 0.8, demonstrating that both systems are effective in discriminating the Acb complex from the other *Acinetobacter* species not belonging to the complex. On the other hand, according to the interpretation criteria proposed by Landis and Koch, the high positive Pearson Kappa index (>0.75) showed an excellent correlation with the identification data obtained by ARDRA plus *rpoB*. It is worth noting that Microflex LT™ v 8.0.0.0 showed the best results as a whole, comparing only the eighty-four *Acinetobacter* spp. strains from University Hospital Marqués de Valdecilla (Table 2).²²

Table 1
Identification of *Acinetobacter* species with two MALDI-TOF MS systems.

ARDRA/ <i>rpoB</i> seq N° strains Species		Vitek-MS™ v3.2 N° strains Species		Microflex LT™ v8.0.0.0 N° strains Species	
54	<i>A. pittii</i>	55	+(<i>A. bereziniae</i>)	57	<i>A. bereziniae</i>
47	<i>A. baumannii</i>	47	<i>A. baumannii</i>	46	–1(<i>A. pittii</i>)
16	<i>A. nosocomialis</i>	15	–1(<i>B. cenocepacia</i>)	16	<i>A. nosocomialis</i>
14	<i>A. dijkschoorniae</i>	0	–13(P150 ^a)–1(<i>C. aurimucosum</i>)	14	<i>A. dijkschoorniae</i>
12	<i>A. seifertii</i>	12	<i>A. seifertii</i>	12	<i>A. seifertii</i>
1	<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. calcoaceticus</i>
5	<i>A. bereziniae</i>	0	–4(P150 ^a)–1(<i>A. pittii</i>)	4	–1(<i>A. pittii</i>)
1	<i>A. gen. sp. 16</i>	0	–1(<i>A. gyllenbergii</i>)	0	–1(<i>A. proteolyticus/haemolyticus</i>)
2	<i>A. gyllenbergii</i>	3	+1(<i>A. gen. sp. 16</i>)	0	–2(<i>A. proteolyticus</i> , <i>A. proteolyticus/haemolyticus</i>)
2	<i>A. haemolyticus</i>	2	<i>A. haemolyticus</i>	2	<i>A. haemolyticus</i>
2	<i>A. vivianii</i>	0	–2(P150 ^a)	0	–2(<i>A. haemolyticus</i> , <i>A. haemolyticus/parvus</i>)
	Kappa		0.81		0.93
	Sensitivity		98.6%		100%
	AUC		0.94 (0.83–1)		0.99 (0.98–1)

^a P150: no result in the database for this spectrum was obtained. In bold were marked those species identified by ARDRA or *rpoB* gene sequencing belonged to Acb complex.

Table 2

Comparison of *Acinetobacter* species belonging to the Acb complex, from University Hospital Marqués de Valdecilla, identified by different database versions of Vitek-MS™ and Microflex LT™ system.

Identification	Vitek-MS™				Microflex LT™	
	v.1.0	v.2.0	v.3.0	v.3.2	v6.0.0.0	v8.0.0.0
Acb complex	76	76	75	ni	ni	ni
<i>A. baumannii</i>	ni	ni	ni	33	32	32
<i>A. calcoaceticus</i>	ni	ni	ni	1	1	1
<i>A. nosocomialis</i>	–	–	–	–	1	0
<i>A. pittii</i>	ni	ni	ni	37	39	39
<i>A. dijkshoorniae</i>	ni	ni	ni	ni	ni	2
Total	76	76	75	71	73	74
Kappa index	–	–	–	0.78	0.77	0.81
Sensitivity	97.3%	96.1%	92.4%	98.6%	98.6%	100%
AUC	0.89 (0.74–1)	0.84 (0.67–1)	0.69 (0.48–0.9)	0.94 (0.83–1)	0.94 (0.83–1)	0.99 (0.97–1)

Abbreviations: ni, not identified; AUC, area under the ROC curve.

Discussion

MALDI-TOF MS is a good methodology for the routine activity in clinical microbiology laboratories, since it rapidly identifies a wide range of bacterial and fungal species of clinical importance. In this study, both Vitek-MS™ and Microflex LT™ systems allowed acceptable identification of Acb complex. Our results demonstrated that ARDRA is still a powerful method that remains valid in those laboratories lacking a MALDI-TOF MS system; in addition, it is also becoming more cost-effective than conventional phenotypic based automated systems.²³

Previous publications have already underlined some of the limitations we have found in this study, including the need to add newly recognized species in databases,¹² which has been considered in the latest available versions, or the difficulty of differentiating species from the haemolytic clade, a situation improved by using an alternative matrix solution (strongly acidified ferulic acid).¹³ Although both Vitek-MS™ and Microflex LT™ systems recognize strains from other less common taxa as belonging to the genus *Acinetobacter*, identification at the species level using MALDI-TOF MS is recommended but with due caution for this purpose. Microflex LT™ discrepancies have minimal to no clinical impact on patient's antibiotic treatment, but Vitek-MS™ discrepancies, on the other hand, would have an enormous clinical impact. The current database of Vitek-MS™ v3.2, should be revised, as already done with previous versions, to include the new *Acinetobacter* species to force the system to simply identify at genus level, which is also of interest in routine practice. More studies, testing in IVD mode with higher number of strains, are still necessary in order to improve the databases of both MALDI-TOF MS systems, since non-*A. baumannii* species are important emerging nosocomial pathogens able to acquire antimicrobial resistance genes from *A. baumannii*²⁴ and having an actual clinical importance.

Transparency declarations

All authors have nothing to declare. This study has not been financially supported by any Diagnostic/Pharmaceutical company.

Ethical approval

Not applicable.

Funding

This study was supported by Plan Nacional de I+D+i 2013–2016, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious

Diseases (REIPI RD16/0016/0007; REIPI RD16/0016/0010) and the 2017 call for Strategic Action on Health (PI17/01932), co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” and operative program Intelligent Growth 2014–2020. I.R. was supported by the Department of Health, Generalitat de Catalunya, grant SLT002/16/00349.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis. 2008;46:1254–63. <http://dx.doi.org/10.1086/529198>.
- Sood P, Seth T, Kapil A, Sharma V, Dayama A, Sharma S, et al. Emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* blood stream infections in febrile neutropenia patients with haematological cancers and bone marrow failure syndromes. J Indian Med Assoc. 2012;110:439–44. PMID: 23520666.
- Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. Yonsei Med J. 2011;52:879–91. <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2011.52.6.879>.
- Park SY, Choo JW, Kwon SH, Yu SN, Lee EJ, Kim TH, et al. Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infect Chemother. 2013;45:325–30. <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.325>.
- Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC, et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. Clin Infect Dis. 2011;52:352–60. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq154>.
- Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. J Infect. 2012;64:282–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2011.12.008>.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5:939–51. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
- Liu PY, Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997;29:19–28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(97\)00080-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(97)00080-1).
- Bernards AT, van der Toorn J, van Boven CP, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:303–8. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01695662>.
- Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnancinski S, Ledebore NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50:1008–13. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05209-11>.
- Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. J Clin Microbiol. 2012;50:2568–76. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00343-12>.
- Marí-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, et al. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. Clin Microbiol Infect. 2017;23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.020>, 210.e1–210.e9.



Comparison of the Vitek MS and Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of *Rhodococcus equi* and *Dietzia* spp.

Carlos Ruiz de Alegría Puig,^a Lillan Pilares,^b Francesc Marco,^c  Jordi Vila,^c Luis Martínez-Martínez,^a Jesús Navas^b

University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain^a; Department of Molecular Biology, School of Medicine, Cantabria University, Santander, Spain^b; ISGlobal, Barcelona Ctr. in Health Res. (CRESIB), Hospital Clinic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain^c

ABSTRACT *Rhodococcus equi* causes pyogranulomatous pneumonia in domesticated animals and immunocompromised humans. *Dietzia* spp. are environmental bacteria that have rarely been associated with human infections. *R. equi* and *Dietzia* spp. are closely related actinomycetes. Phenotypic discrimination between *R. equi* and *Dietzia* on the basis of their Gram stain morphology and colony appearance is problematic. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a fast, reliable, and cost-effective method for identification of a wide variety of microorganisms. We have evaluated the performance of Bruker Biotyper versus that of Vitek MS for identification of a collection of 154 isolates identified at the source as *R. equi* that includes isolates belonging to the genus *Dietzia*. PCR amplification of the *choE* gene, encoding a cholesterol oxidase, and 16S rRNA sequencing were considered the reference methods for *R. equi* identification. Biotyper identified 131 (85.1%) of the 154 isolates at the species level, and this figure increased to 152 (98.7%) when the species cutoff was reduced from a score of ≥ 2.000 to ≥ 1.750 . Vitek MS correctly identified at the species level 130 (84.4%) isolates as long as bacteria were extracted with ethanol but only 35 (22.7%) isolates when samples were prepared by direct extraction from colonies. The two systems allowed differentiation between *R. equi* and *Dietzia* spp., but identification of all *Dietzia* sp. isolates at the species level needed sequencing of the 16S rRNA gene.

KEYWORDS *Rhodococcus equi*, *Dietzia* spp., identification, MALDI-TOF MS, genotypic identification

The soil-dwelling, saprophytic actinomycete *Rhodococcus equi* is a multihost, facultative intracellular pathogen that causes pyogranulomatous infections in several species of domesticated animals, in particular, in young foals and pigs (1). In addition, *R. equi* infects humans (2). At-risk groups are immunocompromised people, such as HIV-AIDS or cancer patients, and transplant recipients. Infection with *R. equi* in these patients results in a granulomatous form of pneumonia whose symptoms resemble clinical and pathological signs of pulmonary tuberculosis and which has a high mortality rate. *Dietzia* spp. are environmental bacteria that have been associated with human infections in a small number of cases (3). The Gram morphology and colony appearance of the species of the genus *Dietzia* are remarkably similar to those seen with *R. equi*.

In clinical microbiology laboratories, *R. equi* is routinely identified using a conventional approach based on growth characteristics, morphology of colonies, the CAMP

Received 7 March 2017 Returned for modification 27 March 2017 Accepted 5 May 2017

Accepted manuscript posted online 10 May 2017

Citation de Alegría Puig CR, Pilares L, Marco F, Vila J, Martínez-Martínez L, Navas J. 2017. Comparison of the Vitek MS and Bruker matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of *Rhodococcus equi* and *Dietzia* spp. *J Clin Microbiol* 55:2255–2260. <https://doi.org/10.1128/JCM.00377-17>.

Editor Karen C. Carroll, Johns Hopkins University School of Medicine

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Carlos Ruiz de Alegría Puig, carlosrdap@hotmail.com.

TABLE 1 Comparison of the identification results for the 154 isolates with the Vitek MS and the Biotyper MALDI-TOF MS systems using two different methods for the preparation of the samples^a

MALDI-TOF MS system	No. of Isolates Identified by:							
	Direct colony method				Extraction method			
	Total	<i>R. equi</i>	<i>Dietzia</i> spp.	Not Identified	Total	<i>R. equi</i>	<i>Dietzia</i> spp.	Not Identified
Vitek MS	35	35	0	119	130 (35 + 95*)	124 (35 + 89*)	6 (0 + 6*)	24
Bruker Biotyper	141	141	0	13	153 (141 + 12*)	144 (141 + 3*)	9 (0 + 9*)	1

^a, the number of strains which required sample extraction to give a reliable identification.

reaction, and biochemical tests, which are frequently performed using the API Coryne system (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France), a commercial multisubstrate kit that includes *R. equi* in its database (4). However, this method is time-consuming and its reliability for the identification of rhodococcal isolates is low, resulting in misidentification of *R. equi* as another rhodococcal species or even another actinomycetes (5). For instance, Bemer-Melchior et al. (6) reported that API Coryne V2.0 gave an identification of *R. equi* for a *Dietzia maris* isolate obtained from an immunocompromised patient. Our group (7) and other authors (8) have also reported the misidentification of *Dietzia* strains as *R. equi*. PCR methods targeting the *R. equi* *choE* gene, encoding a cholesterol oxidase, are accurate and reliable, allowing identification of *R. equi* isolated from human, animal, or environmental samples (9, 10).

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a fast, highly accurate, and cost-effective method for identification of bacterial and fungal pathogens (11). The MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) and the Vitek MS (bioMérieux) platforms are the two MS-based platforms more commonly used for microbial identification. In a previous study (12), we reported that the Bruker MS system identified successfully at the species level a group of 11 isolates initially assigned to *R. equi* by API Coryne V2.0, confirming identification of all isolates as *R. equi* except 1, which was classified as *Dietzia maris*. Although limited to a few isolates, that study envisaged that MALDI-TOF MS might represent an alternative, fast, and worthwhile method for a reliable identification of *R. equi* and *Dietzia* spp.

In the present study, we carried out a comparative evaluation of the performance of Vitek MS versus that of Bruker Biotyper for identification of a panel of 154 isolates initially assigned to *R. equi* by API Coryne V2.0 that included isolates belonging to the genus *Dietzia*.

RESULTS

A total of 144 of the 154 isolates were positive in the PCR amplification assay targeting the *choE* and therefore were assigned to *R. equi*. The remaining 10 isolates gave a negative *choE* PCR result. By partial 16S rRNA sequencing, they were identified as *Dietzia maris* ($n = 5$), *Dietzia natronolimnaea* ($n = 3$), and *Dietzia cinnamomea* ($n = 2$). This identification was considered the reference method.

In direct testing of bacterial colonies with Vitek MS, the system correctly identified 35 (22.7%) isolates at the species level at its best performance. In most cases, failure of the system to give a precise identification was due to its inability to read the samples. When bacteria were extracted with ethanol, Vitek MS correctly identified at the species level a total of 130 (84.4%) isolates: 124 were identified as *R. equi* and 6 as *Dietzia* spp. (Table 1). Within the collection of 144 *R. equi* isolates, Vitek MS properly identified 124 (86.1%) isolates with the maximum score (99.9%). When the confidence score was decreased to 50%, an additional isolate was correctly identified as *R. equi* as well. Considering the group of 10 *Dietzia* sp. isolates, Vitek MS identified 6 (60%) strains with the maximum score (99.9%) and 2 (20%) strains (*D. natronolimnaea* and *D. maris*) with a score of 50%, whereas the remaining 2 strains (*D. natronolimnaea* and *D. cinnamomea*) were not identified (Table 2).

The Biotyper provided high-confidence identifications without extraction of the

TABLE 2 Identification results for *R. equi* (*n* = 144) and *Dietzia* spp. (*n* = 10) by Vitek MS versus Bruker Biotyper

Microorganism(s)	No. of strains	No. (%) of isolates with indicated result by:			
		Vitek MS		Bruker Biotyper	
		Correct identification at species level	Correct low score (50%–99.8%)	Not identified	Identification at genus level
<i>R. equi</i>	144	124 (86.1)	1 (0.7)	19 (13.2)	0
<i>Dietzia</i> spp.	10	6 (60)	2 (20)	2 (20)	0
<i>D. mats</i>	5	4	1	0	1 (10)
<i>D. natronophilum</i>	3	1	1	1	0
<i>D. chironom</i>	2	1	0	1	0
Total no. (%) of strains	154	130 (84.4)	3 (1.9)	21 (13.6)	0
					131 (85.1)
					21 (13.6)
					1 (0.6)
					1 (0.6)

samples for 141 (91.6%) isolates. Conversely, a group of 13 isolates, including the 10 *Dietzia* sp. isolates and 3 *R. equi* isolates, required acetonitrile extraction (Table 1). The system correctly identified at the species level 131 (85%) isolates (130 *R. equi* and 1 *Dietzia* sp.), giving scores of ≥ 2.000 in all cases. The 130 isolates identified as *R. equi* were positive for PCR *choE*, whereas the isolate identified as a *Dietzia* sp. was negative. The remaining *R. equi* isolates ($n = 14$), giving scores in the range of 1.700 to 1.900, were reanalyzed using a species-level cutoff value of ≥ 1.750 . With the ≥ 1.750 score cutoff, all 14 of these isolates were also identified as *R. equi*, in accordance with the results of PCR amplification of the *choE* gene (all were positive). Considering the group of 10 *Dietzia* sp. isolates, the Biotyper identified 1 (10%) strain (score, ≥ 2.000) at the species level and 8 (80%) strains at the genus level (scores ranged between 1.700 and 1.999) and another 1 (10%) could not be identified (score, < 1.700). When the species level cutoff value was lowered to a score of ≥ 1.750 , 7 of 8 *Dietzia* spp. were also correctly identified at the species level, as subsequently confirmed by 16S rRNA sequencing (Table 2).

DISCUSSION

Identification of *R. equi* by conventional methods based on colony morphology, growth properties, or biochemical profiles is not reliable and requires molecular methods to differentiate it from *Dietzia* spp. MALDI-TOF MS is a fast method for identification of microorganisms of clinical interest and could be an adequate option in considering *R. equi* and *Dietzia* spp. In routine diagnostics, MALDI-TOF MS has advantages with respect to the time and effort needed to obtain identification results at the species level. However, there is little information on the performance of the two main commercially available MALDI-TOF MS systems for the identification of these two closely related actinomycetes.

Overall, with the direct colony extraction method, the Biotyper permitted the identification of 91.6% of the strains tested, in contrast to only 22.7% for Vitek MS. For the Biotyper system, previous studies have reported improved species-level identification rates without an increase in the false-identification rates for a variety of different organisms by decreasing the identification score either to 1.900 (13) or to 1.700 (14). By lowering the score representing species-level identification from ≥ 2.000 to ≥ 1.750 , we were able to identify at the species level practically all the strains tested in this study, 144 (100%) *R. equi* strains and 8 (80%) of 10 *Dietzia* sp. strains, without any misidentification. Only one strain gave a score lower than 1.700 and therefore could not be identified with the Biotyper MS. This strain was identified as *D. cinnamomea* by 16S rRNA sequencing. *D. cinnamomea* was first isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant (15), but it is mostly known for its ability to degrade a wide variety of organic compounds and rarely for its pathogenic potential (16). The performance of the Biotyper in identification of *R. equi*, distinguishing it from *Dietzia* spp., is comparable to the performances of PCR *choE* and 16S rRNA sequencing. When the species cutoff value was reduced to a score of ≥ 1.750 , Biotyper correctly identified all the *R. equi* isolates. PCR *choE* analysis is a reliable method for *R. equi* identification, but MALDI-TOF MS is faster and more economical in terms of both labor and monetary cost. Although *Dietzia* spp. are not commonly associated with human infections, sporadic cases necessitate accurate identification of *Dietzia* spp. at the species level. 16S rRNA sequencing is currently the only method that guarantees definitive and conclusive identification of *Dietzia* spp. to the rank of species.

The results obtained in this study indicate that for the Vitek MS system, pretreatment of bacterial colonies with ethanol improves substantially the number of correct identifications with the highest level of confidence. Actinomycetes such as *R. equi* and *Dietzia* spp. contain in their cell walls long-chain mycolic acids as well as a great amount of lipopolysaccharide, preventing the complete uptake of energy when fired upon by the laser. Consequently, mass spectra are not generated. With the use of ethanol in the extraction method, a substantial amount of mycolic acids and polysaccharide is eliminated, while the target proteins are preserved, allowing the generation of high-quality

spectra (17). We consider that, with the extraction method, the Vitek MS system has performed properly, with an acceptable rate of 84.4% of samples correctly identified at the species level. However, it was not able to identify 20 *R. equi* isolates or to distinguish properly 4 *Dietzia* spp. from *R. equi*, while PCR *choE* analysis correctly identified all the *R. equi* isolates. The SARAMIS 2.0 database includes three species of the genus *Dietzia*: *D. maris*, *D. natronolimnaea*, and *D. cinnamomea*. However, Vitek MS identified at the species level only 6 of the 10 *Dietzia* isolates analyzed. The genus *Dietzia* has been established recently, and only a few strains have been implicated in human infections (18).

Overall, in the comparisons of the two systems, the MALDI Biotyper system provided higher accuracy than the Vitek MS system for identification of *R. equi* as well as for differentiation of *R. equi* from *Dietzia* spp. Although the data were limited in that only 10 isolates were included in the study, the results indicated that proper identification of *Dietzia* spp. at the species level requires confirmation by 16S rRNA sequencing. Spectral databases should be regularly updated by suppliers to improve identification rates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. A total of 154 isolates, all originally identified as *R. equi*, were included in the study. A total of 129 of the 154 isolates were previously identified as *R. equi* by means of PCR amplification of the *choE* gene, encoding a *R. equi* cholesterol oxidase (9). Eight of the 154 isolates were negative for the PCR *choE* gene and were identified as members of the genus *Dietzia* by 16S rRNA sequencing (7). The remaining 17 isolates (15 *R. equi* isolates and 2 *Dietzia* sp. isolates) were submitted to the clinical microbiology laboratory of Marqués de Valdecilla university hospital during the period 2010 to 2014. The collection included strains isolated from AIDS patients at different Spanish hospitals ($n = 71$), isolates from pneumonic foals ($n = 34$), and strains isolated from soil samples collected from the environment ($n = 49$). They were grown on Columbia horse blood agar plates at 37°C and stored in cryogenic vials at -80°C in brain heart infusion broth with 20% glycerol.

Reference method. We consider the *choE*-based PCR to be the reference method for *R. equi* identification. All the strains were assayed by *choE* PCR, as described in detail elsewhere (9). PCR-negative *choE* isolates were identified by sequencing of a species-specific region of the 16S rRNA gene delimited by primers DG74 (AGGAGGTGATCCAACCGCA) and PLO6 (5'-GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC-3') (19). The PCR products were sequenced using an ABI Prism 377 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Homology searches were performed with the BLAST tool at the website of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Vitek MS. Two different extraction protocols were used for the preparation of the samples: (I) direct extraction from colonies and (II) extraction with ethanol. For the direct colony extraction procedure, a portion of a fresh colony was directly applied as a thin film on a spot of a MALDI disposable target plate, dried, and overlaid with 1 μl of matrix and 0.6 μl of 28.9% formic acid solution (Vitek MS-FA). Upon drying, the target plate was loaded into the Vitek MS instrument for identification. For the ethanol extraction procedure, a single colony was transferred to a 1.5-ml Eppendorf tube containing 300 μl of API suspension medium (bioMérieux) and mixed thoroughly using a vortex mixer. Absolute ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) (900 μl) was added, and the mixture was mixed thoroughly again. After centrifugation at 13,000 rpm was performed for 2 min, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in the residual ethanol. A volume of 1 μl of the resuspended pellet was loaded on the steel target plate, dried, and overlaid with 1 μl of Vitek MS-CHCA matrix (a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid [HCCA]-acetonitrile/ethanol/water [1:1:1] acidified with 3% [vol/vol] trifluoroacetic acid) and again allowed to air dry.

Each strain tested was spotted twice on the same target slide. Measurements were performed on a Vitek MS mass spectrometer (bioMérieux) according to the manufacturer's suggested settings using automatically collected spectra. Captured spectra were analyzed with Shimadzu Launchpad Identification software that included the database SARAMIS MS-ID version 2.0 (Anagnos Tee GmbH). For each run, *Escherichia coli* ATCC 8739 was included as a standard to calibrate the instrument and to validate the run. The system reported the best identification matches along with confidence values from 0% to 100%. For a reliable identification at the species level, only hits with scores of 99.9% were accepted. Peak matches that yielded identification results with confidence values between 50% and 99.8% were considered acceptable but required confirmation by 16S rRNA sequencing. When a good identification was not obtained with the direct colony extraction method, subsequent analysis was done with the ethanol extraction method.

Bruker Biotyper. All the strains were subjected to analysis with the system using the following procedure: the bacterial biomass was smeared onto a metallic MALDI-TOF MSP 96 plate (Bruker Daltonics) and covered with 1 μl of saturated α -cyan-4-hydroxycinnamic acid-50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid. The plate was dried at room temperature for 5 min. When the first attempt at identification did not give results with a high level of confidence, samples were identified using formic acid-acetonitrile extraction (20). Briefly, 2 to 3 colonies were transferred to a 1.5-ml Eppendorf tube containing 300 μl of distilled water and were then mixed with 900 μl of ethanol by pipetting. The

suspension was pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 2 min, evaporated to dryness, and then reconstituted in 50 μ l of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). After incubation for 30 s, 50 μ l of acetonitrile (Sigma-Aldrich) was added. The suspension was then centrifuged at 13,000 rpm for 2 min. Next, 1.0 μ l of the supernatant was applied to a 96-spot polished steel target plate (Bruker Daltonics) and dried. A saturated solution of 1.0 μ l of MALDI matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid [HCCA]; Bruker Daltonics) was applied to each sample and dried. Measurements were performed with a Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS system (Bruker Daltonics) using FlexControl software with Compass Flex Series version 1.3 software and a 60-Hz nitrogen laser (337-nm wavelength). The protein spectra with mass-to-charge ratios (m/z) ranging from 2,000 to 20,000 were explored with the Bruker Biotyper 3.1 software package with default settings and compared with the reference spectra present in the database, showing the 10 most similar patterns for each isolate. The database for identification was the reference Biotyper library v4.0 5,627 MSP (Bruker Daltonics), which included 5,627 species. The similarity of patterns was represented as a score ($\geq 2,000$, identification at the species level; 1,700 to 1,999, identification at the genus level; $<1,700$, no reliable identification). *E. coli* ATCC 25922 was used as a standard for calibration and as a reference for quality control.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dámaso Crespo for his revision and corrections of the manuscript.

This work was supported by grants from the Institute of Health Carlos III (cofinanced by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe") and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

We declare no conflict of interests.

REFERENCES

- Vázquez-Boland JA, Giguère S, Hapeshi A, MacArthur I, Anastasi E, Valero-Rello A. 2013. *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet Microbiol* 167:9–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.016>.
- Yamshchikov AV, Schuetz A, Lyon GM. 2010. *Rhodococcus equi* Infection. *Lancet Infect Dis* 10:350–359. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70068-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70068-2).
- Sudhinda P, Wang G, Nadelman RB. 2016. Identification of *Dietzia* spp. from cardiac tissue by 16S rRNA PCR in a patient with culture-negative device-associated endocarditis: a case report and review of the literature. *Case Rep Infect Dis* 2016:8935052. [doi:10.1155/2016/8935052](https://doi.org/10.1155/2016/8935052).
- Giguère S, Prescott JF. 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* Infection in foals. *Vet Microbiol* 56:313–334. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00099-0).
- Funk G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. 1997. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *J Clin Microbiol* 35:3122–3126.
- Bemer-Melchior P, Haloun A, Riegel P, Drugeon HB. 1999. Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* 29:1338–1340. <https://doi.org/10.1086/313490>.
- Piñeres L, Agüero J, Vázquez-Boland JA, Martínez-Martínez L, Navas J. 2010. Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 48:1904–1907. <https://doi.org/10.1128/JCM.01730-09>.
- Niwa H, Lasker BA, Hinrikson HP, Franzen CG, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brown JM. 2012. Characterization of human clinical isolates of *Dietzia* species previously misidentified as *Rhodococcus equi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:811–820. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1379-7>.
- Ladrón N, Fernández M, Agüero J, González Zörn B, Vázquez-Boland JA, Navas J. 2003. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. *J Clin Microbiol* 41:3241–3245. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003>.
- Stefanska I, Witkowski L, Rzewuska M, Dzieciatkowski T. 2016. Development and evaluation of the internal-controlled real-time PCR assay for *Rhodococcus equi* detection in various clinical specimens. *J Vet Med Sci* 78:543–549. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0516>.
- Welker M. 2011. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 11:3143–3153. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100049>.
- Vila J, Juiz P, Salas C, Almela M, de la Fuente CG, Zboromyrska Y, Navas J, Bosch J, Agüero J, de la Bellacasa JP, Martínez-Martínez L. 2012. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50:1745–1747. <https://doi.org/10.1128/JCM.05821-11>.
- Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. 2013. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 51:2875–2879. <https://doi.org/10.1128/JCM.00819-13>.
- Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. 2014. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 52:130–138. <https://doi.org/10.1128/JCM.01996-13>.
- Yassin AF, Hupfer H, Schaal KP. 2006. *Dietzia cinnamomea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:641–645. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63863-0>.
- Procópio L, Alvarez VM, Jurelevicius DA, Hansen L, Sørensen SJ, Cardoso JS, Pádula M, Leitão AC, Seldin L, van Elsland JD. 2012. Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamomea* P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:289–302. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9633-7>.
- Dunne WM, Doling JK, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, Mailler S, Girard V, van Belkum A, Deol P. 2014. Rapid inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* species before identification using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 52:3654–3659. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-14>.
- Koerner RJ, Goodfellow M, Jones AL. 2009. The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunistic pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55:296–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00513.x>.
- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32:335–351.
- Hsueh PR, Lee TF, Du SH, Teng SH, Liao CH, Sheng WH, Teng LJ. 2014. Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *J Clin Microbiol* 52:2371–2379. <https://doi.org/10.1128/JCM.00456-14>.



Original article

Evaluation of the Vitek-MS™ system in the identification of *Candida* isolates from bloodstream infections

Carlos Ruiz de Alegría Puig^{a,*}, Jesús Agüero-Balbín^{a,b}, Carlos Fernández-Mazarrasa^a,
Luis Martínez-Martínez^{a,b}

^a Microbiology Service, Marqués de Valdecilla-IDIVAL University Hospital, Spain

^b Department of Molecular Biology University of Cantabria, Santander, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2016

Accepted 26 February 2018

Available online 6 July 2018

Keywords:

Vitek-MS™

MALDI-TOF-MS

Candida spp.

Sensitivity

Specificity

ABSTRACT

Background: Matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) represents a revolution in the identification of microorganisms of clinical interest. Many studies have confirmed the accuracy and fastness of this tool with routine strains.

Aims: To identify clinical isolates of *Candida* from patients diagnosed with candidemia.

Methods: Vitek-MS™ system was used with a collection of 298 blood isolates of the genus *Candida* represented by 9 different species. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA cluster was used as the reference method.

Results: The results of Vitek-MS™ were concordant with those obtained with the reference method for 279 (93.62%) isolates (Kappa coefficient (κ) = 0.91). Vitek-MS™ misidentified 10 (3.36%) isolates and did not identify 9 (3.02%) isolates.

Conclusions: This study determines the potential of Vitek-MS™ in yeast identification, being a reliable and fast alternative in the clinical laboratory, with an acceptable sensitivity of 82% (IC 95%: 70–90.6%), in comparison with a 100% (IC 95%: 92.9–100%) sensitivity of the conventional methods.

© 2018 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Evaluación del sistema VITEK® MS™ en la identificación de aislamientos de *Candida* de pacientes con candidemia

RESUMEN

Antecedentes: La espectrometría de absorción de masas mediante láser asistido por una matriz (MALDI-TOF MS) representa una revolución en la identificación de microorganismos de interés clínico. Muchos estudios han confirmado la exactitud y rapidez de esta herramienta con aislamientos de la rutina clínica diaria.

Objetivos: Identificar aislamientos clínicos del género *Candida* procedentes de pacientes con un diagnóstico de candidemia.

Métodos: Se utilizó el sistema VITEK® MS con un grupo de 298 aislamientos sanguíneos del género *Candida*, representado por 9 especies diferentes. Se utilizó como método de referencia la secuenciación de la región del espaciador de transcripción interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosómico.

Resultados: Los resultados de VITEK® MS coincidieron con aquellos obtenidos por el método de referencia en 279 (93,62%) de los aislamientos (coeficiente Kappa [κ] = 0,91), mientras que clasificó erróneamente a 10 (3,36%) aislamientos y no identificó otros 9 (3,02%).

Conclusiones: VITEK® MS es una alternativa fiable y rápida en la identificación de levaduras en el laboratorio clínico, con una sensibilidad aceptable del 82% (IC 95%: 70-90,6%) en comparación con una sensibilidad del 100% (IC 95%: 92,9-100%) de los métodos convencionales.

© 2018 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:

VITEK® MS

MALDI-TOF MS

Candida spp.

Sensibilidad

Especificidad

* Corresponding author.

E-mail address: carlosrdap@hotmail.com (C. Ruiz de Alegría Puig).

Rapid identification of yeasts is clinically important when treating immunocompromised and hospitalized patients with disseminated yeast infections.¹⁰ *Candida* species are opportunistic pathogens causing systemic infections contributing to high mortality in hematological, transplanted and intensive care unit (ICU) patients. Further, some of these species are intrinsically resistant to several antifungal drugs. Accordingly, rapid identification of *Candida* species would be beneficial for a better management of invasive infections caused by these organisms.^{11,17,23}

Traditionally, morphological, molecular, biochemical and/or immunological methods have been used for the identification of yeasts. Unfortunately, in most cases, these procedures are laborious and slow.¹⁶ Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) is increasingly used in clinical laboratories for fast identification of microorganisms.^{1,21,25,28} This method is based on a pulsed laser that ionizes particles previously implanted in a matrix. These particles, which travel through the mass analyzer, reach a detector and creates a mass spectrum that is compared to reference spectra in a well-characterized library.^{3,24} Two MALDI-TOF-MS devices are currently used in most clinical laboratories: BioTyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and Vitek-MS™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The performance of both systems for identifying *Candida* species have been evaluated in previous studies, with correct identification percentage ranges from 90% to 99.8% and 87.2% to 96.1%, for BioTyper and Vitek-MS™, respectively^{3,4,15,24,27} (Table 1).

Our hypothesis is that Vitek-MS™ system can replace the conventional methods for the identification of *Candida* species with full confidence in a laboratory of clinical microbiology. The aim of the study was to evaluate the performance of this system to identify *Candida* isolates recovered from bloodstream infections, using molecular methods as the gold standard, especially the ITS sequencing.

Material and methods

Strains and identification by conventional methods

The present study was conducted at an 800-bed teaching hospital (University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) which has both an hematological and a transplantation program. We included 298 *Candida* isolates from blood cultures obtained between January 1st, 2005 and December 31st, 2011. This is a retrospective study on a collection of strains from blood cultures of

all hospital services with very different patients, from neonates to elderly people, with an average age of 61.35 years. One isolate per patient was included except when a new episode of candidemia occurred after one month of the previous one. Blood cultures were processed using the Bactec 9240 system (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Candida albicans isolates were preliminarily identified by their growth in both Saboureaud agar with chloramphenicol and Saboureaud agar with chloramphenicol-actidione (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). A molecular method with specific primers was also used.¹⁴ Additionally, for every *Candida* isolate different from *C. albicans*, the API-ID32C identification system (bioMérieux) was used according to the manufacturer's instructions.⁶ API-ID32C galleries were incubated at 30°C and results were read after 24 h, extending incubation until 48 h when recommended by the apiweb™ profile. Ten *Cryptococcus neoformans* and 40 *Rhodotorula mucilaginosa*, from a collection of strains, were used as negative controls.

Molecular identification

For the amplification and sequencing of the ITS (internal transcribed spacer) region of the ribosomal DNA, DNA was extracted from individual colonies grown on CHROMagar plates using the Instagene Matrix (Bio-Rad). The ITS region was amplified with primers ITS1 and ITS4, described previously by White et al.²⁶ The PCR product was purified with NucleoSpin® Gel (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and sequenced with ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA). The sequences of the isolates were compared with those deposited in the GenBank database using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To establish the correct identification, sequences of a given pairwise alignment with the lowest E-value and the highest number of identities (expressed as a percentage) were selected as the most likely species. For *C. albicans* isolates, instead of sequencing, a molecular method with specific primers¹⁴ was used.

In order to determine the concordance between the two identification techniques (one conventional and the other based on a MALDI-TOF-MS system), Kappa coefficient (κ), corresponding to the proportion of concordances observed among the total number of observations, having excluded the concordance produced by random, was calculated.¹³ Diagnostic parameters results were obtained with Stata® v.14 program.

Table 1
Reports on *Candida* identification by MALDI-TOF systems.

No. of isolates in the study	<i>C. albicans</i>	Non- <i>Candida albicans</i> species, and other yeast-like fungi	MALDI-TOF systems	Correct identification (%)	Reference
1192	512	680	BioTyper	97.6	Bader et al. ¹
1383	838	545	Saramis	96.1	
73	0	73	BioTyper	98.3	Lacroix et al. ¹²
533	210	323	Andromas	98.3	
98	24	74	Saramis	94.5	Martinez-Lamas et al. ¹⁴
			Vitek-MS™	96.1	Won et al. ²⁵
			BioTyper	96.2	Chen et al. ³
			Vitek-MS™	87.2	
2683	1051	1632	BioTyper	98.8	Wang et al. ²²
			Vitek-MS™	95.4	
6328	3063	3265	BioTyper	99.8	Fraser et al. ⁴
1207	363	844	Saramis	97.6	Sendid et al. ¹⁹
852	58	794	Vitek-MS™	96.1	Westblade et al. ²³
102	18	84	BioTyper	90	Rosenvinge et al. ¹⁸
			Saramis	79	

Table 2
Identification of *Candida* species with API ID32C and Vitek MSTM.

Molecular methods	API ID32C	VITEK MS TM MALDI-TOF
<i>C. albicans</i> : 109 specific PCR 5 <i>C. albicans</i>	109 not performed 5 <i>C. albicans</i>	109 <i>C. albicans</i> 5 <i>C. dubliniensis</i>
<i>C. parapsilosis</i> group (n = 95) 90 <i>C. parapsilosis</i> 4 <i>C. metapsilosis</i> 1 <i>C. orthopsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> (n = 41)	95 <i>C. parapsilosis</i> 41 <i>C. tropicalis</i>	88 <i>C. parapsilosis</i> 6 Not identified (P150 ^a) 1 Misidentified (<i>C. dattila</i>) 37 <i>C. tropicalis</i> 1 not identified (P150 ^a) 2 misidentified (<i>C. albicans</i> and <i>Geotrichum fermentans</i>) 1 Not read (P201 ^b)
<i>C. glabrata</i> (n = 29)	29 <i>C. glabrata</i>	28 <i>C. glabrata</i> 1 not identified (P150 ^a)
<i>C. guilliermondii</i> (n = 6)	6 <i>C. guilliermondii</i>	6 <i>C. guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i> (n = 5)	5 <i>C. krusei</i>	5 <i>C. krusei</i>
<i>C. lipolytica</i> (n = 3)	3 <i>C. lipolytica</i>	3 <i>C. lipolytica</i>
<i>C. lusitanae</i> (n = 4)	4 <i>C. lusitanae</i>	2 <i>C. lusitanae</i> 2 misidentified (<i>C. tropicalis</i> and <i>Cryptococcus humicola</i>)
<i>C. haemulonii</i> (n = 1)	1 <i>C. sake</i>	1 <i>C. haemulonii</i>

^a P150: the spectrum is not in the data base.

^b P201: bad spectrum during the acquisition.

MALDI-TOF MSTM

Identification of the organisms with the Vitek-MSTM was performed following the manufacturer's recommendations: cells from a single colony on a CHROMagar *Candida* plate, incubated for 24 h at 37 °C, were directly applied onto the steel carrier, lysed by suspension in 0.6 µl of 28.9% formic acid (VITEK MS-FA) and dried for a short time (approximately 2 min). The sample was allowed to air-dry at room temperature, overlaid with 1 µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic) VITEK[®] MS-CHCA matrix and again allowed to air-dry. Measurement was performed on a Vitek-MSTM with SARAMIS MS-IVD v2 database (Anagnos Tee GMBH, bioMérieux), in positive linear mode, with a mass range of 2–20 kDa, using *Escherichia coli* strain ATCC[®] 8739TM as a molecular mass standard. The intensity of the 50-Hz nitrogen laser was under the control of the acquisition software at the settings recommended by the manufacturer. Two samples of the same strain were applied and only hits within the spectra database with scores of 99.9% and a single shot, without repetitions, were accepted. Results were categorized as “no read” if a bad acquisition (P201error) was obtained in both samples and as “no identification” when the result of the spectra corresponded to a P150 error (not in the database).

Results

The identifications provided for the 298 strains with the indicated conventional method were as follows: 114 *C. albicans*, 95 *Candida parapsilosis*, 41 *Candida tropicalis*, 29 *Candida glabrata*, 6 *Candida guilliermondii*, 5 *Candida krusei*, 4 *Candida lusitanae*, 3 *Candida lipolytica*, 1 *Candida haemulonii*. The Vitek MSTM system identified correctly to the species level 279 isolates (93.62%); additionally, 10 isolates (3.36%) were misidentified, 8 isolates (2.69%) were not identified and 1 isolate (0.33%) gave a bad spectrum during the acquisition (Table 2).

The Vitek-MSTM system identified 109/114 (95.6%) *C. albicans*, with the remaining 5 isolates misidentified as *Candida dubliniensis*. All these 5 isolates were identified as *C. albicans* by API ID32C, specific PCR and ITS sequencing.

In the “psilosis” group, the Vitek-MSTM gave an identification for 89/95 (93.7%) isolates, with 88 of them (92.6%) correctly

identified as *C. parapsilosis* and one isolate misidentified as *Candida dattila*. The remaining 6 (6.3%) unidentified isolates in this group were identified by the conventional method as *Candida metapsilosis* (n = 4), *Candida orthopsilosis* (n = 1) or *C. parapsilosis* (n = 1). Both *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* are not included in the database version used in this study.

Vitek-MSTM identified correctly 37/41 (90.2%) *C. tropicalis*; 2 (4.8%) *C. tropicalis* were misidentified as *C. albicans* and *Geotrichum fermentans*, respectively, another one (2.4%) had no identification and a fourth one (2.4%) gave no read. On CHROMagar *Candida* plates, 31 (75.6%) strains of *C. tropicalis* presented colonies with a characteristic blue color at 24 h, the remaining 8 (19.5%) presented a cream color at 24 h and blue color at 48 h, and 2 (4.9%) presented violet colored colonies at both 24 and 48 h. That is in agreement with previously published reports.^{2,18,22}

For *C. glabrata* 28/29 (96.5%) isolates were correctly identified, while 1 (3.5%) isolate was not identified. All *C. guilliermondii* (n = 6), *C. krusei* (n = 5) and *C. lipolytica* (n = 3) were correctly identified by Vitek MSTM. Two of four isolates in the *C. lusitanae* group were correctly identified by Vitek MSTM, while the other 2 (50%) were misidentified as *C. tropicalis* and *Cryptococcus humicola*. The only strain of *C. haemulonii* was correctly identified by Vitek-MSTM but repeatedly misidentified by API-ID32C as *C. sake* (Table 2).

The Kappa coefficient (κ) between the conventional identification techniques and the MALDI-TOF-MS system was 0.855, which according to the assessment of this index by the Landis and Koch scale, indicates a very good concordance. If we perform this Kappa coefficient (κ) by comparing each of the two methods with the reference method, Vitek^{MS} still has a good index (0.91), whereas conventional methods reach almost 1 (0.97).

The sensitivity and specificity of the Vitek-MSTM system reached 82% (IC 95%: 70–90.6%) and 97.2% (IC95%: 94.5–98.8%), respectively, with a positive and negative predictive values of 86.2% (IC95%: 74.60–93.9%) and 96.1% (IC 95%: 93.2–98.1%) respectively. On the other hand, API system sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were 100% (IC 95%: 92.9–100%), 98% (IC 95%: 95.6–99.2%), 89.3% (IC 95%: 78.1–96%), and 100% (IC 95%: 98.7–100%), respectively. The prevalence of candidemia in our hospital during those years reached only 2%, so there is no influence in those values.

Discussion

The identification methods in the clinical laboratory should be reliable and fast. The faster diagnosis of MALDI-TOF compared to API method makes the former a good alternative (Kappa coefficient (κ) = 0.855), being able to advance the diagnosis 24 or 48 h. Our results show an excellent agreement between the conventional identification techniques and the MALDI-TOF-MS system. When comparing the 189 isolates evaluated with these two methods, there was an agreement in the identification of 170 (89.9%) isolates. The API system methodology correctly identified 183 (96.8%) strains while in 6 (3.2%) cases there was no identification to the species level. On the other hand, Vitek MSTM correctly identified 170 (89.9%) strains and did not identify the organism to species level in 19 (10.1%) cases. Our results are within the ranges reported in the literature, perhaps somewhat lower. In our study the number of *C. albicans* isolates is lower than that of other species of the genus, and no new tests were carried out in spectral failed acquisitions.

In conclusion, the Vitek-MSTM system provides an acceptable and rapid identification at the species level in most *Candida* species evaluated, showing similar results to other reported studies (Table 1). This is supported by the good data of sensitivity (82%) and specificity (97.2%) obtained. It is a good alternative to conventional methods for the identification of the

most frequently isolated yeast species. All these characteristics suggest that the Vitek-MS™ system will have a big impact in patient care and laboratory effectiveness.⁹ Nevertheless, more studies with a larger number of less frequently isolated *Candida* species, such as *C. lusitanae*, need to be done. Additional studies are also necessary to avoid some cases of misidentification of *C. albicans* as *C. dubliniensis*. The errors in the identification between these two phylogenetically closely related yeasts have already been reported in the literature, both with Vitek-MS™ and with BioTyper,^{8,20} and it would be necessary to propose new mass peaks for the differentiation of their spectra.

Finally, the database of the Vitek-MS™ should include both *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* as they are currently relevant species, not only from the epidemiological point of view, but because of their antifungal resistance profiles.^{5,7,19} In this regard, other systems such as BioTyper or Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Germany and Shimadzu, Duisburg, Germany) have already included these species in their databases.^{16,21}

Funding

This study has been supported by Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) – co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interests.

References

- Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laserdesorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1359–65.
- Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3025–7.
- Chen JHK, Yam WC, Ngan AH, Fung AM, Woo WL, Yan MK, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3981–7.
- Fraser M, Brown Z, Houldsworth M, Borman AM, Johnson EM. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med Mycol*. 2016;54:80–8.
- Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, et al., and Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1506–9.
- Gutierrez J, Martín E, Lozano C, Coronilla J, Nogales C. Evaluation of the ATB 32C Automicrobic system and API 20C using clinical yeast isolates. *Ann Biol Clin*. 1994;50:443–6.
- Hendrickx M, Goffinet JS, Swinne D, Detandt M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:544–8.
- Hof H, Eigner U, Maier T, Staib P. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* by means of MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab*. 2012;58:927–31.
- Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:1.
- Kim SH, Yoon YK, Kim MJ, Sohn JW. Clinical impact of time to positivity for *Candida* species on mortality in patients with candidaemia. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:2890–7.
- Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, Tanaka J, Nishio M, Kaneda M, et al. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol*. 2012;96:748–57.
- Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:153–8.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159–74.
- Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2860–5.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2912–7.
- Martínez-Lamas L, Pérez del Molino ML, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of *Candida non-albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:568–72.
- Mikulska M, Del Bono V, Ratto S, Viscoli C. Occurrence, presentation and treatment of candidemia. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8:755–65.
- Pfaffer MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996;34:58–61.
- Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gómez-López A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:67–71.
- Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig A, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses*. 2013;56:229–35.
- Sendid B, Ducoroy P, François N, Lucchi G, Spinali S, Vagner O, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol*. 2013;51:25–32.
- Sow D, Fall B, Ndiaye M, Ba BS, Sylla K, Tine R, et al. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia*. 2015;180:173–9.
- Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*. 2013;2013:204237.
- Wang H, Fan YY, Kudinha T, Xu ZP, Xiao M, Zhang L, et al. A comprehensive evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of yeasts part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study, 2012 to 2013. *J Clin Microbiol*. 2016;54:1376–80.
- Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2267–72.
- White TJ, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, editors. PCR protocols, a guide to methods and applications. NY: Academic Press; 1990. p. 315–22.
- Won EJ, Shin JH, Lee K, Kim MN, Lee HS, Park YJ, et al. Accuracy of species-level identification of yeast isolates from blood cultures from 10 university hospitals in South Korea by use of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based Vitek MS system. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3063–5.
- Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:65–7.