

CARTA AO EDITOR

Identificação Direta de Patógenos em Hemoculturas por MALDI-TOF

Pedro F. Del Peloso,¹ Cassiana da Costa Leite,¹ Helio M. Torres Filho,¹ Jonathas Nunes¹
¹Laboratório Richet, Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido em: 05/04/2013

Aceito em: 18/07/2013

micro@richet.com.br

O objetivo deste estudo foi validar uma metodologia direta *in house* para identificação bacteriana a partir de frascos de hemoculturas positivas pela técnica *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF) e avaliar seu benefício clínico em função da redução do tempo de diagnóstico das bacteremias nos pacientes internados em unidades hospitalares do Rio de Janeiro.

Foram utilizados neste estudo para o diagnóstico primário de infecções em corrente sanguínea o equipamento automatizado BD BACTEC®FX com os seguintes frascos: BD BACTEC® Plus Aerobic/F e BD BACTEC® Plus+Anaerobic/F. Para a identificação por *Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), utilizamos o equipamento Bruker Microflex®MS (Bruker Daltonik) em conjunto com o software Maldi flexControl Version 3.0 e Maldi Biotyper Version 3.0.

Preparo do isolado bacteriano para análise por MALDI-TOF:

Após a sinalização de hemocultura positiva pelo equipamento BD BACTEC®FX, era realizada pesquisa direta pelo Gram para identificação da morfologia da possível etiologia, e seguíamos com o procedimento de identificação direta seguindo protocolo de extração protéica pelo Ácido Fórmico.

Para a obtenção de bactérias para identificação por *Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry* e realização de protocolo de extração protéica pelo Ácido Fórmico, inoculávamos em um tubo de soro gel Vacuette® de 8 ml, um volume de 6ml de meio de cultura obtido do frasco de hemocultura positiva do BD BACTEC®FX e adicionávamos 2ml de saponina para obtermos a lise total das hemácias. Centrifugamos o tubo a 3.000 RPM por 10 minutos para remoção completa das hemácias e proteínas do soro, decantamos o sobrenadante com o cuidado de não perder o pellet de bactérias que estará fixado ao gel separador. Resuspendemos este pellet bacteriano em 2ml de água estéril no vórtex e transferimos todo o volume para microtubos Eppendorf de 2ml. Após este procedimento, seguíamos com o protocolo de extração pelo Ácido Fórmico.

Após a finalização do protocolo de extração, utilizávamos 2µl do sobrenadante para identificação do espectro protéico.

Preparo da Matrix e inóculo nas targets do MALDI-TOF:

O preparo da matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) foi seguindo orientação do fabricante Bruker Daltonik. As amostras eram aquecidas em temperatura ambiente e 2µl do sobrenadante eram inoculados na steel target plate (Bruker Daltonik) e gentilmente cobertas por 1µl de solução de matrix.

Para confirmação dos resultados obtidos pelo MALDI-TOF, utilizamos a identificação automatizada no equipamento Microscan WalkAway®96 SI – Siemens com o painel de identificação e antibiograma NUC-55 e PC-33.

Para a identificação dos *Streptococcus pneumoniae*, usamos o disco de optoquina como confirmação adicional.

Os resultados gerados pelo MALDI-TOF interpretam como identificações confiáveis para gênero, scores entre 2.0 e 2.29 e para gênero e espécie, scores entre 2.30 a 3.0. Baseamos nossa interpretação em trabalhos publicados recentemente onde vários autores usavam scores a partir de 2.0 como confiáveis para uma interpretação segura para gênero e espécie em amostras diretas de hemoculturas positivas. Alguns outros autores que usam scores mais baixos e uma nova atualização do software da Bruker (Maldi Biotyper Version 3.1) onde é permitido direcionar o projeto para a avaliação específica de hemoculturas, altera a interpretação dos scores para:

- 2.0 – 3.00: Altamente provável a identificação de gênero e espécie
- 1.8 – 1.999: Seguro para a identificação do gênero e provável espécie
- 1.6 – 1.799: Provável identificação de gênero

No nosso protocolo “in house”, nós fomos capazes de identificar com segurança e posterior confirmação, scores a partir de 1.8. Provavelmente, podemos tornar este valor como cutoff para uma correta identificação.

Os seguintes patógenos foram identificados com scores entre 2.0 a 2.30: *Escherichia coli* (n=30), *Klebsiella pneumoniae* (n=35), *Citrobacter freundii* (n=10), *Serratia marcescens* (n=12), *Haemophilus influenzae* (n=2), *Streptococcus pneumoniae* (n=2), *Staphylococcus aureus* (n=11), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), *Burkholderia cepacia* (n=1), *Enterococcus faecalis* (n=5), *Staphylococcus hominis* (n=5), *Staphylococcus epidermidis* (n=6), *Aeromonas hydrophila* (n=1), *Candida tropicalis* (n=2), *Candida albicans* (n=3) e *Enterobacter cloacae* (n=5). As seguintes bactérias foram identificadas, mas foram consideradas contaminantes:

Tabela 1 - Microrganismos identificados pelo protocolo "in house" com scores acima de 1.8.

Microorganismos (n)	Score 1.8 a 2.0	Score ≥ 2.0
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	0	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)	1	0
<i>Burkholderia cepacia</i> (5)	1	5
<i>Candida albicans</i> (20)	11	9
<i>Candida parapsilosis</i> (7)	2	5
<i>Candida pelliculosa</i> (1)	0	1
<i>Candida tropicalis</i> (2)	0	2
<i>Citrobacter freundii</i> (10)	1	9
<i>Enterobacter cloacae</i> (5)	0	5
<i>Enterococcus faecalis</i> (15)	1	15
<i>Escherichia coli</i> (30)	2	28
<i>Haemophilus influenzae</i> (4)	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (35)	4	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8)	3	5
<i>Serratia marcescens</i> (12)	1	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (11)	0	11
<i>Staphylococcus cohnii</i> (3)	3	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (17)	9	8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (4)	2	2
<i>Staphylococcus hominis</i> (17)	7	10
<i>Streptococcus massiliensis</i> (1)	0	1
<i>Streptococcus peroris</i> (1)	1	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (2)	0	2

Bacillus pumilus (n=1) e *Staphylococcus pettenkoferi* (n=1). Na tabela 1, estão listados todos os microrganismos identificados pelo nosso protocolo "in house" com seus devidos scores sempre acima de 1.8.

Os métodos microbiológicos tradicionais de identificação da maioria dos agentes infecciosos baseiam-se na análise fenotípica do metabolismo de provas bioquímicas dos microrganismos. Mesmo através da utilização de sistemas automatizados, o resultado final da identificação do agente etiológico das infecções leva, em muitos casos, entre 12 e 24 horas, podendo chegar a dias em algumas situações específicas. Em muitas das vezes, quando os resultados são obtidos, perdem impacto clínico e atrasam a correta terapia antimicrobiana no tratamento do paciente. Este tempo pode ser de fundamental importância em alguns casos, como em choque séptico, nos quais a cada duas horas sem tratamento ou com tratamento inadequado, a mortalidade pode duplicar. Inúmeros estudos foram desenvolvidos nos últimos anos demonstrando a efetividade da técnica MALDI-TOF na rápida identificação bacteriana. Outros protocolos foram desenvolvidos para identificar patógenos presentes em hemoculturas, a partir da aplicação da espectrometria de massa diretamente dos frascos de hemoculturas dos sistemas automatizados, quando detectados positivos. Alguns estudos apontam que a utilização desta metodologia aplicada diretamente à hemocultura pode reduzir o tempo de identificação bacteriana em até 34 horas. A metodologia de Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) é uma metodologia sem precedentes em aplicação na microbiologia clínica. De fácil execução e de baixo custo, se insere no laboratório de microbiologia clínica como mais uma ferramenta de identificação bacteriana extremamente rápida e eficaz. Nos pacientes com suspeita de sepsis, as

terapias antimicrobianas empíricas devem ser de amplo espectro e com dosagens plenas até o diagnóstico da etiologia da infecção. Na aplicação direta em hemoculturas positivas, a antecipação da identificação da etiologia em 24 horas, permite ao médico direcionar de forma precisa sua terapia antimicrobiana baseada única e exclusivamente nesta identificação, fazendo com que o alvo terapêutico seja atingido de forma precisa, em menos tempo, com menos efeitos adversos e menor custo do que uma terapia empírica de amplo espectro. Desta forma, a evolução, o prognóstico e o desfecho clínico, terão maior probabilidade de sucesso.

REFERÊNCIAS

1. Carbonnelle, E., J. L. Beretti, S. Cottyn, G. Quesne, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni. 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 45:2156-2161.
2. CLSI. 2008. *Abbreviated identification of bacteria and yeast, 2nd ed. CLSI document M35-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.*
3. Erhard, M., U. C. Hipler, A. Burmester, A. A. Brakhage, and J. Wostemeyer. 2008. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp. Dermatol.* 17:356-361.
4. Friedrichs, C., A. C. Rodloff, G. S. Chhatwal, W. Schellenberger, and K. Eschrich. 2007. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 45:2392-2397.
5. Gonzalez, V., E. Padilla, M. Gimenez, C. Vilaplana, A. Perez, G. Fernandez, M. D. Quesada, M. A. Pallares, and V. Ausina. 2004. Rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia using *S. aureus* PNA FISH. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23:396-398.
6. Haag, A. M., S. N. Taylor, K. H. Johnston, and R. B. Cole. 1998. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 33:750-756.
7. Hensley, D. M., R. Tapia, and Y. Encina. 2009. An evaluation of the Advandx *Staphylococcus aureus*/CNS PNA FISH assay. *Clin. Lab. Sci.* 22:30-33.
8. Hettick, J. M., M. L. Kashon, J. P. Simpson, P. D. Siegel, G. H. Mazurek, and D. N. Weissman. 2004. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76:5769-5776.
9. Hsieh, S. Y., C. L. Tseng, Y. S. Lee, A. J. Kuo, C. F. Sun, Y. H. Lin, and J. K. Chen. 2008. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics* 7:448-456.
10. James M. Musser, Katherine K. Perez, et al. *Integrating Rapid Pathogen Identification and Antimicrobial Stewardship Significantly Decreases Hospital Costs.* 2012 College of American Pathologists.
11. Keys, C. J., D. J. Dare, H. Sutton, G. Wells, M. Lunt, T. McKenna, M. McDowall, and H. N. Shah. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* 4:221-242.
12. Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dum, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa, and D. Harmsen. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46:1946-1954.
13. Murray, P. R. 1979. Modification of the bile solubility test for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 9:290-291.
14. W. Moussaoui, B. Jaulhac, A.-M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewa, P. Riegel and G. Pre'vost. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials *Clinical Microbiology and Infection - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 16, 1631-1638.