

Idoneidad del uso del MALDI-TOF MS para la identificación de *Staphylococcus aureus* y miembros del grupo de *Staphylococcus intermedius* (S.I.G.) - Suitability of MALDI-TOF MS for the identification of *Staphylococcus aureus* and members of the *Staphylococcus intermedius* group (S.I.G.) complex.

Alcalá L,^{a,c} Simón MC,^{a,c} López-Calleja AI,^{b,c} Ferrer I,^{b,c} Pereira J,^{b,c} Ortega C,^{a,c} Torres C,^{d,e} Viguera N,^{b,c} Gómez-Sanz E,^{c*} Revilla MJ,^{b,c} Rezusta A.^{b,c}

Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal, Área de enfermedades infecciosas y epidemiología, Zaragoza, España ^a ; Hospital Universitario Miguel Servet, Área de microbiología, Zaragoza, España ^b ; Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS), Zaragoza, España ^c ; Universidad de La Rioja, Facultad de ingeniería agrícola, Departamento de agricultura y alimentación, Área de bioquímica y biología molecular, Logroño, España ^d ; Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, La Rioja, España ^e.

Email de los autores: Alcalá L: leticia.alcalagarcia@gmail.com; Simón MC: mcsimon@unizar.es; López-Calleja AI: ana9675@gmail.com; Ferrer I: isabelfc58@gmail.com; Pereira J: jpereiraboan@gmail.com; Ortega C: epidemio@unizar.es; Torres C: carmen.torres@unirioja.es; Viguera N: noeliaviguera@hotmail.es; Gómez-Sanz E: elenagomez.titus@gmail.com; Revilla MJ: mjrevilla@gmail.com; Rezusta A: arezusta@unizar.es

*Dirección actual y contacto: **Elena Gómez-Sanz** (elenagomez.titus@gmail.com), Environmental Genomics and Systems Biology Research Group, Institute of Natural Resource Sciences, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), Wädenswil, Suiza.

Nota: la versión en inglés de este artículo está disponible en
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115/011502ing.pdf>

Resumen

A pesar de que el género *Staphylococcus* es comúnmente aislado en humanos y animales, su identificación sigue siendo problemática. Este estudio evalúa la idoneidad del MALDI-TOF MS (Biotyper 3) para su identificación, comparando los resultados obtenidos mediante diferentes métodos: fenotípicos, MALDI-TOF MS (añadiendo o no ácido fórmico) y moleculares. Una colección de 37 cepas fue identificada por técnicas convencionales como *S. aureus* (n= 7), *S. intermedius* (n=1) y *S. pseudintermedius* (n=29). Los aislamientos provenían de perros, tanto sanos como enfermos (n=27), y humanos (n=10), a partir de

diferentes muestras biológicas. Todas ellas fueron también identificadas por biología molecular y los cultivos puros fueron procesados en el MALDI-TOF MS. La información fue analizada con DAG_Stat. La sensibilidad, especificidad, eficiencia y el índice kappa se estimaron para cada especie bacteriana con un nivel de confianza del 95%, tomando la biología molecular como gold standard. Se detectaron Estafilococos de 27 perros y de sus dueños. Solamente una cepa de *S. intermedius* fue aislada, así que los parámetros relacionados con ella tienen que ser considerados con cautela. Todos los *S. aureus* fueron identificados correctamente. Usando MALDI-TOF MS con ácido fórmico, hubo una concordancia casi perfecta entre pruebas en la identificación de *S. aureus* y *S. pseudintermedius*. Cuando no se añadía ácido fórmico, la concordancia fue perfecta para *S. aureus*, mientras que para *S. pseudintermedius* fue buena. Este trabajo demuestra la validez, la utilidad y la fiabilidad del MALDI-TOF MS para la identificación de aislamientos bacterianos pertenecientes a *Staphylococcus* spp.

Palabras claves: Palabras clave: MALDI-TOF MS | *Staphylococcus aureus* | Grupo de *Staphylococcus intermedius* | Identificación | Concordancia | Fiabilidad

Abstract

Although *Staphylococcus* spp. are commonly isolated from humans and animals, their identification is problematic. This study assessed the suitability of MALDI-TOF MS (Biotyper 3) for their identification, comparing the results obtained by using phenotypical methods, MALDI-TOF (with and without adding formic acid) and molecular identification. A collection of 37 strains identified by conventional method as *S. aureus* (n= 7), *S. intermedius* (n=1) and *S. pseudintermedius* (n=29), were analyzed. The isolates belonged to ill and healthy dogs (n=27) and humans (n=10), from different biological samples. All of them were also identified by molecular methods and pure cultures were processed with a MALDI-TOF MS. The information was computed using DAG_Stat. The estimated sensitivity, specificity, efficiency and kappa statistics with a 95% confidence interval were calculated separately for the three bacterial species by taking molecular identification as the gold standard. Estafilococos from 27 dogs and their owners were identified. Only a strain of *S. intermedius* was found, so parameters related to it, might be considered with caution. All *S. aureus* were correctly identified. By using MALDI-TOF MS adding formic acid, lower sensibility and good specificity were calculated for *S. pseudintermedius*. In this case, almost perfect agreement between tests was obtained for *S. aureus* and *S. pseudintermedius*, respectively. When no formic acid was added, total agreement was estimated for *S. aureus* and substantial agreement for *S. pseudintermedius*. This study demonstrates the validity, the usefulness and the reliability of MALDI-TOF MS in the identification of bacterial isolates belonging to *Staphylococcus* spp.

Key words: *Staphylococcus intermedius* | Identificación | Concordancia | Fiabilidad

Introducción

El género *Staphylococcus* está compuesto por patógenos oportunistas, nosocomiales y zoonóticos con cierta importancia en medicina humana y animal. Entre los distintos estafilococos coagulasa positivos (CoPS), los *Staphylococcus aureus* y los miembros del grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG), que incluye *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*, han sido considerados como las especies clínicamente más relevantes (10).

S. aureus coloniza la piel y mucosas de los seres humanos y varias especies animales, como el cerdo o el caballo, siendo capaz de provocar infecciones graves, como endocarditis, neumonía o síndrome shock tóxico (3, 14). Aunque hay muchas áreas corporales que pueden ser colonizadas, el tracto respiratorio superior humano es la zona más frecuente (14). *S. pseudintermedius* y *S. intermedius* son los agentes más comúnmente aislados en la pioderma canina, y también están asociados a infecciones de heridas quirúrgicas y no quirúrgicas, infecciones del conducto urinario, otitis externa y otras infecciones en perros (5, 8, 13).

La transmisión zoonótica de CoPS ha sido descrita en la bibliografía, y parece que el contacto diario intensivo entre los perros y sus dueños puede incrementar la probabilidad de colonización debida a la transmisión interespecie de CoPS en ambos sentidos (4). Estos microorganismos tienen la capacidad de desarrollar resistencia, de forma rápida, a prácticamente cualquier antibiótico de uso clínico (11), generalmente a la metilina, lo que indica resistencia a todos los agentes β -lactámicos (8, 11). La resistencia a metilina se revela como un importante problema asociado a estos organismos, con implicaciones significativas en salud pública (12, 13).

Además, la diferenciación entre *S. aureus* y los miembros del SIG es problemática. La identificación fenotípica no es fiable, no hay kits comerciales disponibles y, hasta ahora, la identificación molecular es la única herramienta fidedigna (5). Aparte, la prevalencia de *S. intermedius* y *S. pseudintermedius* en infecciones humanas está probablemente infraestimada. Se considera que en muchas ocasiones, todos los estafilococos coagulasa positivos se agrupan como *S. aureus* (13).

En la última década, una nueva herramienta taxonómica, la "desorción/ionización láser asistida por matriz" (según sus siglas en inglés), con detector de iones, (TOF: time-of-flight), (MALDI-TOF MS), está siendo cada vez más utilizada en la identificación de microorganismos, debido, entre otras cosas, a su sencillez (5).

Los métodos convencionales se basan en criterios bioquímicos y requieren tests previos adicionales, además de largos procesos de incubación. En comparación, MALDI-TOF MS puede identificar bacterias y levaduras en minutos, en colonias desarrolladas en placas de cultivo, de una forma precisa, reduciendo el coste de material fungible y el tiempo empleado en el diagnóstico (2, 7).

Una identificación temprana y exacta puede reducir el tiempo de recuperación del paciente y la propagación. Debido a la estrecha relación de humanos y animales con el microbioma y resistoma ambiental, estas cepas también representan una fuente de determinantes de resistencia (11).

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la idoneidad de MALDI-TOF MS para la identificación de *S. aureus* y miembros del complejo SIG a partir de perros y sus dueños. Para ello, se comparan los resultados obtenidos utilizando métodos fenotípicos, MALDI-TOF (con o sin Ácido Fórmico añadido) y la identificación molecular, de acuerdo a los parámetros kappa, sensibilidad, especificidad y eficiencia.

Material y Métodos

Aislamiento bacteriano e identificación por métodos convencionales:

Se tomaron muestras de piel y mucosas mediante hisopos estériles en medio de transporte Amies (Nuova Aptaca, Canelli, Italia).

Todas las muestras fueron enriquecidas en el medio Brain Heart Infusion (Oxoid S.A., España) suplementado con un 10% NaCl, y se incubaron a 35-37° C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. Seguidamente, las muestras se sembraron en agar sangre de cordero (Oxoid S.A., España) y en un medio selectivo y diferencial para *Staphylococcus* spp., como es el Mannitol Salt Agar (Oxoid S.A., España). Todas las placas se incubaron aeróbicamente a 37° C durante 24 h.

Las colonias se seleccionaron en base a su morfología, tinción de Gram, β -hemólisis producida en agar sangre y presencia de la enzima catalasa. Todos los cocos Gram positivos, catalasa positivos y hemolíticos, se seleccionaron para continuar con el análisis. Las colonias amarillas en Mannitol Salt Agar se consideraron *S. aureus* y las rosas, como miembros del SIG. Además, se determinó la actividad de la coagulasa a través de la coagulación en tubo, utilizando suero de conejo (Difco S.A., España). Las colonias coagulasa positivas se sometieron al test β -galactosidasa (ONPG test) (Oxoid S.A., España), que permite diferenciar *S. aureus* y SIG (este grupo utiliza dicha enzima), siguiendo las recomendaciones de otros autores (6).

Extracción del ADN y análisis genético

Los cultivos puros se incubaron a 37° C durante 24 h en agar sangre para realizar la extracción de AND mediante **InstaGene Matrix (BioRad Laboratories)**, E.E.U.U, cat n° 732-6030), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los aislamientos se evaluaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dos veces, según las recomendaciones de Lautz *et al.* (2006).

Para distinguir *S. aureus* y SIG, se amplificó el gen *nuc*, utilizando oligonucleótidos iniciadores (primers) específicos (SI *nuc* y SA *nuc*) (Tabla-2). Dichos primers se utilizaron conjuntamente con un control positivo interno que amplificaba la region 16S rADN en una PCR múltiple.

La solución madre de la PCR (50 µl), se preparó con 1 µl de cada primer (25 µl), 1,5 µl dNTP (100 mM, Roche, Switzerland), 1,75 µl dMgCl₂ (50 mM, Applied Biosystem, E.E.U.U.), 5 µl de 10x Applied Biosystem Buffer, 0,3 µl Bio Taq ADN polimerasa (5 U/µl Applied Biosystem, E.E.U.U.), y H₂O. Finalmente, se añadían 3 µl de ADN bacteriano a cada tubo. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador (C1000™ Thermal Cyler, BioRad Laboratories, E.E.U.U.), con estas condiciones: desnaturalización inicial a 95° C durante 4s, seguido de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95° C durante 30s, anillado a 55° C durante 30s y alargamiento a 72° C durante 30s), finalizando con un alargamiento a 72° C durante 7 minutos.

Por otro lado, el loci *pta* permitió diferenciar *S. intermedius* y *S. pseudintermedius* (Bannoehr *et al.*, 2008) (Tabla-2). Este locus codifica la enzima phosphoacetyltransferasa y presenta una zona de restricción para MboI en *S. pseudintermedius*, que no se encuentra en *S. intermedius* and *S. delphini* (1). La amplificación del gen *pta* se realizó con un volumen final de 50µl que contenía 1µl de cada primer (25 mM), 1 µl dNTP (100 mM, Roche, Suiza), 1,5 µl d dMgCl₂ (50 mM, Applied Biosystem, E.E.U.U.), 5 µl de 10x Applied Biosystem Buffer, 0,3 µl Bio Taq ADN polimerasa (5 U/µl Applied Biosystem, E.E.U.U.) y H₂O. Finalmente, se añadían 3 µl de ADN bacteriano a cada tubo.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 95° C durante 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95° C durante 1 minuto, 53° C durante 1 minuto, 72° C durante 1 minuto y finalmente 72° C durante 7 minutos. Muestras de 25 µl de la mezcla de PCR se incubaron con 1 µl de MboI (1000 U/ml) (Takara Bio Inc, Japón) y 2.5 µl de 10x K Buffer durante un tiempo mínimo de 2 h (1). Los fragmentos de AND obtenidos, fueron sometidos a electroforesis para diferenciar las especies estudiadas.

Análisis proteómico (MALDI-TOF MS Bruker®)

Los cultivos puros de todas las muestras se sembraron en agar sangre y se cultivaron a 35° C durante 24 h, y después de eso, las bacterias fueron procesadas en el MALDI-TOF MS Bruker® (Biotyper 3). Una pequeña cantidad de una colonia de cada cultivo puro se transfirió a una placa metálica con 1µl de solución matriz directamente (alfa-Cyano-4-hydroxycinnamic acid in 2.5% TFA/50% acetonitrile) (Bruker, Alemania) o tras añadir 1µl de ácido fórmico (Fluka, E.E.U.U.), para romper la pared bacteriana (7), y tras su evaporación, se añadía la solución matriz.

Análisis de los datos

La información se introdujo en una hoja de cálculo Excel y se computó utilizando DAG_Stat (2). Se calcularon por separado para cada una de las tres especies estudiadas (*S. aureus*, *S. intermedius* y *S. pseudintermedius*), la sensibilidad, especificidad, eficiencia y el parámetro kappa con un nivel de confianza del 95% tomando como gold standard la biología molecular (2).

Los resultados obtenidos con MALDI-TOF MS se acompañan de un score. Todas las bacterias identificadas con scores inferiores a 1,7 se consideraron como "identificaciones poco fiables", y se excluyeron de los análisis posteriores.

Resultados

TABLA-1. Identificación de las cepas mediante métodos convencionales, MALDI-TOF MS, MALDI-TOF MS con ácido fórmico y análisis genético.

Biological origin	STRAIN IDENTIFICATION			
	Conventional method	MALDI- TOF MS (score)	MALDI- TOF MS + Formic Acid (score)	Genetic analysis
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,7)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,136)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Skin (allergy)	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. pseudintermedius</i> (2,199)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,86)	<i>S. intermedius</i> (2,009)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Skin (erythema)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,92)	<i>S. intermedius</i> (1,992)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Skin (erythema)	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. pseudintermedius</i> (2,215)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,25)	<i>S. aureus</i> (2,437)	<i>S. aureus</i>
Dog-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,25)	<i>S. aureus</i> (2,198)	<i>S. aureus</i>
Human-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,43)	<i>S. aureus</i> (2,348)	<i>S. aureus</i>
Dog-Vaginal mucosa (vaginitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2,15)	<i>S. pseudintermedius</i> (1,996)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Preputial secretion (prostatitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2,06)	<i>S. pseudintermedius</i> (1,935)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,979)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,009)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,048)	<i>S. aureus</i> (2,341)	<i>S. aureus</i>
Human-Interdigital space	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,808)	<i>S. aureus</i> (2,072)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,23)	<i>S. aureus</i> (2,269)	<i>S. aureus</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. pseudintermedius</i> (2,112)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. intermedius</i> (1,971)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,415)	<i>S. aureus</i> (2,304)	<i>S. aureus</i>
Human-Interdigital space	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,9)	<i>S. pseudintermedius</i> (1,79)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Preputial secretion (prostatitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,707)	<i>S. intermedius</i> (2,166)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. aureus</i>	No reliable identification*	<i>S. intermedius</i> (2,038)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Interdigital granuloma	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i> (1,804)	<i>S. intermedius</i> (2,164)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. pseudintermedius</i> (2,064)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Nares	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. intermedius</i> (2,055)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2,05)	<i>S. intermedius</i> (1,986)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Nares	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2,083)	<i>S. aureus</i> (2,345)	<i>S. aureus</i>
Human-Interdigital space	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i> (1,807)	<i>S. intermedius</i> (1,971)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Nares	<i>S. aureus</i>	No reliable identification*	<i>S. intermedius</i> (1,81)	<i>S. pseudintermedius</i>
Human-Interdigital space	<i>S. intermedius</i>	No reliable identification*	<i>S. intermedius</i> (1,956)	<i>S. intermedius</i>
Dog-Nasal lavage (rhinitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,729)	<i>S. pseudintermedius</i> (1,906)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Uterine mucosa (metritis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,915)	<i>S. pseudintermedius</i> (1,924)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Auricular haematoma	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,657)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,219)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Urine (cystitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,949)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,063)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Skin (alopecia)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,263)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,093)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Ears (recurrent otitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,893)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,163)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Ears (recurrent otitis)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (2,234)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,135)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Skin (pyoderma)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i> (2,082)	<i>S. intermedius</i> (2,074)	<i>S. pseudintermedius</i>
Dog-Urine (polyuria)	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (1,934)	<i>S. pseudintermedius</i> (2,025)	<i>S. pseudintermedius</i>

*Se consideraba “identificación poco fiable” cuando en la identificación con MALDI- TOF MS no se conseguía un score superior a 1,7 y por lo tanto, la cepa bacteriana no estaba correctamente identificada.

Identificación por métodos convencionales

Una colección de 37 cepas con diferentes orígenes biológicos (Tabla-1), pertenecientes a perros tanto enfermos como sanos (n=27) y sus dueños (n=10), fue identificada mediante métodos microbiológicos convencionales como *S. aureus* (n=10) (3 de ellos no concordaban con el gold standard) y SIG (n=27).

TABLA-2. Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores (primers) utilizados en el estudio.

Oligonucleotido iniciador	Secuencia	Tamaño del producto de PCR (pb)	Referencia
SI nuc 1	CAATGGAGATGGCCCTTTTA	125	<i>Lautz et al.</i> 2006
SI nuc 2	AGCGTACACGTTTCATCTTG		
SA nuc 1	TGCTATGATTGTGGTAGCCATC	420	<i>Lautz et al.</i> 2006
SA nuc 2	TCTCTAGCAAGTCCCTTTTCCA		
16s 1	GGACGGGTGAGTAACACGTGG	252	<i>Lautz et al.</i> 2006
16s 2	TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT		
pta 1	AAAGACAAACTTTCAGGTAA	320	<i>Bannoehr et al.</i> 2008
pta 2	GCATAAACAAGCATTGTACCG		

Como muestra la Tabla 3, los valores más altos obtenidos con este procedimiento se consiguieron en la identificación de *S. aureus*. Como sucede con los parámetros de *S. intermedius*, sus valores calculados fueron bajos. Este hecho tiene que considerarse con cautela, ya que solo había una cepa identificada como *S. intermedius* en el estudio.

Identificación mediante análisis proteómico

En este punto, hay que considerar dos opciones distintas: MALDI-TOF MS: añadiendo o no ácido fórmico.

En el primer caso, se detectaron 8 *S. aureus*, 12 *S. intermedius* y 17 *S. pseudintermedius*. Un *S. aureus* y 11 *S. intermedius* no se identificaron correctamente. A pesar de esto, la sensibilidad para *S. aureus* y *S. intermedius* fue la mejor, mientras que *S. pseudintermedius* consiguió valores más bajos. La especificidad fue más alta para *S. pseudintermedius* y las cepas mejor identificadas con este procedimiento son las de *S. aureus*, mientras que *S. intermedius* y *S. pseudintermedius* no tuvieron Buenos resultados. Hubo buena concordancia entre los tests para *S. aureus*, la concordancia más débil fue estimada para *S. intermedius* y *S. pseudintermedius* respectivamente (Tabla-3).

En el segundo caso, 7 *S. aureus*, 3 *S. intermedius* (ninguno de ellos coincidía con el análisis molecular) y 17 *S. pseudintermedius* fueron detectados, pero 9 microorganismos (todos ellos SIG) no se pudieron identificar correctamente, debido a sus bajos "scores". Sin embargo, todos los parámetros computados mostraron buenos niveles, especialmente para *S. aureus* y la concordancia fue perfecta para *S. aureus* y buena para *S. pseudintermedius*. No se pudieron calcular los resultados para *S. intermedius* cuando no se añadía este ácido (Tabla-3).

TABLA-3. Sensibilidad, especificidad, eficiencia y kappa de los diferentes estafilococos estudiados.

	Método convencional	MALDI- TOF MS (ácido fórmico)	MALDI- TOF MS
<i>S. aureus</i>			
Sensibilidad (IC)	1 (0.59-E)	1 (0.59-E)	1 (0.59-E)
Especificidad (IC)	0.90 (0.73-0.98)	0.96 (0.83-0.99)	1 (0.88-E)
Eficiencia	91.89%	97.30%	100%
Kappa (IC)	0.77 (0.53-1.01)	0.91 (0.75-1.07)	1
<i>S. intermedius</i>			
Sensibilidad (IC)	1 (0.02-E)	1 (0.02-E)	NC*
Especificidad (IC)	0.30 (0.16-0.47)	0.69 (0.52-0.83)	NC*
Eficiencia	31.53%	70%	NC*
Kappa (IC)	0,02 (-0,02- 0,06)	0.11 (-0.09-0.31)	NC*
<i>S. pseudintermedius</i>			
Sensibilidad (IC)	0.89 (0.73-0.98)	0.58 (0.39-0.76)	0.84 (0.6-E)**
Especificidad (IC)	0.87 (0.47-0.99)	1 (0.63-E)	1 (0.59-E)**
Eficiencia	89.19%	67.57%	88.46%**
Kappa (IC)	0.73 (0.48- 0.97)	0.38 (0.15- 0.60)	0.74 (0.47- 1.01)**

*Identificación poco fiable: no se pudo hacer ningún cálculo (NC).

**Para calcular sensibilidad, especificidad, eficiencia o kappa para los *S. pseudintermedius* identificados mediante MALDI- TOF MS, se eliminaron las identificaciones poco fiables.

Identificación mediante análisis genético

Treinta y siete estafilococos fueron identificados como *S. aureus* (n=7), *S. intermedius* (n=1) y *S. pseudintermedius* (n=29), mediante métodos genéticos, considerados como gold standard.

Discusión

Aunque se han calculado valores estimados de *S. intermedius*, estos no son tan precisos y representativos como podrían, debido al tamaño muestral, (sólo se dispuso de una bacteria de este grupo en el análisis) y, por lo tanto, los resultados no son comparables a los de otros estudios.

Todos los métodos analizados en el presente trabajo identificaron correctamente *S. aureus*, mostrando mejores resultados MALDI-TOF MS con respecto a los procedimientos microbiológicos convencionales. Los resultados estimados de sensibilidad y especificidad de los tests convencionales, fueron

similares a los obtenidos en el análisis proteómico. Además, el coeficiente kappa fue diferente en cada método, tomando valores similares a los de otros estudios cuando se utilizó MALDI-TOF MS (2) y valores inferiores pero con una buena concordancia con los bioquímicos.

Sin embargo, existen errores en el diagnóstico de *S. pseudintermedius*: hubo tres *S. pseudintermedius* categorizados como *S. aureus* por métodos bioquímicos y otra equivocación igual al utilizar MALDI-TOF MS (Ácido Fórmico). Las identificaciones por métodos convencionales y MALDI-TOF MS obtuvieron valores similares, mientras que los peores resultados se obtuvieron con MALDI-TOF MS (Ácido Fórmico). Excepto el parámetro kappa, estos resultados no coinciden con los de otros autores (5).

Se considera que el añadir ácido fórmico en el MALDI-TOF MS mejora la detección de bacterias Gram positivas (7) y es por esta razón por la que se añadió antes que la solución matriz. A pesar de que no se encontraron diferencias para *S. aureus*, *S. pseudintermedius* se lograron mejores scores al añadir este ácido, aunque la evidencia pone de manifiesto que no merece la pena utilizar este solvente en ningún caso.

MALDI-TOF MS identificó correctamente *Staphylococcus* spp. No obstante, una de las limitaciones más importantes del análisis proteómico es que pueden producirse fallos en la identificación de microorganismos genéticamente idénticos (7), y, desafortunadamente, en la identificación de los estafilococos a nivel de especie (9). En este estudio, ha habido algunos problemas de diferenciación entre *S. intermedius* y *S. pseudintermedius*, ambos pertenecientes al SIG.

Igualmente, la distinción entre miembros del SIG por pruebas fenotípicas es muy complicada (13): sólo distingue si pertenecen a ese grupo, lleva mucho tiempo y simplemente es un paso previo después del cual se necesitan técnicas de biología molecular para obtener una identificación apropiada. En consecuencia, el análisis molecular se convierte en el único método de identificación fiable por ahora, pero sería interesante incrementar las bases de datos MALDI-TOF MS para ampliar las bacterias detectables, especialmente las de origen animal.

Las enfermedades infecciosas son todavía responsables de altas tasas de mortalidad y morbilidad. La identificación bacteriana es importante para el tratamiento apropiado de pacientes infectados. Este estudio demuestra la validez, utilidad y fiabilidad de MALDI-TOF MS, comparadas con las de otros tests, en la identificación de aislamientos bacterianos pertenecientes a *Staphylococcus* spp. A pesar del hecho de que las técnicas genéticas son más fiables actualmente, necesitan un tiempo considerable para identificar apropiadamente. Los métodos convencionales llevan mucho tiempo, también.

El análisis proteómico reduciría estos intervalos de forma rápida y beneficiosa, aunque son necesarios trabajos adicionales para mejorar la detección de microorganismos de origen animal, dada su implicación en salud pública.

Agradecimientos

Agradecemos al Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, España) permitirnos utilizar su MALDI-TOF MS Bruker® (Biotyper 3) y también al Hospital Universitario Veterinario (Zaragoza, España) por suministrarnos las muestras estudiadas en este trabajo.

Declaramos, a su vez, que no hay ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. **Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR.** 2009. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol, **47**(2):469-71.
2. **Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O.** 2011. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. PLoS ONE 6(1):e16424. Doi:10.1371/journal.pone.0016424
3. **Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, Pyörälä S et al.** 2010. Review Article: Reflection paper on MRSA in Foodproducing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiol Infect, **138**: 626-644.
4. **Chuang CY, Yang YL, Sueh PR, Lee PI.** 2012. Catheter- related bacteremia caused by *S. pseudintermedius* refractory to antibiotic- lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. J Clin Microbiol, **48**(4): 1497- 1498.
5. **Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O.** 2011. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI- TOF MS. Syst Appl Microbiol, **34**: 45-51.
6. **Huerta B, Maldonado A, Ginel PJ, Tarradas C, Gómez- Gascón L, Astorga RJ, Luque I.** 2011. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of Staphylococci in canine pyoderma. Vet Microbiol, **150**: 302- 308
7. **Jordana-Lluch E, Martró Catalá E and Ausina Ruiz V.** 2012. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin Doi: 10.1016/j.eimc. 2012.01.012.
8. **Kadlec K, Van Duijkeren E, Wagenaar JA, Schwarz S.** 2011. Molecular basis of rifampicina resistance in methicillin- resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. J Antimicrob Chemother, **66**: 1236- 1242.
9. **Kooken J, Fox K, Fox A, Altomare D, Creek K, Wunchel D, Pajares- Merino S, Martínez-Ballesteros I, Garaizar J, Oyarzabal O, Samadpour M.** 2014, February. Identification of staphylococcal species based on variations in protein sequences (mass spectrometry) and DNA

- sequence (soda microarray). Moll Cell Probes, **28** (1): 41-50 doi: 10.1016/j.mcp.2013.10.003.
10. **Lautz S, Kanbar T, Alber J, Lämmler C, Weiss R, Prenger-Berninghoff E, Zschöck M.** 2006. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, **53**(9):434-8.
 11. **Pantosti, A.** 2012. Review article: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. Front Microbiol, **3**: 127.
 12. **Scott Weese J, Van Duijkeren E.** 2009. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol, **140**: 418- 429.
 13. **Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Ruzauskas M Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K; Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM).** 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemother, **66**: 2705-2714
 14. **Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Beikum A, Verbrugh HA, Nouwen J.** 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis, **5**:751-

REDVET: 2015, Vol. 16 N° 01

Este artículo Ref. def. 011502_REDNET (Ref. prov. NOV1406_REDNET) está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115/011502esp.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>