

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



65.

Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Marina Oviaño García

Autores

Marina Oviaño García
Belén Rodríguez Sánchez
Juan de Dios Caballero Pérez
Juan Luis Muñoz Bellido

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

65. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica.2019

Coordinador:

Marina Oviaño García¹

Autores:

Marina Oviaño García¹

Belén Rodríguez Sánchez²

Juan de Dios Caballero Pérez³

Juan Luis Muñoz Bellido⁴



¹Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario e Instituto Investigación Biomedica A Coruña (INIBIC), A Coruña;

²Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón e Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid;

³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid;

⁴Servicio de Microbiología. Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	5
2.	Fundamentos teóricos de la espectrometría de masas.....	5
	2.1. ¿Qué es la espectrometría de masas?.....	5
	2.2. Componentes de un espectrómetro de masas y mecanismos de ionización.....	5
	2.3. La espectrometría de masas MALDI-TOF.....	6
	2.4. Plataformas comerciales.....	7
	2.5. FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).....	8
3.	Principios básicos de calidad en la utilización del MALDI-TOF.....	9
	3.1. Integración del MALDI-TOF en el laboratorio de Microbiología Clínica.....	9
	3.2. Control del proceso: parámetros básicos.....	11
	3.3. Calibración y controles.....	11
	3.4. Interpretación de resultados.....	12
	3.5. Mantenimiento.....	15
4.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación bacteriana.....	15
	4.1. Introducción.....	15
	4.2. Identificación de bacterias Gram-negativas.....	16
	4.3. Identificación de bacterias Gram-positivas.....	18
	4.4. Identificación de bacterias anaerobias.....	19
	4.5. Factores que afectan a la calidad de la identificación.....	19
5.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación de micobacterias y <i>Actinomycetales</i>	20
	5.1. Identificación de micobacterias.....	20
	5.2. Análisis de picos para discriminar entre especies estrechamente relacionadas.....	21
	5.3. Identificación de <i>Actinomycetales</i>	21
6.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación de levaduras y hongos filamentosos.....	22
	6.1. Introducción.....	22
	6.2. Identificación de levaduras.....	22
	6.3. Identificación de hongos filamentosos.....	23
7.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación de parásitos.....	24
	7.1. Introducción.....	24
	7.2. Identificación de protozoos.....	24
	7.3. Identificación de helmintos.....	25
	7.4. Identificación de artrópodos.....	25
	7.5. Situación actual del MALDI-TOF en la parasitología clínica.....	26
8.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación de microorganismos en muestras clínicas.....	26
	8.1. Diagnóstico de bacteriemia y sepsis.....	27
	8.2. Diagnóstico de infecciones del tracto urinario.....	28
9.	Impacto clínico y económico del MALDI-TOF en el diagnóstico rápido e integración en los PROA y PRODIM.....	29
10.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la detección de la resistencia a antimicrobianos.....	30
	10.1. Detección de la resistencia a través de la medida actividad enzimática.....	30
	10.2. Detección de la resistencia a través de la medida de la actividad enzimática del análisis del perfil proteico bacteriano.....	32
	10.3. Detección de la resistencia a través de la medida de los efectos antibióticos sobre el crecimiento bacteriano.....	33

11.	Estudios de tipificación mediante MALDI-TOF.....	34
12.	Aplicaciones del MALDI-TOF en la detección de genes o marcadores de virulencia.....	36
13.	Retos futuros y limitaciones en la aplicación del MALDI-TOF en la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica.....	36
14.	Conclusiones.....	37
15.	Bibliografía.....	38

DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-MT-01. Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

PNT-MT-02. Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF.

PNT-MT-03. Espectrometría de masas MALDI-TOF: introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos.

PNT-MT-04. Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF.

1. INTRODUCCIÓN

En 2010 se publicó el número 37 de los Procedimientos en Microbiología Clínica titulado “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología”. En este procedimiento se incluía un apartado sobre métodos proteómicos de identificación bacteriana. Desde la irrupción de la espectrometría de masas MALDI-TOF en los laboratorios de Microbiología Clínica, se ha producido una revolución en el diagnóstico microbiológico. En el momento actual, la espectrometría de masas MALDI-TOF es una de las técnicas más utilizadas en la rutina de los laboratorios para la identificación de microorganismos, tanto de bacterias, como micobacterias, levaduras y hongos filamentosos. En el momento actual, además, los microbiólogos requerimos un mayor número de aplicaciones de esta tecnología, como su utilización directa en muestras clínicas, detección de resistencias o tipado, entre otros.

Debido a todas las innovaciones que se han producido en estos últimos años, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha considerado necesario revisar y estandarizar en este nuevo procedimiento las distintas aplicaciones del MALDI-TOF en el laboratorio de Microbiología Clínica. El presente documento se estructura en dos apartados: el primero constituye una puesta al día en conocimientos teóricos y una guía práctica de recomendaciones para los microbiólogos clínicos basada en la información publicada y el segundo se justifica por la necesidad de disponer de protocolos normalizados de trabajo (PNT) para estandarización y certificación de los laboratorios según las normas ISO, pudiendo posteriormente ser adaptado a las particularidades de cada laboratorio. Los protocolos de cada centro deben, por tanto, adaptarse a las características propias del mismo en relación a los recursos humanos y materiales disponibles, horario de funcionamiento del laboratorio, número de muestras, tipo de pacientes, etc.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.1 ¿QUÉ ES LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS?

La espectrometría de masas es una técnica de determinación estructural que permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Un espectro de masas es una relación de las especies iónicas presentes en una muestra, expresadas en función de su masa/carga (m/z) y la abundancia relativa (intensidad) de cada una en la muestra. La espectrometría de masas fue utilizada históricamente como una técnica analítica de la química clínica, pero no fue hasta hace tres décadas con la aparición de las técnicas de “ionización suave” cuando se consiguió analizar biomoléculas de gran tamaño utilizando un láser como fuente de ionización y una matriz orgánica para facilitar el proceso. De ahí el nombre MALDI-TOF, que obedece a las siglas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo. Esta diferencia respecto de otro tipo de espectrómetros es la que va a permitir que se produzcan muchas menos fragmentaciones en la muestra y que la interpretación del espectro generado sea más sencilla. Cuánto más grande es la molécula que se quiere analizar, más complejo es el proceso de análisis cuando esta se fragmenta en múltiples iones. Sin embargo, si la molécula permanece prácticamente intacta, se generará un espectro con un número mínimo de especies iónicas, que será mucho más sencillo de analizar. De ahí su gran éxito en la Microbiología Clínica. Los espectrómetros de masas tienen 3 componentes básicos: la fuente de ionización, el analizador y el detector.

2.2. COMPONENTES DE UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS MALDI-TOF Y MECANISMOS DE IONIZACIÓN

El primer paso para obtener un espectro de masas es depositar la muestra problema sobre uno de los pocillos de la tarjeta MALDI-TOF. Las tarjetas MALDI-TOF pueden ser de acero, reutilizables, y también de cerámica o plástico desechables. Una vez que la muestra está seca, se añade la matriz y se espera a que seque de nuevo. Otra opción recomendada por ciertos autores, es la co-cristalización de la muestra con la matriz, añadiendo la matriz después de la muestra sin esperar a que ésta se haya secado. Se recomienda dejar secar al aire sin que

la luz incida directamente sobre la muestra, para favorecer la homogénea cristalización de la matriz.

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 α -ciano-3,4-hidroxicinámico (HCCA).

El cristal formado por la muestra y la matriz en uno de los pocillos de la superficie de la tarjeta MALDI-TOF, se introduce en una cámara de alto vacío y a continuación es irradiado por un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm. 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 a 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 mínimas fragmentaciones. Durante el proceso de ionización, la matriz le transfiere habitualmente un protón a la muestra, 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 la práctica, la separación de los fragmentos en su masa/carga tiene lugar en función de la masa.

La siguiente fase después de la ionización es el paso de la muestra por el analizador. El analizador consiste en una región donde se establece un potente campo magnético (TOF) que atrae las partículas cargadas hacia el detector. La energía proporcionada por el láser es constante ($E = 1/2 mv^2$), de forma que las partículas más ligeras vuelan más rápido y llegan antes al detector y las más pesadas tardan más en llegar. El TOF se utiliza en un modo lineal. Tiene una alta sensibilidad y especificidad, pero presenta la desventaja de poseer una resolución más pobre debido al ensanchamiento que sufren los picos de masas. Esto sucede porque la muestra no se encuentra distribuida exactamente igual en todos los puntos de la superficie del pocillo donde incide el láser y, además, cuando este incide la distribución de la energía del pulso tampoco es exactamente igual en todos los puntos. Con ello se provoca que fragmentos con la misma m/z tengan ligeras variaciones en la energía. Esto se ha resultado parcialmente con la introducción de la extracción de los pulsos del láser (PIE). En el PIE hay un retraso en la aplicación del voltaje de la aceleración después del proceso de ionización y provoca una normalización de la energía cinética de los iones que poseen la misma m/z .

Al llegar finalmente los iones al detector, este último registra el tiempo que tarda un grupo de iones en atravesar el campo magnético, de forma que va a transformar la señal de la corriente de iones en una relación de masas (eje x) cuya intensidad será la abundancia relativa, expresada como altura en el eje y.

2.3.LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

La principal ventaja de esta técnica respecto a otro tipo de espectrometría de masas es, como se ha comentado anteriormente, el análisis de macromoléculas con una fragmentación mínima. Esta característica la convierte en una técnica muy versátil en el laboratorio de Microbiología.

La aplicación más utilizada y validada de la espectrometría de masas MALDI-TOF es la identificación de microorganismos. En este caso, el rango de masas de interés está entre los 2.000 Da y los 20.000 Da. La mayoría de los picos de masas que se obtienen en este rango representan proteínas ribosómicas. El conjunto de estos picos de masas constituye el espectro del microorganismo y éste se va a considerar una huella peptídica. Este concepto hace alusión a la singularidad del espectro generado para cada especie microbiana.

El perfil proteico generado se compara finalmente con los perfiles proteicos almacenados para cada microorganismo en la base de datos del equipo que se esté utilizando, de forma que se pueda emitir un informe de identificación en unos pocos segundos. Los algoritmos utilizados para comparar los espectros y asignar un resultado de identificación pueden variar en función del fabricante. El uso cada vez más extendido de bases de datos validadas, comerciales y cada vez más extensas en entradas de microorganismos permite la aplicación de esta tecnología en la rutina diaria de los laboratorios de Microbiología Clínica.

Las ventajas universales de la espectrometría de masas MALDI-TOF son el alto rendimiento, el bajo coste en reactivos, la aplicación en muestras sólidas y la facilidad de uso. En el caso de la identificación tiene especial relevancia la rapidez en la emisión de resultados, la posibilidad de partir de una porción minúscula de colonia y la identificación de microorganismos difíciles de identificar por métodos convencionales. La principal desventaja es el alto coste del equipo, la imposibilidad de identificar microorganismos muy relacionados entre sí, o microorganismos que no estén presentes en la base de datos. Con el tiempo, estas limitaciones seguramente serán menores, ya que el precio de las tecnologías suele descender con el tiempo y las bases de datos pueden ir ampliándose, tanto las comerciales y propias del equipo, como las mismas entradas que pueden ir incorporando los usuarios al equipo.

2.4. PLATAFORMAS COMERCIALES

En la actualidad los sistemas más extendidos son el VITEK MS (bioMérieux, Francia) y el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania). Cada sistema tiene su propia base de datos de microorganismos, que es propiedad del sistema y que construyen y mantienen las propias compañías. Como se ha comentado, estas bases de datos pueden también expandirse por parte del usuario e incorporar nuevas entradas que no estaban previamente representadas. Además del propósito de identificación, estas nuevas entradas pueden utilizarse para el tipado de aislados en las investigaciones epidemiológicas. Las comparativas entre los dos sistemas arrojan resultados muy similares, situándose ambos en porcentajes de identificación superiores al 85%.

El *software* del equipo VITEK MS (bioMérieux) permite dos opciones, trabajar con la versión CE-IVD con base de datos cerrada o trabajar con la versión RUO (*Research Use Only*) en la que se pueden introducir los microorganismos que se quiera en la base de datos y hacer uso de ellos para las identificaciones de rutina. Este modo es mucho más versátil, pero hay que tener en cuenta que, al ser una nueva entrada no certificada, es necesario validarla previamente en cada laboratorio donde se utilice.

El modo de identificación del VITEK MS (bioMérieux) usa un algoritmo basado en la aproximación de poblaciones. Para ello se genera un algoritmo que compara cada especie (una población microbiana) con el resto para generar un modelo específico. El espectro se divide en sectores y a cada uno se le da un peso para facilitar la interpretación computacional, de forma que se genera un modelo matemático de matrices.

El resultado de identificación va a ir asociado a un porcentaje de probabilidad entre 0% y 100%. En verde y con un porcentaje del 99,9 % aparecerán las identificaciones con una única posibilidad de correlación. En amarillo, aparecerán las identificaciones con bajo poder de discriminación y en el que hay más de una posible identificación significativa y un máximo de 4. En rojo, aparecerán los casos en los que no se haya conseguido identificar al microorganismo, debido a que no haya una opción significativa o que el número de posibles identificaciones sea mayor de 4.

En el caso del equipo fabricado por Bruker Daltonik, el nuevo MALDI Biotyper Compass *software* está organizado en módulos de trabajo. Cada uno de estos módulos permite una aplicación diferente. Existe un módulo para la identificación convencional, un módulo para identificación de micobacterias, un módulo para el tipado de microorganismos y otro para la detección de carbapenemasas y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Este hecho ofrece una gran ventaja respecto al sistema Vitek MS (BioMérieux) ya que en el mismo equipo permite, sin necesidad de cambiar de programa, exportar datos, etc, y se pueden realizar múltiples determinaciones. El *software* de este equipo también permite dos opciones, trabajar con

la versión CE-IVD con base de datos cerrada o trabajar con la versión RUO.

En el caso de la identificación, el *software* del MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) trabaja con comparación entre espectros. En general en el análisis del espectro, se tiene más en cuenta el perfil completo, que la presencia puntual de ciertas proteínas en el mismo. Se sigue un algoritmo estadístico multivariante en el que se valora la masa de los picos, la intensidad de los mismos y su frecuencia.

El *software* proporciona un resultado de identificación asociado a un *score* (puntuación). Este *score* es el grado de similitud entre el espectro de la muestra en estudio y los espectros correspondientes a ese microorganismo en la base de datos del equipo. Los criterios de interpretación del fabricante establecen los valores $\geq 2,3$ como alta probabilidad de identificación, entre 2 y 2,2 como probable identificación a nivel de especie, entre 1,7 y 1,9 como probable identificación a nivel de género y los valores $< 1,7$ se interpretan como poco fiables. Existe también un código de colores asociado: el verde corresponde a un valor con alta confianza, con un *score* > 2 ; el amarillo corresponde a un valor con bajo nivel de confianza, con un *score* entre 1,7 y 2 y el rojo corresponde a una identificación imposible o no fiable con un *score* $< 1,7$.

2.5. FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

En la década de 1950-1960, se demostró que los microorganismos crecidos bajo condiciones de cultivo definidas y bajo procedimientos estandarizados generaban espectros de infrarrojo reproducibles y singulares. Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de la espectrometría transformada de Fourier (FT) y a su vez el desarrollo de *softwares* y ordenadores potentes cuando fue posible registrar los espectros de microorganismos con la precisión requerida. Esta aplicación está comenzando a ganar peso como un complemento al MALDI-TOF MS, principalmente como herramienta de tipado de microorganismos.

El espectro de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) de un microorganismo es tan característico como el espectro que se obtiene mediante MALDI-TOF MS, es una huella peptídica del microorganismo. Sólo, del mismo modo, los espectros de los distintos microorganismos son muy similares a simple vista, por lo que se necesitan métodos muy avanzados de evaluación y clasificación. Para ello se utilizan técnicas de correlación como el análisis de *clusters* y algoritmos de comparación con bases de datos para poder realizar la identificación y tipado de los microorganismos.

La selectividad de la técnica de FTIR es tan alta que permite la diferenciación de microorganismos altamente relacionados entre sí. Por ello, que es una técnica excelente para el tipado de microorganismos, ya que pequeñas variaciones dentro de la misma especie se pueden utilizar para clasificar los aislados en distintos grupos.

La espectroscopía infrarroja aplicada a la microbiología se basa en que las moléculas presentes en las células pueden ser excitadas mediante la absorción de radiación infrarroja y emitir vibración que será registrada en el equipo. Aunque los microorganismos representan un complejo sistema formado por muy distintos tipos de moléculas, variando profundamente en su estructura, función y composición, pequeñas diferencias en estas composiciones se pueden detectar mediante FTIR.

Muchas de las bandas que se observan en un espectro de FTIR se pueden asignar a ciertos modos vibracionales. Por ejemplo, el rango entre 2.800 y 3.000 cm^{-1} está dominado por la absorción de ácidos grasos de membrana, el rango entre 1.500 y 1.800 cm^{-1} por las proteínas y el rango entre 900 y 1.200 cm^{-1} se asocia con las bandas de los polisacáridos. Para el tipado de microorganismos la parte más interesante está entre 800 y 1300 cm^{-1} .

Es importante, al igual que en el caso de utilizar el MALDI-TOF con el propósito de tipado, que las condiciones de crecimiento y cultivo del microorganismo sean reproducibles, para evitar variaciones en el espectro debido a la introducción de nuevas variables ajenas al propio microorganismo. El hecho de que la tecnología FTIR represente la composición química del microorganismo en sí, hace que cualquier pequeño

cambio en el procesamiento, cómo el cambio del medio de cultivo, ambiente, etc, pueda producir cambios en el espectro. Por otro lado, posee muchas de las ventajas, como son la facilidad de preparación de la muestra, un tiempo corto de respuesta (minutos), una evaluación fácil y objetiva (los espectros se comparan con la base de datos), diferenciación a nivel de especie y de tipado clonal y bajo coste de reactivos y consumibles.

Como ya se ha comentado, la metodología debe basarse en condiciones muy estandarizadas de crecimiento, preparación de la muestra y medida del espectro generado. Los aislados deben sembrarse en las mismas condiciones de temperatura, medio de crecimiento, y tiempo de incubación. Lo más recomendable es de 16-24 h en agar sangre a 35-37°C. La siembra debe hacerse en 4 cuadrantes en reaislamiento, de forma que una vez que esté crecido el cultivo al día siguiente, se seleccionan aquellas colonias crecidas en el tercer cuadrante y se transfieren a un tubo eppendorf con agua. A continuación, tras vortear para asegurar que la suspensión es homogénea, se transfiere una pequeña cantidad a la microplaca, de forma que se seque dejando una película homogénea de bacteria que pueda ser analizada.

El FTIR está formado por dos compartimentos, el espectrómetro y el compartimento para la microplaca. El compartimento del espectrómetro incorpora una fuente altamente eficiente, de baja potencia y refrigerada por aire, que está totalmente sellado. El espectrómetro está equipado por un láser de frecuencia estabilizada de HeNe. Este láser emite luz roja, en la longitud de onda de 633 nm. El otro compartimento, incorpora una placa microtiter, que se va moviendo en el eje x/y de forma que se vaya leyendo cada posición correspondiente a una muestra sucesivamente, dirigiéndolas al haz del infrarrojo.

Por el momento la información es limitada y los estudios escasos, pero todo apunta a que puede ser una aplicación muy prometedora en el futuro en el tipado de bacterias y levaduras. Las comparaciones de esta metodología se han realizado fundamentalmente con técnicas moleculares de referencia para el tipado de microorganismos como la *Repetitive Element Palindromic-PCR* (rep-PCR), *Multi Locus Sequence Typing*(MLST) y *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) y los resultados están por encima del 90% de concordancia en relación a la técnica de referencia. El FTIR se ha aplicado con éxito para el tipado de enterobacteriales, bacilos Gram-negativos no fermentadores (BGNNF) y *Staphylococcus aureus*. Los estudios que comparan FTIR con MALDI-TOF MS en el tipado ponen de manifiesto la superioridad del FTIR para el tipado de microorganismos, y en comparación con las técnicas moleculares presenta muy buenos resultados a bajo coste y con una metodología sencilla y fácilmente implantable en los laboratorios clínicos de rutina.

3. PRINCIPIOS BÁSICOS DE CALIDAD EN LA UTILIZACIÓN DEL MALDI-TOF

3.1. INTEGRACIÓN DEL MALDI-TOF EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

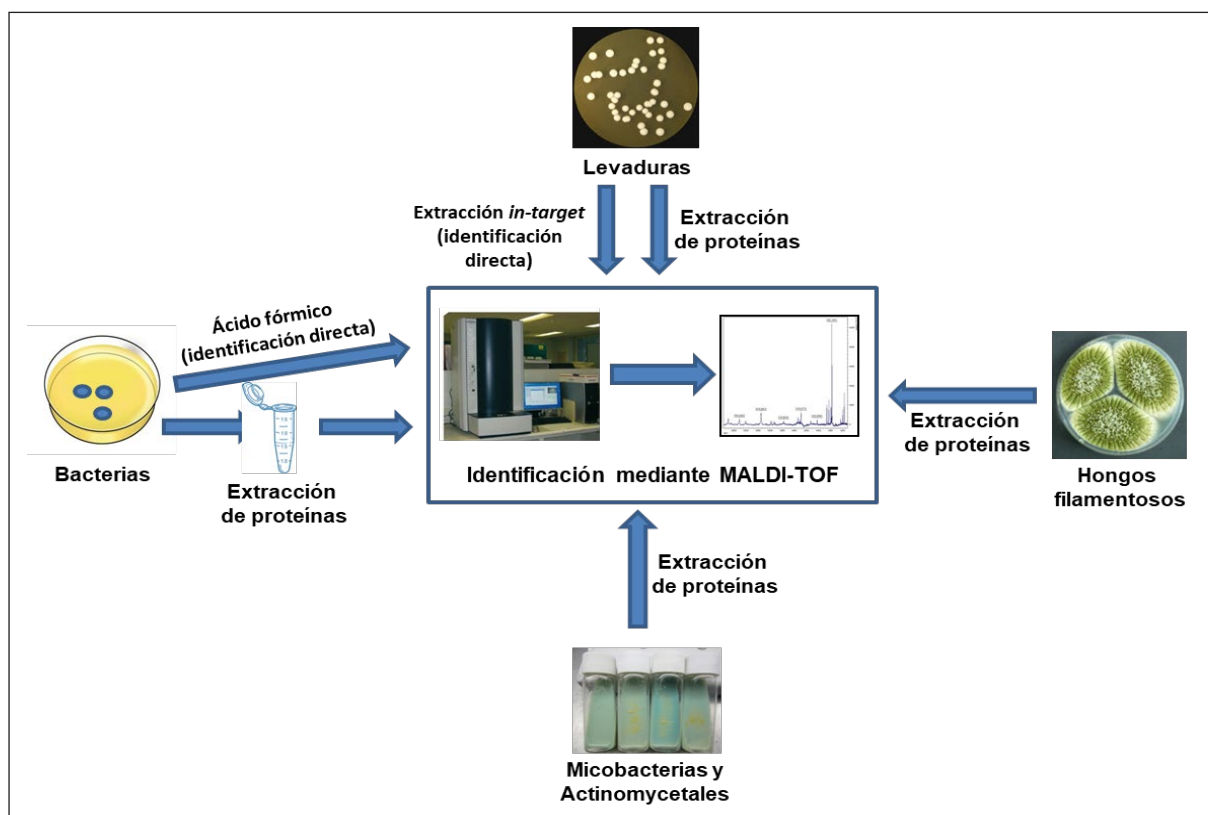
Antes de adquirir un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF hay que asegurarse de que las condiciones en el laboratorio son las óptimas para su instalación. Fundamentalmente hay que tener en cuenta el espacio, la temperatura, los requerimientos eléctricos, la conectividad y la conexión a internet.

La localización del equipo en el laboratorio es fundamental, puesto que son muy utilizados en el día a día. El equipo VITEK MS (bioMérieux), es un equipo de pie, que tiene una altura de dos metros. El equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) es un equipo de mesa, más pequeño, aunque debido a su peso, es habitual tener que reforzar los apoyos. Además, hay que alejar a los sistemas de cualquier tipo de vibración que pueda perturbar su estabilidad. Es importante también el control de la temperatura para evitar un sobrecalentamiento del equipo. También es fundamental tener los requerimientos eléctricos necesarios para su adecuado funcionamiento. Para cumplir estos requisitos es importante conocer las especificaciones técnicas que podrán variar para cada instrumento. Es muy útil también que el equipo esté conectado a la red, de esta forma se pueden obtener tanto informaciones adicionales que facilite el fabricante, como realizar actualizaciones y revisiones del equipo.

Además, se puede conectar el instrumento con el LIS, de modo que sea posible operar con la interfaz del laboratorio.

Una vez comprobado que se cumplen todas las necesidades para la adecuada implementación del equipo en el laboratorio, se debe valorar cómo realizar el flujo de trabajo desde las distintas secciones hacia el MALDI-TOF (Figura 1). Existen dos modelos de integración, el modelo centralizado y el descentralizado. La elección de uno u otro dependerá de las prácticas preexistentes en el laboratorio, del tamaño del laboratorio y de su complejidad, de las necesidades que se quieran cubrir con el equipo, de los métodos de sensibilidad antimicrobiana que se utilicen, del tiempo de respuesta que se pretenda conseguir y de la cualificación de los operadores.

Figura 1. Flujo de trabajo en un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF con diferentes tipos de microorganismos



En el método centralizado es un único operador, habitualmente un técnico de laboratorio, el que realizará la mayor parte del proceso, desde la transferencia del microorganismo a la tarjeta, al pipeteo de los reactivos, a la preparación de la lectura, adquisición del espectro, validación del resultado y realización de controles de calidad. Las ventajas de esta forma de trabajar es que al limitar el número de personas que manejan el equipo, se reduce la variabilidad en el proceso, se minimizan los errores y se garantiza una mayor reproducibilidad y trazabilidad de los resultados. Además, se favorece la competencia del usuario, ya que el grado de entrenamiento es mayor. La limitación principal del método centralizado es el retraso en la emisión de los resultados, ya que los aislados son habitualmente analizados en grandes bloques y pueden generarse cuellos de botella. Otra limitación son los potenciales errores que se pueden producir por confusión en el manejo de los cultivos y los aislados. En el caso de que se trabaje con un modelo centralizado es fundamental una buena comunicación entre las distintas secciones de trabajo y el MALDI-TOF y procurar clarificar al máximo las determinaciones que se esperan, por ejemplo, señalando en el caso de la identificación, la colonia en el medio de cultivo.

En el modelo descentralizado, cada técnico de su respectiva sección es responsable de todo el proceso.

Este modelo tiene su mayor limitación en la cantidad de personal formado y entrenado que se necesita para asegurar un mínimo de competencia en el proceso. La ventaja principal es el dinamismo del proceso con una obtención de resultados en general más rápida que en el modelo centralizado.

3.2. CONTROL DEL PROCESO: PARÁMETROS BÁSICOS

Es necesario tener en cuenta que el MALDI-TOF es un equipo muy complejo y su puesta a punto y mantenimiento se debe realizar por un técnico especializado perteneciente a la casa comercial. No se debe forzar la apertura del equipo ni manipular los parámetros de funcionamiento del equipo sin una asesoría técnica adecuada.

En todo caso, para que los resultados del proceso sean satisfactorios hay que tener en cuenta una serie de factores, que es necesario chequear antes de comenzar a operar. En primer lugar, no se puede empezar a trabajar si se observa alguna señal de alarma, si esto ocurre es obligatorio contactar con el servicio de mantenimiento del equipo.

En el caso de que se esté trabajando con la versión del *software* en modo IVD, es decir aquella certificada, no se pueden comprobar o modificar en ningún caso los parámetros del equipo, ya que sólo son visibles y potencialmente modificables por los técnicos del fabricante. Además, en el caso del MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik), ni siquiera es posible ver el espectro que se está generando ni se puede tener acceso a la cámara de visualización del pocillo de trabajo. Esto es claramente un inconveniente a la hora de interpretar potenciales fallos del equipo y a la hora de interpretar los resultados obtenidos como se detallará en los apartados posteriores.

En el caso de que se esté trabajado con la versión del software en RUO, si no hay señales de alarma hay que comprobar que el voltaje y el vacío son los adecuados antes de comenzar a operar con el equipo. Una vez que se ha asegurado que el equipo está en condiciones de operar, pero se comprueba que los espectros resultantes no tienen una buena resolución, es decir, los picos son poco intensos y definidos y no se pueden diferenciar con claridad del ruido de fondo, es necesario reflexionar sobre qué puede estar influyendo. Uno de los parámetros más importantes en un espectro es la resolución de los picos de masas. La definición espectrofotométrica de resolución es la capacidad para separar entre sí dos fragmentos con masas muy próximas, $R=m/\Delta m$, siendo m la masa del fragmento y Δm la anchura del pico a la mitad de la altura máxima. Para mejorar la resolución hay que comprobar con el técnico los parámetros que pueden influir, como la intensidad del láser, el detector, u otros.

Otro de los factores que influye determinadamente en la resolución de los espectros es que la preparación de los pocillos de la tarjeta que se está leyendo sea totalmente homogénea. Cuanto más heterogéneos estén los pocillos, más dispersión espacial habrá y más anchos aparecerán los picos en el espectro. Por esta razón, nunca se debe dejar secar las muestras o la matriz debajo de luz directa, ni tampoco utilizar métodos de secado rápidos que puedan llevar a que haya zonas del pocillo que sequen antes que otras.

3.3. CALIBRACIÓN Y CONTROLES

Si se está trabajando con el *software* en modo IVD, tanto en los equipos VITEK MS (bioMérieux) como MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik), es necesario tener un control aprobado en cada *run* (o tanda) que se introduzca para continuar con la lectura de las muestras a estudio. Estos controles los proporciona la casa comercial y se tratarán igual que la muestra.

En los equipos VITEK MS (bioMérieux), cada tarjeta consta de 3 grupos de validación de 16 pocillos, cada uno con su pocillo de control. El equipo comienza la lectura del pocillo de control. Si el control no cumple los criterios, el grupo de validación no se adquiere y el instrumento prosigue con el siguiente grupo de validación. Si el control cumple con los criterios, se continúa con la lectura de las muestras. Una vez que se han analizado todas las muestras, se vuelve al pocillo de control y se repite la lectura. Si la comprobación interna falla, se

envía un mensaje de error. En el caso de la calibración, los fabricantes recomiendan que la calibración se haga manualmente por el técnico del equipo con una periodicidad mensual, de forma que se corrijan las posibles derivas que se vayan produciendo con el uso en el equipo. La calibración se realiza con unos 12 pocillos para chequear la variabilidad.

En el caso del MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik) la tarjeta está formada por 96 pocillos, dónde el operario puede situar el pocillo para la calibración y control en cualquier punto. Sobre este pocillo se realizarán 8 calibraciones consecutivas que tendrán una duración aproximada de 1 minuto. Una vez que se ha calibrado el equipo, se procede a la lectura del resto de muestras. El pocillo de calibración también sirve como control, ya que dará un resultado de identificación al igual que para el resto de muestras del *run*.

Si se trabaja en modo RUO, es recomendable que para asegurar la calidad de los resultados que se obtienen en el MALDI-TOF en cada proyecto que se vaya a ejecutar, uno de los pocillos se utilice para la calibración. Esta calibración se podrá hacer de forma automática antes de comenzar la lectura de las muestras, de forma que la aprobación por parte del sistema dará lugar de inmediato a la lectura del resto de pocillos. La calibración es fundamental para comprobar que el equipo está funcionando correctamente. Una desviación de ± 5 Da en los picos de masas puede dar lugar a una identificación no válida o una identificación errónea. En cualquier caso, es obligado que la calibración se haga al menos diariamente. En el caso de que se trabaje con la identificación de muestras, es recomendable también que se realice un control en cada *run* que se vaya a ejecutar, del mismo modo que se haría en el modo IVD, de este modo se asegura la calidad de los resultados obtenidos. En este caso se puede utilizar como control una cepa ATCC. En cualquier caso, es obligado utilizar un control al menos diariamente.

Además de la calibración, que deberá realizarse en cada proyecto, hay que tener en cuenta que hay que validar el estado de nuestro equipo con un control de calidad. Este control será una sustancia conocida que deberá tener una masa dentro del rango en el que se está trabajando. El control lo proporcionará el fabricante del equipo, quien recomendará la periodicidad con la que hay que utilizarlo para comprobar que los métodos y el análisis aplicado por el *software* del equipo es el correcto.

Los controles de calidad negativos, aunque menos utilizados en la rutina, son muy útiles en el caso de sospecha de contaminaciones. El control negativo consiste en utilizar sólo los reactivos que se añadirían al pocillo sin la muestra, es decir la matriz con y sin ácido fórmico. Con el control negativo es posible detectar los falsos positivos debidos a contaminaciones presentes en los reactivos o en las tarjetas si éstas son reutilizables y no se han limpiado adecuadamente.

3.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después de que un microorganismo haya sido identificado mediante MALDI-TOF, se pueden encontrar 3 situaciones: una única identificación con un nivel de confianza elevado, varios resultados de identificación con niveles de confianza próximos, o ningún resultado. El fabricante será el encargado de establecer categorías de fiabilidad cuando se emite un resultado que corresponda a un nivel de identificación adecuado a nivel de especie, a nivel de género o un resultado no fiable en absoluto.

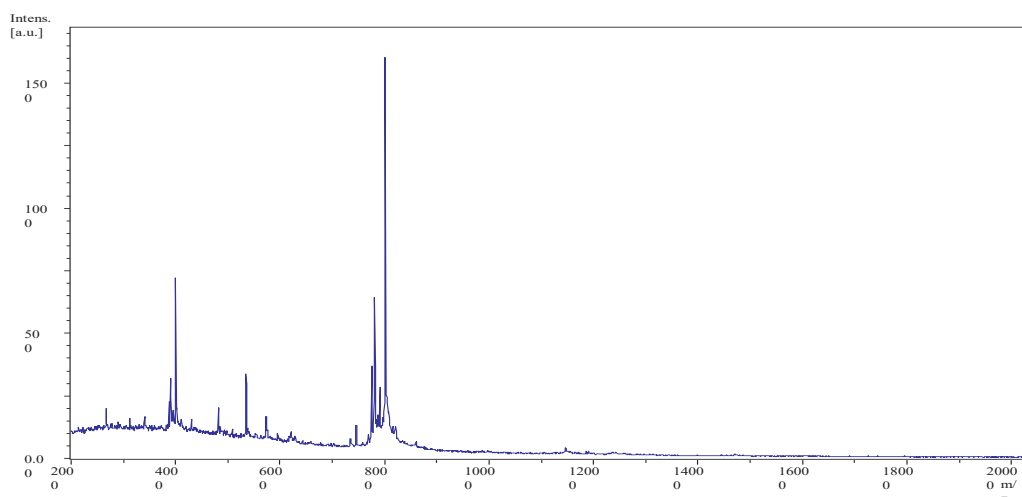
El usuario debe estar familiarizado con los valores que establezca el fabricante en relación a los niveles de confianza y debe reconocer y ser crítico con los resultados que se emitan. En caso necesario se revisará el espectro adquirido y se comprobará si éste es de suficiente calidad. En función de la calidad del espectro nos podemos encontrar ante dos situaciones en las que es necesario intentar distinguir la fuente del problema:

a) Espectro de mala calidad o ningún espectro: no se consigue obtener un resultado de identificación (Figura 2)

- No se ha añadido la matriz antes de la lectura
- Se ha utilizado demasiada o muy poca biomasa
- La matriz o la muestra no están cubriendo el pocillo por completo
- La matriz tiene una cristalización irregular sobre la muestra
- El aislado es demasiado mucoso

- La muestra está contaminada con agar
- El cultivo es mixto
- Los reactivos se han evaporado, preparado incorrectamente o caducado
- El cultivo es demasiado joven o viejo
- La tarjeta de lectura está deteriorada
- La intensidad del láser es inadecuada
- El detector está deteriorado

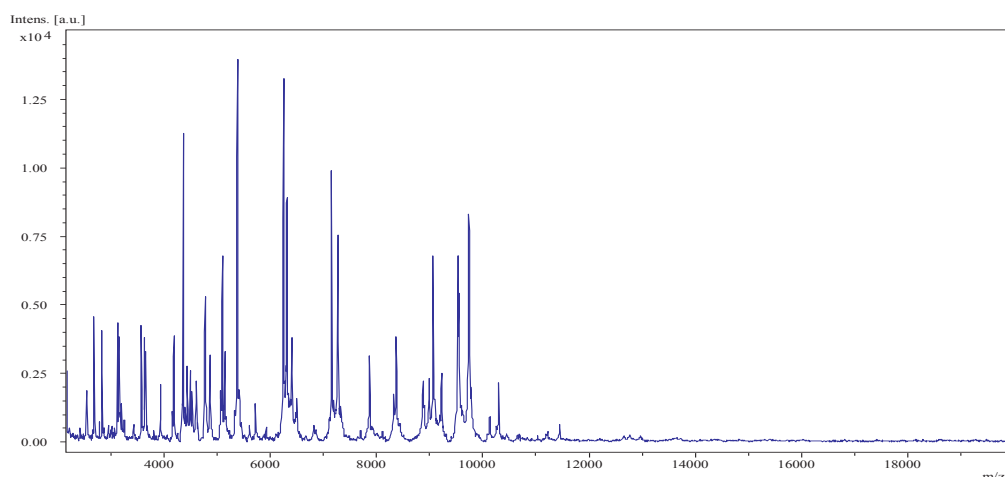
Figura 2. Ejemplo de un espectro de mala calidad.



b) Espectro de buena calidad: el resultado de la identificación no es el esperado o no se consigue obtener un resultado de identificación (Figura 3)

- La muestra se colocó en otro pocillo
- Hay contaminación de la muestra (restos de otra muestra en la tarjeta, contaminación con la matriz, etc)
- El cultivo es mixto
- El microorganismo no está presente en la base de datos

Figura 3. Ejemplo de un espectro de buena calidad.



En el caso de que nos encontremos en la primera situación, lo primero que se debe hacer es observar visualmente la tarjeta, ya que la falta de matriz es fácilmente verificable. También se puede comprobar si la muestra está mal extendida en el pocillo. El visor de la cámara nos puede ayudar, mientras se está adquiriendo el espectro, a comprobar si la muestra está homogéneamente distribuida y si la cristalización de la matriz es buena. Se puede intentar solucionar estos problemas repitiendo en primer lugar la adquisición de

la muestra en el pocillo. Si se sigue sin obtener un resultado satisfactorio, hay que repetir el proceso desde el principio, extendiendo un nuevo pocillo de muestra con la matriz correspondiente.

En el caso de que no obtengamos un resultado de identificación a pesar de obtener un espectro de buena calidad, el margen de mejora es mínimo, puesto que lo más probable es que el microorganismo que estamos analizando no se encuentre en la base de datos de nuestro sistema.

En el caso de muestras con procesamientos problemáticos o especialmente relevantes (bacterias hipermucoasas, micobacterias, hongos filamentosos, hemocultivos directos, etc) se recomienda extender directamente por duplicado cada muestra para asegurarnos de minimizar el margen de error.

En el caso de que no se alcance una identificación fiable, cada laboratorio debe tener un protocolo de verificación en el que se detallará cómo se resolverán las discrepancias producidas. El protocolo más habitual a seguir una vez que se ha producido una identificación fallida es repetir la lectura en el pocillo. Si la identificación continúa siendo fallida, hay que repetir por duplicado tanto la extensión de la muestra como la adquisición del espectro por el mismo sistema. Si se sigue sin obtener una identificación fiable, es necesario realizar una extracción proteica completa y analizar por duplicado la muestra. Si la identificación continúa siendo fallida hay que resolver la identificación utilizando otra metodología de referencia.

En ocasiones el MALDI-TOF proporciona identificaciones a nivel de género o especie con unos valores de fiabilidad altos y que sin embargo no son lo precisos que deberían. Esto ocurre debido a que hay microorganismos muy relacionados entre sí cuyos espectros de masas son iguales o casi iguales y el *software* del equipo no permite diferenciarlos. En este caso hay que tener en cuenta que se debe informar sólo a nivel de género o de grupo. En el futuro estas limitaciones podrían ir desapareciendo con las mejoras de las bases de datos. Los distintos equipos comerciales podrían tener limitaciones diferentes, por eso es importante conocer la base de datos de nuestro equipo y consultar las limitaciones y advertencias propuestas por el fabricante. En el caso de que nos encontremos ante una de estas situaciones, es labor del microbiólogo establecer si es o no necesario llegar a la identificación a nivel de especie y qué metodología utilizar para ello (pruebas bioquímicas, confirmación molecular).

En la [tabla 1](#) se recogen algunos de los ejemplos más comunes, que se detallarán en el próximo apartado de identificación bacteriana.

Microorganismo o grupo	Limitación
<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella</i> spp.	MALDI-TOF no puede distinguir entre estos dos microorganismos
Grupo <i>Bacillus cereus</i>	MALDI-TOF no puede distinguir entre los microorganismos pertenecientes al grupo; <i>B. cereus</i> podría identificarse como <i>B. anthracis</i> y viceversa
<i>Streptococcus pneumoniae</i> vs <i>S. grupo mitis</i>	Algunos MALDI-TOF no pueden distinguir entre <i>S. pneumoniae</i> y <i>Streptococcus</i> grupo <i>mitis</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	Algunos MALDI-TOF no pueden distinguir entre especies pertenecientes al complejo
<i>Burkholderia mallei</i> y <i>B. pseudomallei</i>	MALDI-TOF sólo es capaz de identificarlas a nivel de género
<i>Achromobacter</i> spp.	Algunos MALDI-TOF no pueden llegar a identificación a nivel de especie
Complejo <i>Citrobacter freundii</i>	Es un complejo muy grande de especies muy relacionadas. MALDI-TOF no puede distinguir entre especies del complejo
Complejo <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Es un complejo muy grande de especies muy relacionadas. MALDI-TOF no puede distinguir entre especies del complejo
<i>Neisseria meningitidis</i>	Algunos MALDI-TOF pueden identificar <i>N. polysaccharea</i> u otras especies de <i>Neisseria</i> como <i>N. meningitidis</i>
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i>	Es un complejo muy grande de especies muy relacionadas. MALDI-TOF no puede distinguir entre especies del complejo
<i>Salmonella</i> spp.	MALDI-TOF no es válido para el serotipado. MALDI-TOF puede sobreidentificar <i>S. typhi</i>

3.5. MANTENIMIENTO

Lo primero que es necesario reseñar en relación al mantenimiento de este equipo es que éste es mínimo, lo cual es una de sus grandes ventajas. Es un equipo muy robusto y que necesita una mínima intervención sobre él. El usuario sólo tiene acceso a la zona del equipo en la que se introduce la tarjeta, el resto del equipo está sellado y sólo deberá abrirlo un técnico especializado para su revisión y mantenimiento.

Una de las necesidades más importantes del MALDI-TOF es que éste debe permanecer siempre encendido. Si se apaga se perderá el vacío, que como ya se ha comentado con anterioridad es una condición fundamental para su funcionamiento. Cuanto más tiempo permanezca el equipo sin vacío, más tiempo necesitará para recuperarlo.

Cuando se abra y se cierre la entrada de la tarjeta hay que asegurarse de que las juntas de cierre están perfectamente limpias. Si no lo están, se limpiarán con una gasa o torunda empapada en alcohol al 70%. Además, diariamente hay que pasar un dedo por la superficie de la junta para engrasarla y que el sellado sea eficaz. Es importante que esta maniobra se realice con la mano sin guantes.

En el caso del VITEK MS (bioMérieux), se pueden introducir hasta cuatro tarjetas para la lectura consecutiva en el equipo, esto tiene la ventaja de poder leer un mayor número de muestras, pero tiene la desventaja de que la cámara es más grande y por lo tanto conseguir el vacío lleva más tiempo. Si además el equipo está ubicado en un lugar húmedo, el proceso tarda aún más. Es por ello que el equipo lleva una botella de desecante para eliminar la humedad del aire que pueda entrar en la cámara y minimizar el impacto que causa en el tiempo de respuesta. Si el instrumento se utiliza mucho y se trabaja en zonas de mucha humedad, se puede sustituir de forma periódica el desecante que es un gel de sílice. En general dependiendo del buen mantenimiento del equipo, puede tardar en hacer el vacío de 5 a 10 min. El MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik), sólo permite la utilización de una tarjeta, pero el tiempo que tarda en hacer el vacío y comenzar la adquisición es de 2 a 4 min. Además, de un pocillo de muestra a otro, el tiempo de lectura no suele ser más de 10 segundos.

Si se trabaja en modo RUO, una vez que la tarjeta está dentro del equipo, hay que vigilar que todos los parámetros estén dentro de los rangos de trabajo y que no hay ningún aviso de alarma. Es importante también llevar un control de la limpieza de la fuente de ionización. En los equipos antiguos, la limpieza de la fuente se realiza de forma exclusivamente manual por parte del técnico del equipo cuando llega a un porcentaje de suciedad en torno al 80-90%. En ningún caso debería sobrepasar el 100%. En la actualidad, algunos equipos permiten la limpieza de forma automática con un botón de accionado por parte del usuario. Esta limpieza que dura en torno a 15 minutos es recomendable realizarla semanalmente. Durante este tiempo no se puede utilizar el equipo. Aunque esta limpieza ayuda a tener la fuente en mejor estado de forma continuada, no es tan eficaz como puede ser la limpieza manual, por tanto, se recomienda que igualmente se sigan realizando al menos dos limpiezas manuales al año, de forma paralela a la revisión general del equipo por parte del técnico. Dependiendo de la casa comercial, las limpiezas de la fuente se reducen y se prefiere cambiarla anualmente.

Las actualizaciones en las bases de datos se realizarán con la periodicidad que recomiende el fabricante. Es fundamental también por parte del laboratorio de Microbiología, llevar un registro de los mantenimientos, reparaciones y actualizaciones que se efectúen sobre el equipo, manteniendo la documentación relativa a los mismos para garantizar la máxima calidad de los resultados emitidos.

4. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

4.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de los microorganismos presentes en las muestras clínicas junto al estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos son los dos objetivos principales para un laboratorio de Microbiología Clínica. La consecución de ambos resulta vital para la elección del tratamiento antibiótico más adecuado, siendo la rapidez en la obtención de resultados un factor que mejora significativamente el pronóstico de la enfermedad.

La identificación rápida de algunos microorganismos también reviste importancia desde un punto de vista epidemiológico para el control de la infección nosocomial. Esta rapidez no se consigue mediante el enfoque microbiológico tradicional, basado en la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales, en reacciones bioquímicas y/o antigénicas y en la realización de un antibiograma en medio sólido o líquido. La obtención de resultados mediante este proceso puede demorarse de 36 a 72 horas tras la obtención de la muestra, e incluso más tiempo en microorganismos de crecimiento fastidioso. Otros inconvenientes del enfoque tradicional son un elevado coste económico en personal, medios de cultivo y reactivos, así como una escasa fiabilidad de la fenotipia para la identificación de ciertos grupos de microorganismos. La introducción reciente de técnicas moleculares permite identificar de manera precisa los microorganismos y detectar de forma precoz diversos mecanismos de resistencia. Sin embargo, la aproximación molecular continúa siendo un proceso lento, que requiere en la mayoría de los casos personal e instalaciones especializadas y que se asocia a un elevado coste económico, por lo que no está disponible para muchos laboratorios de Microbiología.

La introducción del MALDI-TOF ha supuesto una revolución en el campo de la Bacteriología Clínica. Esta tecnología permite identificar en cuestión de minutos colonias bacterianas aisladas en medios de cultivo sólidos, adelantando al menos 24-48 horas la identificación definitiva de los microorganismos. Es posible también identificar bacterias creciendo en medios líquidos como los frascos positivos de hemocultivo (ver apartado 8 de este procedimiento). El MALDI-TOF ha demostrado además una fiabilidad en la identificación bacteriana equiparable a la de las técnicas moleculares y superior a la de las técnicas fenotípicas, siendo su coste inferior al de ambas aproximaciones y permitiendo el análisis simultáneo de un elevado número de cepas (*high-throughput*). La identificación de bacterias mediante MALDI-TOF es un proceso sencillo que no requiere de personal e instalaciones especializadas.

Estas ventajas han convertido al MALDI-TOF en una herramienta indispensable para la rutina diaria de los laboratorios de Microbiología Clínica. Pese a la inversión inicial que puede suponer la adquisición del aparato, el MALDI-TOF ha demostrado mejorar el flujo de trabajo del laboratorio clínico y ser una opción coste-eficaz con respecto al enfoque microbiológico tradicional. La fiabilidad del MALDI-TOF no es la misma sin embargo para la identificación de los distintos grupos de bacterias. En este capítulo exploraremos la utilidad de esta tecnología para la identificación de los principales grupos bacterianos y sus limitaciones, así como posibles estrategias que pueden llevarse a cabo para superarlas.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Enterobacterias

El orden *Enterobacterales* incluye bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos y oxidasa negativos que pueden causar una gran variedad de infecciones tanto en el ámbito comunitario como en el nosocomial. Estos microorganismos se encuentran entre los más frecuentemente aislados en los laboratorios de Microbiología Clínica y su identificación mediante métodos fenotípicos constituye una importante carga de trabajo, siendo además una aproximación lenta (24-72 horas) y, a menudo, poco fiable. La identificación a nivel de especie por MALDI-TOF es un proceso más rápido (minutos) y coste-eficaz, que ha demostrado su fiabilidad en un elevado número de estudios para prácticamente la totalidad de especies con importancia clínica de este grupo. No obstante, el MALDI-TOF presenta algunas limitaciones a la hora de discriminar entre algunas especies filogenéticamente próximas o entre los distintos biovars de ciertas especies debido a la similitud existente entre sus espectros de masas. El caso más notorio es el de *Shigella* spp. que se identifica erróneamente como *Escherichia coli* y que requiere de la realización de pruebas bioquímicas (fermentación de la lactosa, prueba del indol) o serológicas adicionales para su identificación. Otros grupos cuya similitud dificulta la identificación precisa por MALDI-TOF son el complejo *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*), el complejo *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*) o los distintos biovars de *Salmonella enterica*. El MALDI-TOF también puede identificar erróneamente las especies del género *Raoultella* por *Klebsiella oxytoca* por la similitud existente entre ambas bacterias.

Cabe destacar que, salvo en el caso de *E. coli/Shigella* spp., no hay suficientes datos que avalen la importancia clínica de la diferenciación a nivel de especie en muchos de los grupos de enterobacterias mencionados. Es posible, además, que estas limitaciones puedan superarse en el futuro mediante el enriquecimiento progresivo de las bases de datos comerciales o el uso de algoritmos de identificación más refinados basados en la presencia de picos especie-específicos. En la actualidad, sin embargo, siempre que se requiera una identificación precisa a nivel de especie en estos grupos conflictivos convendría utilizar técnicas fenotípicas complementarias y recurrir a la biología molecular.

Bacilos Gram-negativos no fermentadores (BGNNF)

Los BGNNF causan infecciones graves en el contexto nosocomial y en pacientes inmunodeprimidos, siendo además colonizadores habituales del tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística (FQ). De manera general, la identificación por MALDI-TOF de los BGNNF presenta una fiabilidad comparable a la de los métodos genotípicos y superior a la de los métodos fenotípicos, siendo una excelente herramienta de identificación para las principales especies implicadas en infecciones, como *Pseudomonas aeruginosa*, el complejo *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) o *Stenotrophomonas maltophilia*. Sin embargo, el MALDI-TOF puede no resultar fiable para la identificación de algunos BGNNF a nivel de especie, bien por estar ausentes en las bases de datos comerciales o por pertenecer a grupos de especies estrechamente relacionadas entre sí. En el primer caso, la creación de una base de datos *in house* tras la correcta identificación del microorganismo por biología molecular puede subsanar este déficit y mejorar la identificación de futuros aislados clínicos. En el segundo caso, algunos algoritmos que identifican picos específicos para cada especie podrían ayudar a una correcta identificación. Algunos microorganismos en los que la identificación por MALDI-TOF podría no resultar fiable a nivel de especie son *Achromobacter* spp. y las especies del complejo *Burkholderia cepacia* (BCC).

En cuanto al género *Achromobacter*, especies poco frecuentes como *A. insuavis*, *A. denitrificans* o *A. ruhlandii*, pueden identificarse erróneamente como *A. xylosoxidans* debido principalmente a la escasez de espectros de referencia en las bases comerciales. El impacto clínico de estas especies infrecuentes está por dilucidar, pero sería necesario recurrir a métodos moleculares para obtener una identificación fiable, tales como la secuenciación del gen *nrdA* o el *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). Por último, las especies del BCC son patógenos nosocomiales frecuentes, siendo además uno de los microorganismos que más impacto clínico y epidemiológico revisten para los pacientes con fibrosis quística. En este contexto, la identificación a nivel de especie presenta una gran importancia, dado el impacto diferencial que tienen las distintas especies y siendo mayor el producido por *B. cenocepacia*. Pese a que el MALDI-TOF es capaz de situar los aislados clínicos dentro del BCC no resulta fiable como método definitivo para la identificación a nivel de especie, sobre todo en el caso de *B. cepacia*, *B. contaminans* o especies poco prevalentes. Cabe destacar que *B. contaminans* es la especie del BCC más prevalente en España y se encuentra ausente en las bases de datos comerciales, identificándose erróneamente como *B. cepacia* o *B. cenocepacia*. Por ello, resulta recomendable identificar las especies de este complejo mediante métodos moleculares, como la secuenciación de genes *housekeeping* (*recA*, *gyrB*) o el MLST.

Aeromonas spp.

En el caso del género *Aeromonas*, el MALDI-TOF identifica correctamente a nivel de género a prácticamente el 100% de las cepas. Sin embargo, pese a que varios estudios informan de tasas de identificación superiores al 90% para las principales especies aisladas en laboratorios clínicos, es frecuente observar en los resultados más de una opción diferente con un score superior a 2 (MALDI Biotyper), es decir, con fiabilidad a nivel de especie. Algunos autores proponen considerar válidos únicamente a aquellos resultados donde aparezca una única especie con score ≥ 2 entre las opciones proporcionadas por el equipo. Es importante considerar también que *A. dhakensis*, que se asocia a una mayor resistencia a los antimicrobianos y a infecciones de curso grave, no se encuentra incluida actualmente en la base de datos del MALDI Biotyper (Bruker Daltonik), por lo que puede identificarse erróneamente como *A. hydrophila*. Por ello, en los casos en los que se requiera una identificación fiable a nivel de especie en representantes de este género, sería recomendable utilizar la secuenciación de genes *housekeeping* como el *rpoD*.

Otras bacterias Gram-negativas

Otras bacterias Gram negativas como *Francisella* spp, *Bartonella* spp, *Legionella* spp, *Haemophilus* spp, *Neisseria* spp. o las pertenecientes al grupo HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, y *Kingella kingae*) se asocian a infecciones de curso grave, siendo difíciles de identificar mediante el enfoque tradicional debido a sus requerimientos nutricionales y a su crecimiento fastidioso. Estos microorganismos no crecen en la mayoría de los sistemas automáticos de identificación y requieren de la realización de complejas pruebas bioquímicas o de técnicas moleculares para su identificación. El MALDI-TOF también ha demostrado identificar correctamente estas bacterias en diversos estudios. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el MALDI-TOF puede identificar erróneamente a *Neisseria polysaccharea* (comensal) con *N. meningitidis* debido a su parentesco filogenético. También es posible identificar erróneamente cepas no encapsuladas de *N. meningitidis* con otras especies comensales de *Neisseria*. Por ello, la identificación de un aislado como *N. meningitidis* por MALDI-TOF debe interpretarse con precaución, sobre todo en muestras faríngeas donde convive con otras especies comensales.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

La naturaleza y el grosor de la pared celular de las bacterias Gram-positivas hace que sean más difíciles de lisar que las Gram-negativas. Debido a ello, la aplicación directa de colonias a la placa del MALDI-TOF puede proporcionar menores tasas de identificación en este grupo de microorganismos. En la mayoría de estudios de evaluación del MALDI-TOF con bacterias Gram-positivas se han demostrado mayores tasas de identificación tras un proceso de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico, en comparación con la aplicación directa de las colonias. Este proceso es ligeramente más lento y laborioso, pero puede sustituirse por la adición de 1 μ L de ácido fórmico (70%) al pocillo del MALDI-TOF tras la aplicación de las colonias y antes de la adición de la matriz. Esta modificación mejora la identificación de las bacterias Gram-positivas de manera similar a la extracción completa de proteínas, siendo un proceso más rápido y sencillo. A pesar de estos requerimientos ocasionales, el MALDI-TOF ha demostrado ser un método fiable para la identificación rápida y precisa de la mayoría de las bacterias Gram-positivas de interés clínico.

Las especies del género *Staphylococcus* forman parte de la microbiota comensal de animales y del ser humano, estando presentes además en los alimentos. *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno humano dentro de este grupo, aunque otras especies de estafilococos coagulasa negativos (ECN), como *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* o *S. schleiferi*, han demostrado ser patógenos emergentes tanto en el contexto comunitario como en el nosocomial. Otros ECN, como *S. epidermidis* o *S. hominis*, son importantes patógenos oportunistas asociados al contexto hospitalario y al uso de dispositivos, siendo además contaminantes frecuentes en las muestras clínicas. La identificación precisa de las especies de ECN es, por tanto, esencial para establecer la importancia clínica de estos microorganismos. Sin embargo, la identificación tradicional mediante métodos fenotípicos manuales o automáticos es lenta, laboriosa y poco fiable como consecuencia de la baja tasa de crecimiento de estas especies y de la presencia en algunas especies (*S. lugdunensis*, *S. schleiferi*) de β -hemólisis y de proteínas de coagulación que pueden identificarlos erróneamente como *S. aureus*. Por otro lado, la identificación molecular mediante PCR y secuenciación del ADNr 16S y *rpoB* es lenta y costosa, requiriendo personal e instalaciones especializadas. La identificación mediante MALDI-TOF se correlaciona bien con los métodos moleculares y es superior a las técnicas fenotípicas, siendo una herramienta más rápida y coste eficaz que las anteriores. El MALDI-TOF también es capaz de identificar fenotipos aberrantes, como *S. aureus* coagulasa negativos o las *Small Colony Variants*, que pueden tener importancia en infecciones de curso crónico.

El MALDI-TOF también ha resultado ser más fiable que los métodos fenotípicos para la identificación de especies del género *Streptococcus*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la plataforma del MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) puede identificar erróneamente estreptococos del grupo *mitis/oralis* como *S. pneumoniae*, dado que se trata de grupos filogenéticamente relacionados y tienen espectros de masas muy similares. La identificación de *S. pneumoniae* requiere, por tanto, de pruebas fenotípicas adicionales como la solubilidad en bilis y/o la sensibilidad a la optoquina. Por su parte, la plataforma de VITEK MS

(bioMérieux) parece superior al MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) en la identificación de *S. pneumoniae* y *S. mitis/oralis*, así como de *S. dysgalactiae* y *S. intermedius*, probablemente porque en su algoritmo de identificación aporta un mayor peso a la presencia de ciertos picos característicos de cada especie. Por último, la plataforma de VITEK MS (bioMérieux) parece también superior al MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) a la hora de identificar especies de estreptococos pertenecientes al grupo bovis, especialmente en el caso de *S. gallolyticus subsp. gallolyticus*, *S. gallolyticus subsp. pasteurianus*, *S. infantarius subsp. infantarius* y *S. equinus*. Aunque algunos autores sugieren que la ampliación de bases comerciales con espectros adquiridos por el usuario podría mejorar la identificación de las especies problemáticas de *Streptococcus*, la identificación definitiva debería confirmarse mediante métodos moleculares, como la secuenciación del gen *sodA*. En cuanto a las especies del género *Enterococcus* y de otros géneros de cocos Gram-positivos catalasa negativos, la fiabilidad de la identificación por MALDI-TOF parece comparable a la de los métodos moleculares.

Dentro de los bacilos Gram-positivos, el género *Corynebacterium* y otros géneros relacionados engloban algunas especies patógenas y una gran cantidad de componentes de la microbiota, que pueden ser clínicamente relevantes en ocasiones. La identificación a nivel de especie en este grupo es importante para dilucidar el valor clínico de un aislado, así como para predecir en ocasiones su patrón de sensibilidad. En general, el MALDI-TOF es superior a los métodos fenotípicos en la identificación de corinebacterias, con una eficacia comparable a la de los métodos moleculares. Sin embargo, se han observado algunos problemas en la diferenciación de determinadas especies, como *C. aurimucosum*, *C. minutissimum* y *C. singulare*. También hay que tener en cuenta que algunas corinebacterias presentan ácidos micólicos en su pared, lo que dificulta la lisis y extracción de proteínas cuando se utiliza el método de aplicación directa de colonias. Por ello, en caso de no obtener una identificación fiable a nivel de especie, es recomendable realizar un procedimiento de extracción de proteínas o, al menos, tratar las colonias con 1 μ L de ácido fórmico antes de añadir la matriz.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS

Los primeros estudios de evaluación del MALDI-TOF para la identificación de microorganismos anaerobios demostraron tasas de identificación inferiores a las de otros grupos bacterianos, probablemente como consecuencia de la escasa representación de estas bacterias en las bases de datos comerciales. Sin embargo, con el enriquecimiento de dichas bases, la fiabilidad del MALDI-TOF para la identificación de anaerobios ha aumentado considerablemente, convirtiéndose actualmente en la principal herramienta utilizada en los laboratorios de Microbiología para la identificación de estas bacterias y sustituyendo a otras técnicas como la cromatografía de gases o las pruebas fenotípicas. De manera adicional, el MALDI-TOF se ha mostrado prometedor a la hora de subtipar bacterias anaerobias de interés clínico, como es el caso de los distintos filogrupos de *Cutibacterium acnes* o los ribotipos de *Clostridioides difficile*.

Es importante mencionar que una extracción completa de proteínas o el pretratamiento de las colonias mediante ácido fórmico puede mejorar el porcentaje de identificación a nivel de especie, especialmente en bacterias Gram-positivas. Asimismo, en bacterias como *Clostridium* spp. reviste especial importancia el uso de cultivos jóvenes, ya que la producción de esporas puede interferir con el proceso de identificación. Por último, algunos autores han propuesto que un score $\geq 1,7$ es suficiente como punto de corte para obtener una identificación fiable a nivel de especie en las bacterias anaerobias, lo que aumentaría la proporción de identificaciones correctas mediante MALDI-TOF.

4.5. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA IDENTIFICACIÓN

Las condiciones de cultivo, tales como el tipo de medio, la temperatura, el tiempo y las condiciones de incubación, podrían afectar a la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF. Los medios de cultivo selectivos y diferenciales que se utilizan comúnmente en los laboratorios de Microbiología contienen componentes, como sales o indicadores de pH, que pueden interferir en la generación de espectros de masas y dar lugar a tasas de identificación inferiores a las obtenidas empleando medios de cultivo generales, como el agar sangre. De igual modo, la composición del medio y las condiciones de incubación pueden introducir

variaciones en el patrón de expresión proteica de las bacterias influyendo de este modo en su identificación por MALDI-TOF. Por último, el número y la intensidad de los picos generados por espectrometría de masas decrece conforme avanza la edad del cultivo, siendo preferibles cultivos jóvenes (24-48 horas) para obtener una correcta identificación de los microorganismos. En la práctica, las condiciones de cultivo (exceptuando su edad) no afectan casi nunca a la identificación. Ello se debe a que los picos generados por MALDI-TOF se corresponden fundamentalmente con proteínas ribosómicas, que estarían siempre presentes independientemente de la metodología de cultivo. En algunos microorganismos, como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* spp. o *Staphylococcus* spp., se ha observado cierta influencia del medio de cultivo en la probabilidad de obtener una identificación exitosa. Estos problemas pueden solventarse mediante subcultivo en medios generales y/o mediante la extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico a partir de las colonias del microorganismo.

La naturaleza de los microorganismos también influye en la calidad de la identificación. Las tasas de identificación por MALDI-TOF son generalmente peores en bacterias difíciles de lisar, como las Gram positivas, bacterias encapsuladas o morfotipos mucosos. En estos casos puede ser necesario realizar un protocolo de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico para obtener una identificación correcta. Como ya hemos mencionado, algunos microorganismos estrechamente emparentados genéticamente tienen espectros de masas muy similares e indistinguibles mediante MALDI-TOF, dando lugar a identificaciones erróneas. En estos casos podría hacerse necesario realizar pruebas fenotípicas complementarias o recurrir a la biología molecular. Por último, es posible que los microorganismos a identificar no se encuentren representados en las bases de datos comerciales. Una manera de solventar este problema consiste en la creación de una base de datos casera con nuevos espectros de masas una vez identificados los microorganismos, si bien puede que esta aproximación no esté al alcance de muchos laboratorios clínicos.

5. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS Y ACTINOMYCETALES

5.1. IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

El significado clínico de las micobacterias no tuberculosas (MNT) presentes en muestras de pacientes se establece dependiendo de la especie identificada, por lo que se recomienda la identificación de estos aislados hasta el nivel de especie. Sin embargo, este objetivo no es fácil de alcanzar debido a la gran complejidad taxonómica del género *Mycobacterium*, con 198 especies descritas (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). De ellas, se ha demostrado que aproximadamente 60 especies de MNT son patógenos humanos capaces de causar infecciones en distintas localizaciones, desde la piel hasta infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, enfermedad pulmonar con síntomas parecidos a la tuberculosis y linfadenitis en niños.

La identificación de estos microorganismos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF ha sido posible gracias a la adaptación del método de preparación de muestras y a la ampliación de las bases de datos comerciales. En el primer caso, se ha demostrado que la ruptura de la pared celular mediante métodos mecánicos permite obtener una mayor cantidad de proteínas bacterianas disponibles para poder ser identificadas mediante MALDI-TOF. También se ha conseguido recientemente la identificación directa a partir de los medios de cultivo líquidos con el consiguiente ahorro en tiempo respecto de la identificación convencional. Se han descrito distintos métodos caseros (ver PNT-MT-01 de este procedimiento), pero también disponemos de dos kits comerciales, el VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT (bioMérieux) para la extracción a partir de medio sólido y el VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT (bioMérieux) para la extracción a partir de medio líquido.

En cuanto a las bases de datos disponibles, las plataformas más utilizadas (Bruker Daltonik y bioMérieux) han incrementado el número de especies representadas. La última versión de la librería de micobacterias del MALDI Biotyper (v5.0) contiene 912 espectros correspondientes a 159 especies de micobacterias, mientras que la versión v2.12 de la librería RUO de VITEK MS contiene 1.286 espectros que representan a

las 45 especies de micobacterias más frecuentes en el ambiente clínico. El hecho de disponer de bases de datos tan amplias para el género *Mycobacterium* ha permitido identificar estos microorganismos mediante MALDI-TOF de manera fiable e incorporar esta aplicación a la rutina sin necesidad de desarrollar bases de datos locales o “in-house” para este fin. En distintos estudios, el MALDI-TOF ha demostrado ser capaz de identificar casi el 100% de los aislados analizados, requiriendo poco tiempo de preparación de la muestra y la interpretación de los resultados.

Además, se ha desarrollado un método específico para la detección de resistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* (rifampicina, isoniazina, linezolid y etambutol) y MNT (claritromicina y rifabutina) (MBT-ASTRA).

5.2. ANÁLISIS DE PICOS PARA DISCRIMINAR ENTRE ESPECIES ESTRECHAMENTE RELACIONADAS

Las especies de MNT estrechamente relacionadas filogenéticamente suelen identificarse mediante MALDI-TOF o a nivel de complejo o como dos especies indiferenciables (por ejemplo, *M. intracellulare/chimaera*). En varios estudios recientes se han desarrollado algoritmos basados en la presencia/ausencia de picos específicos para discriminar subespecies dentro del complejo *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, y *M. abscessus* subsp. *bolletii*). Debido al distinto perfil de sensibilidad a antimicrobianos de estas tres subespecies, su identificación permite aplicar un tratamiento optimizado en cada caso. Además, su identificación no requiere la realización de pruebas confirmatorias, sino que se realiza con los mismos espectros proteicos facilitados por MALDI-TOF para la identificación de los aislados.

Más recientemente, Pranada y cols. han descrito un método basado en el análisis de espectros de proteínas para diferenciar entre *M. intracellulare* y *M. chimaera*. Igual que en el caso del complejo *Mycobacterium abscessus*, la discriminación entre estas dos especies próximas se basa en la presencia/ausencia de picos específicos de especie. En ambos casos, la especificidad y sensibilidad del método es cercana al 100% y su implementación permitiría identificar de manera fiable los aislados de *M. chimaera* que han sido relacionados con el uso de aparatos de soporte cardiopulmonar extracorpóreos (ECMO) y que han causado brotes en hospitales de Europa y América del Norte.

Como limitación de este método, es importante aclarar que, a pesar de su capacidad para identificar con precisión las distintas especies de MNT, MALDI-TOF no discrimina entre especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMYCETALES

En cuanto al orden *Actinomycetales*, cabe destacar los géneros *Nocardia* y *Streptomyces*, agentes causales de infecciones oportunistas poco comunes en pacientes inmunocomprometidos, aunque también son patógenos a veces insospechados de infección en pacientes inmunocompetentes. Ambos géneros están compuestos de un número elevado de especies, con una taxonomía complicada en el caso del género *Nocardia*.

La identificación hasta el nivel de especie es importante en estos microorganismos por el patrón de sensibilidad antibiótica que presentan las distintas especies. Por ello, es necesario disponer de una metodología que facilite su identificación de manera fiable y MALDI-TOF es una buena alternativa a la identificación molecular.

Debido a las características de su pared celular, estos microorganismos también requieren disrupción mecánica para poder acceder a sus proteínas citoplásmicas y realizar su identificación mediante MALDI-TOF. En los últimos años se han publicado diversos estudios referentes a la identificación de aislados de los géneros *Nocardia* y *Streptomyces*. Aunque no hay un método estandarizado de procesamiento de estas muestras, lo más habitual es la aplicación de un proceso de ruptura mecánica seguido de extracción de

proteínas –muy similar al descrito para MNT- para favorecer la identificación hasta el nivel de especie. También se recomienda la ampliación de la base de datos con aislados locales caracterizados molecularmente, lo que permite una mejor identificación incluso de aislados analizados directamente, sin extracción previa de proteínas. Sin embargo, la constante actualización de las bases de datos comerciales facilita la identificación de las especies más comunes y cada vez son menos las especies no representadas en ellas.

Esto supone una gran ventaja para poder implementar la identificación de los *Actinomycetales* mediante MALDI-TOF en la rutina de los laboratorios de Microbiología, facilitando con ello el inicio rápido de terapia antibiótica optimizada.

6. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS

6.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de levaduras y hongos filamentosos está basada en su análisis macroscópico, microscópico y, para su confirmación, en la amplificación y detección de ácidos nucleicos. En el caso de los métodos fenotípicos, pueden presentar el inconveniente de no permitir discriminar entre especies con morfología muy similar y de requerir personal entrenado. En el segundo, los principales inconvenientes son el coste y el retraso en la emisión de los resultados, que los aparta de la primera línea de diagnóstico clínico. La espectrometría de masas MALDI-TOF representa, por todo lo anteriormente expuesto, una ayuda extra a la identificación y en algunos casos llega a suponer una alternativa a los métodos de referencia de identificación de hongos.

Los hongos filamentosos, al tratarse de microorganismos eucariotas, poseen un patrón de proteínas muy complejo y su representación en las bases de datos ha estado, hasta muy recientemente, mucho más limitada que la mayoría de especies de bacterias. Por esta razón, algunos laboratorios han desarrollado sus propias librerías con aislados caracterizados molecularmente.

6.2. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

MALDI-TOF se ha convertido en una técnica cada vez más utilizada para la identificación de levaduras debido a la sencillez de su realización y también por su elevada sensibilidad y especificidad. La identificación se puede llevar a cabo mediante la transferencia directa de biomasa sobre la placa de MALDI-TOF, igual que los aislados bacterianos (ver PNT-MT-01 de este procedimiento). Si bien es cierto, que la identificación se ve muy favorecida cuando se realiza una extracción in-target, es decir se añade un paso de extracción con ácido fórmico en la propia tarjeta antes de añadir la matriz a la muestra. Este sencillo método, permite incluir la identificación de levaduras mediante MALDI-TOF en la rutina del laboratorio de Microbiología. Además, también se ha demostrado la efectividad de la identificación de levaduras a partir de hemocultivos, aunque en este caso se recomienda la utilización de métodos más eficaces de lisis celular mediante kits comerciales (MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik) o VITEK® MS BLOOD CULTURE KIT (bioMérieux) o mediante la utilización de detergentes como el SDS al 0,1%. En los distintos estudios realizados para la identificación de levaduras a partir de hemocultivos se ha demostrado un porcentaje de identificación correcta hasta el nivel de especie de aproximadamente 96% utilizando alguno de los métodos de lisis señalados arriba; alrededor del 3% de los aislados analizados no obtiene identificación fiable con MALDI-TOF y un 1% se identifica erróneamente como una especie relacionada filogenéticamente. Cuando la identificación se realiza a partir de colonias crecidas en medio sólido el porcentaje de identificación correcta de especies también se ha demostrado cercana al 96-97% cuando la levadura identificada corresponde a una de las especies más frecuentes; en caso de tratarse de especies poco comunes, la tasa de identificación correcta está en torno al 85-86% en las dos plataformas de espectrometría de masas más ampliamente distribuidas. MALDI-TOF ha demostrado su eficacia en la identificación de la mayoría de especies de los géneros *Candida* (incluida *C. auris*), *Geotrichum* y *Trichosporon*, así como en la discriminación entre *Cryptococcus neoformans* y *C. gatti*.

6.3. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

La adaptación del proceso de preparación de aislados de hongos filamentosos para su identificación mediante MALDI-TOF ha sido mucho más lenta que la de las levaduras. A la dificultad de romper su pared celular se ha unido su complejidad genómica y taxonómica, así como la falta de representación de especies de importancia clínica en las bases de datos. Estos factores han obligado a los distintos grupos de investigación enfocados en este objetivo a desarrollar y evaluar distintos métodos de extracción de proteínas fúngicas y librerías propias en las que se ha ampliado el número de especies de hongos filamentosos con aislados clínicos. El esfuerzo de llevar esta tarea a cabo es grande, pero ha permitido realizar la identificación de hongos filamentosos de manera rutinaria utilizando MALDI-TOF, con la consiguiente disminución en el tiempo necesario para su identificación final, lo cual demuestra que la construcción de bases de datos amplias y variadas, con aislados bien caracterizados es fundamental para una buena identificación mediante MALDI-TOF. Comercialmente, disponemos del VITEK® MS MOULD KIT (bioMérieux) que proporciona los reactivos y consumibles necesarios para procesar muestras de hongos en cultivo sólido mediante la extracción e inactivación de sus proteínas.

Distintos estudios se han enfocado en la identificación de aislados clínicos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pseudallescheria / Scedosporium* y en el orden *Mucorales*. A pesar de los distintos métodos de preparación descritos por diferentes autores, todos coinciden en la necesidad de romper la pared celular y de realizar una extracción de las proteínas fúngicas. Además, debido al distinto patrón de proteínas expresado por los hongos filamentosos durante su crecimiento, es necesario establecer el momento en el que se realizará su identificación. Por ello, se recomienda que sea en los dos primeros días de crecimiento para evitar la presencia de esporas o de melanina, en el caso de los hongos negros, que dificultan su identificación.

En la actualidad las bases de datos comerciales continúan incorporando nuevos aislados. La base de datos que MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) pone a disposición de los usuarios (Filamentous Fungi Library 2.0) contiene espectros de 152 especies de hongos filamentosos correspondientes a 58 géneros y la de VITEK MS (bioMérieux) versión IVD contiene una base con referencias de 116 especies mientras que la versión RUO v4.15 contiene una base con referencias de 367 especies de 109 géneros. Por su reciente aparición, todavía no se han publicado estudios que evalúen estas bases de datos actualizadas.

La identificación de hongos filamentosos a nivel de especie utilizando ambas plataformas comerciales de espectrometría de masas está entre el 40% y el 70%, con resultados ligeramente superiores si se utiliza la plataforma VITEK MS (bioMérieux).

En el caso de hongos dermatofitos y dematiáceos, los resultados son peores, alrededor del 40- 50% de identificaciones correctas hasta el nivel de especie utilizando las bases de datos comerciales que pueden llegar a aumentar hasta el 95-97% cuando se utilizan librerías ampliadas con espectros de referencia de estos grupos de hongos filamentosos.

Además, algunos de los grupos que han desarrollado las librerías más grandes de hongos filamentosos facilitan que otros usuarios de MALDI-TOF se beneficien de ellas mediante la comparación *on-line* de los espectros que, a pesar de tener suficiente intensidad y número de picos, no se identifican fiablemente usando las bases de datos convencionales. Esta herramienta (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi>) permite una segunda línea de identificación rápida de hongos cuando fallan las bases de datos más ampliamente utilizadas. Los estudios demuestran que el uso de esta base de datos mejora el porcentaje de identificaciones tanto en el caso de la plataforma comercial VITEK MS (bioMérieux) como en el caso de utilizar el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

Como conclusión, la espectrometría de masas también está demostrando ser una herramienta de identificación para levaduras y hongos filamentosos aunque su estandarización, puesta en marcha e implementación en la rutina del laboratorio de Microbiología está siendo más compleja que para otros microorganismos.

mos debido a la complejidad de los mismos. A pesar de ello, los estudios realizados hasta el momento han permitido determinar las condiciones necesarias de preparación de muestras que facilitan la identificación de levaduras y hongos filamentosos. Junto con las mejoras realizadas en las bases de datos y la disponibilidad de las librerías desarrolladas por distintos grupos de investigación, la total inclusión de la identificación de estos microorganismos de forma rutinaria está cada vez más cerca de ser un hecho. En el futuro esto facilitará un mejor manejo del paciente con infección fúngica y un inicio rápido de la terapia más apropiada.

7. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS

7.1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las enfermedades parasitarias es complejo e implica la detección e identificación de una amplia variedad de microorganismos unicelulares y pluricelulares pertenecientes a tres grandes grupos: protozoos, helmintos y ectoparásitos. En la actualidad, el diagnóstico de las parasitosis se basa principalmente en técnicas convencionales como la microscopía, la serología o el cultivo.

Como se ha indicado en los apartados anteriores, la espectrometría de masas MALDI-TOF ha revolucionado el diagnóstico de las infecciones. Sin embargo, esta tecnología no se ha introducido de manera rutinaria en los laboratorios de parasitología clínica en la actualidad debido principalmente a la carencia de espectros de referencia en las bases de datos comerciales, a la complejidad de los ciclos de vida de los parásitos y a la necesidad de contar con cultivos axénicos (puros) de los mismos para conseguir espectros de buena calidad. A pesar de estos inconvenientes se han producido avances en la identificación de especies de parásitos mediante MALDI-TOF, que se resumen a continuación.

7.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS

La tecnología MALDI-TOF se ha utilizado con éxito para la identificación de especies pertenecientes a los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* a partir de quistes obtenidos de roedores infectados experimentalmente, demostrando el potencial de esta técnica para la realización de estudios epidemiológicos en los que es importante la identificación de la especie implicada para dilucidar el origen de un brote. En el caso de *Cryptosporidium* spp., la combinación de MALDI-TOF con técnicas de genotipado ha permitido la identificación directa de las especies del parásito a partir de muestras humanas y animales, de una manera más rápida y coste-eficaz que utilizando la secuenciación Sanger. También se ha conseguido identificar subtipos de *Blastocystis* spp. a partir de muestras clínicas, tras el aislamiento del parásito en un cultivo axénico y la construcción de una base de datos con subtipos de referencia. Asimismo, tras el estudio de espectros obtenidos a partir de cultivos puros de *Entamoeba histolytica* y *E. dispar*, se han logrado identificar picos específicos pertenecientes a ambas especies, que posteriormente se detectan por MALDI-TOF en muestras clínicas (heces) tras un periodo de incubación de 12-24 horas en medio de Robinson.

En cuanto a la identificación de protozoos sanguíneos y tisulares, la identificación de especies de *Leishmania* por MALDI-TOF es la que cuenta con un mayor número de publicaciones, existiendo incluso algunas bases de datos disponibles *online* (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>). La identificación correcta de la especie infectante tiene importancia clínica, epidemiológica y terapéutica pero no está al alcance de los laboratorios clínicos debido a la dificultad de las técnicas requeridas (análisis de isoenzimas). El MALDI-TOF ha demostrado identificar correctamente especies de *Leishmania* aisladas de muestras clínicas por cultivo, incluyendo aquellas pertenecientes al subgénero *Viannia*, responsable de las formas mucocutáneas metastásicas. En todas las publicaciones se requiere como pasos previos la obtención de un cultivo positivo y la construcción de una base de datos de referencia, lográndose la identificación directa con parásitos enteros o tras un proceso simple de extracción con etanol y ácido fórmico al 70%. La identificación de otros protozoos sanguíneos y tisulares como *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp. o *Babesia* spp. a partir de muestras clínicas se encuentra poco desarrollada, aunque existen algunas publicaciones con resultados prometedores.

En cuanto a la identificación de *Trichomonas vaginalis*, se ha desarrollado una base de datos con espectros de referencia en rangos de lectura que difieren de la ventana utilizada habitualmente para la identificación de bacterias para evitar la interferencia debida a los medios de cultivo empleados. Esta aproximación ha permitido identificar todos los aislados utilizados para evaluar la base de datos.

Por último, el MALDI-TOF se ha utilizado con éxito para la identificación de amebas como *Naegleria fowleri* y los distintos genotipos de *Acanthamoeba* spp. En ambos casos, la obtención de un cultivo previo y la construcción de una base de datos de referencia han sido requisitos indispensables para la utilización de esta técnica.

7.3. IDENTIFICACIÓN DE HELMINTOS

El término no taxonómico helmintos comprende distintas especies de gusanos planos y redondos pertenecientes a los *Phyla Platyhelminthes* (duelas y tenias) y *Nematoda*. La identificación de helmintos por microscopía es lenta y requiere un alto grado de especialización, estando normalmente limitada a formas adultas y no a huevos o estadios larvarios. La mayoría de los estudios analizan la utilidad del MALDI-TOF para la identificación de patógenos vegetales y existe poca literatura con respecto a las especies que parasitan a humanos. Sin embargo, el MALDI-TOF se ha utilizado con éxito para la identificación de especies de *Trichinella*, siendo necesaria la construcción de una librería de espectros de referencia, la obtención de 3-5 larvas y un proceso de extracción con etanol/fórmico. También se han utilizado plataformas MALDI-TOF distintas a las utilizadas de manera rutinaria en Microbiología Clínica para la identificación de biomarcadores en sueros de pacientes, así como de antígenos potenciales para el desarrollo de vacunas o de RDTs (*Rapid Diagnostic Tests*).

7.4. IDENTIFICACIÓN DE ARTRÓPODOS

El *Phylum Arthropoda* engloba más de un millón de especies e incluye ectoparásitos de humanos y/o vectores de importantes enfermedades víricas, bacterianas o parasitarias. La identificación rápida y precisa de estos vectores reviste una gran importancia en epidemiología para el control de las enfermedades que transmiten. A nivel clínico, la identificación de ectoparásitos puede orientar el tratamiento que se administra a los pacientes, debido a la especificidad de ciertos vectores para algunos patógenos. La identificación tradicional basada en caracteres morfológicos y claves dicotómicas requiere de un entomólogo experto y es lenta y laboriosa. También es necesaria la obtención de especímenes completos, generalmente formas adultas, siendo difícil la identificación de estadios larvarios, especímenes dañados o formas alimentadas de vectores hematófagos. Por último, la taxonomía tradicional es incapaz de identificar determinadas especies hermanas o crípticas con distinta importancia epidemiológica.

La identificación de artrópodos por MALDI-TOF es la que se encuentra respaldada por mayor número de publicaciones en el campo de la Parasitología. Existen numerosos estudios que demuestran la utilidad de esta tecnología para la identificación de especies de mosquitos, flebotomos, moscas tse-tse, pulgas, garrapatas y ácaros. Las principales ventajas que ha demostrado el MALDI-TOF son una identificación rápida, barata y precisa de numerosas muestras a la vez, siendo una herramienta útil en estudios epidemiológicos. También ha demostrado utilidad en la identificación de especies crípticas e incluso distinguir los distintos estadios larvarios de algunos artrópodos, incluidos los huevos. En todas las publicaciones se realiza una extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico al 70% a partir de diferentes partes del artrópodo (generalmente las patas). Asimismo, la construcción previa de una librería de espectros de referencia es un requisito previo indispensable debido a la carencia de espectros de referencia en las principales plataformas comerciales. Sin embargo, existen en la actualidad algunas bases de datos disponibles online para la identificación de dípteros (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>).

A la hora de identificar especies de artrópodos mediante MALDI-TOF es necesario tener en cuenta dos factores importantes para conseguir espectros de masas reproducibles y de buena calidad. En primer lugar, es importante el método de conservación de la muestra (especialmente en estudios de campo), siendo preferi-

bles los especímenes frescos o congelados a los conservados en alcohol al 70%, ya que este último método ha afectado a la calidad y reproducibilidad de los espectros en algunos estudios. También es importante escoger con cuidado las partes del artrópodo que se van a utilizar para el análisis, eligiendo aquellas cuyos espectros de masas presenten la mayor reproducibilidad. El uso de partes como el abdomen no se recomienda, especialmente en especies hematófagas, ya que reduce la reproducibilidad y la calidad del análisis debido probablemente a diferencias en el contenido del estómago entre los especímenes analizados.

Como conclusión, la identificación de artrópodos es probablemente la aplicación más prometedora del MALDI-TOF y la que podría usarse en la actualidad. Si bien los artrópodos no son una muestra frecuente en los laboratorios de Microbiología Clínica, su uso podría ser muy útil en centros de investigación dedicados a estudios epidemiológicos.

7.5. SITUACIÓN ACTUAL DEL MALDI-TOF EN LA PARASITOLOGÍA CLÍNICA

Existen varias razones por las cuales la tecnología MALDI-TOF no se halla implementada en la actualidad para el diagnóstico de las parasitosis. En primer lugar, los parásitos suelen presentar diferentes estadios (huevos, larvas, quistes, adultos, etc.) que pueden dar lugar a diferentes espectros de masas. Los parásitos presentan además ciclos vitales complejos que hacen imposible en ocasiones la obtención de especímenes para su identificación. Por otro lado, en muchos grupos de parásitos es imprescindible la creación previa de una base de datos con espectros de referencia, lo que resulta inviable para muchos laboratorios clínicos. Finalmente, la necesidad de cultivar los parásitos *in vitro* para obtener espectros de buena calidad limita las aplicaciones de esta técnica, no sólo por la complejidad y la lentitud del cultivo (de días a semanas), sino porque la mayoría de los parásitos requieren de otros microorganismos en cocultivo (cultivos xénicos) para su crecimiento. La identificación de parásitos en cultivos xénicos (por ejemplo, *E. histolytica* con *E. coli*) es menos precisa y depende de la proporción parásito/bacteria u hongo que se encuentre en el cultivo, siendo necesario además un análisis más profundo de los espectros para descartar aquellos picos correspondientes al microorganismo que se utilice como fuente de alimento. Es posible que la combinación de técnicas moleculares con la espectrometría de masas pueda superar estos inconvenientes, lo que posibilitaría una aplicación más extensa del MALDI-TOF en la Parasitología Clínica.

Finalmente, el MALDI-TOF ha demostrado un gran potencial para la identificación de parásitos pero su uso se encuentra actualmente restringido a laboratorios de referencia, siendo necesario resolver algunos inconvenientes para su aplicación en los laboratorios clínicos.

8. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS CLÍNICAS

La identificación directa de microorganismos por MALDI-TOF a partir de muestras clínicas podría adelantar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y la instauración de un tratamiento adecuado antes del resultado del cultivo (24-48 horas). Sin embargo, este proceso plantea una serie de dificultades. En primer lugar, esta tecnología requiere de un mínimo de 10^5 microorganismos para obtener espectros de calidad, siendo dicha densidad microbiana infrecuente en la mayoría de las muestras clínicas. Por otro lado, la presencia de proteínas humanas puede introducir interferencias durante el proceso de identificación. Por último, el MALDI-TOF es incapaz de discriminar los microorganismos que participan en infecciones poli-microbianas obteniéndose, como mucho, la identificación de aquél que se encuentre en mayor cantidad. Es posible reducir las interferencias durante la lectura mediante un procesamiento previo de las muestras, que consiste en eliminar las células eucariotas, concentrar las bacterias por centrifugación y lavar el *pellet* bacteriano resultante (véase PNT-MT-04 de este procedimiento). Asimismo, una tinción de Gram previa a este proceso sirve para seleccionar únicamente las muestras monomicrobianas. Sin embargo, el límite de 10^5 microorganismos hace que la identificación directa por MALDI-TOF sea posible únicamente en dos muestras clínicas principales: frascos de hemocultivo positivos y orinas.

8.1. DIAGNÓSTICO DE BACTERIEMIA Y SEPSIS

La presencia de bacterias (bacteriemia) o levaduras (fungemia) en la sangre de los pacientes son procesos patológicos que se asocian a tasas de mortalidad del 10-30%, dependiendo de la cohorte de pacientes, de su origen y del tipo de tratamiento empírico inicial. Estas cifras son aún mayores en pacientes con criterios de sepsis, en los que es frecuente observar tasas de mortalidad superiores al 40%. La implantación precoz de un tratamiento empírico adecuado frente al agente causal de la bacteriemia es vital para mejorar la supervivencia de los pacientes observándose un incremento en la mortalidad de un 7,6% con cada hora de retraso en su administración. Por esta razón, el diagnóstico etiológico de la bacteriemia o de la fungemia es una prioridad para los laboratorios de Microbiología, cuya misión es proporcionar al clínico información útil que le sirva para instaurar el tratamiento antibiótico adecuado con la mayor brevedad posible.

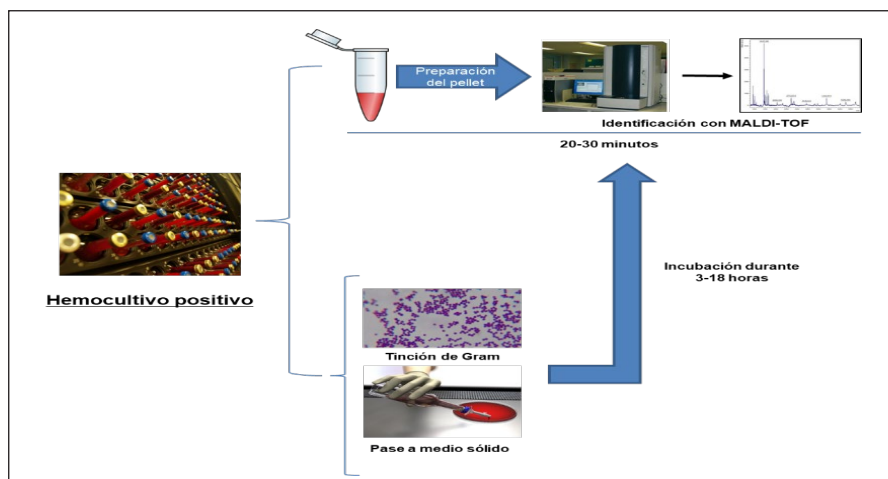
El hemocultivo sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de esta patología ya que, de manera general, la cantidad de microorganismos presentes en la sangre de los pacientes es baja ($<1 \cdot 10^4$ UFC/mL) lo que dificulta su detección directa. Prácticamente todos los laboratorios de Microbiología disponen de estaciones automáticas de incubación de frascos de hemocultivos. Estos sistemas alertan al microbiólogo de la presencia de viales positivos, lo que acelera su extracción del aparato y su procesamiento. Éste incluye la realización de una tinción de Gram y de un antibiograma preliminar, que brindan cierta información acerca del agente causal de la bacteriemia/fungemia y permiten orientar el tratamiento antimicrobiano 24 horas tras la positividad del frasco de hemocultivo. Sin embargo, la identificación y determinación de la sensibilidad definitivas del agente causal mediante técnicas tradicionales se consigue en 2-3 días tras la positividad de los frascos en el mejor de los casos, pudiendo alargarse en infecciones producidas por microorganismos anaerobios o de crecimiento fastidioso. Este retraso influye probablemente en la administración de tratamientos empíricos inadecuados, cuya tasa puede alcanzar el 25-30% con el subsiguiente impacto negativo sobre las probabilidades de supervivencia del paciente.

La introducción del MALDI-TOF ha revolucionado el diagnóstico rápido de la bacteriemia. La posibilidad de identificar el agente causal en menos de 1 hora tras la positividad del frasco permite adelantar 24-48 horas el diagnóstico etiológico de la misma (Figura 4). Este proceso consiste básicamente en concentrar las bacterias de la muestra y retirar componentes que puedan interferir en el proceso de identificación y de determinación de la sensibilidad, tales como células humanas u otras sustancias del medio de cultivo. Para ello existen kits comerciales como el MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik) y el VITEK MS Blood Culture Kit (bioMérieux), aunque la mayoría de los laboratorios emplean diversos métodos caseros basados en una lisis-centrifugación y/o en el uso de detergentes suaves (véase PNT-MT-02 de este procedimiento). El *pellet* bacteriano resultante no sólo puede usarse para identificar el microorganismo causante de bacteriemia, sino también como inóculo de sistemas automáticos de determinación de la sensibilidad, lo que suprime la necesidad de un subcultivo en medio sólido y adelanta el antibiograma definitivo al menos 24 horas, con unos resultados que se correlacionan con los obtenidos mediante el método tradicional. El *pellet* bacteriano también se ha utilizado con éxito para realizar otras pruebas de determinación de la sensibilidad, como ensayos colorimétricos (por ejemplo, Carba-NP test para detección de carbapenemasas), de aglutinación (por ejemplo, detección de la PBP2a de *S. aureus* resistente a la meticilina) o para la detección de β -lactamasas por técnicas moleculares o proteómicas.

Este proceso ha demostrado identificar con éxito más de un 80% de los microorganismos implicados en la bacteriemia/fungemia. Sin embargo, la fiabilidad de la identificación depende de la naturaleza del microorganismo implicado, obteniéndose mejores resultados en bacteriemias producidas por bacilos Gram-negativos y peores en aquellas producidas por cocos Gram-positivos (especialmente *Streptococcus* spp. y estafilococos coagulasa negativos), bacterias encapsuladas (*Haemophilus influenzae*, *K. pneumoniae*) o levaduras (fungemia). Es posible mejorar la identificación de estos microorganismos problemáticos mediante el empleo de un mayor volumen de cultivo y la realización de una extracción de proteínas mediante etanol y ácido fórmico a partir del *pellet* resultante. Con los cocos Gram-positivos puede realizarse el subcultivo de una gota del frasco positivo y realizar el MALDI-TOF a partir del crecimiento obtenido tras 4 horas de incubación, en el caso de no obtener resultados con el método directo. La presencia de bacteriemias polimicrobianas también supone una limitación del método, ya que en el mejor de los casos sólo se obtiene

la identificación del microorganismo presente en mayor proporción. Por estas razones, la tinción de Gram sigue siendo de obligada realización tras la positividad de los hemocultivos. Por último, se han observado peores resultados de este método cuando se utilizan sistemas automáticos que incorporan partículas de carbón en los frascos de hemocultivo, ya que parece que éstas interfieren con el proceso de lectura en el MALDI-TOF.

Figura 4. Flujo de trabajo para la identificación de microorganismos desde el hemocultivo positivo mediante MALDI-TOF.



8.2. DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Las muestras de orina procedentes de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU) presentan a menudo concentraciones $\geq 10^5$ bacterias/mL y son generalmente monomicrobianas, lo que las hace candidatas para el análisis directo mediante MALDI-TOF. Se han publicado numerosos estudios en los que el MALDI-TOF obtiene buenos resultados en la identificación de microorganismos causantes de ITU, especialmente cuando se trata de bacilos Gram-negativos, proporcionando información útil desde el punto de vista terapéutico 24-48 horas antes del resultado del cultivo. Hay que tener en cuenta que, al igual que ocurre en el caso de los hemocultivos, presenta limitaciones a la hora de identificar correctamente ciertos microorganismos, como estreptococos y levaduras. En la mayoría de los casos tampoco consigue identificar las especies implicadas en ITUs polimicrobianas. Por último, se ha demostrado que las β -defensinas presentes en la orina de algunos pacientes interfieren con las proteínas bacterianas durante la lectura, dando lugar a identificaciones poco fiables.

Debido al elevado número de muestras de orina procesadas en la mayoría de los laboratorios clínicos, el uso del MALDI-TOF puede optimizarse realizando un cribado previo de las mismas mediante diferentes estrategias (tiras reactivas, tinción de Gram, citometría de flujo, etc.). Sin embargo, la técnica es laboriosa y no elimina la necesidad de cultivar la muestra, ya que es necesario realizar los estudios de la sensibilidad. Por tanto, el MALDI-TOF podría reservarse para el diagnóstico rápido de las ITU hospitalarias, en pacientes graves.

Antes de la identificación por MALDI-TOF es necesario un procesamiento previo de las orinas, que tiene como finalidad eliminar los leucocitos y concentrar las bacterias presentes en la muestra. Para ello se han empleado varias estrategias, como la centrifugación diferencial, la incubación con detergentes (Tween o SDS) o una combinación de ambas. Tras un proceso de lavado, el pellet resultante puede depositarse directamente en la placa de MALDI-TOF (con o sin la adición de 1 μ L de ácido fórmico al 70%) o puede realizarse una extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico en el caso de no obtenerse resultado con el método directo. La duración de todo el proceso oscila entre 30 y 50 minutos.

9. IMPACTO CLÍNICO Y ECONÓMICO DEL MALDI-TOF EN EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO, E INTEGRACIÓN EN LOS PROA Y PRODIM

Más allá de la aportación realizada por la espectrometría de masas MALDI-TOF a la fiabilidad y exactitud de la identificación microbiológica, que después de casi 10 años de experiencia está fuera de toda duda, quedan todavía campos por explorar. Uno de los principales desafíos en el momento actual es medir el balance entre los beneficios clínicos de esta nueva tecnología y los costes y/o ahorros generados para el sistema sanitario.

La mayor parte de los estudios se centran en medir los beneficios de la identificación microbiana mediante MALDI-TOF en las bacteriemias, por el impacto clínico que supone para el paciente. Los beneficios que se observan mayoritariamente en la literatura son una administración temprana de una adecuada terapia antimicrobiana, una morbilidad y mortalidad reducida, una reducción en la estancia hospitalaria y una reducción en los costes por cada paciente hospitalizado.

Si bien es cierto que la metodología para la identificación directa de microorganismos del hemocultivo aún no está totalmente estandarizada y hay gran variabilidad en función del volumen de hemocultivo utilizado, del método de extracción de los microorganismos (centrifugación, métodos comerciales, tubos con gel separador, microcolonias, etc.), los resultados sugieren que el análisis rápido de los hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF, por cualquiera de estas metodologías, supone una aportación valorable. El principal desafío en este momento como se ha comentado es cuantificar esta aportación, tanto desde el punto de vista clínico como económico. Un estudio reciente cifra la reducción del tiempo requerido para la identificación, en comparación con el procedimiento convencional, en un 60-65% (de 28 horas a 10-11 horas). Otros estudios cifran la reducción del tiempo requerido para la identificación en no menos de 24 horas. Obviamente, la rapidez en la identificación del microorganismo no es tanto un objetivo en sí mismo, como una herramienta para optimizar el tratamiento antimicrobiano lo antes posible. Otros estudios combinan la identificación rápida mediante MALDI-TOF con una política activa de monitorización y, eventualmente, desescalado del tratamiento antimicrobiano, de forma que consiguen mejorar el tiempo de optimización del tratamiento en 20-30 horas, tanto en el sentido de instauración de una terapia óptima en hemocultivos considerados clínicamente significativos, como en el desescalado de los hemocultivos considerados clínicamente no significativos. Esta optimización repercute además en un acortamiento de la estancia global en torno al 40% (alrededor de una semana), un acortamiento de la estancia en UCI del 76% (1,2 frente a 4,3 días) y un acortamiento del 14% en la duración de los tratamientos antimicrobianos (15,9 frente a 18,6 días). En base a la reducción en la estancia global y en la estancia en UCI, los autores consideran que el coste medio por paciente se habría reducido prácticamente a la mitad, pasando de 28.677 a 15.784 dólares. En este sentido, ya se ha incorporado el MALDI-TOF en los programas activos de optimización del tratamiento antimicrobiano (PROA), concluyendo que los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan ambas herramientas de manera combinada. También se destaca su utilidad en los denominados programas de optimización de pruebas de diagnóstico microbiológico (PRODIM).

Por otro lado, si comparamos el MALDI-TOF con otras técnicas diagnósticas rápidas como la biología molecular, podemos observar resultados muy prometedores. Un estudio muy reciente compara el coste/efectividad de diferentes métodos rápidos para el diagnóstico de bacteriemia combinados o no con un PROA, demostrando que el diagnóstico de la bacteriemia por métodos moleculares combinados con un PROA, no mejora significativamente la supervivencia ni de forma global ni ajustada por calidad de vida (*quality-adjusted life years, QALY*) con respecto al diagnóstico molecular no combinado con PROA, aunque reduce los costes en un 25%. Por el contrario, la combinación de diagnóstico rápido mediante MALDI-TOF asociado a un PROA, no sólo reduce los costes un 25% adicional con respecto a la metodología molecular + PROA sino que mejora la supervivencia global en un 7% y mejora la QALY en 0,94 años. De hecho, los autores del estudio concluyen que, incluso en comparación con la combinación PROA + técnicas moleculares, la combinación MALDI-TOF + PROA es la combinación más coste efectiva, y la que se asocia con un mayor ahorro por QALY ganado.

Recientemente se han desarrollado otros tipos de pruebas basadas para la detección de la resistencia antimicrobiana mediante MALDI-TOF. Por el momento tienen como principal limitación el espectro de antimicrobianos en los que son útiles, aunque a medida que se desarrolle esta metodología podrían incrementar

aún más las ventajas de la incorporación del MALDI-TOF en los PROA. Sin embargo, aún no contamos con estudios de coste-efectividad que lo avalen.

10. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Gracias a su versatilidad, el MALDI-TOF se ha introducido en el laboratorio de Microbiología Clínica en el campo de la detección de la resistencia a los antibióticos, especialmente utilizándose como un método rápido.

Existen tres aproximaciones que se pueden aplicar para detectar la resistencia a los antimicrobianos mediante MALDI-TOF: detección de la resistencia a través de la medida de la actividad enzimática, detección de la resistencia a través del análisis del perfil proteico microbiano y detección de la resistencia a través del análisis de los efectos antibióticos que se producen sobre el crecimiento microbiano.

10.1. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A TRAVÉS DE LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Uno de los principales mecanismos de resistencia en bacterias es la modificación de la estructura del antibiótico debido a la acción de las enzimas de resistencia. El antibiótico una vez que ha perdido su estructura original deja de ser activo. En espectrometría de masas, es posible detectar cualquier mecanismo de resistencia que suponga una modificación no sólo en la estructura de la molécula sino en su masa. Los ensayos basados en la monitorización directa de la actividad enzimática de los antibióticos β -lactámicos son el punto de partida de todos los ensayos sobre la detección directa de resistencias a través de MALDI-TOF. Los antibióticos β -lactámicos se inactivan por la hidrólisis del enlace amida en el anillo β -lactámico mediada por una molécula de agua. Esta molécula de agua se añade a la nueva estructura formada, dando lugar a un incremento del peso molecular. Los espectros proporcionados por el MALDI-TOF son únicos para cada antibiótico y su correspondiente metabolito de hidrólisis y pueden ser utilizados para diferenciarlos. Un aislado se considerará sensible al antibiótico estudiado cuando su espectro de masas sea similar a aquel del control negativo, y resistente cuando su espectro sea más próximo al espectro de masas del control positivo. En general, se tendrá en cuenta que una hidrólisis es positiva cuando los picos de masas del metabolito de hidrólisis tengan una intensidad relativa superior al 40% respecto de los picos de masas del antibiótico sin hidrolizar.

La detección directa de la actividad β -lactamasa se realiza de forma muy similar en todos los trabajos publicados. Para ello se resuspende un cultivo bacteriano fresco en un buffer de antibiótico y se incuba a 37°C bajo agitación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifuga y el sobrenadante se deposita en la tarjeta. Una vez seca, puede añadirse la matriz. Finalmente se puede analizar el espectro obtenido. Hay que tener en cuenta que, siempre que se realice un ensayo de detección de la actividad enzimática mediante MALDI-TOF, es imprescindible el uso de un control positivo y negativo.

Lo primero que es necesario tener en cuenta para obtener un espectro de un antibiótico es que el rango de masas en el que se trabaja esté entre 100 y 1.000 Da, por lo que es necesario un calibrador diferente al que se utiliza para la identificación. Este calibrador tiene que tener unos picos de masas dentro del rango de masas en el que se trabaja. El calibrador que se utiliza con más frecuencia es una mezcla de bradiquinina (1-5) y bradiquinina (1-7), además de la matriz. La más empleada al igual que en la identificación de microorganismos es el HCCA.

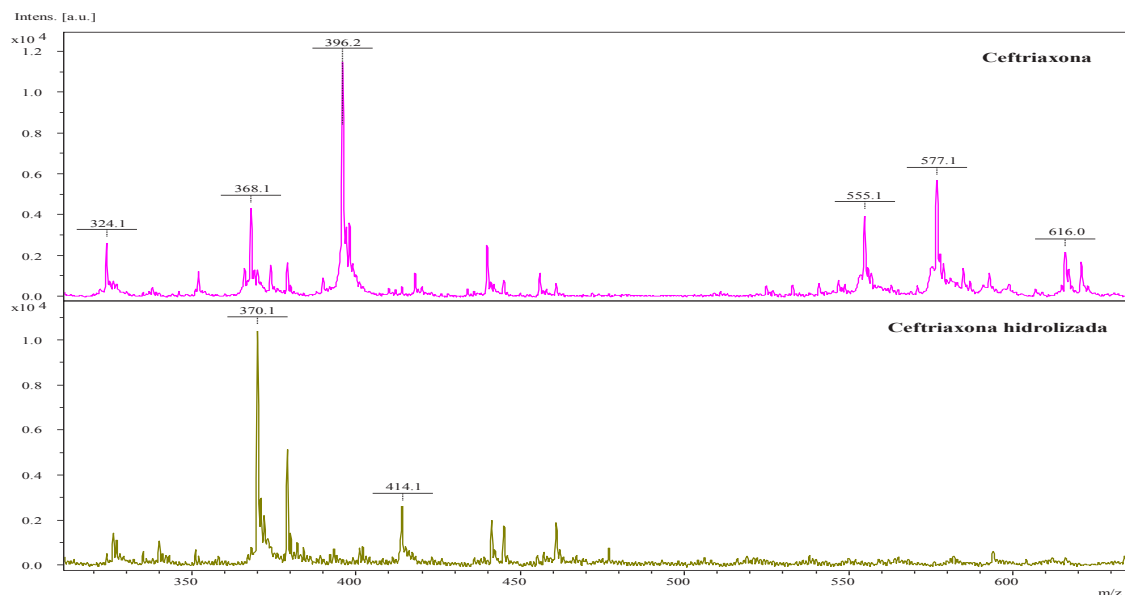
Dentro del grupo de las penicilinas se ha descrito el espectro de masas tanto de la ampicilina como de la piperacilina, sin embargo, el escaso impacto actual de la resistencia a estos antibióticos, no los ha hecho objeto destacado de estudio.

Dentro de las cefalosporinas, se ha descrito el espectro de masas de la cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefpodoxima y cefepima y sus metabolitos de hidrólisis. La cefepima se ha descartado para la detección de β -lactamasas mediante MALDI-TOF por su baja especificidad, ya que presenta falsos positivos en su hidrólisis. La ceftriaxona, es el antibiótico que ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad, además de un menor tiempo de detección. Con 30 minutos de incubación, se observaría una hidrólisis positiva tanto

en el caso de bacterias que poseen BLEE como AmpC (Figura 5). En el caso de cefotaxima y cefpodoxima, los resultados son similares, aunque la experiencia con cefotaxima es mayor. Ambos tienen niveles de sensibilidad superiores al 90%, pero en este caso el tiempo de incubación recomendable sería de 1 hora. En el caso de la ceftazidima, la hidrólisis y posterior detección mediante MALDI-TOF es mucho menos eficaz, por lo que no es un antibiótico recomendable como primera elección para el análisis de β -lactamasas. La sensibilidad es inferior al 90% y el tiempo de incubación recomendable son 3 horas.

En el caso de los carbapenémicos, se han descrito mediante espectrometría de masas, el ertapenem, el meropenem y el imipenem. El imipenem es el que ha demostrado una mayor sensibilidad, superior al 95% y un tiempo de incubación menor, 30 minutos. Para el ertapenem y el meropenem, la sensibilidad oscila entre el 90% y el 95% pero con un tiempo de incubación recomendado de alrededor de dos horas. En el caso del ertapenem los picos de masas del metabolito de hidrólisis están perfectamente caracterizados y aparecen en el espectro de masas. No es así en el caso del meropenem y el imipenem. Para solucionar este problema se han planteado dos alternativas. En el caso del meropenem, se ha propuesto el uso del ácido dihidroxibenzoico (DHB) como matriz. Esta matriz permite observar tanto los picos de masas correspondientes al meropenem como al compuesto hidrolizado. El inconveniente de seguir esta metodología es la necesidad de tener una matriz exclusivamente para la realización de este ensayo. Además, el DHB tiene una cristalización menos homogénea que el HCCA, teniendo que realizar lecturas manuales en muchos casos, lo cual dificulta la automatización del proceso y su uso en la rutina. En el caso del imipenem, el hecho de no observar picos de hidrólisis generaba cierta inseguridad, ya que se puede afirmar que el aislado en estudio es sensible, cuando se observan los picos de masas del imipenem, pero cuando los picos de masas del imipenem han desaparecido, y especialmente si estos no han desaparecido pero su intensidad relativa ha disminuido en el espectro, existe la duda de si realmente se ha producido una hidrólisis eficaz o no. Este problema se ha solucionado utilizando un estándar interno en la matriz. El estándar interno es una sustancia con una masa dentro del rango de estudio, con una ionización muy eficiente y reproducible. El estándar interno más utilizado es la reserpina, que permite la cuantificación del grado de hidrólisis del imipenem. Esta cuantificación se expresa a través del logRQ, o logaritmo de la cuantificación de la resistencia. El logRQ corresponde al cociente del área debajo de la curva del pico de masa del estándar interno entre el área debajo de la curva de los picos de masas correspondientes al imipenem. En el MALDI Biotyper IVD (Bruker Daltonik) existe un módulo de resistencias, el MBT STAR-BL IVD *software* que junto con el MBT STAR-Carba IVD Kit permite de forma automatizada la realización de ensayos de detección de carbapenemasas y la emisión de un informe con la identificación del microorganismo junto con el valor positivo o negativo de la hidrólisis del imipenem. La utilización del logRQ se ha extendido para el resto de los antibióticos, utilizándose el cociente de la relación de las áreas del antibiótico hidrolizado entre el antibiótico sin hidrolizar. Esto permite la automatización de la interpretación de la hidrólisis facilitando la utilización de esta técnica para usuarios no expertos en espectrometría de masas.

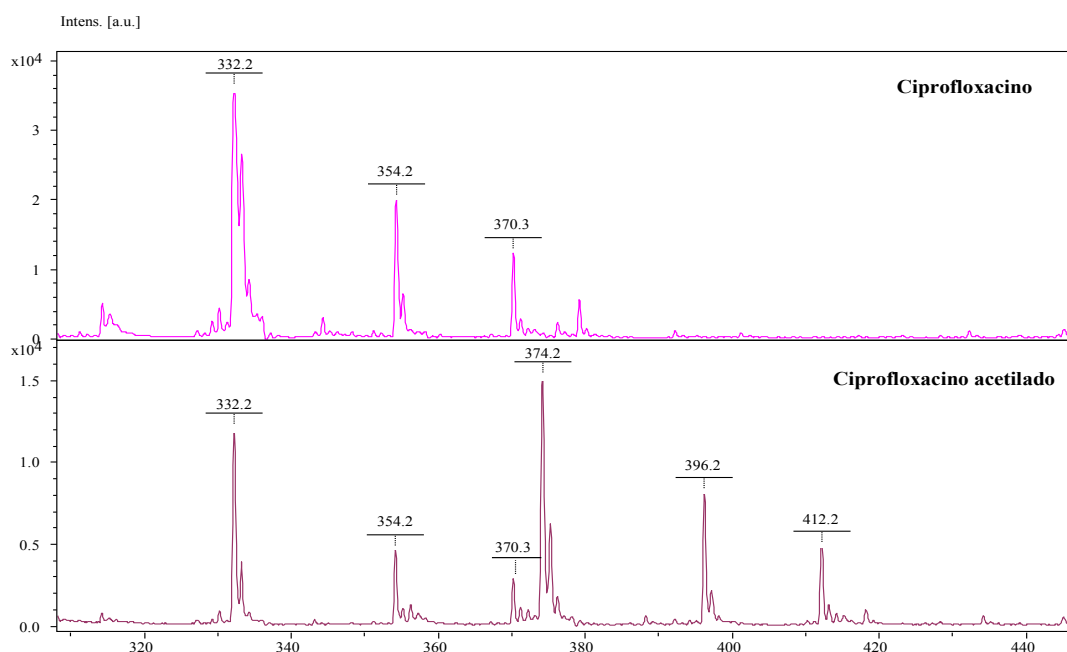
Figura 5. Espectro de masas MALDI-TOF de ceftriaxona y su metabolito de hidrólisis. Las masas señaladas corresponden a las distintas especies iónicas del compuesto.



La ventaja principal de la medida de la actividad enzimática mediante MALDI-TOF es la posibilidad de detectar cualquier tipo de carbapenemasa, incluso aquellas consideradas raras o poco prevalentes (por ejemplo, IMI, GES, FRI, and DIM, etc.) y que no están incluidas en los kits moleculares comerciales

De forma similar al ensayo de detección de la actividad β -lactamasa y carbapenemasa, surge el ensayo de detección de la enzima AAC(6')-Ib-cr, poniendo de relieve la habilidad del MALDI-TOF de detectar cualquier mecanismo de resistencia que suponga un cambio en la masa del antibiótico. La enzima AAC(6')-Ib-cr es el mecanismo de resistencia plasmídico más prevalente en quinolonas. Este mecanismo de resistencia conduce a la acetilación de los antibióticos ciprofloxacino y norfloxacino, de forma que la modificación no supone un cambio de categoría clínica de sensible a resistente por sí mismo, pero si facilita la selección de otros mecanismos de resistencia durante el tratamiento, resultando en una limitación a la hora de abordar las alternativas terapéuticas. En los espectros de masas de los antibióticos descritos, se pueden observar los picos de masas correspondientes a ciprofloxacino y norfloxacino y también a sus formas acetiladas, que corresponden a un aumento de la masa de 43 Da (Figura 6).

Figura 6. Espectro de masas MALDI-TOF de ciprofloxacino y su metabolito acetilado. Las masas señaladas corresponden a las distintas especies iónicas del compuesto.



Este tipo de ensayos tienen la ventaja de ser rápidos y además metodológicamente sencillos de realizar, sin necesidad de estandarización de inóculo, con mínima preparación de reactivos y utilizando el mismo equipo y aplicaciones que utilizaríamos para la identificación bacteriana.

10.2. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO BACTERIANO

En esta aplicación del MALDI-TOF, los microorganismos sensibles y resistentes de una misma especie se diferencian en base a su espectro. Existen picos de masas en el espectro asociados a un patrón de resistencia, debido a la expresión de un péptido o proteína directa o indirectamente relacionado con un fenotipo de resistencia. La presencia de estos picos de masas ayuda a diferenciar entre los microorganismos sensibles y resistentes. Aunque este tipo de técnica se ha aplicado en diversos estudios, conviene validarla en cada institución de forma previa a su aplicación clínica para asegurar la reproducibilidad de los resultados. La principal ventaja de esta técnica es la simplicidad de su metodología, ya que la preparación de la muestra es igual en muchos casos o muy similar a la que se realiza en la identificación de microorganismos.

Los picos de masas o biomarcadores también se pueden identificar automáticamente con un *software* adecuado sin tiempo adicional de procesado. Por el momento sólo hay un *software* comercial en el mercado, el MALDI Biotyper Subtyping *software* module (Bruker Daltonik). El requisito para la automatización del proceso es la identificación del microorganismo con un alto nivel de confianza (score > 2.0). Una vez que el microorganismo ya ha sido identificado, el *software* automáticamente realiza el tipado, comparando el espectro con la librería de referencia y emitiendo un informe final. El módulo permite la identificación de *K. pneumoniae* productora de KPC, mediante la búsqueda del pico de masas a 11.109 Da relacionado con la expresión de la proteína p019. También puede utilizarse para detectar *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), mediante la detección del pico de masas a 2.415 Da que corresponde a la *phenyl* soluble modulina (PSM). Por último, el módulo permite la detección de *B. fragilis* con el gen de resistencia *cfiA* asociado a un patrón de picos de masas concreto. En todos los casos la especificidad del resultado es alta, sin embargo, la sensibilidad dependerá del área geográfica, ya que algunos de los biomarcadores que se buscan para catalogar los aislados en un grupo u otro dependen de la presencia de ciertas proteínas o *cassettes* genéticos que no están presentes de forma universal en todos los aislados.

Utilizando esta metodología también se ha descrito, aunque aún no automatizado, la detección de la presencia de porinas OmpK35, OmpK36 y OmpA en *K. pneumoniae* y OmpA, OmpC, y OmpF en *E. coli*, que hasta el momento se ha realizado fundamentalmente a través de la electroforesis SDS-PAGE, un método largo y laborioso.

En esta línea, se ha publicado recientemente un novedoso método para detectar la resistencia a colistina mediante MALDI-TOF en 15 minutos. El método se ha bautizado como el MALDx-in test. Además, el método es capaz de discriminar entre aislados portadores de la resistencia cromosómica o plasmídica. Se ha estudiado en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. Por el momento no hay estudios clínicos validando la técnica más allá de los descritos por los autores.

10.3. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A TRAVÉS DE LA MEDIDA DE LOS EFECTOS ANTIBIÓTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

En esta aplicación para MALDI-TOF, los microorganismos sensibles y resistentes de la misma especie se diferencian en base a su crecimiento relativo en presencia de un antimicrobiano. Existen dos aproximaciones, la que utiliza isótopos marcados para cuantificar el crecimiento y la que mide el conjunto global de péptidos y proteínas generados en presencia y en ausencia de un antimicrobiano. En ambos casos el procedimiento es muy similar, sin embargo, el uso de isótopos marcados ha relegado este tipo de ensayos a un segundo plano, pasando a utilizarse la segunda aproximación de forma generalizada.

El procedimiento consiste en incubar unas 4 horas, lo suficiente como para poder medir crecimiento microbiano, un cultivo del microorganismo estudiado junto con una solución de antimicrobiano. Pasado ese tiempo se comparará el crecimiento relativo de este microorganismo en la muestra, en relación con la señal del estándar interno que se habría añadido previamente en el cultivo. La ventaja principal de estos ensayos es que se mide la resistencia global del microorganismo al antimicrobiano expuesto, pudiendo esta deberse a mecanismos enzimáticos, bombas de expulsión, porinas, etc. Sin embargo, el inconveniente principal es que el método no puede considerarse como un método rápido, ya que necesita una incubación prolongada y una metodología en general más laboriosa que los métodos de detección de mecanismos de resistencia enzimáticos o de análisis del perfil proteico de la bacteria.

El MBT-ASTRA assay (MALDI Biotyper *antibiotic susceptibility test rapid assay*), que es el nombre con el que se ha designado a este ensayo, cuantifica la generación de pequeños péptidos y proteínas en el espectro. Si un microorganismo es sensible, será incapaz de crecer en presencia del antibiótico, observándose un espectro plano, sin apenas picos de masas. Si por el contrario el microorganismo es resistente, éste crecerá en presencia del antibiótico observándose picos visibles correspondientes a su perfil proteico. Este ensayo se puede realizar incubando la bacteria en un caldo de cultivo junto con el antibiótico en una placa de pocillos, centrifugando posteriormente y depositando el sobrenadante sobre la tarjeta MALDI-TOF. El procedimiento se ha ido simplificando hasta llegar a la incubación de la bacteria junto con el antibiótico, en los propios micropocillos de la tarjeta MALDI-TOF dentro de una cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, el caldo de cultivo se separa de las células microbianas con un papel de filtro absorbente. A continuación, se añade la

matriz y se procede a la lectura de los espectros. La ratio de crecimiento se mide calculando el área debajo de la curva de los picos de masas del perfil proteico del microorganismo generado en presencia del antibiótico entre los picos de masas generados en ausencia de antibiótico. Este tipo de ensayo se ha realizado tanto de bacterias en cultivo como directamente del hemocultivo y se han evaluado distintos antibióticos como piperacilina, oxacilina, cefotaxima, meropenem, gentamicina, ciprofloxacino y vancomicina con buenos resultados.

Este procedimiento no sólo se ha aplicado en bacterias, sino que también se ha estudiado la sensibilidad de micobacterias y hongos filamentosos con buenos resultados, aunque la cantidad de biomasa necesaria y la laboriosidad de la técnica en estos microorganismos no parece que la convierta en una técnica con posible aplicación clínica.

La resistencia antimicrobiana es un proceso complejo, que es resultado de un conjunto de variables como las mutaciones cromosómicas, adquisición de determinantes de resistencia, diferentes niveles de expresión, bombas de expulsión, porinas, etc. El MALDI-TOF no va a reemplazar a ninguna de las técnicas ya existentes para la detección de la resistencia antimicrobiana, pero su uso se puede convertir en un valor añadido, ya que permite adelantar una información muy valiosa con respecto al tratamiento antimicrobiano a un bajo coste.

11. ESTUDIOS DE TIPIFICACIÓN MEDIANTE MALDI-TOF

Los sistemas de tipificación bacteriana, permiten diferenciar cepas pertenecientes a una misma especie que poseen determinados vínculos epidemiológicos. Los métodos de tipificación deben cumplir una serie de requisitos esenciales, como son el presentar un elevado poder discriminatorio, presentar estabilidad a lo largo del tiempo, ser altamente reproducibles, rápidos y de bajo coste. En la actualidad existen una gran variedad de técnicas de tipificación molecular, aunque las más utilizadas son la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y el *multilocus sequence typing* (MLST). Estas técnicas son laboriosas, requieren personal entrenado y su nivel discriminatorio no es suficiente en algunas especies. Las nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva, son técnicas con un excelente nivel discriminatorio y que ofrecen el máximo nivel de información. Sin embargo, por el momento, su utilidad es limitada ya que el precio es elevado, necesitan personal especializado y entrenado y recursos informáticos para el análisis de la información generada.

La gran especificidad de los espectros de proteínas obtenidos mediante MALDI-TOF ha permitido realizar estudios de comparación de poblaciones y de identificación de clones epidemiológicos. El análisis epidemiológico se puede realizar mediante comparación de los espectros generados con una librería construida con aislados caracterizados molecularmente. Esta comparación se realiza mediante aproximaciones bioinformáticas con complejos algoritmos matemáticos. También se puede realizar el tipado o caracterización proteica de un microorganismo a través de la identificación de pequeños péptidos o proteínas que aparecen en el espectro de masas. La presencia/ausencia de determinados picos de proteínas utilizados como biomarcadores y con ciertas características microbiológicas, pueden llegar a identificar clones epidemiológicos e incluso ser marcadores de resistencia a ciertos antimicrobianos.

Esta capacidad de MALDI-TOF abre un nuevo campo de investigación que puede permitir la detección de características importantes de un aislado como puede ser su sensibilidad antibiótica en unos pocos minutos y de manera coste-eficaz, ya que el procesamiento de la muestra sería el mismo que se seguiría para la identificación. Además, desde el punto de vista epidemiológico, la utilización del MALDI-TOF como herramienta de tipado supondría un importantísimo avance en el control de la infección, de forma que se podrían detectar brotes de forma rápida y eficaz ya que dispondríamos de la información a tiempo real. Aunque, por el momento, la información obtenida mediante MALDI-TOF requiere confirmación a través de técnicas moleculares mucho más lentas, la espectrometría de masas supondría una primera línea de actuación que permitiría la toma de decisiones de forma temprana y con un gran impacto posterior.

Independientemente del enfoque que se utilice, el factor más limitante para el tipado de microorganismos mediante MALDI-TOF es la reproducibilidad. Por ello, hay que tener especial cuidado cuando se analizan muestras con este fin, de mantener siempre las mismas condiciones de trabajo, como el tiempo de incubación o el medio de cultivo. Recientemente se ha publicado un procedimiento de análisis

sis estandarizado de cepas mediante MALDI-TOF que consiste en el estudio por triplicado de muestras que se sitúan en dos pocillos diferentes, de modo que se van a generar 6 espectros por muestra. Esto va a permitir, incluso de manera visual, eliminar los espectros que se desvían de la media (“outliers”) y definir el espectro estándar de un tipo de población microbiológica. Los resultados obtenidos han demostrado que el método de tipado mediante MALDI-TOF es reproducible si se cumplen los protocolos de estandarización y además es muy sencillo de desarrollar. La realización del tipado mediante MALDI-TOF, no necesita personal altamente cualificado para llevarlo a cabo. Un entrenamiento básico en el manejo del equipo y en las técnicas de extracción proteica serían suficientes para poder llevarlo a cabo.

Cuando el número de muestras analizadas es bajo, se puede llevar a cabo un análisis visual de los espectros de proteínas, especialmente cuando los biomarcadores de cada población que se busca están ya establecidos. Este estudio visual de picos de masas se puede realizar en el caso del MALDI BioTyper (Bruker Daltonik) mediante el uso del *software* FlexAnalysis y también se pueden utilizar otros programas de acceso libre. Estos programas permiten comparar distintos espectros de proteínas y buscar diferencias entre ellos. Este tipo de estudios se recomiendan cuando se analizan pocas muestras porque permite la detección de la presencia/ausencia de biomarcadores proteicos de manera sencilla, sin la necesidad de complicados algoritmos matemáticos.

En el caso de que se requiera analizar un gran número de muestras o cuando se buscan diferencias entre varias poblaciones, es necesario un análisis bioestadístico mucho más desarrollado a través de distintos algoritmos matemáticos, como pueden ser los dendogramas o las matrices de correlación. Para ello, existen *softwares* específicos de análisis como puede ser BioNumerics (Applied Maths, bioMérieux) o MALDIquant (<http://strimmerlab.org/software/maldiquant/>). En general estos programas de análisis de espectros de proteínas que permiten un análisis exhaustivo de muestras emplean el lenguaje R, por lo que es necesario contar con bioinformáticos para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos.

Hasta el momento, la aplicación de MALDI-TOF para el tipado de bacterias ha permitido identificar clones de *P. aeruginosa* productores de brotes, asociar aislados de *C. difficile* con su correspondiente ribotipo, asignar la presencia de una proteína codificada mediante plásmido con los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a un clon, la identificación de especies muy próximas entre sí y otros. Por el momento todos los estudios están en fase de investigación, y no cuentan aún con una aplicación clínica rutinaria en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para su posible implementación, aún son necesarios más estudios y un nivel de estandarización mayor que el actual, que permitan su validación clínica.

Una de las ventajas principales de esta metodología es que los datos obtenidos de manera local se pueden compartir y comparar a escala global mediante la aplicación de una metodología estandarizada, dando lugar a una fotografía global de la distribución actual de distintos clones de especial interés clínico. La otra ventaja fundamental es el tiempo de respuesta, que comparado con las técnicas actuales de tipado molecular como el PFGE o el MLST es una técnica mucho más rápida y mucho menos laboriosa. Por otro lado, si se compara con las técnicas de secuenciación masiva, el MALDI-TOF sería una técnica mucho más barata. Obviamente, el nivel de información generado es limitado, pero podría ser una herramienta complementaria para actuar en un primer nivel a la espera de una confirmación posterior. También en el caso de hospitales de primer o segundo nivel, son técnicas más fáciles de implementar y que consumen menos recursos, tanto económicos como de personal cualificado si se comparan con las técnicas moleculares.

Para la aplicación clínica de esta técnica, en el caso del que el propósito del estudio ya haya sido descrito con anterioridad, simplemente hay que comparar los espectros de masas de los aislados en estudio con los descritos en la literatura o en una librería de espectros de referencia. Aun así, es importante confirmar previamente la reproducibilidad de los resultados descritos con cepas conocidas de cada área geográfica correspondiente. En el caso de que se quieran realizar estudios de tipado de microorganismos no descritos en la literatura con anterioridad, es imprescindible que los aislados a estudio estén perfectamente caracterizados molecularmente.

A nivel comercial, como ya se ha comentado anteriormente en el apartado de resistencias, el único *software* con interpretación automatizada de los espectros proteicos y que proporciona una información extra, además de la identificación en relación a la aparición de ciertos biomarcadores proteicos para el tipado es el MALDI Biotyper Subtyping *software module* (Bruker Daltonik). Este módulo permite la diferenciación

entre *Mycobacterium chimaera* y el complejo *Mycobacterium intracellulare* y la diferenciación de *L. monocytogenes* de especies próximas con una alta sensibilidad y especificidad. El potencial de las técnicas de tipado mediante MALDI-TOF es inmenso por lo que creemos que será uno de los puntos que más desarrollo experimente en el futuro cercano.

12. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN LA DETECCIÓN DE GENES O MARCADORES DE VIRULENCIA

El hecho de que muchos de los factores de patogenicidad bacterianos sean proteicos, obliga a plantearse la posibilidad de que sean detectables mediante MALDI-TOF, lo que podría aportar, de forma rápida y sencilla, una información muy valiosa en algunas infecciones. Sin embargo, es un extremo que hasta ahora ha sido poco explotado con esta tecnología. Algunas de las principales limitaciones son la sensibilidad de la técnica (requiere una cantidad de proteína relativamente grande) o el tamaño de la proteína, que puede obligar a mover la ventana de detección que utiliza por defecto el espectrómetro para la identificación, y que corresponde básicamente al tamaño de las proteínas ribosómicas.

Aun así, se han realizado algunos estudios al respecto. En relación a la detección de la leucocidina de Pantón-Valentine en *S. aureus*, la presencia de un pico con un cociente m/z de 4.448 parece detectar la presencia de esta proteína con una alta sensibilidad, aunque con una especificidad mejorable (77%). No obstante, no se han realizado estudios posteriores que corroboren este hallazgo. Posteriormente se han realizado publicaciones aisladas sobre detección de otras toxinas, como la toxina binaria de *C. difficile*, que en general no han tenido demasiada repercusión en cuanto a su introducción en clínica. Más recientemente se han descrito métodos para detectar la neurotoxina de *Clostridium botulinum*, el factor letal de *Bacillus anthracis* y la toxina Shiga, aunque en muchos casos lo complejo del método de preparación de la muestra hace poco probable que llegue a tener alguna utilidad clínica.

Se trata de un campo que no tiene la amplitud de aplicación, ni probablemente la repercusión clínica inmediata que tienen otros campos como la identificación o, potencialmente, los estudios de sensibilidad si llegan a concretar las perspectivas actuales. Tampoco juega a su favor la disponibilidad de métodos inmunoenzimáticos, como las inmunocromatografías, rápidos, fiables y baratos. En este aspecto diagnóstico, la espectrometría de masas MALDI-TOF podría tener cierta utilidad en la medida en que no requiera una intervención específica más allá del perfil generado para la identificación. La necesidad de intervenciones adicionales sobre la muestra o sobre el propio equipo para esta aplicación específica, probablemente reduzca mucho su capacidad de competir con los métodos inmunoenzimáticos.

13. RETOS FUTUROS Y LIMITACIONES EN LA APLICACIÓN DEL MALDI-TOF EN LA RUTINA DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

La velocidad a la que está evolucionando la tecnología aplicada al diagnóstico de las enfermedades infecciosas hace difícil hacer previsiones de futuro, ya que factores que son determinantes para la implementación en clínica de estas técnicas, como reproductibilidad, automatización o coste, pueden evolucionar muy rápidamente.

Si se compara la espectrometría de masas MALDI-TOF con otras técnicas rápidas modernas, fundamentalmente las técnicas moleculares, ésta se puede considerar en buena parte como una técnica complementaria, ya que, aunque ambas se pueden incluir en el epígrafe de “diagnóstico rápido” con una altísima especificidad, las técnicas moleculares son técnicas en las que prima la sensibilidad, ya que son capaces de detectar, y en su caso cuantificar, cantidades ínfimas de genoma y además se pueden realizar a partir de muestra directa. Sin embargo, el espectro de microorganismos que son capaces de identificar de forma simultánea es limitado. Las técnicas *multiplex* sindrómicas, muy en boga en este momento, son capaces de identificar de manera simultánea un número de especies o géneros en el orden de las decenas. Por el contrario, la espectrometría de masas MALDI-TOF no puede competir en sensibilidad de detección con las técnicas moleculares, pero el espectro de microorganismos que se pueden identificar de forma simultánea es mucho más amplio. A favor del MALDI-TOF

también cuenta el bajo coste de cada determinación en comparación con las técnicas moleculares. Sin embargo, estas limitaciones pueden cambiar en el futuro. Por un lado, se considera que la biomasa mínima para obtener una identificación fiable mediante MALDI-TOF está en torno a 10^5 microorganismos, aunque estudios recientes sugieren que el aerosol MALDI-TOF puede reducir este umbral hasta 10^2 microorganismos, lo que supondrá un avance significativo. Por otro lado, las técnicas moleculares con la secuenciación masiva a la cabeza de un desarrollo espectacular, harán posible la secuenciación de genomas completos en minutos en dispositivos portátiles y a cada vez menor coste.

Otro reto importante es la diferenciación entre especies muy próximas entre sí, aunque éste probablemente sea un reto fácil de conseguir a medida que se consiga una mejora de las bases de datos. El desarrollo de la metodología de tipado, un tanto dubitativo hasta el momento, y la clarificación de lo que esta tecnología puede dar de sí con respecto a la tecnología molecular en este aspecto es también un campo con mucho recorrido, como lo es también el desarrollo de diferentes planteamientos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos, aspectos ambos contemplados en otros apartados de este documento.

Sin embargo, el principal desafío en este momento, probablemente, es la traducción de estas mejoras tecnológicas en una mejor atención al paciente, derivada de un diagnóstico más rápido y exacto, y de un tratamiento basado en el antibiograma que no se retrase más allá de unas pocas horas con respecto al diagnóstico etiológico.

14. CONCLUSIONES

El aprovechamiento óptimo de las posibilidades que nos ofrece la espectrometría de masas MALDI-TOF en su nivel de desarrollo actual, junto con el resto de técnicas de diagnóstico rápido disponibles, plantea un reto fundamental desde el punto de vista científico-técnico, pero también desde el punto de vista organizativo de la Microbiología Clínica. El diagnóstico rápido debe ser una de las prioridades estratégicas de todos los servicios clínicos y debe estar incluido en un sistema multidisciplinar en el que la unidad de MALDI-TOF tenga una comunicación fluida y continuada con las distintas secciones del laboratorio de Microbiología para satisfacer la demanda diagnóstica que surja en el día a día.

Es un hecho que la integración del MALDI-TOF en los laboratorios de Microbiología Clínica, ha supuesto una revolución en la forma de trabajo. Aunque algunos de los métodos descritos en este procedimiento no hayan sido aún validados para su uso clínico, el potencial que poseen las nuevas aplicaciones para irse incorporando a la rutina del laboratorio es inminente. Los microbiólogos queremos sacar más provecho de la espectrometría de masas y ya no sólo buscamos la identificación bacteriana de muestras en cultivo, sino que queremos realizar la identificación directa de muestras clínicas, la detección de resistencias antimicrobianas, el tipado de microorganismos, etc. La versatilidad del MALDI-TOF hace posible que poco a poco vayamos incorporando nuevas aplicaciones a las ya establecidas y que sean rápidamente aceptadas por los usuarios.

Por otro lado, el abanico de cuadros y síndromes que actualmente podemos abordar con técnicas diagnósticas rápidas y fiables obliga a un replanteamiento radical de la actividad de los Servicios de Microbiología. En el momento actual se ha producido la confluencia de una serie de cuestiones, como son el enorme problema de la resistencia a los antimicrobianos, la necesidad de luchar contra ella entre otras medidas, mediante una racionalización y optimización del uso de los fármacos, y el desarrollo de las técnicas diagnósticas rápidas en Microbiología Clínica, que deben servir para potenciar el papel de la Microbiología en los hospitales. La Microbiología Clínica no puede seguir viéndose como una disciplina cuyos resultados se cifran en días, o incluso en semanas. Es inexcusable avanzar hacia Servicios de Microbiología Clínica con una actividad continuada en el tiempo (24/7/365), lo que requiere un replanteamiento de los horarios de trabajo y de la dotación de personal, y una independencia funcional de la que, desafortunadamente, es frecuente que la Microbiología Clínica carezca, sobre todo en centros de tamaño medio/pequeño. Las grandes ventajas en cuanto a coste-efectividad de las nuevas técnicas rápidas en general, y de la espectrometría de masas MALDI-TOF en particular, solo será posible concretarlas al 100% si se dan estas condiciones.

Finalmente, esperamos que en este procedimiento hayan encontrado una guía práctica para poder incorporar en la rutina de los laboratorios de Microbiología las nuevas aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceyskens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:599-603.
2. Broyer P, Perrot N, Rostaing H, Blaze J, Pinston F, Gervasi G, Charles MH, Dachaud F, Dachaud J, Moulin F, Cordier S, Dauwalder O, Meugnier H, Vandenesch F. An automated sample preparation instrument to accelerate positive blood cultures microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry (Vitek(®)MS). *Front Microbiol*. 2018; 9:911.
3. Calderaro A, Piergianni M, Montecchini S, Buttrini M, Piccolo G, Rossi S, Arcangeletti MC, Medici MC, Chezzi C, De Conto F. MALDI-TOF mass spectrometry as a potential tool for *Trichomonas vaginalis* identification. *BMC Infect Dis*. 2016; 16:261.
4. 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.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for the identification of cultured microorganisms using Matrix-Assisted Laser desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. 1st ed. CLSI guideline M58. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
6. De Hoffmann E, Stroobant V. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed. Wiley and Sons. Estados Unidos 2007.
7. Dupont D, Normand AC, Persat F, Hendrickx M, Piarroux R, Wallon M. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2018; pii: S1198-743X(18)30716-X. [Epub ahead of print]
8. Gallegos-Candela M, Boyer AE, Woolfitt AR, Brumlow J, Lins RC, Quinn CP, Hoffmaster AR, Meister G, Barr JR. Validated MALDI-TOF-MS method for anthrax lethal factor provides early diagnosis and evaluation of therapeutics. *Anal Biochem*. 2018; 543:97-107.
9. Griffiths PR, De Haseth JA. 2007. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2nd ed. Wiley and Sons. United States 2007.
10. Hernández Egido S, Luis Reboredo A, García Señán A, Gil González AB, Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM, Sánchez-Juanes F. Summation of peaks and L34 ribosomal protein in the presence and absence of antibiotics enables susceptibility testing using MALDI-TOF mass spectrometry in 2h from *Escherichia coli*-positive blood cultures. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018; pii: S0213-005X(18)30230-1. [Epub ahead of print]
11. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16:318.
12. Mallecot YH. Work procedures in MALDI-TOF technology. In: *The use of mass spectrometry technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. Cobo F. (ed). London Academic Press 2018. London, United Kingdom. ISBN: 978-0-12-814451-0.
13. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, Vranckx K, Egli AI. The technical and biological reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass

Spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing: employment of bioinformatics in a multicenter study. *PLoS One*. 2016; 11:e0164260.

14. Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, Weisser M, Egli A. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2017. 23:78-85.

15. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B, Gómara M, Alcalá L, Zvezdanova E, Ruíz A, Velasco D, Gude MJ, Bouza E, Bou G. Direct identification of clinical pathogens from liquid culture media by MALDI-TOF MS analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:624-629.

16. 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; 32(1).

17. Perry MJ, Centurioni DA, Davis SW, Hannett GE, Musser KA, Egan CT. Implementing the Bruker MALDI Biotyper in the public health laboratory for *C. botulinum* neurotoxin detection. *Toxins* 2017; 9; 9.

18. Pliakos EE, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. The cost-effectiveness of rapid diagnostic testing for the diagnosis of bloodstream infections with or without antimicrobial stewardship. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31:pii: e00095-17.

19. Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. *J Med Microbiol*. 2017; 66:670-677.

20. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O421-427.

21. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2017; 55:369-379.

22. Zvezdanova ME, Escribano P, Ruiz A, Martínez-Jiménez MC, Peláez T, Collazos A, Guinea J, et al. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. *Med Mycol*. 2019; 57:63-70.

23. Fan WT, Qin TT, Bi RR, Kang HQ, Ma P, Gu B. Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for a rapid identification of streptococci: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017. 36:1005-1012.

24. 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.

25. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36:380-407.

26. Singhal N, Kumar M, Viridi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology* 2016; 143:1491-1500.

27. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol*. 2016; 11:549-566.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MT-01

Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este PNT es definir el proceso de identificación de microorganismos (bacterias, micobacterias, *Actinomycetales*, levaduras y hongos filamentosos) utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF. Los distintos métodos disponibles para dicho fin se detallan en este PNT.

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) permite realizar la identificación de distintas especies de microorganismos mediante comparación de los espectros de proteínas obtenidos por ionización suave de las muestras con un láser de nitrógeno (337 nm) y la base de datos que contiene los espectros de proteínas específicos de cada una de las especies de microorganismos más frecuentemente encontrados en la práctica clínica. El espectrómetro de masas consta de un láser que incide sobre la muestra a la que se le ha añadido una matriz orgánica y que funciona como fuente de ionización, un tubo de vacío por donde se desplazan los iones generados por la energía del láser, a distinta velocidad según su masa, y un detector de estos iones, ubicado al final del tubo de vacío. Además, los espectros de proteínas generados se comparan con la base de datos que contiene espectros de referencia específicos de las especies de microorganismos más frecuentemente detectadas en el laboratorio de Microbiología.

En este documento se recoge la metodología a seguir para llevar a cabo la identificación de bacterias, micobacterias, levaduras y hongos filamentosos adaptados a los equipos MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania). En el caso de disponer de un equipo Vitek MS (Biomérieux, Francia) la adquisición y posterior procesamiento de los espectros deberá ser adaptado a estos equipos siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Se utilizarán como documentos de consulta los manuales de uso facilitados por el fabricante del sistema MALDI-TOF disponible en cada laboratorio. Por ejemplo:

- MALDI Biotyper User Manual 3.1
- Manual de Vitek MS (bioMérieux).
- VITEK® MS MYCOBACTERIUM / NOCARDIA KIT
- VITEK® MS MOULD KIT

4. MUESTRAS

Las muestras se obtendrán directamente a partir de un reducido número de colonias crecidas en placas de agar (1-3 colonias) cuando se aplique el método directo de detección. Para realizar la identificación de un microorganismo a partir de un extracto de proteínas se obtendrá una pequeña cantidad de biomasa con un asa estéril de 1 µl.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 Reactivos

Para la realización de la técnica son necesarios:

- Etanol absoluto calidad HPLC.
- Agua destilada calidad HPLC.
- Ácido fórmico.
- Acetonitrilo.
- Ácido trifluoroacético (TFA).
- Bolas de cristal o zirconia/sílice de 0,5 mm de diámetro (BioSpec).
- Matriz orgánica (HCCA).
- Bacterial test standard (BTS, Bruker).

5.2 Preparación de reactivos

A) Extracción de proteínas

Ácido fórmico al 70%:

- En un tubo eppendorf de 1,5 mL, mezclar 700 µL de ácido fórmico y 300 µL de agua HPLC. Agitar en vórtex.

B) Preparación de la matriz y del calibrador

Solvente orgánico (2,5 % TFA, 50% acetonitrilo):

- En un tubo eppendorf de 1,5 mL mezclar 475 µL de agua HPLC, 500 µL de acetonitrilo y 25 µL de TFA. Agitar en vórtex.
- Se utiliza para la reconstitución de la matriz liofilizada.
- Conservar a temperatura ambiente hasta pasados 15 días de su preparación.

Solución de matriz

- Añadir 250 µL de solvente orgánico a un tubo de matriz liofilizada. Agitar en vórtex 2-3 minutos hasta la disolución completa de los cristales.
- La matriz liofilizada se conserva en nevera (2-4°C). La matriz reconstituida se conserva a temperatura ambiente y resguardada de la luz hasta transcurrida una semana tras su preparación.

Solución *Bruker Bacterial Test Standard* (BTS)

- Reconstituir el BTS liofilizado con 50 µL de solvente orgánico con la pipeta automática, aspirando y expulsando el contenido al menos 20 veces. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y repetir el proceso. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm y hacer alícuotas de 5-10 µL con el sobrenadante.
- Tanto el BTS liofilizado como el producto reconstituido se conservan a -20°C.

C) Limpieza de la placa

Ácido trifluoroacético (TFA) al 80%

- En un tubo eppendorf de 1,5 mL mezclar 800 µL de TFA con 200 µL de agua HPLC. Agitar con el vórtex.

Nota: utilizar siempre guantes para el manejo de ácidos corrosivos. Conviene utilizar una campana de químicos (o en su defecto de flujo laminar) para el manejo del TFA.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas
- Puntas de pipeta
- Asas de siembra estériles (1 µL)
- Asa de siembra metálica
- Gradillas
- Tubos de plástico de 1,5 mL
- Tubos Falcon de 50 mL
- Vórtex
- Microcentrífuga

6.1. CALIBRACIÓN

En el caso del MALDI-TOF Biotyper la tarjeta contiene 96 pocillos, si se trabaja con la versión IVD se puede situar el pocillo para la calibración y control en cualquier punto. Sobre este pocillo se realizarán 8 calibraciones consecutivas que tendrán una duración aproximada de 1 minuto. Una vez que se ha calibrado el equipo, se procede a la lectura del resto de muestras. El pocillo de calibración, también sirve como control ya que nos dará un resultado de identificación al igual que para el resto de muestras de esta tanda.

Si se trabaja en modo RUO, recomendamos que para asegurar la calidad de los resultados que se obtienen en el MALDI-TOF, en cada proyecto que se vaya a ejecutar, uno de los pocillos se utilice para la calibración. Esta calibración se podrá hacer de forma automática antes de empezar la lectura de las muestras. En todo caso esta calibración se realizará al menos diariamente.

6.2. MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA

El usuario debe asegurarse de que se cumplen los siguientes requisitos para poder tener el equipo en correcto funcionamiento:

- a) El MALDI-TOF debe permanecer siempre encendido. Si se apaga se perderá el vacío, que es una condición fundamental para su funcionamiento. Cuanto más tiempo permanezca el equipo sin vacío, más tiempo necesitará para recuperarlo.
- b) Cuando se abra y se cierre la entrada de la tarjeta hay que asegurarse de que las juntas de cierre están perfectamente limpias. Sino lo están, se limpiará con una gasa o torunda empapada en alcohol al 70%. Además, diariamente es necesario pasar un dedo por la superficie de la junta para engrasarla y que el sellado sea eficaz. Es importante que esto se realice con la mano sin guantes.
- c) Una vez que la tarjeta está dentro del equipo, hay que vigilar que todos los parámetros están dentro de los rangos de trabajo y que no hay ningún aviso de alarma.
- d) Es necesario llevar un control de la limpieza de la fuente de ionización. En los equipos antiguos, la limpieza de la fuente se realiza de forma exclusivamente manual por parte del técnico del equipo cuando llega a un porcentaje de suciedad en torno al 80-90 %. En ningún caso debería sobrepasar el 100%. En la actualidad algunos equipos permiten la limpieza de forma automática, con un botón de accionado por parte del usuario. Es recomendable realizar esta limpieza semanalmente, en este proceso se tarda aproximadamente 15 min. Durante este tiempo no se puede utilizar el equipo. Aunque esta limpieza ayuda a tener la fuente en mejor estado de forma continuada, no es tan eficaz como puede ser la limpieza manual, por tanto, se recomienda que igualmente se sigan realizando como mínimo dos limpiezas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

manuales al año, de forma paralela a la revisión general del equipo por parte del técnico.

e) Es fundamental llevar al día las actualizaciones de los métodos de trabajo según las recomendaciones del fabricante.

f) Se deben hacer constar en un registro los mantenimientos, reparaciones y actualizaciones que se efectúen sobre el equipo, manteniendo la documentación relativa a los mismos para garantizar la máxima calidad de los resultados emitidos.

g) Además, el usuario deberá asegurarse de que la limpieza de la tarjeta es óptima. A continuación, se describirá el proceso de limpieza para las tarjetas metálicas:

1. Cubrir la placa con etanol al 70% e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, frotar la superficie suavemente con un papel bajo el grifo y repetir el proceso. Secar la placa.
2. Depositar 100 µL de TFA al 80% sobre la placa y distribuirlo por su superficie frotando energicamente con un papel suave. Realizar esta operación con guantes, sobre papel de filtro y en campana de flujo laminar.
3. Dejar secar la placa al menos 15 minutos a temperatura ambiente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE BACTERIAS

Para la identificación directa de bacterias crecidas en medio sólido, transferir las colonias a analizar a un pocillo de la placa de MALDI-TOF con un palillo de madera, punta de pipeta o con un asa de 1 µL, haciendo una extensión homogénea. Añadir 1 µL de matriz reconstituida y dejar secar a temperatura ambiente antes de introducir la placa en el espectrómetro.

Este proceso es válido para la mayoría de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de interés clínico. Sin embargo, en algunas bacterias Gram-positivas y levaduras conviene realizar una extracción *in-target*, añadiendo 1 µL de ácido fórmico al 70% al pocillo tras hacer la extensión y dejando secar a temperatura ambiente antes de depositar la matriz. Este proceso mejora las probabilidades de obtener una identificación exitosa en microorganismos difíciles de lisar.

Es preferible utilizar cultivos jóvenes (24-48 horas) para obtener buenos resultados de identificación. La intensidad de los picos generados en el aparato desciende conforme avanza la edad del cultivo, aumentando la probabilidad de no obtener una identificación fiable. Del mismo modo, la presencia de endosporas en algunos grupos (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) interfiere con la generación de espectros de masas.

La composición de algunos medios de cultivo también puede interferir con los resultados de identificación, es preferible siempre utilizar medios sin inhibidores de crecimiento.

7.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

El protocolo de extracción completa de proteínas resulta útil para la identificación de bacterias difíciles de lisar mediante métodos más suaves, tales como algunas bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas encapsuladas o mucosas y levaduras:

- Tomar una pequeña porción de biomasa con un asa de 1 µL y resuspenderla en un tubo eppendorf de 1,5 mL con 300 µL de agua HPLC.
- Añadir 900 µL de etanol absoluto, vortear y centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

- Eliminar completamente el sobrenadante mediante decantación y aspiración con micropipeta. De manera opcional, puede dejarse secar el pellet a temperatura ambiente antes de continuar con el proceso, para evitar interferencias en el análisis por parte del etanol.
- Resuspender el *pellet* resultante con 20-50 µL de ácido fórmico al 70% (volumen variable en función de la cantidad de biomasa).
- Añadir el mismo volumen (20-50 µL) de acetonitrilo, vortear y centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos.
- Depositar 1 µL del sobrenadante sobre un pocillo de la placa de MALDI-TOF, dejar secar a temperatura ambiente, añadir la matriz e introducir en el espectrómetro para su análisis.

7.3. IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS Y ACTINOMYCETALES

La presencia de una pared celular dura en el caso de micobacterias no tuberculosas (MNT), *Nocardia* spp. o *Streptomyces* spp. hace necesaria su ruptura y la extracción de las proteínas citoplásmicas para su correspondiente detección e identificación mediante MALDI-TOF. Para ello existen protocolos ya estandarizados como el MycoEX, desarrollado por Bruker y ampliamente utilizado. También se han utilizado otros métodos de ruptura mecánica como la agitación a alta velocidad con bolas de sílice (Ceyssens *et al.*, 2017) o la ruptura mediante sonicado (Alcaide *et al.*, 2018).

En todos los casos:

- Se parte de una pequeña cantidad de biomasa recogida con un asa estéril de 1 µL de la superficie del medio sólido de crecimiento o de 1-1,5 mL del fondo del tubo en el caso de tratarse de medio líquido. En el segundo caso, la muestra se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 rpm.
- El pellet se resuspende en 300 µL de agua destilada en ambos casos –medio sólido y líquido- y se inactiva durante 30 minutos a 95°C.
- Una vez que la muestra se ha enfriado, se añaden 900 µL de etanol absoluto. A partir de este paso ya se puede trabajar en laboratorios de seguridad biológica de nivel 2.
- La muestra se centrifuga brevemente, se elimina todo el etanol y el pellet se deja secar unos minutos.
- A partir del pellet seco se realiza la extracción de proteínas citoplásmicas mediante la adición de 10-50 µL de acetonitrilo y 10 µL de bolas de 0,5 mm de diámetro de zirconia/sílice o de cristal (BioSpec).

A partir de este paso, se puede seguir el protocolo MycoEx (Bruker Daltonik):

- La muestra se agita en un vórtex durante 1 minuto
- Se añade un volumen de acetonitrilo equivalente a la cantidad de pellet y seguidamente se añade el ácido fórmico en el mismo volumen.
- La muestra se agita de nuevo en un vórtex durante 10 segundos
- Se centrifuga a máxima velocidad durante 2 minutos.
- Se pipetea 1 µL del sobrenadante en la placa de MALDI-TOF y se deja secar antes de cubrir la posición con 1 µL de matriz HCCA (preparada según las instrucciones del fabricante).
- Cada muestra se analiza al menos por duplicado.

A partir de la adición de acetonitrilo y bolas de zirconia/sílice o cristal, también se puede someter la muestra a sonicación o a agitación a alta velocidad (Alcaide *et al.*, 2018).

En el caso del sistema Vitek MS, se ha desarrollado un kit comercial (VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NO-CARDIA KIT) que permite la preparación de muestras de MNT y también de aislados del género *Nocardia*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

7.4. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS

En el caso de las levaduras, su identificación se puede realizar directamente con una extracción *in-target*, colocando una pequeña cantidad de levadura desde una colonia y cubriéndola primero con 1 µL de ácido fórmico 100% y posteriormente con 1 µL de matriz, siguiendo el mismo procedimiento que para los aislados bacterianos.

Por su parte, la identificación de hongos filamentosos se realiza del siguiente modo:

- Se recoge una pequeña porción de hifas del borde de la colonia crecida en agar Sabouraud o en agar Patata después de 1-2 días de crecimiento (algunas especies requieren hasta 4 días de crecimiento). Se recomienda levantar las hifas del agar con un asa metálica o, en su defecto, con un asa de plástico a la que se haya cortado la parte final. De esta manera se puede separar mejor el hongo del agar.
- El aislado se deposita en un tubo de 1,5 mL y se añaden 250 µL de etanol 100%.
- La mezcla se agita en un vórtex durante 15 minutos.
- Después se centrifuga a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- Se retira todo el sobrenadante y se deja secar bien el pellet.
- Se realiza una extracción de proteínas estándar con ácido fórmico y acetonitrilo en proporción 1:1 siguiendo el protocolo detallado para bacterias.

Se recomienda analizar cada muestra por duplicado o triplicado, sobre todo en el caso de especies con las que no se tiene experiencia previa.

Recientemente, bioMérieux ha lanzado el kit VITEK® MS MOULD para la preparación de muestras de hongos filamentosos de manera eficaz para su identificación mediante MALDI-TOF.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El *software* Biotyper realiza la identificación automática de los resultados a medida que se van analizando. Este software tiene un código de colores para la interpretación de los scores (verde para score mayor de 2,0; amarillo para score entre 1,99 y 1,7 y rojo para valores inferiores a 1,7). Scores mayores de 2,3 se interpretan como “resultados altamente fiables a nivel especie”; entre 2,3 y 2,0 como “identificación segura hasta el nivel de género y probable hasta el de especie”; entre 1,99 y 1,7 como “probable identificación a nivel de género” y por debajo de 1,7 se consideran resultados no fiables. Sin embargo, en general estos valores de corte se pueden interpretar y, globalmente se aceptan valores inferiores igualmente válidos, especialmente en el caso de las micobacterias, como se explica más abajo. También, existen tres categorías (A-C) en las que se agrupan los resultados como sigue: A, cuando las diez identificaciones con mayor score son mayores de 2,0 y además idénticas; B, cuando estas identificaciones son al menos mayores de 1,7 e idénticas o pertenecientes al mismo género y C, cuando no existe correlación entre las identificaciones.

Debido a la dificultad que ha supuesto identificar algunos microorganismos, como micobacterias y levaduras, mediante MALDI-TOF, los distintos sistemas de espectrometría de masas han ajustado los puntos de corte. La identificación se considera aceptable hasta el nivel de especie si se obtiene la misma identificación para los duplicados de la misma muestra y dentro de las diez identificaciones para cada posición. Además, esta identificación se considera de “alta confianza” si su score es $\geq 1,8$ y de “baja confianza” cuando es $\geq 1,6$. Por debajo de este punto de corte se recomienda repetir el análisis con la misma muestra o preparar una nueva extracción de proteínas a partir de biomasa bacteriana.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	PNT-MT-01	
		Edición N° 02	Página 8 de 8

9. RESPONSABILIDADES

Tanto el personal técnico del área, así como los residentes y el/la facultativo/a del área deben tener los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para desarrollar la metodología descrita en este PNT. Se proporcionará la formación necesaria a todo usuario de MALDI-TOF para que los resultados tengan garantías de calidad.

Los facultativos de área y, eventualmente, los residentes, serán responsables de la interpretación de los resultados y de su traslado al correspondiente informe.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Hay que tener en cuenta que potencialmente se está trabajando con microorganismos muy patógenos o multirresistentes.

Además, cada laboratorio debe adaptar y validar los métodos caseros expuestos en este documento.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Las cepas muy mucosas en muchas ocasiones no se pueden identificar.
- Los cultivos mixtos pueden dar resultados equívocos en la identificación.
- Los microorganismos en cultivos viejos en muchas ocasiones no se pueden identificar.
- Los microorganismos crecidos en medios muy selectivos o con inhibidores de crecimiento en ocasiones no se pueden identificar.
- Dificultad en diferenciar microorganismos muy próximos entre sí.
- Los aislados de *Neisseria* spp. pertenecientes a especies distintas a *N. meningitidis* poco representadas o ausentes en la base de datos comercial (*N. bergeri*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*), pueden ser identificadas por MALDI-TOF erróneamente como *N. meningitidis*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, *et al.* How to identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:599-603.
2. Mallecot YH. Work procedures in MALDI-TOF technology. In: The use of mass spectrometry technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology. Cobo F. (ed). London Academic Press 2018. London, United Kingdom. ISBN: 978-0-12-814451-0.
3. Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, *et al.* Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:1342.e5-1342.e8.
4. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010;5:1733-54.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 02	Página 1 de 7

PNT-MT-02

Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 02	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este PNT se describen los principales métodos caseros y comerciales utilizados por los laboratorios clínicos para la identificación directa de microorganismos por MALDI-TOF a partir de frascos de hemocultivo positivos

2. FUNDAMENTO

La elevada densidad microbiana presente en los frascos de hemocultivo positivos (10^6 - 10^8 ufc/ml en función de la naturaleza del microorganismo) hace que sea posible la identificación directa de bacterias o levaduras mediante MALDI-TOF sin necesidad de esperar al crecimiento de los microorganismos en medio sólido. El uso de esta técnica permite adelantar el diagnóstico etiológico de la bacteriemia/fungemia de 24 a 48 horas, lo que supondría un beneficio en términos de reducción de la morbimortalidad, del uso de antibióticos y del coste económico asociados a esta enfermedad.

Además de las bacterias/levaduras, el medio de cultivo contiene otros componentes no microbianos (células humanas, proteínas, etc) que pueden interferir con la adquisición y la comparación de los espectros de masas durante el análisis por MALDI-TOF. Los procedimientos descritos en este PNT persiguen concentrar y purificar los microorganismos presentes en el hemocultivo positivo, con objeto de obtener una densidad microbiana suficiente para el análisis y reducir al mínimo la cantidad de interferencias. El resultado final de estos procesos es la obtención de un *pellet* bacteriano/fúngico que puede analizarse en el MALDI-TOF, bien de manera directa o tras realizar una extracción de proteínas en el caso de no obtener una identificación fiable con el primer método.

Se han descrito numerosos procedimientos caseros basados en su mayoría en técnicas de centrifugación diferencial o de lisis/centrifugación con detergentes suaves (por ejemplo, SDS 10%). Por su parte, las principales plataformas comerciales de espectrometría de masas han desarrollado *kits* comerciales como el MALDI Sepsityper IVD kit (MALDI Biotyper, Bruker, Alemania) o el VITEK® MS Blood Culture RUO (bioMérieux, Francia). Tanto los métodos comerciales como los caseros han demostrado tasas de identificación exitosa (>80%) y tiempos de ejecución (≤ 1 hora) similares, por lo que cada usuario puede elegir aquél que mejor se adapte a la rutina de su laboratorio clínico. En este documento se presentan ejemplos de cada modalidad.

Cabe destacar que el *pellet* con el microorganismo concentrado y purificado puede servir también para inocular sistemas automáticos de determinación de la sensibilidad, tales como el VITEK® 2 (bioMérieux), el Phoenix® (BD Diagnostics, Baltimore, MD, EEUU) o el MicroScan® (Beckman Coulter, CA, EEUU). Este enfoque permitiría adelantar los resultados del antibiograma de 18 a 24 horas. La evidencia que respalda la validez de este proceso es todavía escasa. Sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado una excelente correlación entre los resultados de sensibilidad obtenidos mediante este procedimiento en comparación con el método tradicional, basado en la inoculación de colonias crecidas en medio sólido. El *pellet* también puede servir de inóculo para otras pruebas de determinación de la sensibilidad, tales como la difusión con discos o las tiras de gradiente, así como para otras pruebas complementarias como el Carba NP test (bioMérieux) o técnicas moleculares.

Las tasas de identificación exitosa cuando se realiza el MALDI-TOF a partir del hemocultivo son siempre inferiores a las obtenidas cuando se utilizan colonias crecidas en medio sólido, especialmente cuando se trata de cocos Gram-positivos. Es posible realizar en paralelo subcultivos cortos (2-5 horas de incubación en función de la naturaleza del microorganismo), que pueden analizarse mediante MALDI-TOF en el caso de no obtener una identificación a partir del hemocultivo. Por ello, especialmente en bacteriemias producidas por cocos Gram-positivos, conviene inocular diferentes placas de medios de cultivo a la vez que se realiza la tinción de Gram y se extrae el material necesario para el análisis directo por MALDI-TOF.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 02	Página 3 de 7

La principal limitación de este proceso es la imposibilidad de identificar más de un microorganismo presente en los frascos de hemocultivo (bacteriemias mixtas). Por ello, la realización de la tinción de Gram sigue siendo indispensable antes de comenzar con la identificación por MALDI-TOF.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de MALDI Biotyper (Bruker).
- Manual de Vitek® MS (bioMérieux).
- Manual de usuario del MBT Sepsityper IVD Kit.
- Manual de usuario del VITEK® MS Blood Culture Kit RUO.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se obtienen extrayendo de los frascos de hemocultivo positivos un volumen variable desde unas gotas a unos mililitros (1-8 mL) en función del método de procesamiento elegido, utilizando una jeringuilla estéril de 10 mL.

4.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Los frascos procedentes de bacteriemias mixtas no son candidatos para la identificación directa por MALDI-TOF, debido a la escasa probabilidad de obtener un resultado fiable. Por ello, conviene elegir únicamente aquellos frascos en los que aparezca una única morfología en la tinción de Gram.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. GENERALES

- Agua calidad HPLC.
- Etanol absoluto grado HPLC.
- Ácido fórmico al 70%.
- Acetonitrilo.
- Bacterial Test Standard (BTS)
- Matriz orgánica de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico).

5.2. MÉTODO DE LISIS-CENTRIFUGACIÓN

- Solución de cloruro amónico en agua destilada estéril (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM).
- Solución de SDS al 10% o saponina al 5% en agua destilada estéril.

5.3. MÉTODOS COMERCIALES

- Tanto el MBT Sepsityper IVD Kit (Bruker) como el VITEK® MS BLOOD Culture Kit RUO (bioMérieux) incorporan sendos tampones comerciales de lisis de células eucariotas (*lysis buffer*) y de lavado del *pellet* bacteriano (*washing buffer*).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

5.4. PREPARACIÓN DE REACTIVOS, CALIBRACIÓN DEL APARATO Y LIMPIEZA DE LA PLACA

- Los reactivos necesarios para la preparación de la matriz, la calibración del aparato y la limpieza de la placa se encuentran detallados en el PNT-MT-01 de este procedimiento.

5.5. SUBCULTIVO CORTO

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar McConkey
- Agar Schaedler u otros medios para microorganismos anaerobios.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Campana de flujo laminar.
- Jeringuillas de 10 mL.
- Tubos de plástico estériles de 50 mL.
- Tubos de plástico estériles de 15 mL.
- Tubos de plástico estériles de 1,5 mL.
- Gradillas.
- Micropipetas.
- Puntas de pipeta estériles con filtro.
- Agitador vórtex.
- Centrífuga y microcentrífuga.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. MÉTODOS DIRECTOS CASEROS

7.1.1. Centrifugación diferencial

Esta técnica permite separar las bacterias de las células humanas en base a sus diferentes velocidades de sedimentación. Un ejemplo de esta técnica sería el siguiente:

- Extraer de 8 a 10 mL del hemocultivo y transferirlos a tubos de plástico estériles de 15 mL.
- Centrifugar 10 minutos a aproximadamente 100 g. Recoger el sobrenadante y desechar el sedimento (células sanguíneas).
- Repartir el sobrenadante en 4 tubos de 1,5 mL y centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender los 4 *pellets* resultantes con 1 mL de agua estéril en un único tubo de 1,5 mL. Para ello, la suspensión del primer sedimento puede utilizarse para resuspender el siguiente y así sucesivamente hasta completar los 4 tubos.
- Centrifugar 2 minutos a 15.500 g y desechar el sobrenadante, eliminando los restos mediante aspiración con micropipeta.
- Recoger del *pellet* el contenido de un asa estéril de 1 µL, extenderlo homogéneamente sobre un pocillo de la placa del MALDI-TOF y dejar secar a temperatura ambiente. Realizar el experimento por duplicado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

- Añadir 1 µL de ácido fórmico y dejar que se seque a temperatura ambiente. Añadir 1 µL de matriz HCCA y dejar secar de nuevo.
- Introducir la placa en el aparato para su análisis.

7.1.2. Lisis-centrifugación con detergentes suaves

Mediante esta técnica se emplean detergentes suaves, como el SDS, la saponina o el Tween, para lisar las células sanguíneas. Un ejemplo de este procedimiento sería el siguiente:

- Extraer 1 mL del contenido del frasco de hemocultivo positivo mediante una jeringuilla y transferirlo a un tubo de plástico estéril de 1,5 mL.
- Añadir 200 µL de SDS al 10%, agitar con vórtex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos. Desechar completamente el sobrenadante mediante decantación y aspiración con micropipeta.
- Resuspender el sedimento con 1 mL de agua estéril, mediante pipeteo o agitación con vórtex. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos y desechar completamente el sobrenadante mediante decantación y aspiración con micropipeta. Este proceso puede repetirse en caso de que el *pellet* resultante continúe hemático.
- Recoger una porción del *pellet* con un asa estéril de 1 µL y depositar por duplicado en la placa del MALDI-TOF, siguiendo los pasos descritos en el apartado 7.1.

7.1.3. Lisis-centrifugación con cloruro de amonio

Este método utiliza una solución de cloruro de amonio para lisar las células sanguíneas. Un ejemplo de este procedimiento sería el siguiente:

- Extraer 5 mL del contenido del frasco de hemocultivo mediante una jeringuilla y transferirlos a un tubo de plástico de 50 mL con 45 mL de agua estéril. Agitar con vórtex y centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante mediante decantación y aspiración con micropipeta o tubo de vacío.
- Resuspender el sedimento con 1 mL de solución de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM). Vortear y centrifugar a 140 g durante 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante. Si el *pellet* continúa hemático, resuspender de nuevo en 2 mL de agua estéril y volver a centrifugar a 140 g durante 10 minutos, eliminando de nuevo el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* resultante en 200 µL de agua estéril.
- Para la identificación del microorganismo, transferir 1 µL de la resuspensión del *pellet* a un pocillo de la placa del MALDI-TOF, dejar secar y proceder como se ha descrito en el apartado 7.1 de este PNT.

7.2. MÉTODOS COMERCIALES

Tanto la plataforma Biotyper (Bruker) como el VITEK® MS (bioMérieux) han desarrollado *kits* comerciales para la identificación directa de bacterias a partir de frascos de hemocultivo positivos. Ambos *kits* se basan en procedimientos de lisis/centrifugación similares a los descritos anteriormente. El procedimiento para la identificación bacteriana se encuentra detallado en el manual de usuario de cada *kit* comercial. El tiempo de obtención de los resultados es de unos 30 min aproximadamente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

7.3. SUBCULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Este método se puede utilizar en el caso de que no se obtenga un resultado en la identificación directa o en el caso de disponer de menos personal, ya que es un método menos laborioso, más barato y proporciona un resultado en unas horas.

- Extraer un 1 mL del hemocultivo e inocular unas gotas en agar sangre y/o agar chocolate y/o agar Mc-Conkey y/o agar Schaedler, en función de la sospecha clínica.
- Incubar las placas de 2-5 horas a 37°C en aerobiosis (McConkey), en 5% de CO₂ (sangre y chocolate) y en anaerobiosis (Schaedler).
- Revisar periódicamente las placas hasta observar un crecimiento suficiente como para realizar el análisis por MALDI-TOF. Es conveniente asegurarse también de que sólo crece una especie bacteriana.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La obtención y expresión de resultados se encuentra detallada en el punto 8 del PNT-MT-01 de este procedimiento (ver PNT-MT-01).

9. RESPONSABILIDADES

Tanto el personal técnico del área, así como los residentes y el/la facultativo/a del área deben tener los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para desarrollar la metodología descrita en este PNT. Se proporcionará la formación necesaria a todo usuario de MALDI-TOF para que los resultados tengan garantías de calidad.

Los facultativos de área y, eventualmente, los residentes, serán responsables de la interpretación de los resultados y de su traslado al correspondiente informe.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- En caso de no obtener una identificación mediante los métodos caseros descritos, puede reservarse una porción de *pellet* purificado para realizar una extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico, como se detalla en el punto 7.2 del PNT-MT-01 de este procedimiento.
- La utilización de jeringuillas para obtener material de los frascos debe realizarse con las debidas precauciones de bioseguridad y siempre dentro de una cabina de flujo laminar.
- Los métodos 7.1.1 y 7.1.3 utilizan un volumen mayor de hemocultivo, por lo que podrían ser más útiles para la identificación de microorganismos que alcanzan menores densidades de población, como *Streptococcus* spp. o levaduras.
- Subcultivar en paralelo una gota del hemocultivo en diferentes medios y condiciones de incubación puede ser una estrategia útil en el caso de que no funcionen los métodos de identificación descritos anteriormente. Transcurridos tiempos de incubación cortos puede obtenerse biomasa suficiente como para realizar el análisis por MALDI-TOF. El tiempo de incubación necesario varía en función del microorganismo implicado, siendo más corto en enterobacterias (2 horas aproximadamente) y más largo en cocos Gram-positivos (4-5 horas).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF	PNT-MT-02	
		Edición Nº 01	Página 7 de 7

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Son las mismas limitaciones generales descritas en el PNT-MT-01 de este procedimiento.

La identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos presenta globalmente tasas de éxito superiores al 80%. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que estas tasas son siempre inferiores comparadas con aquellas correspondientes a la identificación de colonias crecidas en medios sólidos. Los bacilos Gram-negativos presentan un mayor porcentaje de identificaciones correctas. El porcentaje de fallos en la identificación es mayor en cocos Gram-positivos y levaduras, posiblemente debido a una mayor dificultad en su lisis y/o a una menor densidad poblacional en los frascos positivos de hemocultivo. Estos problemas pueden solventarse en parte utilizando un mayor volumen del hemocultivo para el análisis. También puede reservarse una porción del pellet bacteriano para realizar una extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico si no se consigue la identificación con los métodos descritos.

El método que tiene unos porcentajes más altos de identificación es el MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik). En general los métodos comerciales son más caros que los caseros, pero también son más rápidos, necesitan un volumen menor de sangre y tienen un certificado de calidad. Por último, la realización en paralelo de un subcultivo durante el proceso de identificación puede resultar útil en el caso de no obtener una identificación a partir de los frascos de hemocultivo, o en el caso de falta de personal para realizar un método directo.

Como ya se ha mencionado, el MALDI-TOF suele fallar a la hora de identificar los microorganismos que participan en bacteriemias mixtas o, como mucho, consigue identificar a aquél que se encuentra en mayor proporción. El subcultivo en paralelo, inoculando diferentes medios y utilizando diferentes condiciones de incubación, podría en parte solventar este problema, aunque la tinción de Gram sigue siendo un primer paso necesario para identificar aquellos frascos de hemocultivo correspondientes a bacteriemias mixtas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) in clinical microbiology. J Microbiol Methods. 2017; 138:20-29.
2. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: A prospective observational study. Clin Infect Dis. 2013; 56:1101-1107.
3. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin Microbiol Infect. 2015; 2:313-322.
4. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano MR, Larrosa Escartín N, Martín Arriaza M. PNT-HMM-02: Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). En: Procedimientos en Microbiología Clínica nº 62: Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. Cercena

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-MT-03	
		Edición Nº 01	Página 1 de 9

PNT-MT-03

Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2007	Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-MT-03	
		Edición Nº 02	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el método a seguir para la introducción de nuevos microorganismos que no se encuentren registrados previamente en la base de datos para la identificación de microorganismos por espectrometría de masas MALDI-TOF. En general en este procedimiento se seguirán las adaptaciones necesarias para el seguimiento en un equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania).

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite la identificación de microorganismos en base a un perfil proteico de los mismos, obtenido a partir de la ionización suave de estas proteínas mezcladas con una matriz y su migración en un tubo de vacío. Este perfil se compara habitualmente con una base de datos pre-existente, proporcionada por el fabricante. A pesar de que las bases de datos que permiten la comparación de los espectros se someten a actualizaciones periódicas en las que se aumenta el número de referencias disponibles, existe la posibilidad de que el usuario elabore una base de datos propia. Esta elaboración puede ser conveniente cuando microorganismos de interés no estén recogidos en la base de datos original, o cuando se considere útil aumentar el número de espectros de una especie concreta para ganar especificidad en la identificación.

Además, en aquellas situaciones en que se considera pertinente realizar un tipado de los microorganismos, es oportuno introducir el perfil de cada uno de los microorganismos por separado, para poder realizar esos dendrogramas con la mayor garantía de reproducibilidad.

En este documento recoge la metodología a seguir para llevar a cabo la introducción de un microorganismo en la base de datos adaptados a los equipos MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). En el caso de disponer de un equipo Vitek MS (Biomérieux) la adquisición y posterior procesamiento de los espectros deberá ser adaptado a estos equipos siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Manual de FlexControl (Bruker Daltonics)
2. Manual de FlexAnalysis (Bruker Daltonics)
3. Guía rápida MALDI Biotyper 3.0. Francisco Soria Melguizo SA, Madrid.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La procedencia de los microorganismos no es relevante, ya que pueden proceder de todo tipo de muestras clínicas, así como de colecciones tipo. Los microorganismos a introducir en la base de datos han de cultivarse en medio sólido que favorezca un crecimiento homogéneo.

El procedimiento se realizará siempre a partir de un cultivo puro, si es posible de 24 horas de incubación. Cuando no sea posible trabajar a partir de cultivos de 24 horas, porque el microorganismo sea de crecimiento lento, se debe determinar el tiempo que el microorganismo tarda en adquirir un crecimiento suficiente, y a partir de ahí definir un tiempo de incubación fijo para el microorganismo en cuestión. Es imprescindible utilizar:

1. El mismo medio de cultivo
2. El mismo tiempo de incubación
3. La misma temperatura de incubación

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-MT-03	
		Edición N° 02	Página 3 de 9

4.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Los nuevos perfiles introducidos van a ser la referencia para la identificación de futuros microorganismos problema. Por tanto, es muy importante que la identificación previa sea absolutamente fiable. Salvo cuando se trabaje con cepas de referencia, es imprescindible obtener previamente una identificación contrastada mediante técnicas moleculares, habitualmente mediante secuenciación del ARN ribosómico 16S en el caso de bacterias, o técnicas equiparables en el caso de hongos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los descritos en el PNT-MT-01 de este procedimiento

6. APARATOS Y MATERIAL

Los descritos en el PNT-MT-01 de este procedimiento.

6.1. CALIBRACIÓN

Se seguirá el proceso descrito en el PNT-MT-01 de este procedimiento.

6.2. MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA

Se seguirán los procesos descritos en el PNT-MT-01 de este procedimiento.

7. PROCEDIMIENTO

7.1.. REALIZAR UNA CALIBRACIÓN CON MATRIZ Y BTS NUEVOS

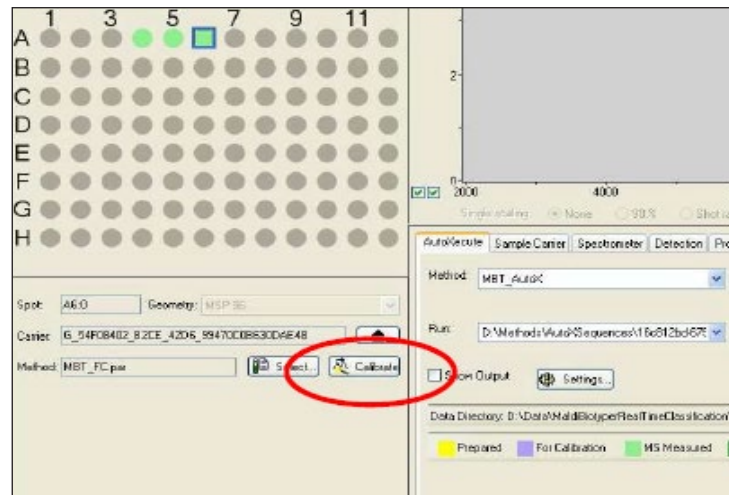
7.1.1. Preparación:

1. Añadir 1 µL de BTS en una posición de la tarjeta y dejar secar a temperatura ambiente.
2. Una vez seco el BTS, y antes de que transcurran 5 minutos, añadir 1 µL de matriz sobre el mismo, y dejar secar a temperatura ambiente.

7.1.2. Procesamiento:

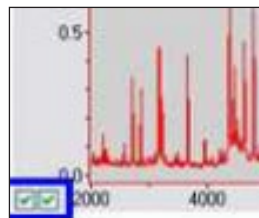
1. Abrir el programa FlexControl.
2. Esperar a que aparezcan, en la parte inferior derecha de la pantalla, los mensajes *READY* e *IN*.
3. Esperar a que aparezcan, en la parte inferior izquierda de la pantalla, los mensajes *Laser standby* ó *for Help, Press F1*.
4. En la representación de la tarjeta que aparece en la parte inferior izquierda de la pantalla del programa FlexControl, seleccionar la posición en la que se haya colocado el BTS (quedará enmarcada por un cuadro azul)
5. Pulsar el botón *Calibrate* (parte inferior izquierda de la pantalla, por debajo de la representación de la tarjeta).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-MT-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 9



Precaución: los parámetros de calibración no deben modificarse sin el consentimiento expreso del servicio técnico.

6. Comprobar que los dos cuadros situados en la parte inferior izquierda de la gráfica están activados



7.2. EXTRACCIÓN CON ETANOL/ÁCIDO FÓRMICO

La introducción de un perfil nuevo requiere espectros de alta calidad, por lo que es recomendable hacer una extracción con etanol/ácido fórmico.

1. Tomar dos asas de 1 μ L de cultivo, y suspenderlas en 300 μ L de agua HPLC en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
2. Homogeneizar en vortex.
3. Añadir 900 μ L de etanol absoluto.
4. Homogeneizar en vortex.
5. Centrifugar 2 minutos a 15.500 rpm.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Centrifugar 1 minuto a 15.500 rpm.
8. Retirar los restos de sobrenadante (etanol) con pipeta*.
9. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente o en estufa de 37°C para secar bien el *pellet* (15 minutos deben ser suficientes si se han realizado bien los pasos anteriores).
10. Añadir 50 μ L de ácido fórmico al 70% al sedimento. Resuspender con pipeta y/o vórtex hasta su completa disolución.
11. Añadir 50 μ L de acetonitrilo. Si por algún motivo fuera necesario modificar el volumen de ácido fórmico, hay que modificar el de acetonitrilo en la misma medida.
12. Centrifugar 2 minutos a 15.500 rpm.

* Es importante que no queden restos de etanol. Si es necesario, repetir los pasos 7 y 8.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-MT-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

7.3. LECTURA Y PROCESAMIENTO

En condiciones estándar, se obtiene un espectro entre 2 y 20 kDa de forma automática trabajando en el modo lineal positivo a una frecuencia de 200 hertzios. Los parámetros para el espectrómetro en el rango automático de detección son: IS1 a 20 kV, IS2 a 17.5 kV, lente a 6kV, *detector gain* 7.4 V.

1. Crear un directorio específico para los ficheros generados en D:\Data\
2. Transferir 1 µL del sobrenadante de la extracción con etanol/ácido fórmico a, como mínimo, 8 posiciones de la tarjeta. Dejar secar.
3. Añadir 1 µL de matriz a cada posición. Dejar secar.
4. Añadir 1 µL de BTS, a dos posiciones, dejar secar, añadir 1 µL de matriz, dejar secar.
5. Añadir una posición con 1 µL, de BTS, dejar secar, añadir 1 µL de muestra, dejar secar, añadir 1 µL de matriz, dejar secar.

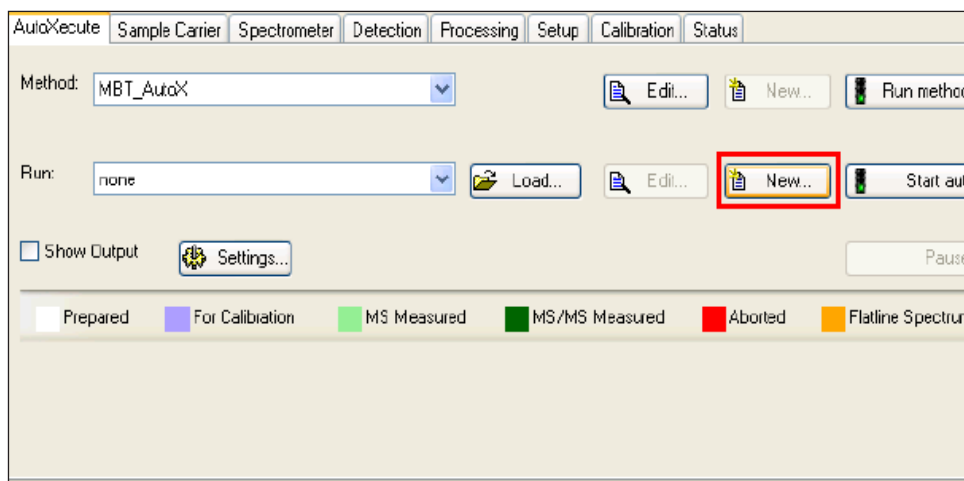
De este modo se tendrán finalmente dos posiciones con BTS, y una con BTS+muestra y 8 posiciones sólo con muestra por cada microorganismo.

6. Hacer una calibración estándar a partir de una de las posiciones con BTS sólo.

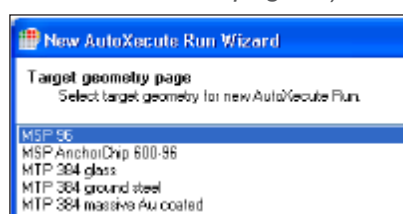
7.4. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS

7.4.1. Creación de la lista de adquisición

1. Abrir el programa FlexControl y, en la pestaña AutoXecute, seleccionar New Run Method.




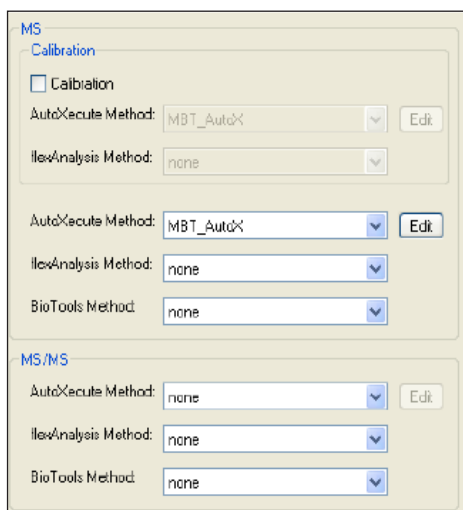
2. En el listado de *Target Geometry* que aparece, seleccionar MSP96, y seleccionar el botón Cancel (abajo a la derecha). Confirmar esta cancelación en la ventana de aviso que aparecerá (*Do you want to close wizard and loose all data entere don wizard pages?*)



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-ITS-03a	
		Edición Nº 01	Página 6 de 9

Aparecerá la ventana AutoXecute Run Editor.

3. Seleccionar el directorio al que se van a enviar los datos en la ventana Data Directory (arriba a la derecha). Al seleccionar el botón  se abrirá un listado con todos los directorios disponibles.
4. Una vez seleccionado el directorio, pedirá un nombre específico para el microorganismo en estudio. Es aconsejable asignarles ya el nombre que deseamos que tenga en la base de datos, pues facilita el procesamiento de datos posterior.
5. En el apartado MS (zona superior central de la ventana del AutoXecute Run Editor, en la ventana AutoXecute Method, Seleccionar MBT_AutoX.



6. En la representación de la placa de la ventana AutoXecute Run Editor, seleccionar las posiciones en que se encuentre el microorganismo objeto de estudio, y pulsar el botón + en el menú superior. Al hacerlo, aparecerá en la parte inferior una tabla con las posiciones seleccionadas. Si se hace ahora doble *click* en el signo +, incluirá en la tabla tres lecturas por posición (24 en total).

7. Seleccionar la posición donde esté situada la mezcla BTS+muestra, e identificarla en la ventana *sample name*, dentro del área *data destination* (área superior derecha de la pantalla), y pulsar el botón + en el menú superior. Esta posición se añadirá a la tabla de la parte inferior.
8. Proceder igual para identificar la posición en que esté situado el BTS sólo.
9. Habrá que completar este procedimiento para cada microorganismo que se quiera introducir (puntos 4 a 8).
10. Una vez introducidos todos los espectros, seleccionar el botón *OK* o *Grabar*, y aparecerá una ventana donde habrá que nombrar el método creado y guardarlo.

7.4.2. Adquisición de espectros

1. Programa FlexControl. Pestaña AutoXecute. Seleccionar en la ventana *Run* el método que se ha creado y guardado en el paso anterior. (zona izquierda de la pantalla).
2. Seleccionar el botón *Start Automatic Run* (zona derecha de la pantalla). FlexControl comenzará a adquirir los espectros, creando una carpeta por microorganismo, otra para el BTS y otra para mezcla BTS-muestra. En la carpeta de microorganismo habrá una carpeta por posición, y en éstas una por espectro.

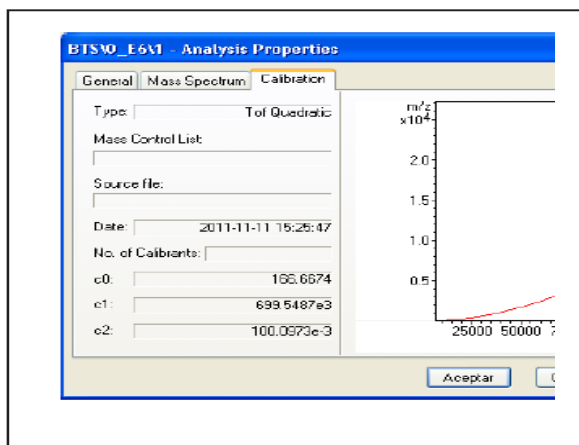
7.5. ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE LOS ESPECTROS

7.5.1. Revisión de los espectros adquiridos

1. Abrir FlexAnalysis. En el Menú de la barra superior, File-Open.
2. Aparecerá la ventana *Spectrum Browser*. En esta ventana se selecciona el directorio en el que se guardaron los espectros.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

3. Seleccionar el espectro correspondiente al BTS. Open (ángulo inferior derecho de la ventana). Aparecerá el espectro del BTS en FlexControl en formato gráfico (picos).
4. Seleccionar, en el menú superior, el icono de Propiedades. Se abrirá la ventana *Analysis Properties*. Abrir la pestaña *Calibration*, y anotar los valores correspondientes a c0, c1 y c2.

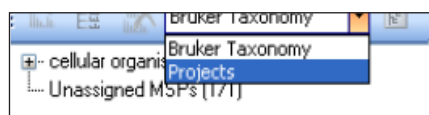


5. Aceptar en la ventana *Analysis Properties* y cerrar esta ventana. Si en el momento de cerrar aparece una ventana de aviso de flexAnalysis con la pregunta *Do you want to save the current state of processing including the embedded method?*, seleccionar **No**.
6. De nuevo en la ventana *Spectrum Browser*, abrir todos los espectros de una de las cepas objeto de estudio, y marcar todos los espectros en la columna lateral izquierda, para que aparezcan las gráficas.

7. Repetir el punto 3 para cada espectro, comprobando que los valores de c0, c1 y c2 coinciden con los que habíamos registrado del BTS.
8. En el caso de que coincidan, seleccionar todos los espectros, y abrir el método MBT_Standard.FAMSMMethod. (En la barra superior *Method*, en el desplegable que aparece *Open*, y ahí seleccionar MBT_Standard.FAMSMMethod).
9. En la barra de herramientas, dentro de la opción *Process*, seleccionar *Smooth Mass Spectrum*
10. En la barra de herramientas, también dentro de la opción *Process*, seleccionar *Substract Mass Spectrum Baseline*.
11. Comparar los espectros a lo largo del intervalo m/z de toda la cepa y cambiar al mismo color los que sean similares y con un color distinto aquellos que se salgan de esa tónica.
12. Anotar los espectros que se salgan de la tónica general para eliminarlos. Ha de tenerse en cuenta que guardar un mínimo de 20 espectros para poder crear una entrada en la base de datos.
13. Eliminar los espectros descartados directamente en el directorio de carpetas.
14. Este proceso ha de realizarse con cada una de las cepas.

7.6. CREAR UNA NUEVA ENTRADA EN LA BASE DE DATOS

1. Abrir el programa Biotyper y, en la ventana que aparecerá, seleccionar *Projects* en la ventana de la esquina superior derecha.

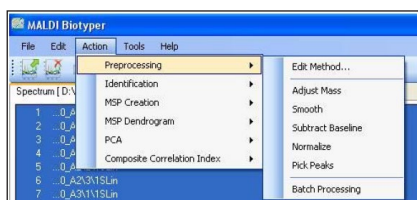


2. Abrir los espectros seleccionando *Add Spectra* en la barra de herramientas; se abrirá la ventana del buscador de espectros. Seleccionar el directorio deseado tras pulsar *Browse* en la ventana del buscador de espectros

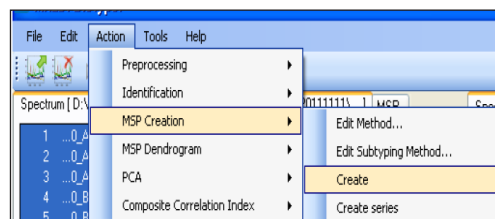
3. Abrir solamente una de las cepas seleccionándola y pulsando *Open*. Se abrirán todos los espectros.
4. Seleccionarlos todos de forma que queden marcados en azul.
5. En la barra de herramientas, seleccionar *Action* y dentro del desplegable marcar *Preprocessing* y después *Edit Method* para comprobar que Biotyper Preprocessing Standard Method es el que aparece como *Method Name*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-ITS-03a	
		Edición Nº 01	Página 8 de 9

6. Volver a seleccionar todos los espectros y siguiendo los pasos del punto 5 marcar *Batch Processing*.



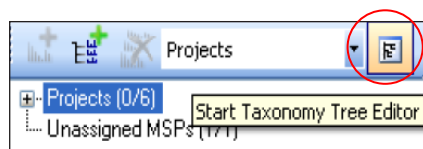
7. En el menú *Action* de nuevo, marcar ahora **MSP Creation** y después *Create* en el desplegable.



8. Poner el nombre completo de la especie (hacer referencia en él al número de cepa o nombre del hospital) en la ventana que aparece. Pulsar *Ok* y la entrada en la base de datos se creará automáticamente.

9. En la ventana superior derecha aparecerá una nueva MSP sin asignar (*Unassigned MSPs (1/1)*)

10. A la derecha del desplegable superior derecho, donde marca *Projects*, pulsar el botón *Start Taxonomy Tree Editor*.



11. Aparece una nueva ventana donde se pueden crear nuevos nodos y asignar las nuevas entradas a cada uno de ellos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Una vez que el microorganismo está incluido en la base de datos del equipo, el resultado de identificación será el mismo que en una identificación que ya estaba previamente establecida en la base de datos por el fabricante (ver PNT-MT-01 de este procedimiento).

9. RESPONSABILIDADES

Tanto el personal técnico del área, así como los residentes y el/la facultativo/a del área deben tener los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para desarrollar la metodología descrita en este PNT. Se proporcionará la formación necesaria a todo usuario de MALDI-TOF para que los resultados tengan garantías de calidad.

Los facultativos de área y, eventualmente, los residentes, serán responsables de la interpretación de los resultados y de su traslado al correspondiente informe.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Hay que tener en cuenta que se trabaja con microorganismos potencialmente patógenos o multirresistentes.

Además, cada laboratorio debe adaptar y validar los métodos caseros expuestos en este documento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Espectrometría de masas MALDI-TOF: Introducción de un nuevo microorganismo en la base de datos	PNT-ITS-03a	
		Edición Nº 01	Página 9 de 9

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los espectros tienen que cumplir criterios de calidad. Los picos de masas más relevantes del espectro tienen que tener intensidades superiores a 1000. La resolución depende de la masa del pico ($R = m / \Delta m$). En general irán de 800 a 2000, a mayor masa, mayor debe ser la resolución.
- Los microorganismos que se vayan a introducir en la base de datos tienen que estar perfectamente caracterizados por métodos moleculares (secuenciación del 16S ARNr).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. PLoS One. 2010; 5(12):e14235.
2. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, García-Fraile P, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Velázquez E. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. PLoS One. 2011; 6(5):e20223.
3. Marín M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, Bouza E, Rodríguez-Sánchez B. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2018; 24:1342.e5-1342.e8.
4. Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, Wybo I, Kostrzewa M, Friedrich AW; ENRIA workgroup. Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. Anaerobe. 2018; 54:224-230.
5. Zvezdanova ME, Escribano P, Ruiz A, Martínez-Jiménez MC, Peláez T, Collazos A, Guinea J, Bouza E, Rodríguez-Sánchez B. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. Med Mycol. 2019; 57:63-70.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-MT-04

Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición Nº 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir de una manera general el proceso de detección de β -lactamasas y carbapenemasas mediante la técnica de MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) a partir de cultivos bacterianos y de hemocultivos positivos. Es conveniente que cada laboratorio adapte la metodología a sus condiciones particulares. En general en este procedimiento se seguirán las adaptaciones necesarias para el seguimiento en un equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania), por su mayor desarrollo en el software necesario para el análisis de espectros antibióticos.

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas es una técnica analítica tradicionalmente utilizada para identificar compuestos químicos. Desde la década de 1970 se ha aplicado a la identificación de microorganismos, y, en los últimos años, la aplicación de nuevas plataformas fáciles de usar e interpretar ha permitido su total implantación en los laboratorios de Microbiología Clínica para su uso rutinario. El conjunto de posibles aplicaciones del MALDI-TOF está creciendo constantemente, siendo dos de las más prometedoras la detección de resistencias antibióticas y el tipado para estudios epidemiológicos.

La detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas se basa en seguir la reacción de hidrólisis del antibiótico a través de su espectro de masas mediante MALDI-TOF. Si la bacteria es portadora de la enzima de resistencia, será capaz de hidrolizar el antibiótico, de forma que la masa del mismo, aumentará en 18 Da. Si la bacteria es sensible, el espectro del antibiótico permanecerá intacto.

En este documento se recoge la metodología a seguir para llevar a cabo la detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas adaptados a los equipos MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Se detallarán las posibilidades tanto de seguir el método comercial, como la realización de un método casero. En el caso de disponer de un equipo Vitek MS (Biomérieux, France) la adquisición y posterior procesamiento de los espectros deberá ser adaptado a estos equipos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Se utilizarán como documentos de consulta los manuales de uso facilitados por el fabricante del sistema MALDI-TOF disponible en cada laboratorio. Por ejemplo:

- MALDI Biotyper User Manual 3.1
- 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; 32(1).

4. MUESTRAS

Para la detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas se puede partir de dos tipos de muestras:

1. Microorganismos crecidos en medios de cultivo sólidos
2. Hemocultivos positivos

En el caso de microorganismos crecidos en medios de cultivo sólidos, se recomienda que los cultivos sean frescos de unas 16-24 horas. A partir de aquí, la fiabilidad de los resultados puede verse reducida. En el caso de hemocultivos positivos, se recomienda del mismo modo que la detección se haga de forma temprana, sin que pasen más de 24 horas de la positividad del hemocultivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 02	Página 3 de 9

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS

Para la realización de la técnica son necesarios los siguientes reactivos:

- Si se realiza el método comercial:
 - MBT STAR – Carba Kit IVD
- Si se realiza el método casero:
 - Antibióticos: cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ertapenem e imipenem
 - Bicarbonato de amonio
 - Cloruro de zinc
 - Dodecil sulfato sódico (SDS)

Reactivos comunes:

- Agua estéril (calidad HPLC)
- 1-Propanol
- 2-Propanol
- Ácido trifluoroacético 80%
- Bradiquinina (1-5), Bradiquinina (1-7)
- Matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) (HCCA) (tapón rojo)
- Solvente orgánico (acetónitrilo 50%, agua 47,5% y ácido trifluoroacético 2,5%)

Si la técnica se realiza directamente del hemocultivo:

- MBT Sepsityper IVD Kit (Bruker Daltonik)
- Otros (consultar PNT-MT-02 de este procedimiento)

5.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

5.2.1. Si se realiza el **método comercial**, seguir las instrucciones del fabricante. En resumen:

- **MBT STAR-ACS** (calibrador estándar de antibióticos)
Se disuelve en 25 μ l de agua destilada, con pipeteo. Se conserva a -20°C durante 6 meses.
- **MBT STAR-BL Matrix** (matriz, tapón naranja)
Se disuelve en 50 μ l de MBT STAR-BL Matrix Solvent. Se agita en vórtex durante 2 min. Se conserva a temperatura ambiente y en oscuridad un máximo de 1 día.
- **MBT STAR-BL Antibiotic reagent** (viales de reacción individuales con imipenem liofilizado). Se añaden 50 μ l del buffer de reacción (MBT STAR-BL Incubation buffer) y se agita en vórtex durante 30 segundos. El antibiótico disuelto es estable a temperatura ambiente un máximo de 4 horas.

5.2.2. Si se realiza el método casero:

A) Preparación del buffer de reacción:

10 mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 μ g/ml y 0,005% SDS, pH= 8 (conservación a temperatura ambiente)

- Se preparan 20 ml de una solución 10x: solución de stock (se conserva en nevera)
- Se disuelven 158,1 mg de bicarbonato de amonio en 20 ml de agua y se agita bien. El pH debería ser entre 8-9 (no es necesario el ajuste).
- Se disuelven 10 mg de cloruro de zinc en un 1 ml de agua y se agita. Se consigue una disolución de 10 mg/ml: solución stock de zinc

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

4. Se añade 1 ml de la solución stock a 9 ml de agua. Se agita.
5. Se añaden a la solución anterior 10 μ l de cloruro de zinc de la solución stock para conseguir una concentración de trabajo de 10 μ g/ml. Se agita.
6. Se añade a la disolución anterior 0,5 mg de SDS. Se agita.

B) Soluciones antibióticas de trabajo:

Tabla 1. Concentraciones y tiempos de incubación para cada antibiótico.

Antibiótico	Concentración	Tiempo de incubación
Cefotaxima	0,5 mg/ml	60 min
Ceftriaxona	0,2 mg/ml	30 min
Cefpodoxima	0,2 mg/ml	60 min
Ertapenem	0,5 mg/ml	60 min
Imipenem	0,25 mg/ml	30 min

Las soluciones antibióticas de trabajo se prepararán diariamente y sólo se usarán durante 4 h (a temperatura ambiente). Pueden conservarse a -20°C un máximo de 15 días y a -70°C durante 1 mes.

Se recomienda la utilización de ceftriaxona para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y el imipenem para la detección de carbapenemasas.

C) Preparación de la matriz (HCCA):

Se añade 250 μ l de solvente orgánico a un tubo de matriz liofilizada (tapón rojo). Agitar bien en vórtex durante 2-3 minutos hasta su completa disolución. Comprobar que la disolución es incolora y no hay restos de cristales amarillos en suspensión.

La solución reconstituida debe conservarse a temperatura ambiente y en un lugar oscuro, en su defecto puede envolverse con papel de aluminio.

D) Preparación del calibrador:

Se resuspende la bradiquinina (1-5) y la bradiquinina (1-7) en 500 μ l de agua. Se pueden hacer alícuotas y congelar a -20°C . Se mezclan 1,5 μ l de bradiquinina 1-5, con 2 μ l de bradiquinina (1-7) y se añaden 96,5 μ l de agua. Se hacen alícuotas de 5 μ l en tubos eppendorf para un sólo uso, que se pueden conservar a -20°C .

6. APARATOS Y MATERIAL

- Asas estériles de siembra
- Micropipetas.
- Puntas de micropipeta.
- Gradillas para tubos eppendorf.
- Vórtex.
- Agitador tipo orbital.
- Microcentrifugas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

- Tubos de reacción de 1,5 ml tipo eppendorf o similares.
- Falcon.
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.
- Balanza de precisión.
- Espátula.
- Nevera.
- Congelador.
- Placas de acero de 96 pocillos.
- IVD-CE MALDI Biotyper.

6.1. CALIBRACIÓN

La calibración se realizará siempre que se pase del modo de identificación al modo de detección de resistencias. Su función es confirmar que los parámetros del equipo son los óptimos para leer en este modo, los cuáles son una condición previa para obtener espectros de calidad. Se utiliza el calibrador MBT STAR-ACS (Bruker Daltonik) en el caso de utilizar el kit comercial, y en el caso de utilizar el modo casero hay que utilizar la mezcla anteriormente descrita de bradiquinina(1-5) y bradiquinina (1-7).

En el sistema se debe entrar en el FlexControl software (Bruker Daltonik) y ejecutar el método MBT_STAR_BL.par y en el AutoXcute: MBT_STAR_ACS_AutoX. Hay que comprobar que inmediatamente el rango de masas de trabajo cambia de **2.000 a 20.000 Da** para pasar de 100 a 1000 Da.

El proceso de calibración, tanto manual como automática, está detallado en Manual Maldi Biotyper 3.0. El procedimiento a seguir en la calibración es el mismo en el modo de lectura para detección de resistencia a antibióticos que en el modo de lectura para identificación microbiana.

6.2. MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA

El mantenimiento es común al descrito en el PNT-MT-01 de este procedimiento. A continuación, se describirá un procedimiento adicional de limpieza para las tarjetas metálicas que se utilicen para ensayos de detección de la resistencia. Este protocolo deberá utilizarse después del protocolo de limpieza convencional descrito en el PNT-MT-01 y poco antes de depositar las muestras que se vayan a analizar sobre la tarjeta.

1. Preparación de la solución de lavado: en un tubo falcon se mezclan, 15 ml de 1-propanol, 22,5 ml de 2-propanol y 12,5 ml de agua HPLC.
2. Esparcir de 100 – 200 ml de la solución de lavado sobre la tarjeta.
3. Frotar la placa hasta que esté seca con un pañuelo suave.
4. Esperar 5 minutos hasta que cualquier residuo haya sido eliminado.
5. Ya se pueden depositar las muestras sobre la tarjeta.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CULTIVOS BACTERIANOS Y CONTROLES DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS

Se necesita tener a disposición un control positivo (cepa productora de carbapenemasa) y un control negativo (cepa no productora de carbapenemasa) para la realización de cada ensayo. Las cepas deben ser frescas, por lo que son necesarios cultivos bacterianos de 16-24 h para garantizar el correcto funciona-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 02	Página 6 de 9

miento del ensayo. Medios de cultivo como el agar sangre Columbia o Mueller-Hinton, han sido evaluados con buenos resultados.

7.2. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A PARTIR DE COLONIAS EN CULTIVO

7.2.1. Método comercial

- Para cada muestra, se recogen de 2 a 5 colonias con un asa de siembra de 1 μ l, de forma que el agujero del asa quede totalmente cubierto.
- Se resuspenden las colonias en el tubo previamente reconstituido de **MBT STAR-BL Antibiotic Reagent Solution**. La suspensión tiene que resultar bastante turbia, no transparente.
- Vortear la solución unos 10 segundos.
- Incubar las muestras en agitación durante 30 minutos en el caso de *Enterobacterales* y 60 min para *Acinetobacter* spp. a 37°C.
- Después de la incubación, centrifugar las muestras a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- Se asignarán dos posiciones de la tarjeta a cada muestra y se depositará sobre cada una 1 μ l del sobrenadante.
- Dejar que las muestras sequen a temperatura ambiente, sin que la luz incida directamente sobre ellas, de forma que la muestra sea homogénea en el pocillo.
- Añadir 1 μ l de **MBT STAR-BL Matrix**. No dejar más de 30 minutos desde que la muestra está seca hasta que se añade la matriz.
- Una vez seca la matriz, proceder a la lectura. No dejar más de 60 minutos desde que la tarjeta está preparada hasta la lectura.

7.2.2. Método casero

Se diferencia del método anterior en que se resuspenden las colonias en 50 μ l de la solución antibiótica correspondiente y el tiempo de incubación será dependiente del antibiótico estudiado (tabla 1). Además, la matriz que se utilice será la matriz convencional que se utiliza para identificación (HCCA).

7.3. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA DIRECTAMENTE DEL HEMOCULTIVO

7.3.1. Método comercial

Cuando se utilice el **MBT STAR-Carba IVD Kit** para detectar la presencia de carbapenemasas directamente del hemocultivo positivo, las proteínas bacterianas tendrán que extraerse previamente utilizando el **MBT Sepsityper IVD Kit** con un protocolo ligeramente modificado respecto al utilizado para la identificación, de forma que se obtengan espectros de máxima calidad.

Las modificaciones respecto al protocolo convencional (ver PNT-MT-02 de este procedimiento) son que la cantidad del Lysis Buffer se reduce de 200 μ l a 100 μ l. y que el protocolo se frena en el paso anterior a añadir la mezcla de agua-etanol necesaria para la precipitación de las proteínas. De esta forma la actividad enzimática de las carbapenemasas presentes en las bacterias se mantiene intacta.

Una vez que la bacteria está aislada, se resuspende en 50 μ l de la solución **MBT STAR-BL Antibiotic Reagent Solution** y se vortea durante 10 segundos. A continuación, se incuba en agitación a 37°C durante 60 minutos. Los pasos siguientes son equivalentes a los explicados en el apartado anterior sobre cultivos bacterianos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 02	Página 7 de 9

7.3.2. Método casero

En el caso de utilizar el método casero, se puede utilizar el **MBT Sepsityper IVD Kit** o cualquiera de los métodos descritos en el PNT-MT-02 para la extracción de las proteínas bacterianas del hemocultivo. Una vez aislada la bacteria se resuspende en 50 μ l de la solución antibiótica correspondiente y el tiempo de incubación será dependiente del antibiótico estudiado (tabla 1), pero equivalente al utilizado en el caso cultivos bacterianos. Del mismo modo, la matriz que se utilice será la matriz convencional que se utiliza para identificación (HCCA).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. MÉTODO COMERCIAL

Una vez que el espectrómetro de masas ha obtenido los espectros correspondientes de cada una de las muestras analizadas, el módulo MBT STAR-BL IVD determinará la capacidad hidrolítica de cada una de las muestras en relación a los controles. La clasificación será:

- Hidrólisis (H): actividad carbapenemasa.
- No hidrólisis (NH): no se detecta actividad carbapenemasa.
- Resultado incierto. Es necesario volver a analizar la muestra: el resultado no está claro en relación a la producción de carbapenemasa. El ensayo debe repetirse.
- Mensaje de error: puede deberse a problemas técnicos en el equipo o debido a que los controles positivos o negativos no están en rango.

8.2. MÉTODO CASERO

- Para la interpretación manual se utilizará el programa FlexAnalysis 3.3.
- Abrir los espectros de los controles positivo y negativo y los de las muestras que se vayan a analizar.
- En primer lugar, comprobar que el control negativo tiene los picos de masas correspondientes al antibiótico que se está evaluando y el control positivo los picos de masas correspondientes al antibiótico hidrolizado (tabla 2). Si esto no es así, no se puede seguir con la evaluación de los antibióticos en las muestras clínicas.
- En segundo lugar, comparar los espectros de las muestras con el control positivo y negativo. Se considerará un resultado como positivo cuando desaparezcan por completo los picos de masas correspondientes a los antibióticos (control negativo) y en su lugar aparezcan los picos correspondientes a los metabolitos del antibiótico hidrolizado (control positivo), o cuando la intensidad de los picos de masas del antibiótico disminuyan al menos un 50%, con respecto a los correspondientes a su metabolito.
- En el caso del imipenem, sólo se van a observar picos de masas del antibiótico intacto, no de su metabolito de hidrólisis, por lo que la hidrólisis positiva se considerará cuando no se observen los picos de masas del imipenem (control negativo).

9. RESPONSABILIDADES

Tanto el personal técnico del área, así como los residentes y el/la facultativo/a del área deben tener los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para desarrollar la metodología descrita en este PNT. Se proporcionará la formación necesaria a todo usuario de MALDI-TOF para que los resultados tengan garantías de calidad.

Los facultativos de área y, eventualmente, los residentes, serán responsables de la interpretación de los resultados y de su traslado al correspondiente informe.

Tabla 2. Caracterización de los picos de masas de los antibióticos en su forma original e hidrolizados.

Antibiótico	MW	Patrón de sensibilidad (Da)										Patrón de resistencia (Da)							
	[g/mol]	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+Na+K] ⁺	[M+C ^b +H] ⁺	[M-X+H] ⁺	[M-X ^c -CO ₂ +H] ⁺	[M _{hidrol} +H] ⁺	[M _{hidrol} +Na] ⁺	[M _{hidrol} +2Na] ⁺	[M _{hidrol} +Na+K] ⁺	[M _{hidrol} -CO ₂ +H] ⁺	[M _{hidrol} -CO ₂ +Na] ⁺	[M _{hidrol} -CO ₂ +K] ⁺	[M _{hidrol} -X+H] ⁺	[M _{hidrol} -X-CO ₂ +H] ⁺
Ampicilina	349,4	350,4	372,4	394,4							368,4	390,4	412,4		324,4				
Piperacilina	517,5	518,5	540,5	562,5							536,5	558,5	580,5						
Cefotaxima	455,5	456,5	478,5					396,5										414,5	370,5
Ceftazidima	546,6	547,6						468,6										486,6	442,6
Ceftriaxona	554,6	555,6	577,6				616,6	396,6	368,6	324,6								414,6	370,6
Cefpodoxima	427,5	428,5	450,5	473,5		466,5												414,5	370,5
Cefepima	480,6	481,6						296,6										414,6	370,6
Ertapenem	475,5	476,5	498,5	520,5	542,5	514,5	536,5				494,5	516,5	538,5	554,5	450,5	472,5	488,5		
Meropenem	383,4	384,5	406,5	428,5															
Imipenem	299,4	300,4						489,4											

^a Los términos sensibilidad y resistencia mediante MALDI-TOF MS se refieren al patrón de masas característico del antibiótico sin modificaciones y el correspondiente a su forma hidrolizada.

^b El imipenem forma complejos con la matriz (HCCA) dando lugar a un pico que es la suma de sus masas moleculares.

^c X, acetil para cefotaxima, piridin para ceftazidima, triazin-ytiol para ceftriaxona, metoxi para cefpodoxima y pirrolidin para cefepima.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de bacterias portadoras de β -lactamasas y carbapenemasas mediante MALDI-TOF	PNT-MT-04	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Hay que tener en cuenta que se está trabajando con microorganismos potencialmente patógenos o multi-resistentes.

Además, cada laboratorio debe adaptar y validar los métodos caseros expuestos en este documento.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Sólo existe de un kit comercial en el mercado para la detección de carbapenemasas. Este kit, el MBT STAR-Carba IVD (Bruker Daltonik), sólo puede usarse en equipos MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Vitek MS (Biomérieux) no dispone de ningún kit comercial para la detección de carbapenemasas.
- No están disponibles aún en el mercado kits comerciales para la detección de β -lactamasas.
- Los ensayos de detección de la actividad enzimática, sólo son capaces de detectar la presencia de β -lactamasas y carbapenemasas, pero no se pueden considerar una prueba de sensibilidad, ya que con este sistema no se detectan problemas de permeabilidad, presencia de porinas, bombas de expulsión y otros posibles mecanismos de resistencia.
- La cantidad de bacteria presente debe ser suficiente para realizar el ensayo, si se utiliza menos cantidad de la recomendada, se pueden obtener falsos negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Oviaño M, Gómara M, Barba MJ, Reville MJ, Barbeyto LP, Bou G. Towards the early detection of β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis. J Antimicrob Chemother. 2017; 72:2259-2262.
2. Oviaño M, Sparbier K, Barba MJ, Kostrzewa M, Bou G. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). Int J Antimicrob Agents. 2016; 48:655-660.
3. 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; 32(1).
4. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. J Clin Microbiol. 2012; 50:927-37.