



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VERIFICACIÓN DEL EQUIPO PARA IDENTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS MALDI BIOTYPER**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

EDUARDO MORENO VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Luciano Hernández Gómez

VOCAL: Profesora: Rosalía Guevara Leonel

SECRETARIO: Profesora: María del Rosario Vázquez Larios

1er. SUPLENTE: Profesora: Mónica Berenice Heras Chavarría

2° SUPLENTE: Profesor: Javier Fernández Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

ASESOR DEL TEMA:

M. en AOS María del Rosario Vázquez Larios

SUSTENTANTE:

Eduardo Moreno Vázquez

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. Antecedentes.....	4
3.1 Identificación bacteriana en la actualidad.....	4
3.1.1 Identificación microscópica.....	4
3.1.2 Identificación macroscópica.	5
3.1.3 Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	6
3.1.4 Identificación mediante métodos moleculares.....	11
3.1.5 Métodos de identificación basados en la proteómica	12
3.2 Espectrometría de masas.....	12
3.2.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF	13
3.2.2 Identificación de bacterias mediante espectrometría de masas	14
3.3 Verificación de pruebas de identificación microbiológica.....	16
4. Materiales y métodos.....	17
4.1. Materiales	17
4.1.1 Instrumental.....	17
4.1.2 Reactivos.....	17
4.1.3 Equipos	17
4.1.4 Software	17
4.2 Material biológico.....	17
4.2.1 Identificación de los microorganismos de rutina.....	19
4.3 Metodología.....	20
4.3.1 Preparación de reactivos:.....	20
4.3.2 Preparación de la muestra	20
4.4 Obtención del espectro de masas e identificación de la cepa.	21
4.5 Concordancia de resultados	21
4.6 Verificación del equipo	22
4.6.1 Cálculo de la exactitud y la precisión	22
5. Resultados y análisis	23

5.1 Cepas control	23
5.2 Bacterias Gram positivas.....	25
5.3 Bacterias Gram negativas	29
5.4 Levaduras.....	34
5.5 Cálculo de la precisión y exactitud	36
5.6 Reducción del tiempo de análisis de muestras.....	38
5.7 Interferencia del medio de cultivo	40
6. Conclusiones	41
7. Bibliografía	43

1. Introducción

A pesar de los avances en el campo de la medicina, las enfermedades infecciosas siguen siendo la causa de una elevada morbilidad y mortalidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe actualizado en 2011, 4 de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial son por agentes infecciosos.¹⁴

Para un manejo óptimo de los pacientes es indispensable obtener la identificación microbiológica del agente causal de la infección en el menor tiempo posible. Solo así será posible aplicar un tratamiento antimicrobiano efectivo y reducir el espectro del tratamiento administrado empíricamente.¹⁴

La obtención de un diagnóstico microbiológico resulta complejo utilizando los métodos convencionales considerados como *estándar de oro*, que se basan en el cultivo, seguido de la identificación fenotípica del microorganismo una vez aislado. El tiempo necesario para la obtención del cultivo del microorganismo puede variar entre 24 y 48 horas según los requerimientos del microorganismo. Asimismo, serán necesarias 24 horas adicionales para disponer de los resultados definitivos de la identificación y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, lo que conlleva como mínimo un total de 48 a 72 horas desde la obtención de la muestra del paciente.¹⁴

Los métodos de identificación bacteriana usados habitualmente en microbiología clínica se siguen basando en las pruebas de identificación convencional, considerando las características morfológicas y microscópicas de los microorganismos, como son su crecimiento en distintos medios de cultivo, condiciones de cultivo, pruebas bioquímicas y, en algunos casos, a partir de ciertas características de sensibilidad a los antimicrobianos.^{4, 7, 10} Aunque la identificación fundamentada en estas propiedades ha evolucionado tecnológicamente, la miniaturización de las series de pruebas y la automatización de su realización y lectura, se siguen basando en los mismos principios y recursos que las pruebas en uso de hace 25–30 años.⁹ Esta metodología hace que la identificación del microorganismo se retrase horas o incluso días desde su crecimiento en los medios de cultivo hasta la identificación, y en ocasiones resulta difícil cuando se trata de

microorganismos con escasa actividad bioquímica y enzimática, por lo que se deben considerar los avances tecnológicos que pueden modificar radicalmente estas metodologías.^{7, 9}

La espectrometría de masas denominada Matrix-Assited Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) se fundamenta en el perfil de proteínas y es considerado método rápido y fiable para la identificación bacteriana en el campo de la microbiología clínica.^{7, 9}

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Realizar la verificación del equipo Microflex MALDI Biotyper

2.2 Objetivos particulares

- Analizar la eficacia del MALDI TOF para la identificación de cepas clínicas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y levaduras aisladas de diversas muestras clínicas de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH), a partir de su aislamiento en medios de cultivo habituales.
- Determinar la interferencia del medio del cultivo con la identificación del microorganismo.
- Determinar la reducción del tiempo que implica el uso del MALDI Biotyper al sustituir los sistemas convencionales para la identificación bacteriana.

3. Antecedentes

3.1 Identificación bacteriana en la actualidad

Actualmente, la identificación bacteriana en microbiología clínica se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas como la morfología, aspecto en los medios de cultivo, propiedades fisiológicas, propiedades bioquímicas, degradación de macromoléculas, tipos de enzimas respiratorias, necesidades nutricionales, características quimiotaxonómicas, inhibición por diversas sustancias (antibióticos, colorantes) y reacciones frente a anticuerpos. Asimismo, se utilizan técnicas sencillas como la microscopía en fresco o previa tinción, cultivos y diferentes procedimientos más complejos.^{4, 10}

3.1.1 Identificación microscópica.

Uno de los primeros pasos en la identificación de las bacterias es la observación microscópica de una tinción de Gram o de una tinción de ácido-alcohol resistencia se emplea para obtener información rápida de una muestra en el ambiente clínico.²¹

La tinción de Gram es utilizada especialmente para ver las propiedades de afinidad tintorial bacteriana, lo que lleva a diferenciarlas en dos grandes grupos: Gram positivas (color violeta) y Gram negativas (color rojo), a la vez que permite distinguir su morfología y forma de agruparse (Ver figura 1). Asimismo, permite, considerando el tipo de muestra, hacer un diagnóstico presuntivo de algunas bacterias como *S. pneumoniae*, *Neisseria* spp, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Listeria* spp, *Vibrio* spp, *Enterobacteriaceae*, entre otras.¹⁰

La coloración de una bacteria mediante la tinción de Gram puede proporcionar información valiosa para el tratamiento de ciertas enfermedades. Las bacterias Gram positivas pueden ser destruidas principalmente por las penicilinas y las cefalosporinas. Las bacterias Gram negativas; por lo general, son más resistentes, ya que los antibióticos no pueden atravesar la capa de lipopolisacárido; por lo que los antibióticos utilizados deben ser relativamente

pequeños e hidrófilos para atravesar las porinas que forman los canales llenos de agua que atraviesan esa capa.²¹



Fig. 1. Tinción de Gram. Izquierda: Bacilos Gram negativos. Derecha: Cocos Gram positivos en cadenas

Otras tinciones diferenciales, como la de ácido-alcohol resistencia, son útiles para un grupo más limitado de microorganismos.²¹ La tinción de Ziehl-Neelsen, basada en la capacidad de algunas especies de resistir la decoloración por una mezcla de alcohol-ácido, debido a sus paredes ricas en ácidos micólicos y ceras D, se mantiene en la actualidad como imprescindible para detectar la presencia de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*.¹⁰

La coloración por medio de colorantes panópticos como Giemsa y Wright y con fluorocromos como naranja de acridina y auramina, se utilizan para la observación de bacterias que presentan dificultad para teñirse con los colorantes de anilina, como los utilizados en la técnica de Gram, o que tienen poco contraste con el material de fondo. Otro tipo de tinciones habituales de gran utilidad para bacterias muy finas como *Treponema pallidum* son las tinciones de plata (Fontana-Tribondeau), que permiten recubrir a estos microorganismos con su precipitado y aumentar el tamaño, facilitando así su visión microscópica.¹⁰

3.1.2 Identificación macroscópica.

La clave para identificar las bacterias como agentes patógenos depende de su aislamiento en cultivo puro. Una colonia de cultivo puro está compuesta por un solo tipo de microorganismos y procede de una única célula. Una vez que se han aislado las bacterias por medio de su cultivo correspondiente, enriquecido o selectivo, el paso siguiente es el conocimiento de las características ambientales de su crecimiento óptimo (aerobio, anaerobio, microaerófilas, tiempo de cultivo, temperatura de crecimiento, etc), el estudio

visual del aspecto de las colonias, observándose características como morfología, elevación, bordes, tamaño, color, olor, tipo de superficie, densidad, consistencia, incrustación en el medio de cultivo, crecimiento en sábana (swarming) y otras características; así como, su comportamiento frente a los distintos sustratos incorporados al medio de cultivo como hemólisis, fermentación de azúcares, utilización de sales, etc (medios diferenciales).¹⁰

Los medios diferenciales incorporan pruebas bioquímicas para medir la presencia o ausencia de enzimas implicadas en el catabolismo de uno o varios sustratos específicos. Por ejemplo, la utilización de azúcares se mide incorporando un indicador de pH que cambia de color con la acidificación (agar sal y manitol, agar Mac Conkey, etc, que a al mismo tiempo son medios selectivos). La producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) se detecta por crecimiento en un medio que contiene hierro férrico. Si se produce sulfuro, el ión férrico reacciona con el H_2S para formar FeS , visible como un precipitado negro (agar Salmonella-Shigella, agar Hektoen, etc, que también son medios selectivos) (ver figura 2).¹⁶

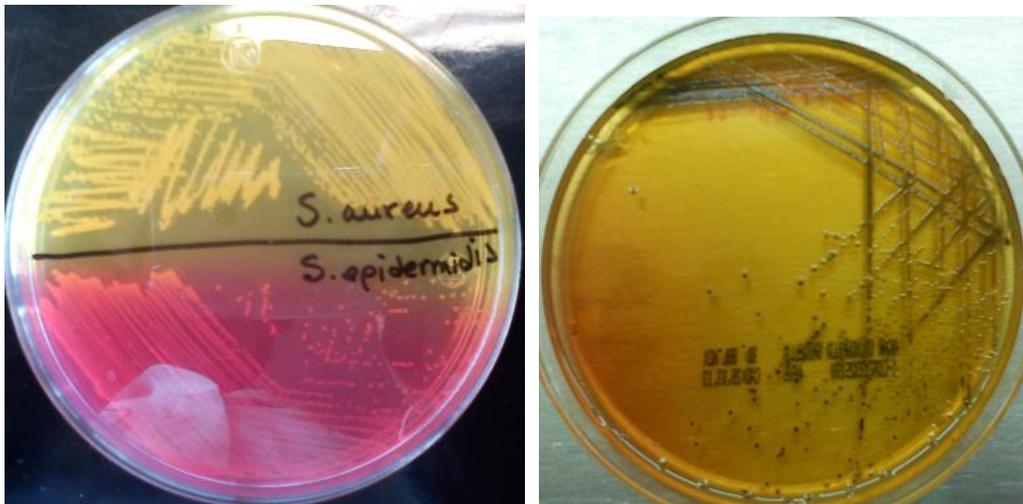


Fig. 2. Medios selectivos y diferenciales. Izquierda: Aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* en agar sal y manitol. Derecha: Aislamiento de *Salmonella* sp en agar Salmonella-Shigella.

3.1.3 Identificación mediante pruebas bioquímicas

3.1.3.1 Pruebas bioquímicas convencionales

Para la identificación final se estudia el comportamiento metabólico mediante pruebas de identificación, como la utilización de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas con la

producción de sustancias detectables por reacciones directas e indirectas.¹⁰ Las actividades enzimáticas son ampliamente utilizadas para diferenciar a las bacterias, incluso las bacterias estrechamente relacionadas pueden ser clasificadas en especies diferentes mediante el empleo de pruebas bioquímicas (ver figura 3).²¹

Las pruebas de identificación pueden ser rápidas y sencillas o complejas¹⁰:

- 1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como catalasa y oxidasa.
- 2) Otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 horas como hidrólisis del hipurato, β -galactosidasa (ONPG), aminopeptidasas, ureasa e indol.
- 3) Pruebas con lectura de 18 a 48 horas, donde se incluyen óxido-fermentación (Hugh-Leifson), reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges Proskauer, agar hierro de Kligler, fermentación de carbohidratos, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, descarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato y prueba de CAMP, entre las más frecuentes.
- 4) Pruebas basadas en patrones de resistencia a ciertas sustancias, tales como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis y crecimiento en caldos hipersalinos.⁴



Fig. 3. Pruebas bioquímicas convencionales en tubo. De izquierda a derecha: Citrato, Ornitina descarboxilasa, Malonato, Sorbitol, Salicina, Lisina descarboxilasa, Lactosa y Arginina descarboxilasa.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas bioquímicas, la identificación final se efectúa por medio de los sistemas de esquemas clásicos como matriz de cuadrículas y los diagramas de flujo ramificados. En la matriz de cuadrículas se expresan las pruebas bioquímicas positivas frente a diferentes sustratos y el porcentaje de positividad para distintas especies bacterianas (ver figura 4). La precisión es bastante alta, pero la interpretación es tediosa hasta llegar a un patrón determinado para identificar la especie y el biotipo. Los diagramas de flujo reducen la complejidad de la lectura de toda la matriz, utilizando algoritmos, pero un fallo en uno de los puntos puede originar interpretaciones erróneas finales (ver figura 5).¹⁰

"MICROORGANISMO" ^{a,b}	PRODUCCIÓN DE INDOL	ROJO DE METILO	VOGES-PROSKAUER	CITRATO (SIMMONS)	SULFURO DE HIDRÓGENO (TSI)	HIDRÓLISIS DE UREA	FENILALANINA DESAMINASA	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOTILIDAD	HIDRÓLISIS DE GELATINA (22 °C)	CRECIMIENTO EN KCN	UTILIZACIÓN DE MALONATO	"D-GLUCOSA, ÁCIDO"	"D-GLUCOSA, GAS"	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	FERMENTACIÓN DE SACAROSA	FERMENTACIÓN DE D-MANITOL	FERMENTACIÓN DE DULCITOL	FERMENTACIÓN DE SALICINA	
Enterobacter																						
<i>E. cloacae</i>	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	0	98	75	100	100	93	97	100	15	75	
<i>E. cowanii</i>	0	ND	92	100	0	0	0	0	0	0	92	0	92	0	100	100	100	100	100	100	100	
<i>E. dissolvens</i>	0	0	100	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	0	100	100	0	100	
<i>E. gergoviae</i>	0	5	100	99	0	93	0	90	0	100	90	0	0	96	100	98	55	98	99	0	99	
<i>E. hormaechei</i>	0	57	100	96	0	87	4	0	78	91	52	0	100	100	100	83	9	100	100	87	44	
<i>E. intermedius</i>	0	100	100	65	0	0	0	0	0	89	89	0	65	100	100	100	100	65	100	100	100	
<i>E. kobei</i> (grupo entérico 69)	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	25	100	100	100	
<i>E. nimipressuralis</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100	
<i>E. pyrinus</i>	0	29	86	0	0	86	0	100	0	100	43	0	0	86	100	100	14	0	100	0	100	
<i>E. sakazakii</i>	11	5	100	99	0	1	50	0	99	91	96	0	99	18	100	98	99	0	100	5	99	

Fig. 4. Ejemplo de una matriz de cuadrículas para identificación de especies de *Enterobacter*.

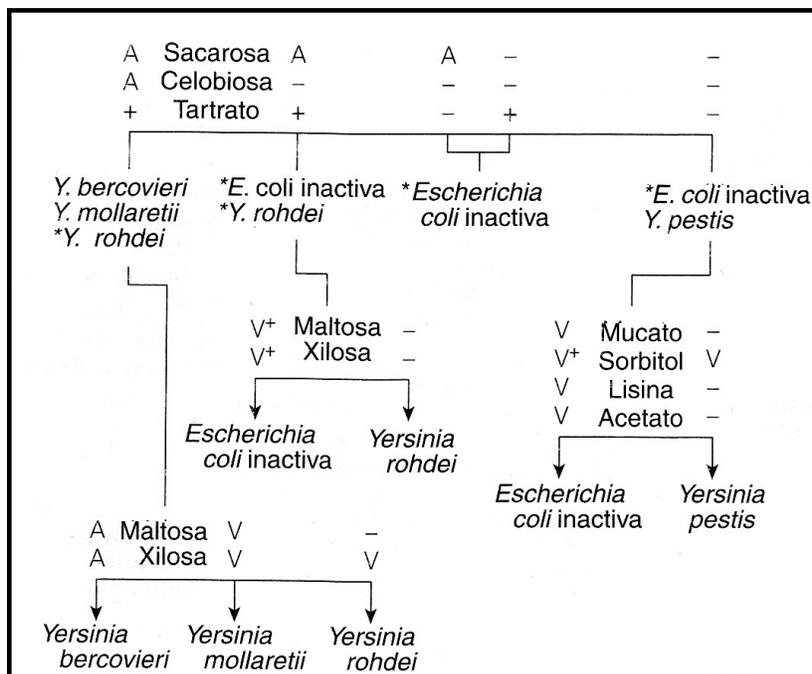


Fig. 5. Ejemplo de un diagrama de flujo para diferenciación de especies de *Escherichia* y *Yersinia*

3.1.3.2 Microsistemas comerciales

El concepto de combinar una serie de medios o sustratos diferenciales en un solo sistema, seleccionado para ayudar a identificar miembros de un grupo de bacterias, es un desarrollo lógico. De hecho, la disponibilidad de sistemas de identificación comerciales evolucionó naturalmente, casi como una necesidad práctica. Los microorganismos patógenos no solo son muchos, sino que a menudo tienen también requerimientos nutricionales especiales y se necesitan numerosas pruebas bioquímicas para su identificación. Mantener la diversidad de los medios convencionales requeridos está más allá de la capacidad de muchos laboratorios. La construcción compacta, las reacciones químicas fácilmente visibles, un tiempo de conservación prolongado y un control de calidad estandarizado provisto por los fabricantes de estos equipos hacen muy conveniente su uso en los laboratorios de microbiología.¹⁵

A) Microsistemas manuales.

Se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica y cada especie está

definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. Algunos de los sistemas disponibles en el mercado son: API (bioMérieux), MicroID (Remel), BBL Crystal (Becton Dickinson BBL), etc.⁴ El sistema de galería API y el sistema miniaturizado BBL Crystal son los más utilizados en la actualidad (ver figura 6).¹⁰



Fig. 6. Microsistema de identificación BBL Crystal Enteric/NF ID.

B) Sistemas comerciales automatizados

Existen en el mercado sistemas automatizados y semiautomatizados para la identificación de bacterias en los que, además de encontrarse sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos compuestos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realizan simultáneamente la identificación y las pruebas de susceptibilidad del microorganismo al mismo tiempo. Los más utilizados en la actualidad son el Vitek2 (bioMérieux), Microscan (Siemens), BD Phoenix (Becton Dickinson) y Sensititre (IL Diagnostics).^{4, 10}

Los sistemas consisten en unos paneles o tarjetas con una serie de pocillos con diversos sustratos. En cada uno de ellos se determina una prueba y dan el resultado en porcentaje de identificación o en porcentaje de tipificación. En algunos casos será necesaria alguna prueba externa para diferenciar entre dos o más especies, como en los casos en que hay hemólisis, pigmentación, movilidad, reacción de oxidasa, etc.¹⁰

Los sustratos encontrados en estos paneles (Microscan, Siemens) o tarjetas pueden interpretarse visualmente (sustratos cromogénicos) y posteriormente los resultados

son convertidos en un número, denominado biotipo de siete u ocho dígitos que puede ser traducido en una identificación con un libro de códigos que proporciona el fabricante. Como alternativa, se puede utilizar un lector automático para detectar el crecimiento bacteriano cambios de color por diferencias en la transmisión de luz.¹⁵

Existen paneles de lectura rápida (Vitek2, bioMérieux) que utilizan compuestos marcados fluorescentes. Cada sustrato consiste en un fluoróforo unido a un compuesto de fosfato, azúcar o aminoácido. En las reacciones fluorogénicas, si se presenta una enzima bacteriana específica se escinde el compuesto fluorescente, liberando al fluoróforo, y en las fluorométricas se detectan cambios en el pH como ocurre con la fermentación de hidratos de carbono.¹⁵

Además, existen sistemas semiautomatizados y automatizados como el AutoScan y Walkaway (Siemens), respectivamente, que procesan la combinación de hasta 96 paneles convencionales o rápidos en forma simultánea, agrega reactivos a paneles convencionales, lee e interpreta los resultados de los paneles, respectivamente (ver figura 7).¹⁵



Fig 7. Derecha: Lector automático MicroScan autoSCAN. Izquierda: Panel del microsistema MicroScan Combo Neg 44.

3.1.4 Identificación mediante métodos moleculares

Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica se han desarrollado métodos genotípicos considerando una amplia variedad de genes que han sido utilizados como dianas moleculares, constituyendo el análisis del rRNA

16S el marcador inicial y considerándose como marcador suficiente para realizar una identificación más precisa.⁴ El rRNA 16S es un polirribonucleótido incluido en la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano, actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación y, aunque constituye la diana de acción para algunos antimicrobianos, produciéndose mutaciones que conducen a la resistencia fenotípica, no se invalida la utilización del rRNA 16S para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia del gen presenta de forma aproximada 1500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.⁴

Las técnicas de identificación molecular mediante el análisis del rRNA 16S se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación del gen o sus fragmentos.⁴

3.1.5 Métodos de identificación basados en la proteómica

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.⁴

La espectrometría de masas recientemente se ha integrado en la microbiología como un método rápido y fiable para la identificación de microorganismos, basada en el perfil de proteínas obtenido mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF fue ya propuesta hace varias décadas.⁴

3.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental muy usada que se fundamenta en separar iones gaseosos cargados de acuerdo con las relaciones de carga/masa. Mediante esta tecnología es posible obtener información cualitativa y cuantitativa relacionada con la estructura de componentes orgánicos e inorgánicos en mezclas complicadas, las concentraciones relativas y absolutas de componentes de las mezclas, y la composición isotópica y las relaciones relativas de isótopos en muestras desconocidas de analito.¹²

3.2.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La tecnología MALDI (del inglés *matrix-assisted laser desorption ionization*) es una técnica en la que la muestra se mezcla con un solvente que contiene moléculas orgánicas (la matriz) que absorben fuertemente la radiación láser. Esta radiación, la cual absorbe la matriz, causa primero la evaporación del solvente y después fotoexcita la muestra, la cual se ioniza. Una ventaja de este método es que ahorra la necesidad de seleccionar frecuencias de láser que coincidan para distintos analitos, ya que es la matriz, y no el analito, la que absorbe la radiación láser.¹²

Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF, por *Time Of Flight*) funcionan midiendo en secuencia cuándo y cuántos iones de distintas relaciones de masa a carga llegan a un detector después de inyectar una sola ráfaga de iones. Estos se aceleran rápidamente entrando a un tubo de deriva hacia el detector. Los iones que tienen la misma carga recibirán cada uno la misma energía cinética, recorrerán el tubo de deriva a distintas velocidades y así llegarán al detector en distintos momentos. El detector de iones mide y cuantifica la cantidad de iones que salen del tubo de deriva y llegan al detector. Por lo anterior, se le llama instrumento de tiempo de vuelo a esta clase de espectrómetro de masas, ya que los iones se dispersan y se miden por los tiempos distintos que tardan en recorrer la longitud del tubo de deriva (ver figura 8).¹²

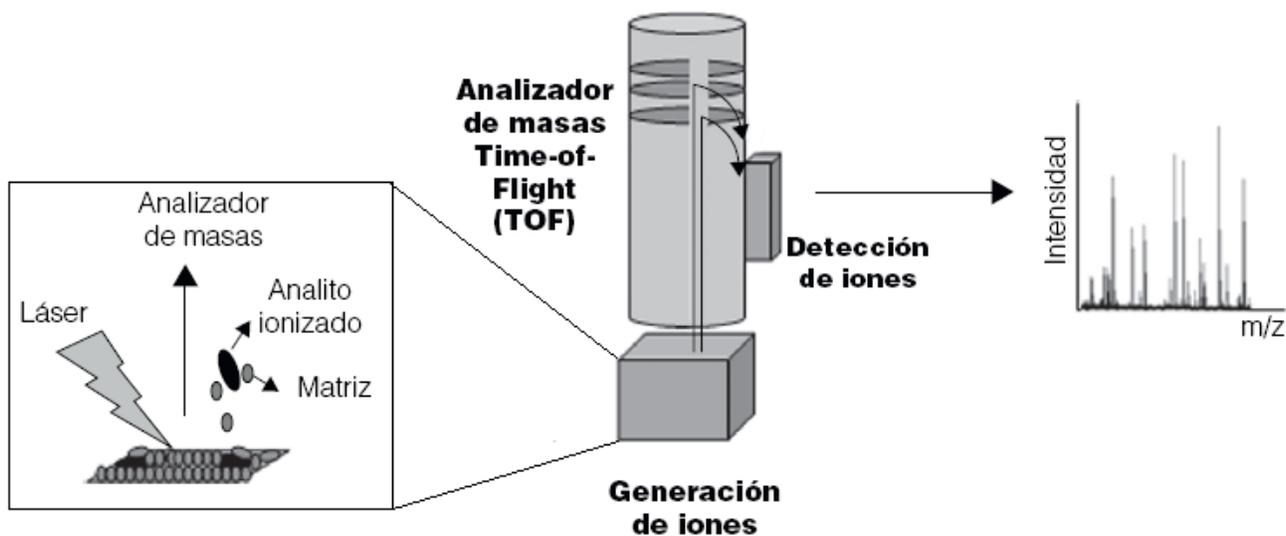


Fig. 8. Diagrama del funcionamiento de un espectrómetro MALDI-TOF. Modificado de Jordana-Luch, 2012.

Referencia 14.

3.2.2 Identificación de bacterias mediante espectrometría de masas

Las primeras aplicaciones extendidas de la espectrometría de masas fueron la determinación de pesos moleculares de proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos y lípidos individuales en fluidos biológicos fue.¹²

En 1975 la espectrometría de masas fue utilizada para analizar bacterias directamente mediante pirolisis seguida por ionización por impacto de electrones; logrando diferenciar microorganismos grampositivos y gramnegativos,^{14, 18, 19} incluso dos miembros del mismo género, *Staphylococcus*, produjeron espectros diferentes en este primer experimento.^{18, 20} Sin embargo, no fue hasta la invención de las llamadas técnicas de ionización suave, MALDI e ionización por electrospray (Electrospray Ionization, ESI) que esta tecnología empezó a utilizarse en los laboratorios para aplicaciones de rutina. Estas técnicas de ionización suave permitieron el análisis de proteínas de elevado peso molecular y a la vez facilitaron el análisis de mezclas, ya que mediante estas técnicas los componentes de una mezcla compleja se ionizan sin sufrir apenas fragmentaciones, lo cual simplifica los espectros de masas.¹⁴

Con este método se analizan las proteínas microbianas más abundantes (principalmente proteínas ribosómicas), y el total de las masas de las proteínas proporcionan una distribución característica de masa y de intensidad de las proteínas ribosómicas. Puesto que el espectro de masas es específico de la especie para un gran número de microorganismos, se puede interpretar como una huella dactilar molecular y puede usarse para la identificación de especies microbianas.⁵

3.2.2.1 La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología

Recientemente han aparecido diversas plataformas que han permitido a los laboratorios de microbiología clínica acceder más fácilmente a esta tecnología. Actualmente, las dos plataformas comerciales más utilizadas son MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) y Axima@SARAMIS (AnagnosTec GmbH, Postdam, Alemania). Ambos utilizan la tecnología MALDI-TOF y tienen un rango de detección de proteínas entre 2000 y 200 000 Dalton. La identificación se realiza por la comparación del espectro o perfil proteico obtenido

con la base de datos que ofrece cada casa comercial, en la que se encuentran representadas una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Una vez obtenido el espectro de masas y comparado con los existentes en la base de datos, el software le adjudica una identificación y un valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación.¹⁴

En cuanto a la muestra de partida, se han descrito dos metodologías diferentes:

- **Análisis de células intactas o transferencia directa.** Se selecciona la colonia de interés y se aplica directamente sobre la tarjeta del instrumento; a continuación, se cubre la muestra con la solución matriz y se deja secar al aire. Posteriormente se introduce la tarjeta en el instrumento para su análisis.
- **Extracción de proteínas.** Este protocolo utiliza etanol para inactivar las bacterias y ácido fórmico para la disrupción de su pared. Se suspende una colonia con agua bidestilada y etanol. Después de centrifugar y eliminar los restos de etanol, se añade ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo para la disrupción de la pared celular. Una vez centrifugada la muestra, se recoge el sobrenadante y se deposita 1 μ L en la tarjeta del instrumento, se recubre con la matriz, se deja secar y se procede a su análisis.¹⁶

El método de transferencia directa es la técnica que más ha sido evaluada en la bibliografía. Aunque estos estudios muestran que el método es efectivo, un número significativo de bacterias grampositivas y levaduras fallan en ser identificadas. El método de extracción con etanol y ácido fórmico ha probado ser más fiable para identificar a estos microorganismos, pero es más laborioso y requiere mayor tiempo.⁷

Otros estudios evaluaron la utilidad de una transferencia directa que es cubierta con 1 μ L de ácido fórmico en la tarjeta del instrumento y se observó que fue superior que la transferencia directa simple, particularmente en bacterias grampositivas y levaduras.¹⁴

3.3 Verificación de pruebas de identificación microbiológica.

Aunque las compañías que ofrecen estas tecnologías están (al día de hoy) buscando la acreditación de la Food and Drug Administration (FDA), ambas bases de datos están etiquetadas actualmente para uso exclusivo en investigación. Actualmente, no hay una guía formal que describa el proceso que se requiere específicamente para verificar el desempeño de estos sistemas.⁷

El Cumitech 31A. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory de la ASM establece que las pruebas o equipos que identifiquen aislamientos a nivel de especie deben ser probados en paralelo con la prueba existente u otro método de referencia en un mínimo de 200 aislamientos. De ser posible, estos aislamientos deben incluir todas las especies identificables por el equipo nuevo o que se revisará.⁶

Para pruebas de identificación microbiológica debe haber al menos un 90% de concordancia entre el sistema existente o el método de referencia antes de que el nuevo método se considere verificado. El nivel de error en las identificaciones considerado aceptable debe ser determinado por cada laboratorio. Ciertos grupos de microorganismos (por ejemplo, no fermentadores, corinebacterias, estafilococos coagulasa negativos) pueden ser más desafiantes para identificarse por los nuevos sistemas y una mayor flexibilidad puede ser necesaria al evaluar la precisión del nuevo método (por ejemplo, la identificación a nivel de género puede ser un rendimiento aceptable).⁶

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1 Instrumental

- Placas para MALDI-TOF microScout de acero inoxidable de 96 objetivos [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania].
- Micropipetas capacidad 0.5 - 10 μL , 10 - 100 μL y 100 - 1000 μL [Eppendorf, Hamburgo, Alemania].

4.1.2 Reactivos

- Acetonitrilo absoluto [Tedia, Fairfield, Estados Unidos].
- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) racionado (2.5 mg por tubo) [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania].
- Ácido fórmico [Tedia, Fairfield, Estados Unidos].
- Ácido trifluoroacético certificado [Tedia, Fairfield, Estados Unidos].
- Agua grado HPLC [Tedia, Fairfield, Estados Unidos].
- Etanol absoluto [Reamex, Cd de México, México].

4.1.3 Equipos

- MALDI Biotyper [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania]

4.1.4 Software

- FlexControl 3.4 [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania].
- MALDI Biotyper 3.1 [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania].

4.2 Material biológico

Las cepas utilizadas en el estudio se obtuvieron de las siguientes fuentes (ver figura 9):

- a) Cepas del trabajo de rutina en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (237) durante el periodo del 14 de octubre de 2013 al 15 de noviembre de 2013, provenientes de orina, aspirados bronquiales,

expectoraciones, hemocultivos, secreciones de herida, exudados faríngeos y nasales. Las muestras se sembraron en agar sangre, agar chocolate y agar Mac Conkey, según el tipo de muestra y se incubaron en atmósfera aerobia o en 5% de CO₂ según el tipo de muestra procesada de acuerdo con la metodología microbiológica habitual. Las levaduras del género *Candida* se sembraron en CHROMagar, agar dextrosa de Sabouraud y agar sangre; otros géneros de levaduras se sembraron en agar sangre y agar dextrosa de Sabouraud.

- b) Cepas conservadas en congelación a -70° (136) obtenidas en el año 2012, representando proporcionalmente los principales agentes patógenos de las mismas fuentes citadas en el inciso A. Estas cepas se recuperaron en los medios de cultivo establecidos por el laboratorio (ver figura 9). Se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas rápidas (oxidasa y catalasa, según correspondió) para confirmar la pureza de las cepas ensayadas.
- c) Cepas control (31). Las cepas de referencia ATCC (American Type Culture Collection) que se utilizaron se presentan en la tabla 1

Tabla 1: Cepas ATCC utilizadas

Microorganismo	ATCC	Microorganismo	ATCC
<i>Candida albicans</i>	90028	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
<i>Candida glabrata</i>	90030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Candida parapsilosis</i>	22019	<i>Salmonella enterica</i>	13076
<i>Candida tropicalis</i>	66029	<i>Serratia liquefaciens</i>	27592
<i>Enterobacter cloacae</i>	700323	<i>Staphylococcus aureus</i>	43300
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	<i>Staphylococcus aureus</i>	33862
<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35984
<i>Escherichia coli</i>	35218	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	17666
<i>Gardnerella vaginalis</i>	15309	<i>Streptococcus agalactiae</i>	12386
<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	<i>Streptococcus bovis</i>	9809
<i>Haemophilus influenzae</i>	49247	<i>Streptococcus mitis</i>	6249
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	<i>Streptococcus mutans</i>	25175
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
<i>Moraxella catarrhalis</i>	49143	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
<i>Neisseria lactamica</i>	49142		

4.2.1 Identificación de los microorganismos de rutina

Las cepas se identificaron de acuerdo con la metodología establecida en el laboratorio. Los cocos Gram negativos (*Moraxella*), bacilos Gram positivos y estreptococos del grupo Viridans se identificaron por métodos convencionales; *Haemophilus*, cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos no fermentadores mediante paneles de MicroScan (Siemens); y los bacilos Gram negativos fermentadores mediante tarjetas de Vitek 2 (bioMérieux). Los aislamientos de *Salmonella* y estreptococos beta hemolíticos se serotipificaron mediante sueros específicos.

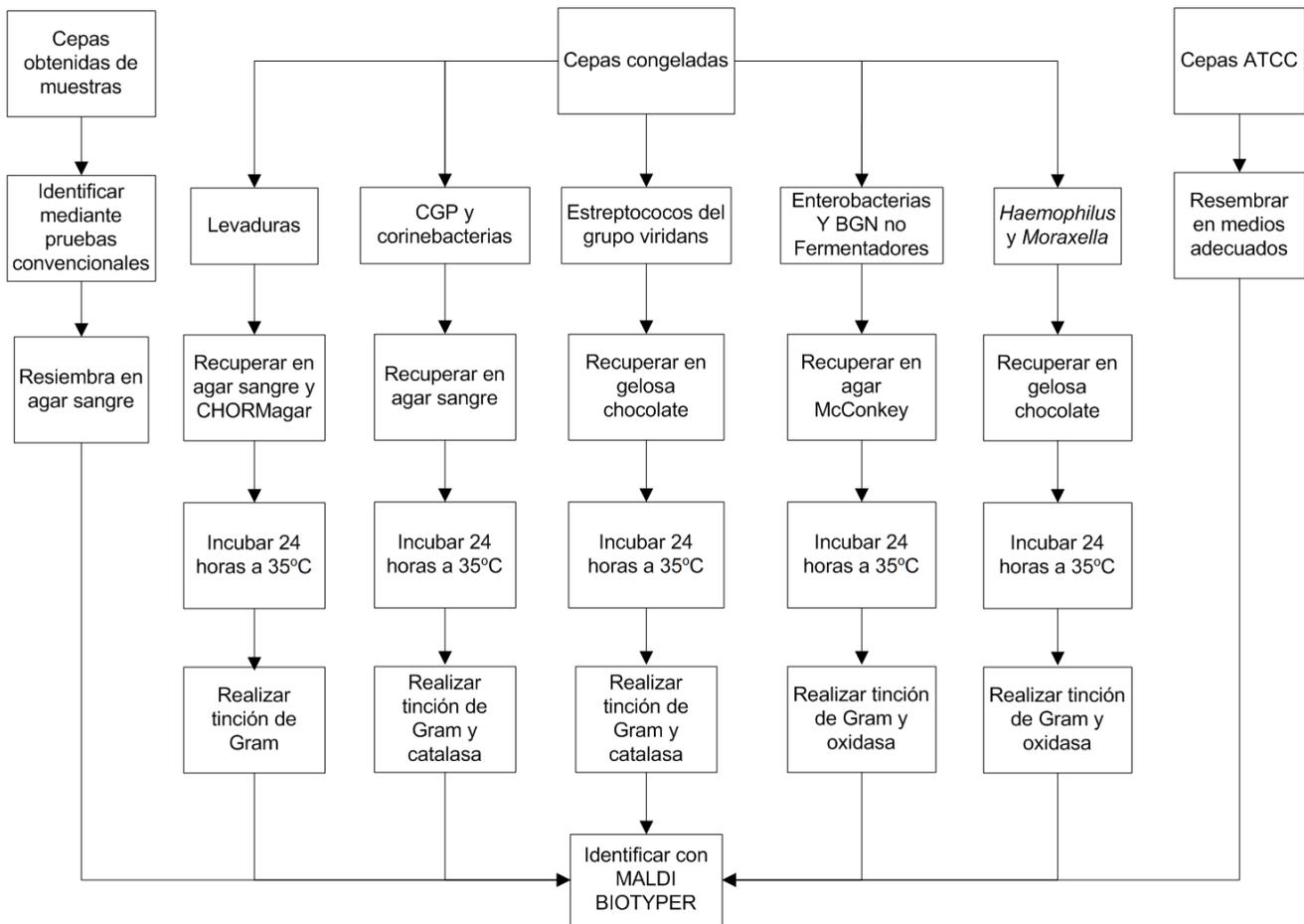


Figura 9. Diagrama de flujo general.

4.3 Metodología.

4.3.1 Preparación de reactivos:

- Disolvente estándar: 50% de acetonitrilo absoluto, 47.5% agua grado HPLC y 2.5% de ácido trifluoroacético.
- Solución matriz: Se añadieron 250 μL de disolvente estándar a 1 tubo de HCCA racionado.
- Solución de ácido fórmico al 70% v/v: 70% de ácido fórmico en 30% de etanol absoluto.

4.3.2 Preparación de la muestra

4.3.2.1 Transferencia directa.

Para cada cepa, una colonia o parte de ella se tomó con un palillo de madera y se colocó en uno de los objetivos de la placa para MALDI TOF y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se cubrió con 1 μL de solución matriz y se dejó secar a temperatura ambiente (todas las cepas ensayadas fueron tratadas mediante este método).

4.3.2.2 Método de adición de ácido fórmico al 70%

La colonia se colocó en uno de los objetivos de la placa para MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, se cubrió con 1 μL de ácido fórmico al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se cubrió con 1 μL de solución matriz y nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente.^{11, 20}

Para las levaduras, estreptococos del grupo Viridans y bacilos Gram positivos se utilizaron los dos métodos mencionados.

4.4 Obtención del espectro de masas e identificación de la cepa.

La espectrometría de masas MALDI-TOF se llevó a cabo en el equipo MALDI Biotyper en los parámetros y condiciones preestablecidas por el fabricante y controladas mediante el software FlexControl 3.4. La identificación fue realizada mediante el software MALDI Biotyper 3.1.

De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se consideró una cepa como identificada certeramente a nivel de especie cuando ésta obtuvo una puntuación mayor a 2.0, como identificado certeramente solo a nivel de género cuando la cepa obtuvo una puntuación entre 1.7 y 1.999, y como una identificación no fiable si la puntuación obtenida fue menor a 1.7.

La puntuación se establece con una correlación teórica entre el espectro adquirido y el espectro de referencia. El software MALDI Biotyper establece este valor.⁵

4.5 Concordancia de resultados

Resultados concordantes: No se realizan pruebas adicionales.

Si el resultado obtenido mediante el equipo MALDI Biotyper y el obtenido mediante los microsistemas (MicroScan, Vitek o Crystal) o pruebas bioquímicas convencionales realizadas en el laboratorio es el mismo.

Discordancia de resultados:

- a) Resultado discordante a nivel de especie: Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas a la cepa para determinar la especie correcta.
- b) Resultado discordante a nivel de género: Se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas rápidas a las cepas (catalasa u oxidasa, de acuerdo la bacteria) y se identificó la cepa nuevamente mediante un microsistema diferente al utilizado inicialmente o mediante pruebas bioquímicas convencionales.

4.6 Verificación del equipo

4.6.1 Cálculo de la exactitud y la precisión

Para calcular la exactitud se utilizó la siguiente fórmula ⁶:

$$\frac{\text{Número de resultados correctos}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

Se considera como un resultado correcto a la concordancia entre la identificación obtenida mediante métodos convencionales y la obtenida con el MALDI Biotyper.

Para calcular la precisión se utilizó la siguiente fórmula ⁶:

$$\frac{\text{Número de repeticiones concordantes}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

La exactitud del equipo se calculó a nivel de género y a nivel de especie.

Para la precisión del equipo se evaluó la concordancia en los rangos de puntuación obtenidos al analizar las cepas y se calculó mediante la repetición de 8 cepas de referencia por triplicado en tres días distintos: *C. albicans* ATCC 90028, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *H. influenzae* ATCC 10211, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619 y *S. pyogenes* ATCC 19615; además, se incluyó una cepa de *E. coli* aislada de un paciente.

5. Resultados y análisis

Se analizaron un total de 404 microorganismos, incluyendo cepas control, de los cuales 116 fueron Gram positivos, 260 Gram Negativos y 28 levaduras, abarcando 31 géneros y 61 especies.

La identificación obtenida por los métodos utilizados en el laboratorio y por el equipo MALDI Biotyper se muestran en las tablas 2, 3, 4 y 5 considerando la puntuación obtenida para cada cepa.

5.1 Cepas control

Tabla 2. Resultados de las cepas control		
Cepa	ID MALDI Biotyper	Rango de puntuación obtenida
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	1.700 - 1.999
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	1.700 - 1.999
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	1.700 - 1.999
<i>C. tropicalis</i> ATCC 66029	<i>C. tropicalis</i>	1.700 - 1.999
<i>E. cloacae</i> ATCC 700323	<i>E. cloacae</i>	> 2.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	> 2.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<i>E. faecalis</i>	> 2.0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i>	> 2.0
<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>E. coli</i>	> 2.0
<i>G. vaginalis</i> ATCC 15309	<i>G. vaginalis</i>	> 2.0
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	<i>H. influenzae</i>	> 2.0
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>H. influenzae</i>	> 2.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	> 2.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	> 2.0
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 49143	<i>M. catarrhalis</i>	> 2.0
<i>N. lactamica</i> ATCC 49142	<i>N. lactamica</i>	> 2.0
<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002	<i>P. mirabilis</i>	> 2.0

Tabla 2. Resultados de las cepas control (continuación)		
Cepa	ID MALDI Biotyper	Rango de puntuación obtenida
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	> 2.0
<i>S. enterica</i> ATCC 13076	<i>Salmonella sp</i>	1.700 - 1.999
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	<i>S. liquefaciens</i>	> 2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i>	> 2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	> 2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i>	> 2.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>S. epidermidis</i>	> 2.0
<i>S. maltophilia</i> ATCC 17666	<i>S. maltophilia</i>	> 2.0
<i>S. gallolyticus (bovis)</i> ATCC 9809	<i>S. gallolyticus (bovis)</i>	> 2.0
<i>S. mitis</i> ATCC 6249	<i>S. pneumoniae</i>	1.700 - 1.999
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. mutans</i>	> 2.0
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	> 2.0
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. pyogenes</i>	> 2.0
<i>S. agalactiae</i> ATCC 12386	<i>S. agalactiae</i>	> 2.0

Las cepas control ensayadas fueron identificadas correctamente por el MALDI Biotyper a excepción de la cepa *S. mitis*, que fue identificada como *S. pneumoniae*. Desde el análisis de las cepas control puede observarse que la diferenciación entre estas especies por el MALDI Biotyper no es certera por las características genéticas que poseen.

La cepa de *S. entérica* fue identificada correctamente a nivel de género, y el equipo MALDI Biotyper emite una alerta señalando que el género *Salmonella* solo puede ser identificado a ese nivel debido a la similitud entre las especies.

Respecto a las cepas control de levaduras, todas obtuvieron una puntuación entre 1.700 – 1.999.

5.2 Bacterias Gram positivas

Tabla 3. Resultados de bacterias Gram positivas					
ID convencional (no. de cepas)	Nivel de correlación			ID MALDI Biotyper (no. de cepas)	Puntuación
	Especie	Género	No ID		
<i>S. aureus</i> (23)	23			<i>S. aureus</i> (23)	>2.0 (23)
<i>S. epidermidis</i> (23)	23			<i>S. epidermidis</i> (23)	>2.0 (23)
<i>S. haemolyticus</i> (1)	1			<i>S. haemolyticus</i> (1)	1.7-1.999 (1)
<i>S. hominis</i> (1)	1			<i>S. hominis</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. lugdunensis</i> (1)	1			<i>S. lugdunensis</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. saprophyticus</i> (1)	1			<i>S. saprophyticus</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. warneri</i> (2)	2			<i>S. warneri</i> (2)	>2.0 (2)
<i>E. casseliflavus</i> (1)	1			<i>E. casseliflavus</i> (1)	1.7-1.999 (1)
<i>E. faecalis</i> (15)	15			<i>E. faecalis</i> (15)	>2.0 (14) 1.7-1.999 (1)
<i>E. faecium</i> (3)	3			<i>E. faecium</i> (3)	>2.0 (3)
<i>E. durans</i> (1)		1		<i>E. hirae</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. agalactiae</i> (3)	3			<i>S. agalactiae</i> (3)	>2.0 (3)
<i>L. monocytogenes</i> (3)	3			<i>L. monocytogenes</i> (3)	>2.0 (3)
<i>P. acidilactici</i> (1)			1	No identificado (1)	<1.7 (1)
<i>S. gallolyticus (bovis)</i> (1)	1			<i>S. gallolyticus</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. mitis</i> (6)	2	4		<i>S. oralis</i> (2)	1.7-1.999 (2)
				<i>S. pneumoniae</i> (3)	>2.0 (2) 1.7-1.999 (1)
				<i>S. thermophilus</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. mutans</i> (3)		3		<i>S. australis</i> (1)	1.7-1.999 (1)
				<i>S. pneumoniae</i> (1)	1.7-1.999 (1)
				<i>S. sanguinis</i> (1)	1.7-1.999 (1)
<i>S. pneumoniae</i> (2)	2	1		<i>S. pneumoniae</i> (2)	>2.0 (1) 1.7-1.999 (1)
<i>S. salivarius</i> (1)				<i>S. oralis</i> (1)	1.7-1.999 (1)

Tabla 3. Resultados de bacterias Gram positivas (continuación)					
ID convencional (no. de cepas)	Nivel de correlación			ID MALDI Biotyper (no. de cepas)	Puntuación
	Especie	Género	No ID		
<i>S. sanguis</i> (7)	1	6		<i>S. parasanguis</i> (1)	1.7-1.999 (1)
				<i>S. constelatus</i> (1)	1.7-1.999 (1)
				<i>S. anginosus</i> (2)	>2.0 (1) 1.7-1.999 (1)
				<i>S. pneumoniae</i> (3)	1.7-1.999 (3)
Grupo <i>Viridans</i> (4)	3	1		<i>S. peroris</i> (3)	>2.0 (2)
				<i>S. pneumoniae</i> (1)	1.7-1.999 (1)

Para el género de los estafilococos se observa que una cepa presentó una puntuación que la clasifica en el rango de certeza de identificación a nivel de género; sin embargo, la misma identificación se obtuvo por el MALDI Biotyper y por métodos microbiológicos habituales (ver tabla 3).

Con respecto al grupo de los enterococos, todas las cepas fueron concordantes con las metodologías utilizadas; sin embargo, una cepa de *E. faecalis* y otra *E. casseliflavus* obtuvieron puntuaciones entre 1.7 y 1.999. Asimismo, se observa que la cepa de *E. durans*, identificada por el sistema fue identificada como *E. durans/hirae*, ya que el software no diferencia ambas especies; por lo cual, el laboratorio realizó como prueba adicional la fermentación de rafinosa, identificando a la cepa como *E. durans*, ya que la prueba es negativa para *E. durans* y positiva para *E. hirae*¹⁵. Se consideró que esta cepa fue identificada a nivel de especie porque *E. durans* y *E. hirae* pertenecen ambos al grupo 3 de los enterococos y que el análisis taxonómico actual se hace mediante técnicas genéticas¹⁵, se consideró que esta cepa fue identificada a nivel de especie.

Para *S. agalactiae* se observa que las tres cepas fueron identificadas con una buena puntuación a nivel de especie. En este grupo en particular resulta importante, ya que la identificación fenotípica que se realiza se basa en pruebas de aglutinación que, a pesar de que se obtienen resultados en unos cuantos minutos, resultan costosas.

La identificación de los EGV a nivel de especies es difícil y la identificación fenotípica no siempre es exacta, incluso utilizando los microsistemas,⁸ puesto que los EGV se encuentran clasificados en seis grupos mayores: *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. bovis*, *S. salivarius* y *S. mutans*, dentro de los cuales se organizan las 30 especies reconocidas de EGV^{8, 15}, por lo que se consideró como concordancia a nivel de especie cuando el MALDI Biotyper emitía como resultado una especie perteneciente al grupo identificado en el laboratorio; sin embargo, aun considerando estas características no se obtuvo un nivel de concordancia.

La hibridación DNA-DNA es el método que se utiliza para confirmar especies a nivel de género en los EGV.^{2, 8} Incluso el uso de la secuenciación del gen del rRNA 16S resulta en una resolución pobre, debido a que las especies *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae* y *S. pneumoniae* muestran una homología mayor al 99% en su secuencia.⁸ Se puede inferir que una alta homología en el genoma repercutirá en una alta homología en las proteínas, lo cual explica la dificultad para discernir entre estas especies. Se han propuesto métodos alternativos para la identificación a nivel de especie como la secuenciación del gen de la RNasa P (*rnpB*)⁸ o de la autolisina (*lytA*)² sin embargo, estos métodos no son accesibles para la mayoría de los laboratorios clínicos.

La identificación de *S. pneumoniae* por el MALDI Biotyper presenta dificultades, Cabe mencionar que la identificación de *S. pneumoniae* mediante los métodos de la sensibilidad a optoquina y solubilidad en bilis es satisfactoria cuando se aíslan de sitios estériles (hemocultivos y LCR); sin embargo, a partir de muestras no estériles, como las del tracto respiratorio presentan problemas, porque *S. pneumoniae* es un microorganismo competente naturalmente (es decir, naturalmente capta DNA del medio en que se encuentra) y debido a ello existe transferencia horizontal de genes que modifican también sus características fenotípicas, lo que dificulta su identificación.² La totalidad de las cepas analizadas proviene de muestras del tracto respiratorio y la prueba que se utiliza para diferenciar a *S. pneumoniae* es la sensibilidad a optoquina que puede considerarse como un factor de interferencia.

Por lo anteriormente expuesto se decidió no tomar en cuenta este grupo de bacterias para los cálculos de exactitud del MALDI Biotyper, debido a que se requiere que las cepas sean identificadas por métodos moleculares para asegurar un resultado correcto que se pueda comparar con el emitido por el equipo.

Las cepas de *L. monocytogenes* se identificaron correctamente utilizando el método de adición de ácido fórmico; sin embargo, cabe aclarar que el equipo emite una alerta para este género que indica que las especies de *Listeria* están estrechamente relacionadas y se puede requerir una tipificación fenotípica para determinar la especie.

5.3 Bacterias Gram negativas

Tabla 4. Resultados de bacterias Gram negativas						
ID convencional (no. de cepas)	Nivel de correlación				ID MALDI Biotyper (no. de cepas)	Puntuación obtenida
	Especie	Género	No ID	Ninguna		
<i>H. influenzae</i> (3)	3				<i>H. influenzae</i> (3)	>2.0 (3)
<i>H. parainfluenzae</i> (12)	12				<i>H. parainfluenzae</i> (12)	>2.0 (10) 1.7-1.999 (2)
<i>M. catarrhalis</i> (1)	1				<i>M. catarrhalis</i> (1)	>2.0 (1)
<i>N. mucosa</i> (2)	2				<i>N. mucosa</i> (2)	>2.0 (2)
<i>C. freundii</i> (6)	3			3	<i>C. freundii</i> (3)	>2.0 (3)
					<i>E. coli</i> (3)	>2.0 (3)
<i>C. koseri</i> (2)	2				<i>C. koseri</i> (2)	>2.0 (2)
<i>E. aerogenes</i> (4)	4				<i>E. aerogenes</i> (4)	>2.0 (4)
<i>E. cloacae</i> (25)	25				<i>E. cloacae</i> (22)	>2.0 (21) 1.7-1.999 (1)
					<i>E. asburiae</i> (3)	>2.0 (3)
<i>E. coli</i> (87)	87				<i>E. coli</i> (87)	>2.0 (87)
<i>E. gergoviae</i> (1)	1				<i>E. gergoviae</i> (1)	>2.0 (1)
<i>E. vulneris</i> (1)		1			<i>E. coli</i> (1)	>2.0 (1)
<i>K. oxytoca</i> (5)	5				<i>K. oxytoca</i> (1)	>2.0 (5)
<i>K. pneumoniae</i> (10)	10				<i>K. pneumoniae</i> (10)	>2.0 (10)
<i>M. morgani</i> (1)	1				<i>M. morgani</i> (1)	>2.0 (1)
<i>P. mirabilis</i> (3)	3				<i>P. mirabilis</i> (3)	>2.0 (3)
<i>P. multocida</i> (1)	1				<i>P. multocida</i> (1)	>2.0 (1)
<i>P. rettgerii</i> (1)	1				<i>P. rettgerii</i> (1)	>2.0 (1)
<i>S. enterica</i> (2)		2			<i>Salmonella</i> sp (2)	1.7-1.999 (2)
<i>S. liquefaciens</i> (2)	2				<i>S. liquefaciens</i> (2)	>2.0 (2)
<i>S. marcescens</i> (16)	16				<i>S. marcescens</i> (16)	>2.0 (16)
<i>S. sonnei</i> (2)	2				<i>E. coli</i> (2)	>2.0 (2)

Tabla 4. Resultados de bacterias Gram negativas (continuación)						
ID convencional (no. de cepas)	Nivel de correlación				ID MALDI Biotyper (no. de cepas)	Puntuación obtenida
	Especie	Género	No ID	Ninguna		
<i>A. baumannii</i> (1)	1				<i>A. baumannii</i> (1)	>2.0 (1)
<i>A. lwoffii</i> (1)	1				<i>A. lwoffii</i> (1)	>2.0 (1)
<i>A. hydrophila</i> (1)	1				<i>A. hydrophila</i> (1)	>2.0 (1)
<i>B. cepacia</i> (6)	6				<i>B. cepacia</i> (6)	>2.0 (6)
<i>P. aeruginosa</i> (27)	26		1		<i>P. aeruginosa</i> (26)	>2.0 (26)
					No identificado (1)	<1.7 (1)
<i>P. alcaligenes</i> (2)	2				<i>P. oleovorans</i> (2)	>2.0 (2)
<i>P. fluorescens</i> (3)	1		2		<i>P. fluorescens</i> (1)	>2.0 (1)
					No identificado (2)	<1.7 (2)
<i>P. putida</i> (2)	2				<i>P. monteilli</i> (1)	>2.0 (1)
					<i>P. putida</i> (1)	>2.0 (1)
<i>P. stutzeri</i> (5)	2	2			<i>P. mendocina</i> (1)	>2.0 (1)
					<i>P. oleovorans</i> (1)	>2.0 (1)
					<i>P. stutzeri</i> (2)	>2.0 (2)
					No identificado (1)	<1.7 (1)
<i>S. maltophilia</i> (11)	11				<i>S. maltophilia</i> (11)	>2.0 (11)
<i>S. paucimobilis</i> (2)	1		1		<i>S. paucimobilis</i> (1)	1.7-1.999 (1)
					No identificado (1)	<1.7 (1)

Dentro del grupo de *Haemophilus* solo hubo dos cepas de *H. parainfluenzae* que obtuvieron una puntuación entre 1.700 y 1.999, pero fueron identificadas concordantemente con el resultado obtenido por el laboratorio.

Cabe mencionar que en el caso de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*, una información importante para cuestiones médicas y epidemiológicas es la serotipificación y determinación del biotipo de la cepa; puesto que, existen 6 tipos capsulares de *H. influenzae* (a, b, c, d, e y f), siendo el b el más virulento, y varias especies no tienen cápsula, por lo que no son serotificables. Además, existen 7 distintos biotipos de *H. influenzae* y de *H. parainfluenzae*

determinados por tres pruebas bioquímicas: producción de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa.¹⁵

El equipo MALDI Biotyper no es capaz de ofrecer información sobre el serotipo ni el biotipo de la cepa, por lo que la determinación de estos debe realizarse mediante pruebas de aglutinación y pruebas bioquímicas convencionales.

El mayor número de cepas analizadas fueron las enterobacterias, puesto que son las de mayor incidencia en los laboratorios clínicos, y en el estudio realizado se muestra que la mayor parte de las cepas ensayadas fueron concordantes con puntuaciones excelentes, excepto una cepa de *E. cloacae* que obtuvo una puntuación entre 1.700 y 1.999.

Con relación al grupo de enterobacterias, se encontró:

- A) Tres cepas identificadas como *C. freundii* por microsistema, el MALDI Biotyper las identificó como *E. coli*, por lo que se procedieron a realizar pruebas bioquímicas convencionales en tubo y en otro microsistema para identificar a la bacteria. Las pruebas bioquímicas convencionales y el segundo sistema automatizado las identificaron como *E. coli*, independientemente de que la prueba de indol fuera negativa. En la literatura se ha publicado que una proporción mínima de cepas de *E. coli* no produce indol a partir de triptófano (1%).¹⁵ De este modo, se observa que el MALDI Biotyper puede ser una herramienta útil para identificar cepas que muestran fenotipos atípicos.
- B) Una cepa identificada como *E. vulneris* mediante métodos convencionales y que fue identificada como *E. coli* por el MALDI Biotyper. Un segundo microsistema identificó la cepa como *E. coli*.
- C) Tres cepas identificadas como *E. cloacae* por el laboratorio y como *E. asburiae* por el equipo MALDI Biotyper. En este caso, es importante mencionar que *E. cloacae* se considera como un complejo genómico heterogéneo compuesto por seis especies: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*.^{13, 17} La identificación fenotípica de todas las especies pertenecientes a este taxón usualmente es difícil y no siempre se logra, por lo que se utilizan métodos moleculares.¹⁷ Las secuencias de DNA que codifican para el rRNA 16S no forman un grupo coherente pero forman un árbol irregular.¹³ Al tener secuencias diferentes en los genes que

codifican las proteínas ribosomales, es probable que el equipo MALDI Biotyper pueda distinguir más fácilmente entre las especies de este complejo que los métodos fenotípicos.

Respecto a las cepas del género *Shigella*, cabe mencionar que fueron identificadas como *S. sonnei* por el laboratorio y como *E. coli* por el MALDI Biotyper; no obstante, se debe considerar que cada vez que el software identifica una *E. coli* emite una alerta informando que no es posible distinguir a *E. coli* del género *Shigella*, por lo que se deben realizar pruebas adicionales. No es posible considerar estas cepas como una identificación errónea a nivel de género ni de especie porque las cuatro especies de *Shigella* y *E. coli* forman una sola especie con base en los estudios de hibridación de DNA. Sin embargo, como las especies de *Shigella* se asocian con un espectro específico de enfermedades, se siguen considerando a las especies de *Shigella* como un género separado.¹⁶ La diferenciación entre *E. coli* y *Shigella* spp deberá seguirse haciendo en base a características fenotípicas y de serotipo, como pruebas bioquímicas y de aglutinación con antisueros.

Las cepas de *Salmonella* fueron identificados por el MALDI Biotyper como *Salmonella* sp. Actualmente existen solo dos especies en el género *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori*. Las cepas de *S. enterica* se clasifican de acuerdo a su serotipificación.¹⁵ Debido a que el MALDI Biotyper se fundamenta principalmente en la ionización de proteínas, no puede distinguir entre serotipos de *S. enterica* por el momento, por lo que se deben utilizar pruebas de aglutinación con antisueros y pruebas bioquímicas convencionales para llegar a la identificación de serotipos médicamente relevantes.

Dentro del grupo de los bacilos Gram negativos no fermentadores, tres cepas del género *Pseudomonas* obtuvieron puntuaciones menores a 1.7, considerando el puntaje, el equipo MALDI Biotyper no las identificó. Además, se analizaron dos cepas de *S. paucimobilis* que, a pesar de proceder de la misma fuente, una obtuvo una puntuación menor a 1.7, por lo que se considera que el MALDI Biotyper no la identificó y la otra obtuvo una puntuación de 1.796.

El género *Pseudomonas* ha presentado varias revisiones taxonómicas en los últimos 100 años y actualmente cuenta con 202 especies en la Lista Aprobada de Nombres Bacterianos.

Publicaciones recientes confirman que existen 7 grupos dentro del género *Pseudomonas* con base en la comparación de las secuencias de rRNA 16S.³ Los 7 grupos que se propusieron fueron: *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* y *P. pertucinogena*¹, por lo que la identificación fenotípica de estas especies es difícil y la base de datos de los microsistemas utilizados en el laboratorio no identifican todas las especies. Por lo anterior, se consideró como una identificación concordante a nivel de especie cuando las especies identificadas por el MALDI Biotyper así como el sistema MicroScan pertenecían al mismo grupo genómico. Por lo que se consideró como concordancia a nivel de especie en los siguientes casos: *P. alcaligenes* y *P. oleovorans* pertenecen al grupo de *P. aeruginosa*, y *P. putida* y *P. montelli* pertenecen al grupo de *P. putida*; pero *P. mendocina* pertenece al grupo de *P. aeruginosa*, por lo que su identificación como *P. stutzeri* solo se consideró a nivel de género, al igual que la cepa identificada como *P. stutzeri* por el laboratorio y como *P. oleovorans* por el MALDI Biotyper.¹

Cabe mencionar que realizar la resolución entre estas especies de bacterias no tiene impacto en el tratamiento del paciente.

5.4 Levaduras

Tabla 5. Resultados de levaduras				
Cepa	Identificación del laboratorio	Puntuación en agar Sangre	Puntuación en CHROMagar	Puntuación en ADS
A	<i>C. albicans</i>	1.916	1.978	1.944
B	<i>C. parapsilosis</i>	1.774	1.950	1.930
C	<i>C. tropicalis</i>	< 1.7	1.837	1.704
D	<i>C. glabrata</i>	1.787 (Identificación como <i>C. parapsilosis</i>)	1.955	> 2.0
E	<i>T. asahii</i>	1.793	No realizada	> 2.0
F	<i>C. neoformans</i>	< 1.7	No realizada	<1.7
G	<i>C. lipolytica</i>	< 1.7	1.761	1.887
H	<i>C. tropicalis</i>	1.875	1.935	1.922
I	<i>C. tropicalis</i>	> 2.0	1.959	1.866
J	<i>C. albicans</i>	> 2.0	<1.7	1.905
K	<i>C. lusitaniae</i>	> 2.0	1.752	1.771
L	<i>C. glabrata</i>	1.852	1.824	> 2.0
M	<i>C. guillermondii</i>	> 2.0	> 2.0	> 2.0
N	<i>C. parapsilosis</i>	> 2.0	<1.7	> 2.0
O	<i>C. pelliculosa</i>	> 2.0	1.946	> 2.0
P	<i>C. glabrata</i>	> 2.0	1.979	1.857
Q	<i>C. albicans</i>	> 2.0	1.785	> 2.0
R	<i>C. orthopsilosis</i>	1.730	Sin picos en el espectro	1.706
S	<i>C. tropicalis</i>	> 2.0	<1.7	1.895
T	<i>C. glabrata</i>	1.782	> 2.0	> 2.0
U	<i>C. albicans</i>	1.866	1.974	> 2.0
V	<i>C. glabrata</i>	> 2.0	> 2.0	1.974
W	<i>C. albicans</i>	1.833	<1.7	1.924
X	<i>C. albicans</i>	> 2.0	1.813	1.861
Y	<i>C. albicans</i>	1.991	<1.7	1.932
Z	<i>C. tropicalis</i>	1.998	1.852	> 2.0

En el caso de las levaduras, las cepas ensayadas se obtuvieron de agar sangre, CHROMagar y agar dextrosa de Sabouraud (ADS) (ver tabla 5).

Con respecto a las cepas de referencia ATCC (A – D) se observa que a partir de agar sangre se obtienen las menores puntuaciones; asimismo, discrepancia en *C. glabrata* que fue identificada como *C. parapsilosis*. En el caso de la cepa de referencia de *C. tropicalis*, a pesar de que obtuvo una puntuación menor a 1.7, la primera opción de identificación fue *C. tropicalis*. En el caso de las cepas control ensayadas, se encontró

La cepa de *C. neoformans* no se identificó a partir de ninguno de los medios de cultivo utilizados porque ambos ofrecieron puntuaciones menores a 1.7; sin embargo, la primera opción fue *C. neoformans* cuando la cepa provenía de ADS con puntuación de 1.637 contra 1.397 obtenida en agar sangre.

Se puede observar que las mejores puntuaciones se obtienen en agar sangre y en ADS; a pesar de que las cepas sembradas en CHROMagar son identificadas en la mayoría de los casos, existe un número que no son identificadas confiablemente con respecto a los otros medios de cultivo (6 aislamientos con puntuación menor que 1.7 en CHROMagar contra 3 en agar sangre y 1 en ADS); por lo que, se determinó que este medio de cultivo interfiere con la identificación de las cepas analizadas.

Aunque las puntuaciones obtenidas se encuentran en el rango de identificación confiable a nivel de género, todas las identificaciones fueron correctas a nivel de especie, a excepción de una cepa. Para el caso de levaduras se podría determinar un rango diferente para considerar una cepa identificada a nivel de especie, por ejemplo, con una puntuación a partir de 1.9 o incluso 1.8.

5.5 Cálculo de la precisión y exactitud

Los datos para el cálculo de la precisión se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Datos para el cálculo de la precisión				
	Repeticiones concordantes			
Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Total
<i>C. albicans</i>	1/3	2/3	3/3	6/9
<i>E. faecalis</i>	3/3	2/3	3/3	8/9
<i>E. coli</i>	3/3	3/3	3/3	9/9
<i>H. influenzae</i>	2/3	3/3	2/3	7/9
<i>P. aeruginosa</i>	3/3	3/3	3/3	9/9
<i>S. aureus</i>	3/3	3/3	3/3	9/9
<i>S. pneumoniae</i>	3/3	1/3	3/3	7/9
<i>S. pyogenes</i>	3/3	3/3	3/3	9/9
<i>E. coli</i> (silvestre)	3/3	3/3	3/3	9/9
			Total	64/72
			% Precisión	90.1%

Se analizaron estas cepas control por triplicado en tres días diferentes y se consideró el rango de puntuación obtenido más frecuentemente como valor para calcular la precisión.

Se observó que el mayor problema en la precisión se encuentra en la cepa de *C. albicans*, aislada en CHROMagar por lo que la precisión del equipo es de 90.1%.

Con los datos obtenidos en el proceso de verificación de las cepas ensayadas y las observaciones expuestas anteriormente, se calculó la exactitud a nivel de especie y de género, para cada grupo de bacterias y en general (ver tabla 7).

Tabla 7. Datos para el cálculo de la exactitud						
Grupo	Cepas ID hasta especie	Cepas ID hasta género	Muestras totales	% ID especie	% ID género	%ID especie + género
<i>Staphylococcus</i>	60	0	60	100	0	100
<i>Enterococcus</i>	20	0	20	100	0	100
Estreptococos beta hemolíticos	5	0	5	100	0	100
Bacilos Gram positivos	4	0	5	80	0	80
Cocos Gram negativos	5	0	5	100	0	100
<i>Haemophilus</i>	17	0	17	100	0	100
Enterobacterias	171	2	173	98.8	1.2	100
BGN NF	53	5	61	86.9	8.1	95.0
Levaduras	24	2	26	92.3	7.1	85.7
General	359	9	372	96.5	2.4	98.9

La exactitud del MALDI Biotyper para la identificación de microorganismos a nivel de especie es de 96.5 %, por lo que el equipo se considera apto para aplicarse en el proceso de identificación bacteriana en microbiología clínica.⁶

5.6 Reducción del tiempo de análisis de muestras

Los métodos convencionales para la identificación bacteriana que se llevan a cabo tradicionalmente proporcionan un resultado después de 48 a 72 horas, dependiendo del tipo de microorganismo que se trate. Las muestras que se procesan en el laboratorio deben sembrarse en medios de cultivo e incubarse 24 a 48 horas para obtener un buen desarrollo bacteriano, en el mejor de los casos. Posteriormente, se requieren 24 a 48 horas más para obtener los resultados de identificación y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana (Figura 10).

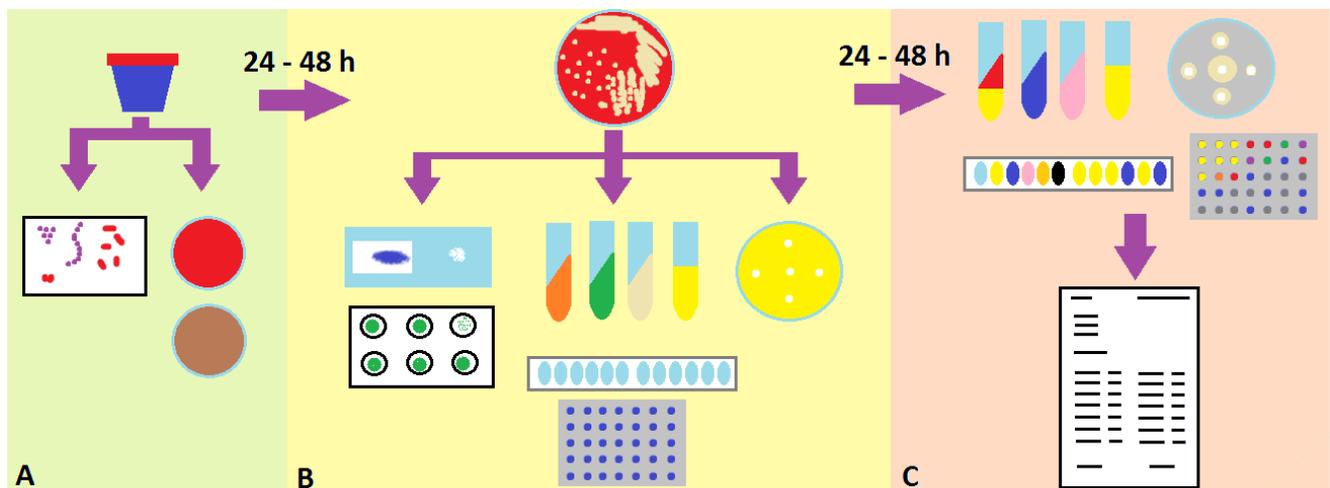


Fig. 10. Esquema de identificación tradicional. A) La muestra llega al laboratorio, se realizan análisis microscópicos y se siembra en medios adecuados. B) Cuando hay un buen desarrollo, se realizan pruebas de identificación rápida, como oxidasa o catalasa, o reacciones de aglutinación; la cepa se inocula en pruebas bioquímicas convencionales o microsistemas manuales o automatizados y se siembran en el medio correspondiente para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, si no se incluye en el microsistema. C) Se interpretan las pruebas bioquímicas y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y se emite el reporte final.

Con el equipo MALDI Biotyper se requieren 24 horas de incubación del cultivo de la muestra original y solo unos cuantos minutos más para procesar el aislamiento y obtener el resultado de la identificación bacteriana.

Cabe mencionar que esta tecnología no proporciona perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de la cepa analizada; sin embargo, se inicia con un tratamiento empírico basado en la epidemiología de la población. El hecho de tener la identificación del

microorganismo patógeno puede ayudar al médico a modificar o corregir el tratamiento antimicrobiano que está suministrando al paciente (Figura 11).

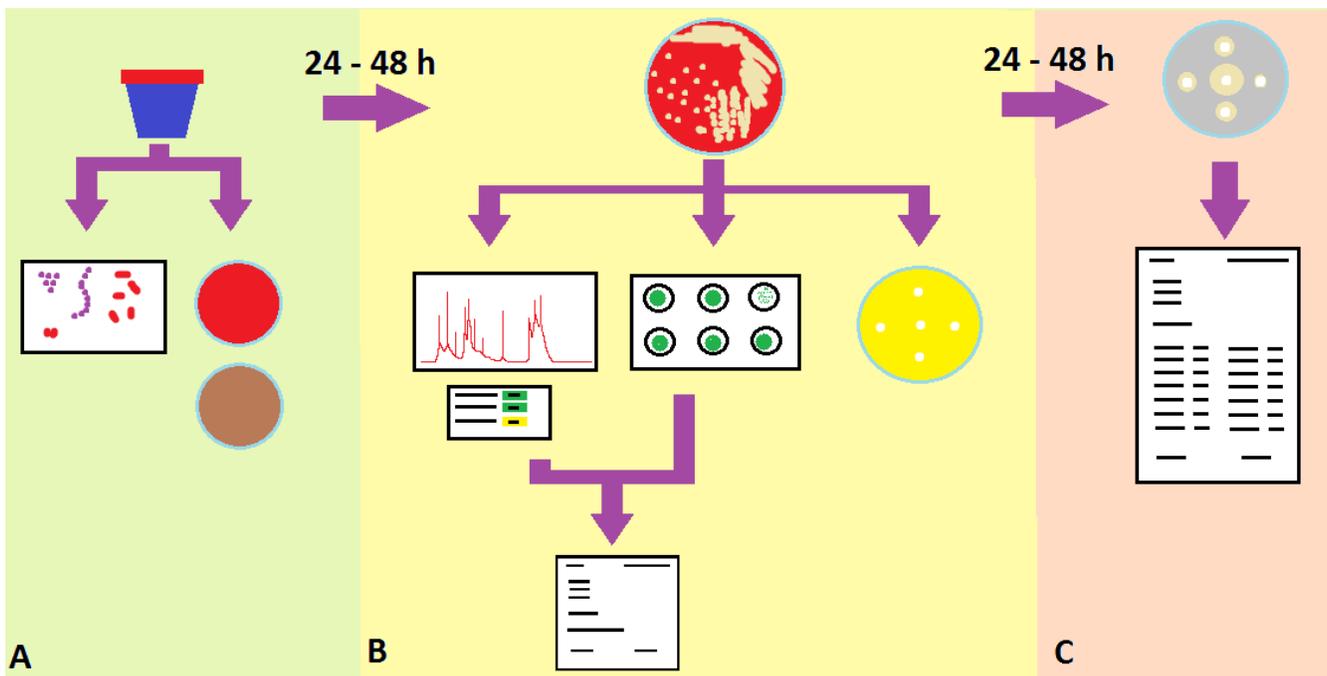


Figura 11. Esquema de identificación propuesto para el uso del MALDI Biotyper. A) La muestra llega al laboratorio, se realizan análisis microscópicos y se siembra en medios adecuados. B) Cuando se observa crecimiento microbiano, se analiza mediante el MALDI Biotyper para obtener una identificación. Si es necesario, se hacen reacciones de aglutinación y se emite un reporte preliminar; además, se inocula el perfil de susceptibilidad antimicrobiana (en placa o en microsistemas). C) Se interpreta el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y se emite el reporte final.

Esta tecnología, como lo indican algunas publicaciones, es capaz de discriminar la presencia de factores de patogenicidad o de mecanismos de resistencia. Existen publicaciones que indican que la espectrometría de masas es capaz, por ejemplo, de detectar la presencia de betalactamasas de espectro extendido y de diferenciar entre *S. aureus* sensible y resistente a meticilina.⁹

El tratamiento de la muestra es bastante sencillo y rápido, puesto que solamente se requiere tomar una colonia con un aplicador de madera, realizar el extendido en la placa de acero inoxidable y añadir la matriz con una micropipeta. Después de colocar la placa en el equipo, bastan unos cuantos minutos para obtener el resultado.

Se observó que el tiempo aproximado de tratamiento de una sola muestra, desde que se toma la colonia hasta la obtención del resultado es de 10 a 15 minutos, aunque este puede variar dependiendo de: a) la calidad del extendido, porque si es muy grueso o hay muy poca muestra el equipo debe realizar más disparos con el láser para obtener lecturas adecuadas; b) la velocidad de evaporación del solvente de la matriz. En ambientes muy húmedos o fríos, tarda más en evaporarse; y c) la adición de ácido fórmico, ya que se debe esperar a que evapore antes de poder colocar la matriz, lo que aumenta aproximadamente 5 minutos el tiempo de tratamiento. Si se colocan más cepas en la placa para MALDI TOF, el tiempo promedio por cepa disminuye, ya que la placa tiene capacidad para colocar 96 muestras.

Actualmente existe la posibilidad de realizar identificación bacteriana directamente de muestras como orina o hemocultivos, que previamente han sido detectados positivos, mediante kits como el MALDI Sepsityper [Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania]. Con este kit se toma una alícuota del medio de cultivo, se realiza un tratamiento de lisis celular y limpieza con amortiguadores, posteriormente se centrifuga la muestra para obtener un pellet donde se encuentran las células bacterianas y se realiza una extracción con etanol y ácido fórmico para obtener las proteínas que se colocan en la placa del MALDI TOF para ser analizadas.

Aunado a las ventajas expuestas, es importante mencionar que el costo por identificación que ofrece el MALDI Biotyper es mucho menor que los sistemas convencionales utilizados ya que los reactivos empleados se utilizan en el orden de 1 μ L por muestra, por lo que el impacto del costo de la compra del equipo puede amortiguarse con la disminución en el gasto de consumibles que requieren los otros sistemas.

5.7 Interferencia del medio de cultivo

Las cepas ensayadas fueron sembradas en agar sangre, agar chocolate y agar Mac Conkey. En el caso de las bacterias, no se observó que el medio del cual proviniera el aislamiento tuviera interferencia con el resultado de la identificación; sin embargo, para el caso de las levaduras, ya se expuso anteriormente que el medio sí interfiere con los resultados obtenidos para la identificación y para la puntuación que obtienen las cepas analizadas.

6. Conclusiones

- Se realizó la verificación del equipo MALDI Biotyper, obteniéndose una concordancia con los métodos de identificación convencionales de 96.5% a nivel de especie y 98.9% a nivel de género, sin incluir cepas de estreptococos del grupo Viridans ni *S. pneumoniae*. La precisión obtenida fue de 90.1%, atribuyéndose una disminución en este valor debido a que las puntuaciones obtenidas para la cepa de *C. albicans* presentaron las variaciones mayores.
- Se observó que el equipo MALDI Biotyper ofrece una identificación correcta de cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores y cocos Gram negativos y bacterias del género *Haemophilus*; no obstante, en el caso de los estreptococos del grupo Viridans y *S. pneumoniae*, existen problemas para discernir entre especies debido a la similitud genómica de estos microorganismos. Asimismo, por el bajo número de cepas de bacilos Gram positivos, no hay datos sólidos para considerar un desempeño adecuado por el equipo MALDI Biotyper.
- Se determinó que la aplicación del equipo MALDI Biotyper para el grupo de los estreptococos beta hemolíticos permitiría a diversos centros ahorrar recursos destinados a pruebas de aglutinación o discos utilizados.
- Para los géneros *Shigella* y *Salmonella* se estableció que para determinar la especie y/o el serotipo deben utilizarse los métodos inmunológicos, puesto que esta información es importante a nivel epidemiológico y el MALDI Biotyper no puede determinarlos. Asimismo, en el caso de las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*, se requiere la serotipificación o biotipificación.
- Se determinó que, en el caso de levaduras, podría ampliarse el rango de puntuación a 1.9 o 1.8 para considerar una cepa como identificada a nivel de especie.
- Se determinó que los medios de cultivos que se utilizan para la siembra de las cepas y/o muestras no interfieren con los resultados de identificación mediante el MALDI

Biotyper, a excepción de las levaduras, con las cuales se observó que las mejores puntuaciones se obtienen a partir de los medios de agar sangre y de agar dextrosa de Sabouraud.

- Se observó que el equipo MALDI Biotyper ofrece resultados confiables de identificación en un tiempo menor que los medios convencionales utilizados. El tratamiento de la muestra es sencillo y rápido, por lo que resulta en un sistema fácil de utilizar.
- Además, se debe considerar que, debido a la capacidad del equipo de incorporar nuevas librerías de microorganismos, para incrementar el número de especies que se pueden identificar y la calidad de la identificación de aquellas especies que no cuentan con muchos espectros en la librería de referencia actual.
- Se determinó que los costos para la identificación de bacterias y levaduras pueden disminuir, debido a que el MALDI Biotyper no requiere de materiales consumibles; además, se ahorraría en medios de cultivo, reactivos, kits y pruebas que se utilizan diariamente en el laboratorio.
- Se determinó que el equipo MALDI Biotyper podría funcionar como un control de calidad interno para el laboratorio puesto que, en este caso, las cepas que fueron utilizadas para la verificación fueron en su mayoría cepas que se identificaron a la par en el laboratorio de rutina. Este control de calidad fue realizado a ciegas, debido a que las cepas que se utilizaron para ser analizadas en el MALDI Biotyper no habían sido identificadas aún, y en muchos casos la identificación emitida por el MALDI Biotyper no fue comunicada al laboratorio de rutina, solamente se conoció la concordancia de los resultados hasta que se presentó el reporte de identificación de ambas partes.
- Es importante considerar que la introducción de las nuevas tecnologías en el campo de la microbiología clínica, no sustituye el criterio microbiológico del analista, que sigue siendo fundamental para emitir un resultado confiable que apoye al diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

7. Bibliografía

1. Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16s rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000; 50: p. 1563-1589.
2. Arbique, J., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M., Steigerwalt, A., Morey, R., Jackson, D., Davidson, R., Facklam, R. Accuracy of Phenotypic and Genotypic Testing for Identification of *Streptococcus pneumoniae* and Description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. Journal of Clinical Microbiology. Oct 2004. Vol 42. No. 10. p. 4686-4696.
3. Asli, O., David U. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? Microbial Ecology 2012. 63: p. 239-248.
4. Bou, G. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011; 29 (8): p. 601-608.
5. Bruker Daltonik GmbH. IVD MALDI Biotyper 2.3. Manual del usuario. Revisión 1 (Abril 2013). Alemania.
6. Clark, B. R. Cumitech 31A. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. 2009. ASM Press, Washington, DC.
7. Doern, C. Charting Uncharted Territory: A review of the verification and implementation process for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for organism identification. Clinical Microbiology Newsletter. Vol.35. No.9. 2013 p. 69-78
8. Doern, C., Carey-Ann B. It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. Journal of Clinical Microbiology, Nov 2010. Vol 48 No. 11. p. 3829-3835
9. Ferreira L.F. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010; 28(8): p. 492-497
10. Gobernado, M., López-Hontangas, J.L. Identificación bacteriana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003; 21 (Supl. 2): p. 54-60.

11. Haigh, J. Improved Performance of Bacterium and Yeast Identification by a Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in the Clinical Microbiology Laboratory. Journal of Clinical Microbiology. Sept. 2011. Vol 49. No. 9. p. 3441
12. Higson, S. Química Analítica. Primera edición. McGraw-Hill Interamericana. México, 2007.
13. Hoffmann, H., Andreas, R. Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter cloacae*. Applied and Environmental Microbiology. Sept 2003, Vol 69, No. 9. p. 5306-5318.
14. Jordana-Lluch, E., Martró, E., Ausina, V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2012. doi:10.1016/j.eimc.2012.01.012
15. Koneman E., Koneman. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
16. Madigan M., Martinko, J., Parker, J., Sánchez.Pérez, M. Brock. Biología de los microorganismos. 12ª Edición. Pearson Addison Wesley. Madrid, 2009.
17. Mezzatesta, F., Gona, F., Stefani, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiology. Jul 2012, Vol. 7, No. 7. p. 887-902.
18. Russell, S. Microorganism characterization by single particle mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 2009. 28, 376-387.
19. Sandrin, T., Goldstein, J., Schumaker, S. MALDI TOF MS Profiling of bacteria at the strain level: A review. Mass Spectrometry Reviews, 2013, 32, 188-217.
20. Theel, E., Schmitt, B., Hall, L., Cunningham, S., Walchak, R., Patel, R., Wengenack, N. Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology, Sep 2012, Vol. 50, No. 9. p. 3093-3095.
21. Tortora, G., Funke, B., Case, C. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires, 2007.