



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y LA ESPECIFICIDAD DE LA
ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE AISLAMIENTOS DE *SERRATIA MARCESCENS* PROCEDENTES DE
DIVERSOS ORÍGENES CLÍNICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA DIAZ PORRAS

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



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: GUTIERREZ RAMOS ABEL
VOCAL: Profesor: BONIFAZ TRUJILLO JOSÉ ALEXANDRO
SECRETARIO: Profesor: ARAIZA SANTIBÁÑEZ JAVIER
1er. SUPLENTE: Profesor: CAMACHO CRUZ ALEJANDRO
2° SUPLENTE: Profesor: JIMENEZ REYES GENARO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SUSTENTANTE:

MARIANA DÍAZ PORRAS

INDICE

1. RESUMEN	7
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.2 JUSTIFICACIÓN	9
1.3 OBJETIVOS	10
1.3.1 Objetivo general.....	10
1.3.2 Objetivos específicos.....	10
1.4 HIPÓTESIS	10
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 <i>Serratia marcescens</i>	11
2.1.1 Características generales.....	11
2.1.2 Antecedentes.....	13
2.1.3 Importancia de las infecciones por <i>Serratia marcescens</i>	15
2.2 Métodos de identificación bacteriana	17
2.2.1 Métodos fenotípicos.....	17
2.2.2 Métodos genotípicos.....	20
2.2.3 Proteómica.....	22
2.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF	24
2.3.1 Antecedentes.....	24
2.3.2 Fundamento.....	26
2.3.3 Componentes.....	27
2.3.3.1 Fuente de ionización.....	27
2.3.3.2 Analizador TOF.....	28
2.3.3.3 Detector.....	29
2.3.4 La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología.....	30
2.3.4.1 VITEK® MS.....	30
2.3.4.1.1 Ventajas y limitaciones de MALDI-TOF MS en la identificación microbiana.....	32
2.3.4.1.2 Costos.....	33

3. METODOLOGÍA	35
3.1 Tipo y diseño de estudio.....	35
3.2 Muestra.....	35
3.3 Criterios de selección.....	35
3.3.1 Criterios de inclusión.....	35
3.3.2 Criterios de exclusión.....	35
3.4 Identificación fenotípica.....	36
3.5 Identificación de cepas de <i>Serratia marcescens</i> por medio del equipo VITEK MS®	37
3.5.1 Preparación de la muestra.....	37
3.5.2 Generación del espectro de masas.....	38
4. RESULTADOS	40
5. DISCUSIÓN	46
6. CONCLUSIONES	49
7. BIBLIOGRAFÍA	50

1. RESUMEN

Desde el siglo pasado, las infecciones causadas por *Serratia marcescens* se han considerado de carácter oportunista afectando principalmente a pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos, lo que las clasifica como infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). Actualmente, este agente es causante de un amplio rango de enfermedades tales como, neumonía, meningitis, infecciones del tracto urinario, torrente sanguíneo, oculares, de heridas, piel, entre otras, que se han atribuido a instrumental médico contaminado, manos contaminadas del personal médico o soluciones desinfectantes.

En años recientes, los reportes epidemiológicos muestran un aumento en las IAAS causadas por esta bacteria y sumado a esto un incremento en la resistencia a antimicrobianos por lo que para su identificación son necesarios métodos más rápidos, reproducibles, sensibles y específicos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la sensibilidad y la especificidad de una plataforma comercial (VITEK® MS – bioMérieux®) para la identificación de cepas de *Serratia marcescens* aisladas de diversos orígenes clínicos mediante espectrometría de masas con tecnología MALDI-TOF (por sus siglas en inglés *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*). Se identificarán 198 aislados por medio de pruebas bioquímicas convencionales y se confirmará su identidad con un sistema automatizado basado en espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante décadas, en el laboratorio de microbiología clínica se han empleado métodos de identificación basados en el perfil bioquímico y metabólico de las bacterias. Al paso de los años se han logrado automatizar la realización y lectura de las pruebas, sin embargo, el fundamento es similar a las pruebas de identificación clásicas. ⁽¹⁾

El avance tecnológico permitió el uso de las distintas técnicas basadas en biología molecular como método de identificación, las cuales tienen alta sensibilidad y especificidad, pero no todos los laboratorios tienen los recursos necesarios para su implementación.

Para un diagnóstico y un tratamiento adecuado, es necesaria la identificación eficaz y oportuna de las bacterias que ocasionan patologías que hoy en día continúan generando una elevada mortalidad y morbilidad, dado que esto repercute directamente en el manejo del paciente y su pronóstico, y debido al aumento en la resistencia a los antimicrobianos. ⁽²⁾

Si bien, los sistemas automatizados (basados en pruebas bioquímicas) utilizados en la actualidad para la identificación rutinaria de microorganismos patógenos al humano, son altamente confiables, para obtener un resultado se requiere de 24 a 72 horas. Esto ha obligado a la creación de nuevas tecnologías y sistemas que en poco tiempo obtienen resultados con alto nivel de confianza.

En fechas recientes la espectrometría de masas MALDI-TOF, ha surgido como una alternativa rápida y eficaz para la identificación de bacterias en el laboratorio clínico. ⁽²⁾

Por otro lado, *Serratia marcescens*, es una bacteria que en un inicio era considerada inofensiva para el humano, sin embargo, se ha reportado desde el siglo pasado como patógeno oportunista y cada vez más aumenta el número de casos, por lo que es importante que su identificación sea precisa y oportuna. ^(3,4,5)

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los requisitos de un equipo automatizado de identificación microbiológica ideal, deberían ser; capacidad de detección de cualquier microorganismo, detección a partir de la muestra clínica directa, obtención de resultados en un periodo corto de tiempo (1-6 h), detección de resistencia, factores de virulencia o toxinas, y una buena relación costo-efectividad. ⁽²⁾ Hasta el momento el espectrómetro de masas, en específico el equipo VITEK® MS, cumple con algunas de las características antes descritas y aunque la técnica ya fue propuesta hace varias décadas, su aplicación en el trabajo rutinario en algunos laboratorios es reciente.

En este trabajo se pretende evaluar la sensibilidad y la especificidad de una plataforma comercial (VITEK® MS – bioMérieux®) de un sistema automatizado de espectrometría de masas frente a la identificación bioquímica convencional, utilizando una colección de cepas de *Serratia marcescens* aisladas de diversos orígenes clínicos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Validar una plataforma comercial (VITEK® MS) de un sistema automatizado basado en espectrometría de masas para la identificación de *Serratia marcescens* a partir de una serie de aislados de distintos orígenes clínicos comparándolo con pruebas bioquímicas convencionales específicas para esta especie.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Verificar la viabilidad y obtener cultivos puros de las cepas de *Serratia marcescens*.
- Aplicar el método de análisis de células intactas para la identificación de *S. marcescens* por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.4 HIPÓTESIS

Se espera que la metodología propuesta por la plataforma comercial, VITEK® MS, sea una técnica rápida y confiable que reduzca el tiempo de identificación de los aislados clínicos de *Serratia marcescens* en comparación con los métodos convencionales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Serratia marcescens*

2.1.1 Características generales

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo sin agrupación que mide 0.5 a 0.8 μm de ancho por 0.9 a 2 μm de largo; es aerobio facultativo y móvil. ^(5,6,7)

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y dentro de la misma, algunos autores, la clasifican en la división *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) debido a su importancia clínica como patógeno oportunista. ^(5,8) Es una bacteria que se ha aislado de diversas fuentes, entre ellas; agua, suelo, animales, alimentos y plantas. ^(5,6)

Como otros miembros de las enterobacterias, es un microorganismo fermentador de glucosa, oxidasa negativa y reduce el nitrato a nitrito. También fermenta sucrosa, manitol, sacarosa y D-sorbitol, en cambio, no fermenta lactosa, L-arabinosa y rafinosa. Es indol, ureasa y arginina dihidrolasa negativo; mientras que es citrato, lisina-descarboxilasa, ornitín-descarboxilasa, catalasa y Vogues-Proskauer positivo. A diferencia de otros miembros de su familia, tiene la capacidad de producir DNAsas, lipasas y gelatinasas. ^(5,6,9,10)

Su desarrollo en los medios utilizados en el laboratorio clínico (agar tripticase soya, agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate y agar McConkey) es adecuado. Crece bien, entre los 30 y 37°C aunque, en comparación con otras especies de su género, es incapaz de crecer a una temperatura menor a los 5°C. ⁽⁶⁾ Se ha comprobado el potencial de *S. marcescens* para sobrevivir en condiciones extremas o utilizar muy pocos nutrientes para desarrollar, por ejemplo, se ha aislado este microorganismo en soluciones desinfectantes, antisépticos y agua bidestilada. ⁽⁵⁾

Una de las características principales de este microorganismo es que algunas cepas de *S. marcescens* son capaces de producir un pigmento rojizo llamado prodigiosina. El nombre se le atribuye a Kroft, quien fue el primero en extraerlo en

1902, pero fue hasta 1960 que su estructura fue determinada. Químicamente, ésta molécula se compone por tres anillos pirrólicos (Figura 1), es insoluble en agua, por lo que no difunde al agar; y es fotosensible. ^(6,7)

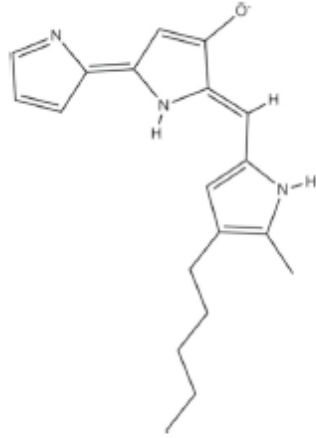


Figura 1.- Estructura química de la prodigiosina ⁽¹¹⁾

El tono y la intensidad puede variar del rojo oscuro al rosa pálido dependiendo de las condiciones y el tiempo de crecimiento de las colonias, incluso se ha visto que desaparece al realizar resiembras. ⁽⁷⁾

Su biosíntesis se ve afectada por factores como temperatura, pH, iones inorgánicos, algunos aminoácidos y carbohidratos. Asimismo cuando los cultivos se incuban entre 28 y 30°C la producción del pigmento es favorecida mientras que a 37°C no se observa esta coloración. ^(6,7)

La prodigiosina no es exclusiva de *S. marcescens*, *S. plymuthica* y *S. rubidaea*, otras especies del género, que también causan infección, lo producen, así como otras bacterias Gram negativas de origen marino, hasta ahora sin importancia clínica, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythreus* y *Hahella chejuensis*. ^(6,11) Existen otros microorganismos capaces de formar pigmento rosa o rojo como las levaduras *Rhodotorula sp.* y *Sporobolomyces salmonicolor*, las cuales están relacionadas con infecciones humanas poco frecuentes. ^(12,13,14)

El papel fisiológico de la prodigiosina en la bacteria, aún es desconocido, no obstante, se ha encontrado que ésta molécula tiene propiedades, antiparasitarias,

antifúngicas y actibacteriales y actualmente hay investigaciones sobre su actividad farmacológica como agente inmunosupresor y anticancerígeno debido a sus propiedades inmunomoduladoras. ^(6,11,12)

2.1.2 Antecedentes

Las primeras observaciones de este microorganismo datan del siglo VI a. de C y se han encontrado muchas referencias donde se relaciona a esta bacteria con acontecimientos “milagrosos” debido a su crecimiento en hostias. Hasta 1823, un farmacéutico italiano, Bartolomeo Bizio, confirmó que los fenómenos eran causados por un microorganismo, solo que para ese momento no se tenía claro si era una bacteria. ⁽⁷⁾ Es por esta razón que en años subsecuentes a su descubrimiento, este microorganismo recibió distintos nombres (Tabla 1) ⁽¹⁵⁾ pero Bizio fue quien le asignó el nombre que hasta 1980 sería el definitivo, *Serratia* en honor a Serafino Serrati, un físico italiano pionero en la invención del barco de vapor; y *marcescens*, que deriva del latín *marceo* que significa “decaer o descomponer” ya que observó que la intensidad del pigmento cambiaba rápidamente. ⁽⁷⁾

Tiene preferencia por los alimentos hechos a base de harina de maíz y que contienen almidón, razón por la cual se descubrió su existencia, aunque, cuando se encontraban colonias pigmentadas desarrollando sobre éstos, eran confundidas con gotas de sangre. ⁽⁷⁾

Tabla 1.- Nombres asignados a *Serratia marcescens* a lo largo del tiempo. ⁽¹⁵⁾

Nombre	Autor	Año
<i>Serratia marcescens</i>	Bizio	1823
<i>Zaogalactina imetrofa</i>	Sette	1824
<i>Mucor sanguineus</i>	DeCol	1824
<i>Protococcus imetrophus</i>	Meneghini	1838
<i>Monas prodigiosa</i>	Ehrenberg	1849
<i>Palmella prodigiosa</i>	Montagne	1853
<i>Micraloa prodigiosa</i>	Zanardini	1863
<i>Bacteridium prodigiosum</i>	Schroeter	1872
<i>Microcococcus prodigiosus</i>	Cohn	1872
<i>Micrococcus imetrophus</i>	Trevisan	1879
<i>Bacillus prodigiosus</i>	Flügge	1886
<i>Bacillus imetrophus</i>	Trevisan	1887
<i>Bacillus marcescens</i>	De Toni y Trvisan	1889
<i>Bacterium prodigiosum</i>	Lehmann y Neumann	1896
<i>Coccobacterium sp.</i>	Schmidt y Weiss	1902
<i>Liquidobacterium prodigiosum</i>	Orla-Jensen	1909
<i>Dicrobactrum prodigiosum</i>	Enderlein	1917
<i>Erythrobacillus prodigiosus</i>	Winslow et al.	1920
<i>Salmonella marcescens</i>	Pribam	1929
<i>Salmonella prodigiosa</i>	Pribam	1929
<i>Chromobacterium prodigiosum</i>	Topley y Wilson	1929

Antes de considerar patógena a *Serratia marcescens* fue utilizada como marcador biológico en muchos experimentos para explicar los mecanismos de infección en el hombre, y por el ejército de Estados Unidos Americanos para estudiar la vulnerabilidad de su población frente a una guerra biológica, dado que era fácil reconocer sus colonias pigmentadas. ^(5,6,7)

2.1.3 Importancia de las infecciones por *Serratia marcescens*

Las infecciones causadas por los miembros del género *Serratia*, en particular *S. marcescens*, no fueron reconocidas hasta después de los años 50. Ahora, *S. marcescens* se considera un patógeno importante para el humano, responsable de infecciones nosocomiales, algunas difíciles de tratar. ⁽⁶⁾

S. marcescens, en relación a su género, es la especie con mayor probabilidad de ser recuperada en las muestras clínicas, y así como otras enterobacterias, se puede encontrar en gran variedad de éstas, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, orina, muestras pulmonares, sangre, secreciones de heridas, etc. ⁽⁶⁾

A pesar de que en las primeras infecciones atribuidas a *S. marcescens* se lograba aislar un microorganismo que producía un pigmento rojo, ahora, se sabe que la mayoría de las cepas que se recuperan en el laboratorio clínico no son pigmentadas, por lo que son difíciles de distinguir de otros organismos. ^(5,6)

En la literatura, se cuenta con más de 200 reportes dónde se ha identificado a *S. marcescens* en brotes epidémicos, por esta razón se cree que las infecciones causadas por esta bacteria son, principalmente, de origen nosocomial ⁽⁶⁾

Se ha visto que afecta en lo primordial, a pacientes con inmunosupresión severa o pacientes en estado crítico, sobre todo en unidades de cuidados intensivos tanto de adultos como en población pediátrica, especialmente en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN). ^(6,16)

El principal sitio que infecta es la sangre, seguido del tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal. También puede afectar el tracto urinario y raras veces el sistema nervioso central. ^(4,16,17) Los principales factores de riesgo asociados, así como las fuentes de infección, son diversos, en la tabla 2 se reúnen algunos reportados en la literatura, de acuerdo al tipo de paciente ^(3,6,7,16,17,18,19).

Tabla 2.- Factores de riesgo y fuentes de infección relacionados a infecciones causadas por *S. marcescens*. (3,6,7,16,17,18,19)

Tipo de pacientes	Reservorios o fuentes de infección	Factores de riesgo
Adultos	Nebulizadores contaminados Medicamentos inhalados Sistemas de aire acondicionado Lavabos Broncoscopios Ropa quirúrgica Solución salina normal o heparinizada Jabón líquido Dispensadores de jabón Agua del grifo Medicamentos contaminados Transfusiones Bolsas recolectoras de orina Soluciones desinfectantes contaminadas	Inmunosupresión Uso de antibióticos de amplio espectro Colocación de catéteres Cirugías Uso de esteroides Estancia hospitalaria prolongada Procedimientos que implican la manipulación del tracto respiratorio y urinario
Pediátricos	Manos de personal sanitario Exposición al personal sanitario Leche contaminada (materna y de fórmula) Extractores de leche Nutrición parenteral contaminada Otros pacientes infectados o colonizados Incubadoras Laringoscopios Tubos de succión Dispensadores de jabón Sistemas de aire acondicionado Soluciones y jabón desinfectante contaminados Nebulizadores	Prematurez Bajo peso al nacer (<1.5 kg) Tratamiento antimicrobiano prenatal Duración del tratamiento antimicrobiano con gentamicina o ampicilina Tiempo de estancia hospitalaria Duración de la estancia en UCIN Infección materna antes del parto Exposición a procedimientos invasivos (colocación de catéteres venosos, intraperitoneales o urinarios)

Algunas de las infecciones que causa *S. marcescens* son difíciles de tratar debido a que es frecuente que las cepas implicadas demuestren multi-drogo resistencia. Se sabe que la resistencia a varias clases de antibióticos, incluyendo algunos β -lactámicos y tetraciclinas, es de tipo intrínseca y que el principal mecanismo de adquisición es por transferencia horizontal de genes a través de plásmidos. ^(7,12,16)

2.2 Métodos de identificación bacteriana

En microbiología, se utilizan gran variedad de métodos para identificar los microorganismos que provienen de muestras clínicas, con el objetivo de conocer la identidad del agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz. Para identificar un aislamiento bacteriano se requiere el análisis de la información obtenida en las pruebas que describen los perfiles característicos de las bacterias. ^(20,21)

Por lo general, en la mayoría de los laboratorios, la identificación bacteriana se lleva a cabo mediante tinciones y siembra de los microorganismos en medios de cultivo rutinarios, además de pruebas para diferenciar entre las distintas especies. En 1970, este proceso se hizo más sofisticado con la creación de las tiras API (*Analytical Profile Index*, por sus siglas en inglés). Hasta 1990, fue que algunos métodos fenotípicos se automatizaron; y a partir del año 2000 se incorporó al laboratorio, la identificación genotípica. Siendo así, los métodos pueden ser divididos en dos grupos, fenotípicos y genotípicos. ⁽²²⁾

2.2.1 Métodos fenotípicos

Los criterios fenotípicos se basan en las características físicas y metabólicas observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas. En el presente, todavía la mayoría de las estrategias de identificación se realiza por medio de métodos convencionales que se basan en estas características, puesto que su realización y costo los hacen más accesibles. ^(20,21)

Los métodos fenotípicos permiten la identificación bacteriana a nivel de género pero no en todos los casos a nivel de especie. ⁽²²⁾

La cantidad y tipos de pruebas seleccionados dependen de varios factores, como el tipo de bacterias a identificar, la importancia clínica del aislamiento bacteriano y la disponibilidad de los métodos. ⁽²¹⁾

El tiempo para lograr la identificación bacteriana depende en gran parte del periodo de incubación necesario antes de disponer de los resultados de la prueba. A su vez, la duración de la incubación depende de si la prueba determina la actividad metabólica que requiere crecimiento bacteriano o si la prueba se basa en la determinación de la presencia de una enzima o de determinado producto celular que puede detectarse sin la necesidad de crecimiento de la bacteria. Muchos esquemas de identificación convencionales especifican 18 a 24 horas de incubación, o más, antes de que las pruebas puedan interpretarse con precisión. Por lo que siempre se ha buscado desarrollar estrategias de identificación más rápidas. ⁽²¹⁾

En el mercado existen numerosos sistemas o equipos multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. También hay sistemas cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado, incorporando los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona, con un índice alto de confiabilidad, la identificación del microorganismo. La tabla 3 muestra los sistemas disponibles para la identificación de enterobacterias, familia a la que pertenece *S. marcescens*. ^(20,21,23)

En la actualidad se ha planteado la idea de la “automatización total” del laboratorio de microbiología e incluso ya se han creado mecanismos que comprenden equipos en línea para siembra, análisis de colonias desarrolladas mediante digitalización de imágenes y posterior identificación por espectrometría de masas y realización de antibiograma automatizado a las colonias identificadas. ⁽²⁴⁾

Tabla 3.- Sistemas comerciales de identificación fenotípica para enterobacterias.

(20,21,23)

Tipo de sistema	Nombre	Fabricante	Tiempo de incubación
Manual	API 20E	bioMérieux®	18-24 h
	API RapiD 20E		4h
	Crystal Enteric/Nonfermenter	Becton Dickinson Diagnostic Systems ®	18-20h
	RapID ONE	Remel ®	4h
Automatizado	BD Phoenix NID	Becton Dickinson Diagnostics Systems®	2-12 h
	VITEK GNI	bioMérieux®	4-13 h
	VITEK 2 GNI +		2-12 h
	NEG ID Type 3	Dade MicroScan, Inc®	15-42h
	Rapid NEG ID Type 3		2.5 h
	Sensititre AP 80	Trek Dignostics Systems®	5-18h

2.2.2 Métodos genotípicos

Los métodos de identificación genotípica involucran la determinación de alguna porción del genoma bacteriano a través de técnicas que realizan el análisis de ácidos nucleicos (DNA o RNA). Éstos pueden detectar, identificar y caracterizar etiologías infecciosas, reduciendo los tiempos de identificación así como mejorando la sensibilidad y especificidad. ^(21,25)

Hay un gran número de métodos moleculares disponibles, la mayoría de ellos se basan en el análisis de DNA, ya sea en base a la amplificación o la secuenciación. Estas estrategias pueden tener un enfoque relativamente simple basado en amplificación de DNA (PCR o ensayos de detección relacionados); o más complejo como el análisis de fragmentos de restricción (RFLP) o la secuenciación del genoma completo. ⁽²⁶⁾

Estas técnicas se han incorporado al diagnóstico clínico como un complemento a los métodos convencionales y de manera particular, para identificar agentes nuevos, no cultivables o fastidiosos, y para la detección de virus. Desafortunadamente muchos de los laboratorios aún no emplean ningún tipo de diagnóstico molecular por lo cual, la realización de las pruebas se limita a centros especializados o de referencia. Además, a pesar de las ventajas del diagnóstico molecular, aún no logra reemplazar los métodos convencionales. ^(25,27,28)

Tabla 4.- Ventajas y desventajas del uso de métodos moleculares en bacteriología clínica ^(25,27,28)

Criterio	Ventajas	Desventajas
Identificación	<p>Capacidad para identificar agentes difíciles de cultivar</p> <p>Capacidad para detectar agentes infecciosos en pacientes con terapia antimicrobiana previa</p> <p>La identificación se puede realizar con ausencia de cultivo</p>	<p>Problemas asociados a contaminación microbiana</p> <p>Problemas con la inhibición de las enzimas utilizadas en PCR</p> <p>Problemas con microorganismos donde la extracción del DNA es complicada</p> <p>El tiempo varía según el método a utilizar</p>
Costo-Efectividad	<p>Es rentable, particularmente con muestras de cultivo negativo y pruebas serológicas negativas, para evitar el análisis extendido de varios patógenos potenciales</p> <p>Favorece a la elección de tratamiento antibiótico adecuado</p> <p>Favorece que la estancia hospitalaria del paciente se reduzca</p>	<p>Se requieren áreas y equipo especializados</p> <p>Equipos y reactivos costosos dependiendo del método que se aplique (termocicladores, secuenciadores, primers, reactivos para PCR etc.)</p> <p>Se requiere capacitación para personal y que éste cuente con conocimientos de biología molecular</p>
Impacto en la terapia farmacológica	<p>Se puede iniciar o modificar una terapia de manera temprana, en presencia de una identificación molecular de una muestra de cultivo negativo o pruebas serológicas negativas</p> <p>Detección de genes de resistencia antimicrobiana por medio de PCR</p>	

2.2.3 Proteómica

El proteoma es definido como el número total de proteínas expresadas por el genoma de una célula en un tiempo determinado. A diferencia del genoma, el proteoma es dinámico y varía con el tipo de célula, estado de desarrollo y condiciones ambientales. ^(29,30)

La proteómica es el estudio y caracterización de dichas proteínas, incluyendo la expresión, estructura, funciones y modificaciones. El término fue usado por primera vez por Mark Wilkins a mediados de los años noventa. Involucra las técnicas para la identificación y cuantificación de proteínas de un tejido célula u organismo. En general, el análisis proteómico comprende la purificación, separación e identificación de las proteínas. ^(20,29)

En los últimos años, se han logrado grandes avances en el campo de la proteómica. Las tecnologías son rápidas y sensibles, y la combinación de éstas ha permitido el estudio de proteínas en todos los tipos de organismos tanto eucariontes como procariontes. ⁽²⁹⁾

Uno de los progresos más importantes en la proteómica ha sido la espectrometría de masas, en específico la tecnología MALDI-TOF. Una aplicación de mucho interés en microbiología es la identificación de microorganismos basada en el perfil de proteínas, ya fue propuesta hace varios años y se ha introducido en muchos laboratorios de microbiología clínica en la última década. ⁽²⁰⁾

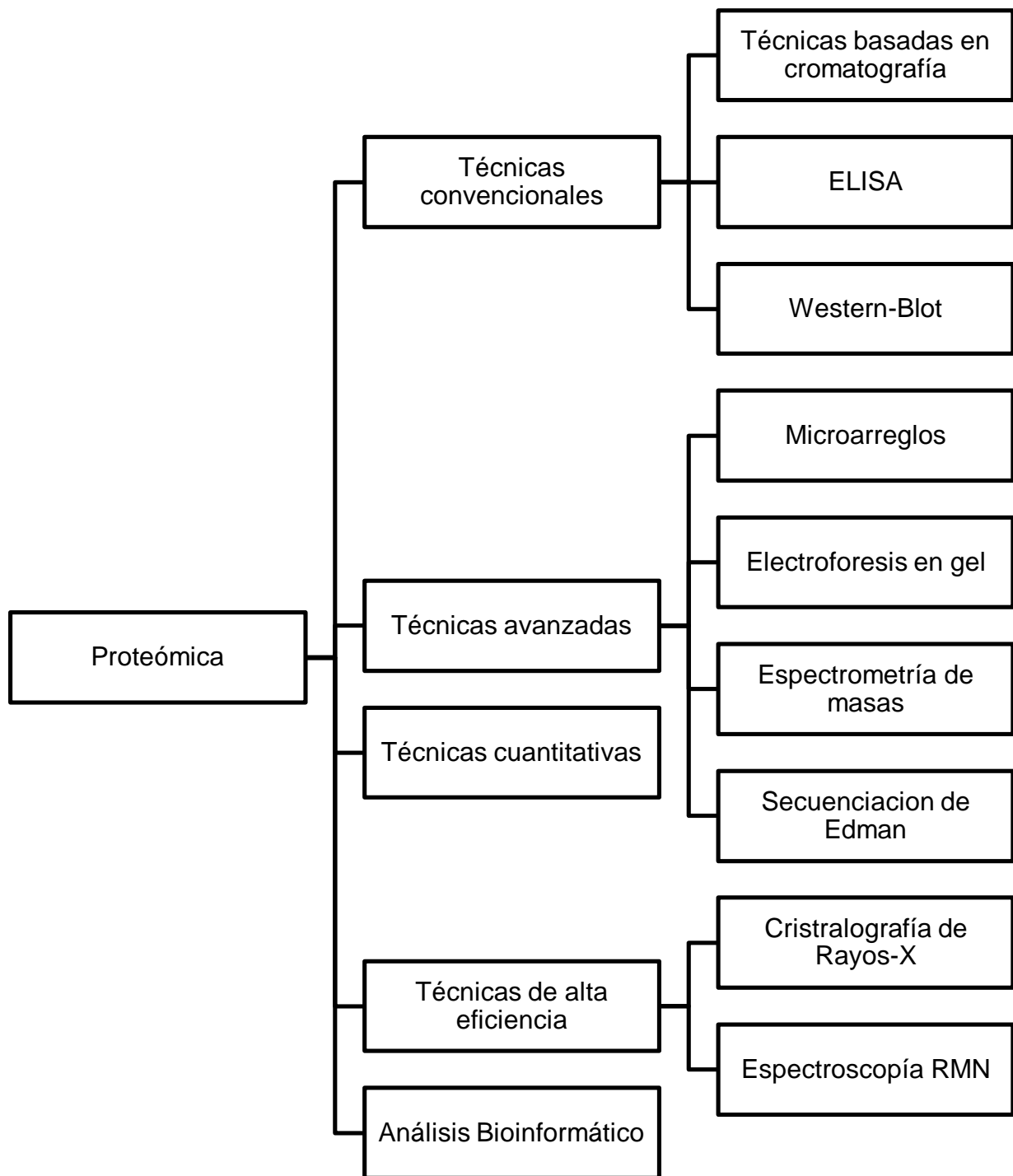


Figura 1.- Visión general de las técnicas utilizadas en proteómica. ⁽²⁹⁾

2.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF

2.3.1 Antecedentes

De manera general, la espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis utilizada para caracterizar sustancias, determinando su masa molecular así como obtener su información estructural, o detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. ⁽³¹⁾

A lo largo de los años, ha ampliado su alcance desde isótopos a moléculas pequeñas, moléculas orgánicas más complejas, hasta macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas. Igualmente, la espectrometría de masas, engloba una gran variedad de modalidades pero todas se basan en la producción de iones y su posterior análisis. ⁽³²⁾

Dado que la EM surgió como una técnica de análisis de compuestos inorgánicos, parte de su hallazgo se le atribuye al físico J.J Thomson, conocido por sus contribuciones al descubrimiento del electrón. Él creó el primer instrumento que podría considerarse un espectrómetro el cual medía los pesos atómicos de los elementos. Más tarde Aston y Dempster, estudiantes de Thomson, crearon una versión más avanzada de este instrumento, con el que probaron la existencia de isótopos no radiactivos de algunos elementos ⁽³³⁾

En los años siguientes, se realizaron modificaciones a los espectrómetros de masas y se fueron introduciendo nuevos sistemas de ionización para ampliar el rango de materiales que podían analizarse. En consecuencia las aplicaciones de la EM se expandieron a otras áreas de la ciencia partiendo de la química orgánica, hasta llegar al campo de la biología y la bioquímica ⁽³²⁾

Durante la primera mitad del siglo XX, se establecieron los distintos esquemas de separación de iones que se conocen. En 1946 W.E. Stephens creó el sistema TOF, el analizador de masas más utilizado dentro del campo de la microbiología.

⁽³²⁾

Un factor importante que permitió la aplicación de la EM para el estudio de macromoléculas y por ende la identificación de bacterias y otros microorganismos, fue la llegada de las técnicas de ionización suave. La fuente de ionización ha sido un aspecto que ha ido evolucionando; de acuerdo al campo de estudio donde se emplea y la muestra a analizar, se requiere un tipo de ionización específico. ^(32,34)

La tecnología que se utiliza actualmente en microbiología (MALDI), fue aplicada a partir de 1996, no obstante, en años anteriores se tenía una idea de la misma. Desde que se comenzó el análisis de macromoléculas con EM, el principal reto fue proporcionar la energía suficiente para ionizarlas sin destruirlas. En los años ochenta se implementó el uso de láser para ionizar y volatilizar moléculas. Diversas técnicas fueron utilizadas pero aún no se conseguía preservar la integridad de la muestra por completo. En 1987, Kochi Tanaka, ingeniero japonés, consiguió ionizar y detectar proteínas de alto peso molecular con una suspensión de nanopartículas metálicas en glicerol. Finalmente, Michael Karas y Franz Hillenkamp desarrollaron la técnica conocida como MALDI. Aunque en un inicio trabajaron con aminoácidos, implementaron el uso de una matriz orgánica que era capaz de absorber la energía y transferir una parte a las moléculas de la muestra e ionizarlas. ^(32,34)

La EM fue propuesta como un nuevo método de identificación bacteriana a partir de 1970. Pese a que se tenían altas expectativas de la técnica para el campo de la microbiología clínica, pasó más de una década para que el primer equipo de identificación basado en MALDI-TOF MS se comercializara. ⁽³⁵⁾

En 1996 Holland et al., realizaron los primeros análisis de células bacterianas intactas, es decir sin ningún tratamiento previo, basándose en espectrometría de masas MALDI-TOF. Con su trabajo logró demostrar la rapidez de este método. ^(35,36)

Hasta el año 2009 Seng et al., publicaron el primer trabajo que sería clave para la introducción de esta tecnología al trabajo rutinario en el laboratorio de

microbiología clínica puesto que una gran cantidad de cepas fueron analizadas dando más del 95% de identificaciones correctas. ^(35,36)

2.3.2 Fundamento

MALDI-TOF MS es una técnica analítica que permite la identificación rápida de microorganismos a nivel de especie mediante el análisis total de proteínas, en su mayoría ribosomales, del rango entre los 2 000 y los 20 000 Da. El análisis se realiza a partir de bacterias completas o de extractos de ellas. Éstas son depositadas en una placa de acero inoxidable, y son impregnadas con una matriz orgánica que cristaliza la muestra. El complejo matriz-bacteria es irradiado con un láser de nitrógeno, generando iones en fase gaseosa (desorción-ionización por láser asistida por matriz). Posteriormente las partículas son aceleradas, y pasan a través de un tubo de vacío. El tiempo que tardan en atravesarlo (tiempo de vuelo) está en función de su relación masa/carga (m/z) y es medido con un detector. La detección de los iones genera un espectro de masas característico de cada bacteria (huella peptídica) el cual es comparado con una base de datos de referencia y por consiguiente se logra la identificación del microorganismo. ^(34,37,35,38,39)

Por lo anterior, los tres elementos principales que forman un espectrómetro de masas son: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. ⁽²⁾

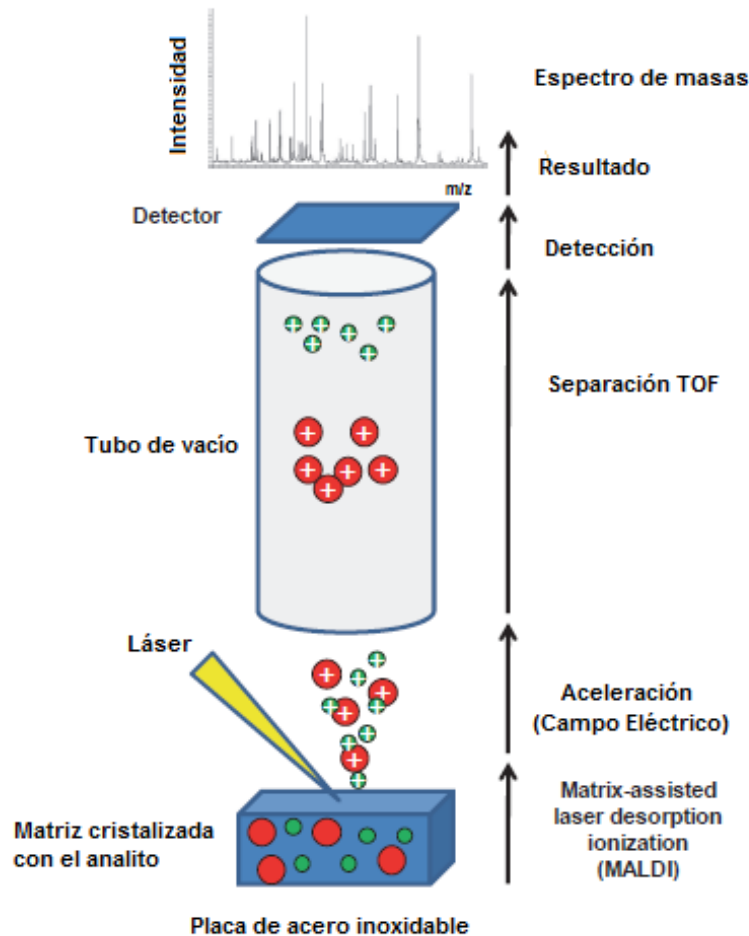


Figura 2.- Principio de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias. ^(39,43)

2.3.3 Componentes

2.3.3.1 Fuente de Ionización

El punto de partida de un análisis por espectrometría de masas es la formación de iones gaseosos de la muestra; el alcance y utilidad del método están condicionados por el proceso de ionización. La apariencia del espectro de masas para las distintas moléculas que se analizan depende en gran parte del método para formar los iones. ⁽⁴⁰⁾

Existen muchas fuentes de ionización; la tecnología MALDI-TOF MS; como su nombre lo indica, utiliza una fuente de desorción en donde el agente ionizante, un haz de láser de nitrógeno de longitud de onda de 337nm, transforma la muestra en iones gaseosos de manera directa. ^(20,40)

Previo a la ionización, la muestra debe combinarse con un ácido orgánico sobre una placa de metal. La función principal de esta sustancia es cristalizar la muestra para absorber la energía del láser y transferir parte de ésta a la muestra, conservando así la integridad de la misma. ^(2,36,41) La matriz absorbe la luz ultravioleta que proporciona el láser, después una parte de ésta se calienta rápidamente (en nanosegundos) y se vaporiza junto con la muestra. ⁽⁴²⁾

La elección del ácido depende del tipo de muestra que se estudia. Las más comunes son el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (para oligosacáridos, glicopéptidos y glicoproteínas), el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico y el ácido sinapínico (para proteínas). ^(2,36,41)

Seguido a esto, los iones son formados tras bombardear el complejo matriz-muestra con el láser. Esto produce una nube de partículas, de la cual los iones son extraídos al someterse a un campo eléctrico. El análisis involucra cientos de disparos de láser para crear el espectro final y eliminar el ruido de fondo. ^(2,20)

Es importante mencionar que una propiedad característica de los espectrómetros de masas es que todos los componentes, con excepción del procesador de la señal y el dispositivo de lectura, cuentan con un sistema de vacío para mantener bajas presiones (10^{-4} a 10^{-8} torr) facilitando la producción y manipulación de electrones y iones libres, además de evitar interferencias con componentes atmosféricos. ⁽⁴⁰⁾

2.3.3.2 Analizador TOF

Se trata del componente principal del espectrómetro. A pesar de existir diferentes analizadores, éste es uno de los más simples y es el más utilizado en las aplicaciones de la EM dentro del campo de la microbiología. ⁽²⁾

En el analizador los iones cargados de distintos tamaños son acelerados por medio de un campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V. Las partículas aceleradas atraviesan un tubo de aproximadamente un metro de longitud y son separados de acuerdo al tiempo que tarda cada ion en recorrer el tubo hasta llegar al detector (tiempo de

vuelo), el cual está en función de su relación m/z ; en consecuencia las partículas más ligeras llegan primero al detector que las pesadas. ^(20,40)

La mayor parte de los iones generados poseen una sola carga ($z=1$) por lo que la relación m/z es igual a la masa molecular (m). ⁽²⁾

Algunos analizadores incluyen un espejo o reflector al final del tubo que proyecta los iones hacia el detector; su función es incrementar la longitud del tubo para compensar las velocidades cinéticas antes que los iones impacten con el detector; con ello se obtiene un aumento en la resolución del sistema al momento de generar el espectro de masas. ⁽⁴¹⁾

2.3.3.3 Detector

Al final del analizador los iones impactan en el detector y producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. La información que recopila da lugar la llamada “huella química”, es decir el espectro de masas. En él se muestra la masa de los diferentes iones de la muestra calculada a partir del tiempo de vuelo. En el eje de las ordenadas se representa la relación m/z mientras que en el eje de las abscisas se representa la intensidad, es decir el número de iones de una determinada relación m/z que ha impactado contra el detector. En el caso de MALDI-TOF la relación suele ser equivalente a la masa molecular por lo que en el espectro solo se observa un pico predominante correspondiente a dicha masa. ^(2,20)

2.3.4 La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica

El desarrollo de la tecnología MALDI-TOF MS ha revolucionado la identificación rutinaria de microorganismos, al introducir una técnica que es rápida, fácil, eficiente y que utiliza insumos de bajo costo. Ha sido adaptada para el apoyo en el diagnóstico clínico y tiene el potencial para complementar e incluso, reemplazar la identificación convencional de bacterias. ⁽⁴³⁾

La identificación microbiana utilizando EM ha evolucionado gracias a la optimización en los componentes del sistema, la implementación de mejores métodos de preparación de la muestra y la constante actualización de la base de datos. ⁽⁴⁴⁾

Recientemente han aparecido diversas plataformas que han permitido la introducción de esta técnica en los laboratorios. Se cuenta con dos plataformas comerciales con tecnología MALDI-TOF aprobados por la FDA para la identificación de bacterias cultivadas en medio sólido, disponibles en el mercado, Bruker® MALDI Biotyper (Bruker Daltonics®) y VITEK® MS (bioMérieux®). ^(39,44)

Ambos sistemas han sido reportados en la literatura médica, aunque el de Bruker® se ha descrito más. ⁽⁴⁴⁾

El desarrollo de la plataforma VITEK® MS comenzó en 2008. En el caso de las bacterias, está aprobado para identificar Gram negativas, Gram positivas, anaerobios y bacterias fastidiosas. ⁽⁴⁴⁾

2.3.4.1 VITEK® MS

Uno de los objetivos de la EM en la identificación microbiana es la optimización del flujo de trabajo. Para tal propósito, VITEK® MS, tiene la capacidad de analizar cuatro tarjetas a la vez. Cada una consta de 48 pocillos de muestra, de modo que se pueden analizar hasta 192 aislamientos simultáneamente. Una sola tarjeta se divide en tres bloques o grupos de adquisición de 16 pocillos cada uno. En cada

bloque hay un pocillo en la parte central disponible para colocar la cepa de control interno y de calibración (*Escherichia coli* ATCC 8739).^(45,46)

La preparación de la muestra es un aspecto importante para la identificación. Para este equipo, en general se han descrito dos métodos distintos: análisis de células intactas o completas y extracción previa de proteínas. El primero consiste en depositar una colonia pura del microorganismo a identificar, directamente sobre el pocillo de muestra; mientras que para el segundo se efectúa una extracción de proteínas del microorganismo por medio de solventes orgánicos y/o ácidos orgánicos, antes de colocar la muestra en la tarjeta.^(2,47)

La plataforma de VITEK® MS está conformado por el espectrómetro de masas (*hardware*) el *software* y la base de datos; esta última es exclusiva de bioMérieux®. Además, la empresa desarrolló su propio algoritmo para la identificación microbiana, y lo comercializaron. El *software* incluye tres aplicaciones conectadas entre sí para intercambiar datos, la estación de preparación, la estación de adquisición y el servidor MYLA®. Todas son controladas por medio de una computadora; la estación de preparación tiene la función de registrar las muestras mediante un lector de código de barras único, para asegurar una trazabilidad y mayor confiabilidad al ingresar los datos. La estación de adquisición está conectada directo al instrumento, muestra el estado del mismo y obtiene los espectros. El servidor MYLA® realiza la integración y trazabilidad de las muestras y los resultados desde la estación de adquisición para su análisis y también está conectado a la estación de preparación.^(45,46)

Respecto a la generación de los espectros, para cada uno, el equipo produce 100 disparos en cinco diferentes posiciones del punto objetivo, es decir, del pocillo de muestra a identificar, a una frecuencia de 50 Hz.^(45,46)

Para realizar la identificación, VITEK® MS, lee cada espectro y detecta una serie de picos que se clasifican según su masa e intensidad. Con base en ello, compara el espectro obtenido con el espectro típico de cada especie, almacenado en la

base de datos del equipo, de acuerdo a la presencia y ausencia de picos específicos y así conocer la identidad del microorganismo. ^(45,46)

2.3.4.1.1 Ventajas y limitaciones de MALDI-TOF MS en la identificación microbiana

La utilización de MALDI-TOF MS presenta ventajas y limitaciones. Como ventajas la técnica presenta una alta tasa de identificación y rapidez, ya que obtiene resultados en menos de un minuto por muestra y un aproximado de 90 microorganismos identificados por hora. ⁽²⁰⁾

La facilidad en la preparación de la muestra, el manejo de equipo y el análisis de los datos la vuelve una técnica simple, confiable y reproducible.; además de que la mayoría de las bacterias no necesitan tratamiento previo de extracción. ^(20,39)

Por su rapidez, tiene un impacto directo en la atención al paciente como la administración de antibióticos más eficientes, reducción en los tiempos de hospitalización y disminución en el gasto sanitario por paciente. ^(20,39)

Las principales limitaciones e inconvenientes de la técnica se mencionan a continuación:

La relación cantidad de microorganismo por microlitro de matriz influye en la obtención de un buen resultado, por tanto es conveniente conseguir estandarizar el inóculo. ⁽²⁰⁾

Un aspecto muy importante a considerar es el tiempo de incubación del cultivo. Se recomienda que no exceda las 72 horas, esto depende del microorganismo a identificar. Se debe trabajar con cultivos puros o colonias aisladas perfectamente diferenciadas, puesto que el algoritmo no es capaz de clasificar de manera confiable los microorganismos de una mezcla bacteriana. Otra limitación es que el sistema no logra diferenciar entre organismos altamente relacionados. ^(20,48)

Es importante tomar en cuenta algunas consideraciones técnicas como que el equipo requiere calibraciones y controles de calidad frecuentes y es obligatorio un

periodo de capacitación para el personal. Respecto a los reactivos el principal inconveniente es que la matriz no es estable más de 15 días porque se cristaliza.
(20)

El número de referencias en las bases de datos comerciales empleadas para establecer la comparación e identificación de los microorganismos sigue siendo limitado, pero a través de la colaboración entre las compañías comerciales y los hospitales de varios países se han logrado ampliar con un mayor número de cepas ya caracterizadas.⁽²⁰⁾

2.3.4.1.2 Costos

La inversión inicial del equipo es alta (aproximadamente 200, 000 dólares) comparada con la de otros equipos (Tabla 5). Hasta ahora esto ha limitado el acceso y la adaptación de este método a laboratorios con mayor capacidad, sin embargo, el bajo costo de insumos y reactivos lo compensa. Se ha estimado que el costo del análisis es de menos de \$0.50 dólares por aislamiento.^(39,48,49)

Tabla 5.- Costo estimado en dólares de métodos de identificación convencional contra la identificación por EM.^(23,39,49)

Nombre del sistema	Costo del instrumento	Costo por test
VITEK® 2	\$159,000	\$7.15
Micro Scan Rapid Neg ID Type 3	\$153, 038	\$14.39
VITEK® MS	\$200,000	\$0.50

En el 2012 Tan et al., realizaron un estudio en un laboratorio donde procesaron alrededor de 175,000 aislamientos de bacterias y hongos por año. Encontró que la incorporación del sistema MALDI-TOF MS reduce los costos de reactivos y procesamiento por identificación en un 56.9% en un año, comparado con el uso de la metodologías estándar. En otro estudio, Tran et al., reportaron un ahorro anual de \$ 69,108.61 dólares u 87.8%, en costos de reactivos en comparación con los métodos tradicionales. Tomando en cuenta el trabajo del analista y los costos de mantenimiento, se logró un ahorro anual cerca del 52% y la compensación del costo inicial del instrumento en un tiempo estimado de 3 años. ^(35,39) Por otra parte se ha demostrado que el uso de este sistema reduce hasta en una sexta parte el volumen de los residuos de riesgo biológico generados, si se compara con los métodos convencionales. ⁽⁵⁰⁾

3. MÉTODOLÓGÍA

3.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio experimental, analítico, comparativo y descriptivo en aislados clínicos de *Serratia marcescens* obtenidas de distintos centros de salud del país y recopilados por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

3.2 Muestra

Se analizaron 198 cepas de *Serratia marcescens* que fueron proporcionadas por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la UANL.

Las cepas se conservaron en ultracongelación a -70°C en un equipo REVCO en tubos Eppendorf con caldo tripticase soya con glicerol al 10%, hasta su uso en el laboratorio, manteniendo cadena fría entre 4 y 8°C .

Se verificó la viabilidad de las cepas. Para esto fueron resembradas en agar tripticase soya. A partir de este cultivo se realizó una segunda siembra en el mismo medio incubando a 28°C por 24 a 48 horas antes del análisis, requisito solicitado por el fabricante.

3.3 Criterios de selección

3.3.1 Criterios de inclusión

- Cepas de *Serratia marcescens* que hayan sido identificadas por medio de la colección de pruebas bioquímicas (estándar de oro).
- Cepas de *Serratia marcescens* que hayan presentado desarrollo de colonias aisladas en agar tripticase soya entre 24 y 48 horas antes del análisis.

3.3.2 Criterios de exclusión

- Cepas de *Serratia marcescens* que no hayan presentado desarrollo de colonias aisladas en agar tripticase soya entre 24 y 48 horas antes del análisis.

3.4 Identificación fenotípica

Se realizó la identificación inicial de los aislamientos de *Serratia marcescens* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL mediante el siguiente protocolo de pruebas: tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa; la segunda fase consistió en la aplicación de pruebas bioquímicas convencionales, para *Serratia marcescens*, de las cuales, son específicas: descarboxilación de la lisina, descarboxilación de la ornitina, rojo de metilo, Voges-Proskauer, asimilación del malonato, ureasa, DNAsa, licuefacción de la gelatina y utilización del citrato.

De manera adicional, se realizaron pruebas de fermentación de diferentes carbohidratos, para lo cual se empleó el caldo base adicionando como indicador el rojo fenol, con un pH final de $7,4 \pm 0.2$. Los carbohidratos que se incluyeron en las pruebas fueron: Arabinosa, L-Ramnosa, D-Xilosa, Adonitol, Celobiosa y D-Arabitól. Los carbohidratos se añadieron en una concentración al 1%.

Se Interpretaron las pruebas de acuerdo a la información de la Tabla 6.

Tabla 6.- Pruebas específicas para identificación fenotípica de *S. marcescens*.^(9,10)

Tipo de prueba	Interpretación
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
Descarboxilación de la lisina,	Positivo
Descarboxilación de la ornitina	Positivo
Rojo de metilo	Variable
Voges-Proskauer	Positivo
Asimilación del malonato	Negativo
Licuefacción de la gelatina	Positivo
DNAsa	Positivo
Utilización del citrato.	Positivo
Fermentación de Carbohidratos	
D-Sorbitol	Positivo
Arabinosa,	Negativo
L-Ramnosa,	Negativo
D-Xilosa	Negativo
Sacarosa	Positivo
Adonitol,	Variable
Celobiosa	Negativo
D-Arabitol	Negativo

3.5 Identificación de cepas de *Serratia marcescens* por medio del equipo VITEK MS®

3.5.1 Preparación de la muestra

Para cada una de las cepas, se empleó el método de análisis de células intactas. Con un palillo de madera se colectó una cantidad suficiente de la colonia cultivada en agar tripticase soya incubada a 28-30°C por 24h, formando una capa delgada sobre el pocillo de la tarjeta. Enseguida se agregó 1.0 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, y se dejó secar. Cuando se completó un bloque, se llenó el pocillo

de calibración de la misma manera con la cepa *E. coli* ATCC 8739 cultivada en agar sangre de carnero al 5% a 37°C por 24 h.

Una vez que en los pocillos necesarios fueron colocadas las cepas, se registró la tarjeta en la estación de preparación haciendo un escaneo del código de barras de la misma. De igual manera cada pocillo se registró escribiendo el número de muestra y seleccionando el tipo de microorganismo a analizar, en este caso, bacterias. Por último se registró la tarjeta en la estación de adquisición, se colocó en el porta-muestras y éste se introdujo en el instrumento. Después se le indicó al instrumento que iniciara el análisis y de manera automática, el equipo ajustó las presiones. Seguido a esto leyó la tarjeta comenzando con el pocillo de calibración y después las muestras problema. Al terminar, realizó una segunda lectura de la cepa de calibración. Es importante señalar que si el equipo no lee correctamente el pocillo de calibración al inicio de la identificación, no procede a leer las muestras.

3.5.2 Generación del espectro de masas




Después de que el sistema terminó el análisis, envió los espectros al servidor y asignó un porcentaje de confianza el cual representa la similitud entre el espectro generado y los espectros de la base de datos.

Cuando los espectros presentaron una alta similitud, le asignó un porcentaje de confianza del 99.9%. En algunos casos no se obtuvo una coincidencia perfecta, no obstante era posible encontrar similitud con un espectro que fuera cercano a un espectro de referencia en la base de datos del equipo, de manera que se proporcionó una identificación del organismo con un porcentaje de confianza entre el 60 y el 99.8%. Si no se encontró un patrón de identificación único, el equipo mostró una lista de posibles microorganismos con baja discriminación y un valor de confianza menor al 60%, o determinó que la cepa no se encontraba en la base de datos.

Algunas veces el equipo no logró la identificación del microorganismo y emitió mensajes de advertencia tales como "espectro defectuoso", "no hay suficientes picos", "demasiado ruido de fondo" o "falla en la calibración"; de tal manera que todos los aislamientos involucrados se volvieron a analizar y el segundo resultado se tomó en cuenta para el análisis.

De manera adicional el equipo asigna un nivel de confianza con un símbolo según la identificación lograda misma que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7.- Simbología de los niveles de confianza asignados por VITEK® MS ⁽⁵¹⁾

Símbolo	Nivel de confianza	Interpretación	Acción
	Alto	El resultado de la identificación está consolidado	Validar resultado
	Medio	El resultado de la identificación se debe seleccionar entre las opciones	Elegir la identificación y validar el resultado y/o repetir análisis
	No aplica	El resultado de la identificación no está consolidado	Dependiendo del caso, repetir el análisis: <ul style="list-style-type: none"> • En la misma tarjeta • En un nueva tarjeta • Utilizar otro método de preparación de la muestra

4. RESULTADOS

Se identificaron los 198 aislados de *Serratia marcescens* por medio del equipo VITEK® MS con la tecnología MALDI-TOF. Los resultados finales obtenidos se muestran en la tabla 9. Se incluyeron dos niveles de confianza, uno en porcentaje y uno de acuerdo a la simbología de la tabla 7.

A continuación se muestra una tabla que contiene algunas discrepancias que se obtuvieron en la identificación inicial de algunas cepas.

Tabla 8.- Discrepancias en la identificación de cepas de *S. marcescens* mediante del equipo VITEK® MS.

No. de Muestra	Microorganismo identificado	Nivel de confianza (%)	Nivel de confianza
22	<i>Escherichia coli</i>	99.9	Alto
40	<i>Pseudomonas putida</i>	98.3	Alto
71	<i>Escherichia coli</i>	64	Alto
77	<i>Serratia liquefaciens</i>	98.6	Medio
92	<i>Escherichia coli</i>	99.8	Medio
148	<i>Propionobacterium acnes</i>	98.6	Alto

Tabla 9.- Resultados finales de la identificación de cepas de *S. marcescens* mediante del equipo VITEK® MS.

No. de Muestra	Código de registro	Nivel de confianza (%)	Nivel de confianza	No. de Muestra	Código de registro	Nivel de confianza (%)	Nivel de confianza	No. de Muestra	Código de registro	Nivel de confianza (%)	Nivel de confianza
1	1468215-2	99.9	Alto	11	106328-4	99.9	Alto	21	1632909	99.9	Alto
2	1470223-21	99.9	Alto	12	468V	99.9	Alto	22	13046949	99.9	Alto
3	0574867-1	99.9	Alto	13	521E	99.9	Alto	23	13134831	99.9	Alto
4	1470223-22	99.9	Alto	14	1440H	99.9	Alto	24	7027692	99.9	Alto
5	23334	99.9	Alto	15	1691 H	99.9	Alto	25	839706	99.9	Alto
6	11629	99.9	Alto	16	1789H	99.9	Alto	26	1430910-2	99.9	Alto
7	33177	99.9	Alto	17*	1629093	99.9	Alto	27	EB2011	99.9	Alto
8	4491	99.9	Alto	18	1613929	99.9	Alto	28	EB042	99.9	Alto
9	1456930-1	99.9	Alto	19	1637792	99.9	Alto	29	EB1902	99.9	Alto
10	NR	99.7	Alto	20	1613941	99.9	Alto	30	EB682	99.9	Alto

31	EB1578	99.9	Alto	45	EB783	99.9	Alto	59	EB2514	99.9	Alto
32	EB1091	99.9	Alto	46	EB1072	99.9	Alto	60	EB2257	99.9	Alto
33	EB1659	99.9	Alto	47	EB631	99.9	Alto	61	EB1867	99.9	Alto
34	EB1047	99.9	Alto	48	EB486	99.9	Alto	62	EB708	99.9	Alto
35	EB1471	99.9	Alto	49*	EB452	99.9	Alto	63	EB2455	99.9	Alto
36	EB1739	99.9	Alto	50	EB1897	99.9	Alto	64	EB1520	99.9	Alto
37	EB1383	99.9	Alto	51	EB213	99.9	Alto	65	EB758	99.9	Alto
38*	EB1864	99.9	Alto	52	EB082	99.9	Alto	66	EB1092	99.9	Alto
39	EB1307	99.9	Alto	53	EB1697	99.9	Alto	67	EB1220	99.9	Alto
40*	EB503	99.9	Alto	54	EB713	99.9	Alto	68	EB2330	99.9	Alto
41*	EB005	99.9	Alto	55	EB038	99.9	Alto	69	EB1946	99.9	Alto
42	EB759	99.9	Alto	56*	EB2387	99.9	Alto	70	EB1875	99.9	Alto
43	EB2472	99.9	Alto	57	EB217	99.9	Alto	71	EB592	99.9	Alto
44	EB1297	99.9	Alto	58	EB1454	99.4	Alto	72	EB762	99.9	Alto

73	EB1611	99.9	Alto	87	EB1519	99.9	Alto	101	SMn6	99.9	Medio
74	EB715	99.9	Alto	88	EB629	99.9	Alto	102	SMn7	99.9	Medio
75	EB650	99.9	Alto	89	EB734	99.9	Alto	103	SMn8	99.9	Alto
76	EB462	99.9	Alto	90	EB753	99.9	Medio	104	SMn9	99.9	Alto
77	EB788	99.9	Alto	91	EB2077	99.9	Alto	105	SMn10	99.9	Medio
78	EB336	99.9	Alto	92	EB1965	99.9	Alto	106	SMn11	99.9	Alto
79	EB1848	99.9	Alto	93	EB1999	98.2	Medio	107	SMn12	99.9	Alto
80	EB2038	99.9	Alto	94	EB2085	99.3	Medio	108	SMn13	99.9	Alto
81	EB1601	99.9	Alto	95	EB2520	99.9	Alto	109	SMn14	99.9	Medio
82	EB741	99.9	Alto	96	SMn1	99.9	Alto	110	SMn15	99.9	Alto
83	EB2982	99.9	Alto	97	SMn2	99.9	Alto	111	SMn16	99.9	Alto
84	EB1908	99.9	Alto	98	SMn3	99.9	Medio	112	SMn17	99.9	Alto
85	EB1071	99.9	Alto	99	SMn4	99.9	Medio	113	SMn18	99.9	Alto
86	EB1587	99.9	Medio	100	SMn5	99.9	Medio	114	SMn19	99.9	Alto

115	SMn20	99.9	Alto	129	SMn34	99.9A	Alto	143	SMn48	99.9	Alto
116	SMn21	99.9	Alto	130	SMn35	99.9	Alto	144	SMn49	99.9	Alto
117	SMn22	99.9	Alto	131	SMn36	99.9	Medio	145	SMn50	99.9	Alto
118	SMn23	99.9	Alto	132	SMn37	99.9	Alto	146	1471903-5	99.9	Alto
119	SMn24	99.9	Alto	133	SMn38	99.9	Alto	147	1471903-51	99.9	Alto
120	SMn25	99.9	Alto	134	SMn39	99.9	Alto	148	1484924-2	99.9	Alto
121	SMn26	99.9	Alto	135	SMn40	99.9	Alto	149	1202546-2	99.9	Alto
122	SMn27	99.9	Alto	136	SMn41	99.9	Alto	150	1471903-5	99.9	Alto
123	SMn28	99.9	Alto	137	SMn42	99.9	Alto	151	149552-2	99.9	Alto
124	SMn29	99.9	Alto	138	SMn43	99.9	Alto	152	112210	99.9	Medio
125	SMn30	99.9	Alto	139	SMn44	99.9	Alto	153	INN-01	99.9	Alto
126	SMn31	99.9	Alto	140	SMn45	99.9	Medio	154	INN-02	99.9	Alto
127	SMn32	99.9	Alto	141	SMn6	99.9	Alto	155	INN-03	99.9	Medio
128	SMn33	99.9	Medio	142	SMn47	99.9	Alto	156	INN-04	99.9	Medio

157	INN-05	99.9	Medio	171	328647	99.9	Alto	185	246408	99.9	Alto
158	INN-06	99.9	Medio	172	290700	99.9	Alto	186	293144	99.9	Alto
159	INN-07	99.9	Alto	173	276738	99.9	Alto	187	232881	99.9	Alto
160	INN-08	99.9	Alto	174	298932	99.9	Alto	188	223060	99.9	Alto
161	INN-09	99.9	Alto	175	19249	99.9	Alto	189	186189	99.9	Alto
162	INN-10	99.2	Medio	176	297915	99.9	Alto	190	254479	99.9	Alto
163	307961	99.4	Medio	177	219356	99.9	Alto	191	211922	99.9	Alto
164	211922	99.9	Alto	178	256229	99.9	Alto	192	296329	99.9	Alto
165	268349	99.9	Alto	179	328647	99.9	Alto	193	23820	99.9	Alto
166	248261	99.9	Alto	180	273467	99.9	Alto	194	279143	99.9	Alto
167	277597	99.9	Alto	181	251935	99.9	Alto	195	330459	99.9	Medio
168	267590	99.9	Alto	182	261050	99.9	Alto	196	322367	99.9	Alto
169	9672	99.9	Alto	183	253922	99.9	Alto	197	298932	99.9	Alto
170	2610050	99.9	Alto	184	248018	99.9	Alto	198	252847	99.9	Alto ¹

* Cepas que presentaron pigmento

5. DISCUSIÓN

La espectrometría de masas (EM) ha demostrado ser de gran utilidad para la identificación de bacterias. Se sabe que *Serratia marcescens*, es un bacilo Gram negativo (BGN). Por sus características, la pared de los BGN es fácil de desintegrar por el láser del espectrómetro de masas y las proteínas contenidas en esas bacterias quedan liberadas con mayor facilidad que en otro tipo de microorganismos con pared más gruesa o compleja, permitiendo una mejor identificación. ⁽⁵²⁾ En este trabajo se observó que esta bacteria puede ser identificada directamente desde una colonia en una placa de agar dando resultados aceptables.

Para que el método de análisis de células intactas pueda ser empleado y con ello se vea reflejado un ahorro de trabajo y tiempo, es necesario que la distribución de la muestra en la matriz sea homogénea puesto que si esto no se cumple la calidad y reproducibilidad de los espectros es baja y no es posible la identificación del microorganismo. ⁽⁵³⁾

Todas las cepas de *S. marcescens* coincidieron en su identificación con la plataforma comercial VITEK® MS, a nivel de especie, de manera que el valor de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo es del 100%. Estudios previos muestran una buena correlación entre la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF y la identificación convencional, para esta bacteria. A diferencia de éstos, en este estudio se analizaron un número mayor de muestras. ^(1,46,54,55)

Según la simbología de la tabla 7, el equipo determinó un nivel de confianza medio para 22 cepas (11.11%) de 198. Un porcentaje de confianza menor al 99.9% es debido a que el equipo proporciona opciones para elegir la identidad del microorganismo. Un porcentaje de confianza del 99.9% y un nivel de confianza medio, se observan cuando se realiza una segunda lectura en la misma tarjeta porque en un primer análisis no se encuentra coincidencia con algún espectro de

la base de datos y en uno subsecuente sí. Aún con estos resultados la identificación se considera confiable.

En un inicio, el equipo identificó de manera errónea 6 cepas (3.03%), lo cual se debió a que éstas no se encontraban correctamente aisladas. Para lograr la resolución de la identidad de estos aislados se realizó una resiembra y se repitió el análisis en una tarjeta nueva en distintos días.

En la bibliografía consultada no existen reportes en donde se mencione la interferencia del pigmento producido por *S. marcescens* en el análisis por EM. Se comprobó que las cepas provenientes de muestras clínicas y resiembras no producen pigmento ^(5,6,7), debido a que las muestras provenían de distintos orígenes clínicos y fue necesario más de un cultivo para lograr la identificación completa de los aislados., lo que provoca la pérdida de la capacidad de producir pigmento. En total 6 (3.03%) de las 198 muestras presentaron pigmento e incluso algunas con muy poca intensidad.

En cuanto al tiempo del análisis, VITEK® MS es un sistema que permite la identificación de manera prácticamente inmediata una vez que se dispone de un crecimiento suficiente en placa. Esto se traduce en una ganancia de tiempo de al menos 18-24 horas. ⁽¹⁾

Se considera que se requirió alrededor de 11 a 15 min para analizar una muestra desde que se depositó en la placa hasta que se obtuvo el resultado, debido a que la preparación de la muestra se realiza en 1-2 min, el sistema tarda un aproximado de 10 min en adquirir las condiciones de vacío y temperatura para iniciar la lectura de las muestras, y el análisis para la generación del espectro dura menos de un minuto.

La identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas es una de las aplicaciones con mayor impacto clínico potencial de la tecnología MALDI-TOF MS, pero involucra importantes limitaciones. Muchas muestras contienen proteínas de origen humano que pueden interferir en los perfiles de identificación.

Aun en ausencia de éstas, la presencia de más de un tipo de microorganismo originaria perfiles no identificables. Es probable que solo algunas muestras de las que no es problemático obtener volúmenes grandes, y en los que las proteínas de origen humano son escasas, como la orina, puedan ser elegibles para la identificación directa mediante este sistema. ^(50,53)

Además de la identificación de microorganismos, la tecnología MALDI-TOF MS se ha dirigido a la detección de patrones de resistencia a los antibióticos, en especial, en la determinación de la producción de β -lactamasas. No obstante, aún es necesario realizar más investigaciones para que este sistema reemplace al antibiograma tradicional que permite la determinación de la sensibilidad *in vitro* a un panel completo de antimicrobianos ya que en este equipo únicamente se identifican factores de resistencia de naturaleza proteínica. ⁽⁵⁰⁾

A pesar de que la elección de esta tecnología conlleva costos importantes relacionados con la adquisición o arrendamiento del equipo, cada vez más los laboratorios lo han incluido en la rutina de trabajo por su fácil manejo y consumo mínimo de reactivos.

6. CONCLUSIONES

La plataforma VITEK® MS permitió una confiable y rápida identificación de cepas de *S. marcescens* por medio de la técnica de análisis de células intactas sin ningún método previo de extracción de proteínas.

Hasta ahora este sistema continúa siendo considerado como una técnica complementaria en el trabajo en el laboratorio de microbiología. Cabe destacar que aunque se determine la identidad de un microorganismo, este no siempre representa al agente etiológico del padecimiento, es muy importante realizar la interpretación correcta de los resultados y tomar en cuenta los aspectos clínicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñiz MC, et al. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption time-of-flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(8).
2. Jordana LLunch E, Martró Catalá E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(10).
3. Adamson V, Mitt P, Metsvaht T, Telling K, Naaber P, Maimets M. Prolonged outbreak of *Serratia marcescens* in Tartu University Hospital: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2012; 12(281).
4. Merino JL, Pita MJ, Bouarich H, Bueno B, Caldés B, Caldés S, et al. *Serratia marcescens* bacteraemia outbreak in haemodialysis patients with tunnelled catheters due to colonisation of antiseptic solution. Experience at 4 hospitals. *Nefrología*. 2016; 36(6).
5. Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol*. 1997; 46(11).
6. Mahlen SD. *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(4).
7. Yu VL. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *N Eng J Med*. 1979; 300(16).
8. Eickhoff TC, Steinhauer BW, Finland M. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* Division. Biochemical and serologic characteristics and susceptibility to antibiotics. *Ann Intern Med*. 1956; 65(6).
9. Koneman EW. *Koneman Dignóstico Microbiológico: texto y atlas en color*. 6a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
10. McFaddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
11. Darshan N, Manonmani HK. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol*. 2015; 52(9).
12. Bennett JW. Seeing Red: The Story of Prodigiosin. *Adv Appl Microbiol*. 2000; 47.
13. Wirth F, Goldani Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infec Dis*. 2012.
14. Frando AP, Valderrama S, Poveda Henao C, Osorio J, Neira MY. Emerging fungal infections: *Sporobolomyces salmonicolor* fungemia. *Case Report. Infect*. 2010; 14(S2).
15. Gaughran ER. From superstition to science: the history of a bacterium. *Trans N Y Acad Sci*. 1969; 31(1).
16. Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM. *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16(4).

17. Iosfidis E, Farmaki E, Nedelkopoulou N, Tsivitanidou M, Kaperoni M, Pentsoglou V, et al. Outbreak of bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric department. *Am J Infect Control*. 2012; 40(1).
18. Voelz A, Müller A, Guillen J, Le C, Dresbach T, Engelhart S, et al. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. *Int J Hyg Environ Health*. 2010; 213(2).
19. Yeung HM, Chavarria B, Shahsavari D. A Complicated Case of *Serratia marcescens* Infective Endocarditis in the Era of the Current Opioid Epidemic. *Case Rep Infect Dis*. 2018; 2018.
20. Bou G, Fernández Olmos A, García C, Sáez Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(8).
21. Forbes BA. Diagnóstico microbiológico. 11a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
22. Sandle T. Microbial Identification. In *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control.*: Woodhead Publishing; 2016. p. 103-114.
23. O'Hara M. Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(1).
24. Hervé B. Nuevas Tecnologías en Diagnóstico Microbiológico: Automatización y algunas aplicaciones de identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Rev Med Clin Condes*. 2015; 26(6).
25. Morshed MG, Lee MK, Jorgensen D, Isaac-Renton JL. Molecular methods used in clinical laboratory: prospects and pitfalls. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 49(2).
26. Franco Duarte R, Cernáková L, Kadam S, Kaushik K, Salehi B, Bevilacqua A, et al. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms: From Past to Present. *Microorganisms*. 2019; 7(5).
27. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Curr Issues Mol Biol*. 2007; 9(1).
28. Speers DJ. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev*. 2006; 27(1).
29. Aslam B, Basit M, Atif Nisar M, Khurshid M, Hidayat Rasool M. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017; 55(2).
30. Berg JM. *Bioquímica*. 6a ed. Barcelona: Reverté; 2008.
31. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. *Bioquímica clínica y Patología molecular*. 2nd ed. Barcelona: Reverté; 1998.
32. Mingorance J, Regueiro B, Muñoz Bellido J. Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34(Supl 2).
33. Yates JR. A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nat Methods*. 2011; 8(8).

34. Buchan BW, Ledeboer A. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(4).
35. Angeletti S. Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Microbiology. *J Microbiol Methods.* 2016; 138.
36. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem.* 2010; 44.
37. Sauguet M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends Microbiol.* 2017; 25(6).
38. Dierig A, Frei R, Egli A. The Fast Route to Microbe Identification: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34(1).
39. Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med.* 2013; 33(3).
40. Skoog DA, Crouch R, Holler FJ. *Principios de análisis instrumental.* 6th ed.: Cengage Learning; 2008.
41. Graves PR, Haystead TAJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics.* *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(1).
42. Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry: SHIMADZU (Shimadzu corporation), 2019. Consultado el 22/Jul/2019 Disponible en: <https://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>.
43. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012.
44. Heaton P, Patel R. Mass Spectrometry Applications in Infectious Disease and Pathogens Identification. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens.*: Elsevier; 2018.
45. VITEK® MS bioMérieux España, 2018. Consultado el 02/Agosto/2019. Disponible en: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/vitek-r-ms>.
46. Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Rapid Identification of Bacteria in Routine Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8).
47. Hou TY, Chiang Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* 2019; 27 (2).
48. Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Micobiol.* 2018; 56(4).
49. Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M, Gilligan PH. Cost Savings Realized By Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(8).

50. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología. *Infect.* 2017; 22(1).
51. Guia Rápida VITEK(R) MS bioMérieux. 2015.
52. Hernández Pascual Á, Ballesteros Téllez M, Galán Sánchez F, Rodríguez Iglesias M. Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias. *Eferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(Supl 2).
53. Culebras E, Álvarez Buylla A, Artacho Reinoso J, Lepe J. Estudios de tipificación con MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol.* 2016; 34(Supl 2).
54. Cherakoui A, Hibb , Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix- Assisted Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Convencional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4).
55. Faron ML BBHJea. Multicenter evaluation of Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. *PLos One.* 2015; 10(11).