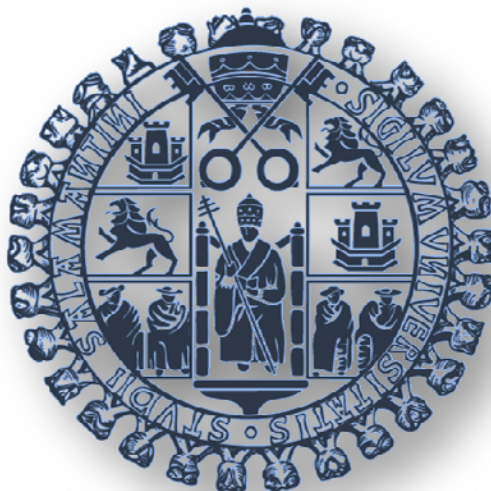


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**Departamento de Ciencias Biomédicas y
del Diagnóstico**



**Utilización de la Espectrometría de Masas
MALDI-TOF en epidemiología bacteriana.**

**Estudio comparativo con técnicas de epidemiología
molecular en *Acinetobacter baumannii*,
Staphylococcus aureus resistente a meticilina y
Legionella pneumophila.**

TESIS DOCTORAL

Silvia Vega Castaño

2015

"Me enseñaron que el camino del progreso no es rápido ni fácil".

Marie Curie (1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería ofrecer mi más sincero agradecimiento al Dr. **Juan Luis Muñoz Bellido**, mi tutor desde el comienzo de mi residencia. Gracias por ser asesor científico inagotable de este maravilloso mundo y por tener una paciencia infinita conmigo.

Especial mención a la Dra. **Laura Ferreira Redondo** de la Unidad de Investigación del HUS, por sus grandes ideas, y por dejarme participar en ellas.

A la profesora Genoveva Yagüe, del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, por facilitarme cepas de *Legionella* para la realización de este estudio.

A todos mis adjuntos del Servicio de Microbiología y Parasitología del HUS: Nieves, Inma, Ana, Santi, Suso, Mónica, Javier y Angelita, gracias por darme lecciones sobre Microbiología y sobre la vida.

A todos mis jefes de Micro de Castilla y León que tanto me han enseñado: José Elías (Salamanca), Marito (Palencia), Eva (Burgos), Ángel (Soria), Pepe Eiros (Valladolid) y Susana (Segovia).

A mis padres, mis hermanos y toda mi familia, de la que he recibido siempre su apoyo incondicional.

A mis compañeras residentes por escucharme día a día.

A Fernando, investigador implacable, por “entenderme a la primera” y por encontrar mis listas de trabajo perdidas.

A todas mis “madres” del Servicio: Mai, Mari, MJose, Obdu..., no sé qué hubiera hecho sin vuestra ayuda. Paula, te echamos de menos.

A todos mis amigos de esta gran ciudad, que me acogió tan bien y que siempre llevaré donde vaya: M.José, Ale, Ana, Rosa, Bea, M.Jesus, Eleni, Isa, Sara, Henar, Juan, Juancar, Mario, Antonio y Kike. A mis amigas de Sevilla por su apoyo logístico desde la distancia: Marta, M.Carmen, Caro, Raquel, Esme, Zahira, Elena y Sara.

Gracias a todos por confiar en mí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
1. Espectrometría de masas	3
Reseña histórica.....	3
Fundamento teórico-técnico de EM	4
EM MALDI-TOF en Microbiología Clínica	8
1.3.1. Aplicaciones de EM MALDI-TOF en la identificación de microorganismos	10
1.3.2. Identificación directa a partir de muestras clínicas.....	12
1.3.3. Detección de resistencia a antibióticos por EM MALDI-TOF.....	12
1.3.4. Detección de clones por EM MALDI-TOF	13
2. Epidemiología molecular	15
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.1. Reseña histórica.....	17
3.2. Etiología y ecología	17
3.3. Diagnóstico de laboratorio	19
3.4. Patogenia y presentación clínica	20
3.5. Mecanismos de resistencia	23
3.6. Epidemiología	27
3.7. Tratamiento y prevención	30
4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	32
4.1. Reseña histórica	32
4.2. Etiología y ecología	33
4.3. Patogenia y presentación clínica	34
4.4. Mecanismos de resistencia	35
4.5. Epidemiología	37
4.6. Tratamiento y prevención	38
5. <i>Legionella pneumophila</i>	40
5.1. Reseña histórica y epidemiología	40
5.2. Etiología y ecología	42
5.3. Patogenia y presentación clínica	42
5.4. Diagnóstico de laboratorio	45
5.5. Tratamiento y prevención	46
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
RESULTADOS	69
DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	134
ANEXOS	153

INTRODUCCIÓN

1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

1.1. RESEÑA HISTÓRICA

La espectrometría de masas (EM) es una técnica basada en la separación y detección de partículas que se utiliza en la identificación de moléculas. Las primeras aplicaciones de esta tecnología fueron en el análisis químico rutinario de mezclas de hidrocarburos en los años 40. Posteriormente se usó para elucidar estructuras de diversos compuestos orgánicos como polipéptidos, proteínas y biopolímeros de alto peso molecular (Pm).

Poco a poco, la EM se fue consolidando como una técnica analítica cualitativa y cuantitativa, que permitía la identificación de estructuras tanto de muestras elementales, como de grandes proteínas y polímeros (González-Buitrago, 2006).

La primera descripción de la utilización de la EM en el campo de la microbiología fue en 1975, cuando **Anhalt** y colaboradores usaron esta técnica, ampliamente conocida es ese momento en la química analítica, para la identificación de bacterias. Esta aplicación no se perfeccionó hasta el año 1988 cuando el equipo formado por **Karas** y **HilleKamp**, introdujeron la desorción-ionización por láser asistida por una matriz (**MALDI**, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) como método de ionización para biomoléculas grandes. La importancia de la matriz radica en que ésta permite la cristalización de las muestras de manera uniforme y su ionización posterior sin degradar la muestra. Por este hallazgo recibieron el Premio Nobel de Química en el año 2002.

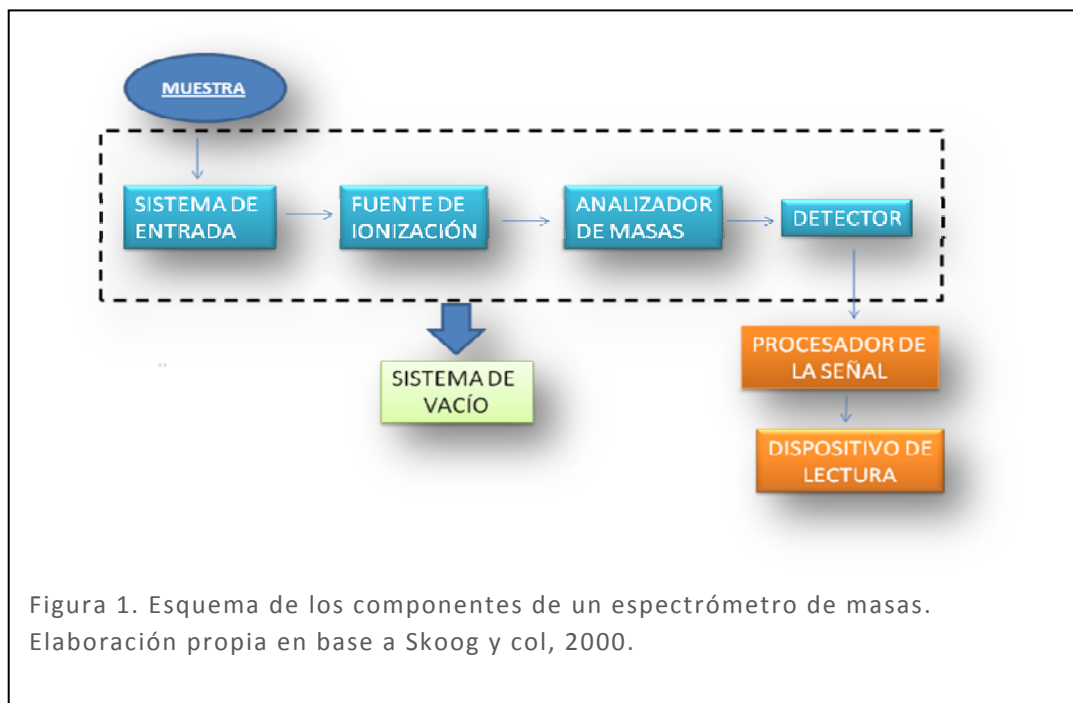
Desde entonces la EM y en concreto EM MALDI, se afianzó como una herramienta analítica poderosa para el estudio de proteínas, que podía aplicarse en la identificación microbiana dentro del campo de la investigación (Vorm, 1994).

Los esfuerzos se fueron ampliando en el análisis medioambiental, farmacéutico, industria alimentaria y sobre todo en el estudio de proteínas complejas involucradas en procesos biológicos, lo que hizo que se pusiera de manifiesto su potencial como plataforma analítica en la detección de biomarcadores de enfermedades (Yates, 2000). Además, su capacidad para la desorción de moléculas termolábiles de alto Pm, su precisión y su sensibilidad, combinadas con un amplio intervalo de detección de masas (1- 300 KDa), hacen de él un método adecuado para determinación de biomoléculas como péptidos, proteínas, oligosacáridos y oligonucleótidos, habiendo realizado grandes contribuciones en el campo de

la proteómica (Marvin, 2003). El análisis del genoma basado en EM MALDI representa un avance en la secuenciación y en su aplicación en la epigenética (Ragoussis, 2006).

1.2. FUNDAMENTO TEÓRICO-TÉCNICO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La EM se fundamenta en la separación de partículas (moleculares o atómicas) por su diferencia de masa. El análisis se lleva a cabo en aparatos llamados espectrómetros de masas cuya instrumentación se compone de un sistema de entrada, una fuente de ionización, un analizador de masas, un detector y, por último, un procesador de la señal asociado a un dispositivo de lectura. El sistema de entrada, la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector llevan acoplado un sistema de vacío, que mantiene las bajas presiones en todo el campo de instrumentación para que las partículas cargadas no interactúen con los componentes de la atmósfera y como consecuencia sean destruidas. Se resume en la figura 1.



El proceso se realiza en cuatro etapas:

1. Ionización de muestras

Una cantidad de muestra pequeña pero representativa se introduce en el espectrómetro de masas mediante el sistema de entrada. Los sistemas de entrada disponibles son:

- sistemas indirectos
- sistemas por sonda directa
- sistemas cromatográficos
- sistemas por electroforesis capilar

El sistema de entrada más utilizado es la sonda directa, ya que permite la introducción de sólidos y líquidos no volátiles en la región de ionización mediante un soporte o sonda metálica, que se inserta a través de un cierre diseñado para minimizar la pérdida de vacío.

La sonda se coloca en la cámara de ionización, donde se deben transformar los componentes del analito en iones gaseosos. Según el método usado para la formación de iones existen varias fuentes que se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de cámaras de ionización y sus agentes ionizantes. Elaboración propia en base a Skoog y col, 2000.

Fuentes de fase gaseosa	AGENTES IONIZANTES
Impacto de electrones (EI)	Electrones
Ionización química (CI)	Iones gaseosos
Ionización por campo (FI)	Electrodo de elevado potencial
Fuentes de desorción	AGENTES IONIZANTES
Desorción/ionización asistido por una matriz(MALDI)	Haz de láser
Desorción por plasma (PD)	Fragmentos de fisión
Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Haz de átomos
EM de iones secundarios (SIMS)	Haz de iones
Ionización por termonebulización (TS)	Elevada temperatura

De todas las nombradas anteriormente, el método de ionización más usado es el de **desorción/ionización por láser asistido por una matriz (MALDI)**. En este método la fuente de desorción (el haz de láser), transforma directamente las muestras sólidas o líquidas no volátiles en iones gaseosos. Su principal ventaja es la obtención de espectros muy simplificados, a partir de compuestos de Pm superior a 100.000 Daltons (Da) térmicamente inestables como proteínas. Para ello se mezcla una disolución ácido alcohólica de la muestra con un exceso de una sustancia **matriz**. Esta sustancia es la que se encarga de absorber la radiación y transferir la energía a la muestra, en nuestro caso proteínas.

La elección de la matriz es crucial en el éxito de los experimentos, ya que una selección racional lleva a la incorporación del analito y formación de cristales de forma más adecuada (Marvin, 2003). Por ello, la matriz debe ser lo suficientemente soluble en el disolvente de la muestra como para que haya un gran exceso en la mezcla sólida depositada en la sonda.

Los nuevos materiales de matriz desarrollados son derivados del ácido cinámico, el **ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico**, que es fácilmente soluble en disolventes orgánicos como el acetonitrilo y el ácido trifluoroacético. Su evaporación lenta permite el desarrollo de cristales de la muestra de forma homogénea. Las proteínas se distribuyen mejor en estos cristales que siendo confinadas directamente en la superficie de la sonda (Vorm, 1994).

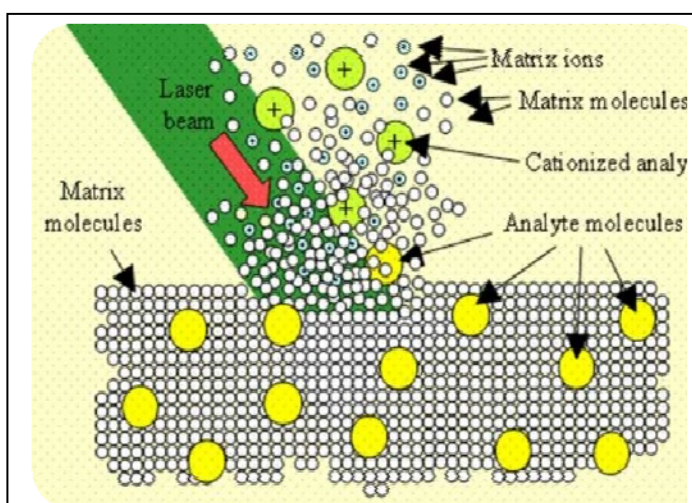


Figura 2. Esquema básico de MALDI donde se observa la sublimación del analito en iones, por cortesía de Bruker Daltonics.

La mezcla sólida se expone a la acción del haz de láser provocando la sublimación del analito a iones gaseosos (figura 2).

2. Aceleración de los iones por campo eléctrico.

El flujo de iones formados en la etapa anterior, generalmente de carga única (positiva), se somete a la acción de una diferencia de potencial elevada y desarrollan una energía cinética.

3. Dispersión de iones según su masa y carga.

Dado que la mayoría de los iones formados tienen una sola carga, y el resto de los parámetros permanecen constantes, la relación masa/carga (m/z) suele ser la masa del ión. Y puesto que todos los iones tienen la misma energía cinética, sus velocidades variarán inversamente proporcional a sus masas. Por tanto las partículas más grandes, con menor velocidad, tardarán más tiempo en recorrer todo el tubo y llegarán al detector más tarde que las partículas más pequeñas.

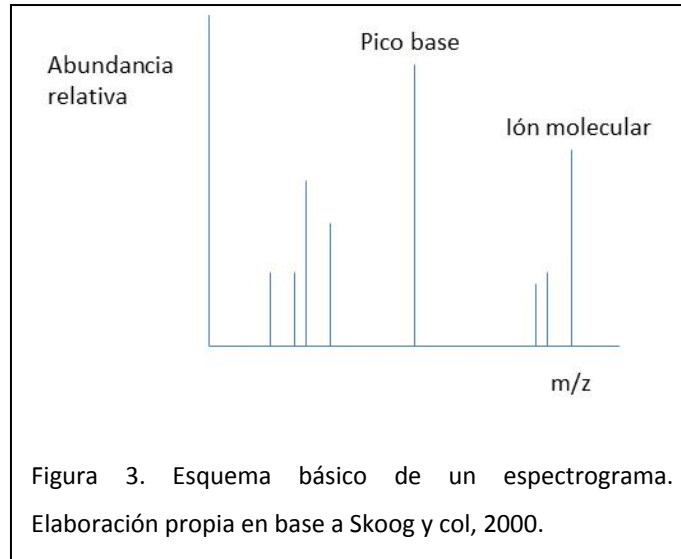
El analizador de masas ideal es aquel capaz de distinguir entre diferencias pequeñas de masa y además es capaz de permitir el paso de un número de iones suficiente para producir una corriente de los mismos fácilmente medibles.

4. Detección de iones y producción de señal eléctrica.

En los analizadores de masa de tiempo de vuelo o “**Time Of Flight**” (TOF) los iones producidos son acelerados mediante un campo eléctrico pulsante y la separación en función de su masa se produce durante su recorrido hasta el detector situado al final del tubo. Además ofrecen la posibilidad de análisis rápido en EM en tándem y miniaturizado (Fenselau, 2001).

El ordenador que controla el espectrómetro de masas recoge las distintas señales y las reproduce, para una fácil interpretación, en lo que se conoce como espectrograma. Es un gráfico de barras donde se representa la abundancia relativa de los picos de cada especie iónica con respecto a su relación masa/carga.

Al pico más alto se le conoce como pico base y se le asigna un valor relativo de 100%. La intensidad de los demás picos se expresara en porcentaje de la intensidad del pico base. Al ión no fragmentado se le llama ión molecular (Figura 3).



Los espectros de masas se pueden adquirir bien de forma automática, método del que se obtiene mayor rendimiento pero es menos reproducible, o bien de forma manual, donde el usuario puede especificar valores umbral de varios parámetros, como número de disparos, intensidad del pico base, resolución mínima del umbral, relación señal-ruido, selección del rango de pico de masas, etc. Todo ello es necesario en el algoritmo para la adquisición de espectros (Zhang, 2014).

1.3. EM MALDI-TOF EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

La EM MALDI-TOF fue propuesta como alternativa a los sistemas de identificación habituales ya que, por sus características, podía permitir la identificación bacteriana con una fiabilidad muy alta en un corto periodo de tiempo (Emonet, 2010). Clásicamente, los laboratorios de Microbiología Clínica han venido llevando a cabo la identificación de microorganismos, en general, mediante cultivo, rasgos fenotípicos o características de crecimiento como morfología celular, y patrones bioquímicos basados en la metabolómica (Risch, 2010).

Sin embargo, los test bioquímicos aplicados en paneles miniaturizados a veces pueden ser lentos e imprecisos a la hora de dilucidar algunas especies bacterianas (Sauer, 2010). Además el tiempo requerido para un cultivo rutinario oscila entre 24-72 horas dependiendo del tipo de microorganismo en cuestión, ya que existen bacterias de crecimiento lento o metabólicamente inertes llamadas comúnmente *fastidiosas*, que necesitan un tiempo añadido de crecimiento y pruebas adicionales. Así mismo, la mayoría de ellos requieren una evaluación inicial como tinción de Gram, prueba de la catalasa o prueba de la oxidasa para una identificación presuntiva (Dubois, 2010).

Este nuevo sistema permite un procesamiento suficientemente ágil y sencillo como para obtener un resultado en un tiempo mínimo, del orden de seis a ocho minutos desde que la bacteria se deposita en la placa o sonda metálica hasta que se recibe la identificación por el software asociado a un base de datos que incluye espectrogramas de la mayoría de los patógenos humanos (Seng, 2009).

El nivel de fiabilidad de la identificación de microorganismos es equiparable al de la secuenciación del ARNr 16S, ya que en el espectro de masa generado, cada pico corresponde a un fragmento molecular liberado desde la superficie celular durante la desorción láser (Edward-Jones, 2000). Se consideran huellas dactilares de las proteínas más abundantes y conservadas de los microorganismos, las proteínas ribosomales (Emonet, 2010). La coevolución de las proteínas ribosomales y ARNr podría explicar las similitudes entre el dendrograma generado por genes ARNr y el conseguido por MALDI-TOF, que relaciona los espectros obtenidos con una biblioteca de espectros de cepas conocidas (Dubois, 2010). Además, las proteínas ribosomales de todas las bacterias usan rangos altos de masa, del orden de 2.000 a 20.000 Da, y están cargadas positivamente, lo que favorece su medida con MALDI y le confiere mayor robustez a la identificación (Mellman, 2008).

Se estableció que la identificación de microorganismos por EM se basaba en el proteoma o conjunto de proteínas sintetizadas por la célula en un determinado momento (Paulovic, 2013). Esto planteaba un importante inconveniente, al menos desde el punto de vista teórico, ya que la síntesis de proteínas puede cambiar bajo condiciones diferentes de cultivo, factores de crecimiento disponibles, condiciones de almacenamiento de la muestra, etc. Estas variables deben mantenerse constantes, de lo contrario, la expresión del perfil de proteínas puede ser modificada (Pavlovic, 2013. Ueda, 2015).

Existen otros parámetros que afectan a la reproducibilidad de la EM, como son la matriz elegida, la calibración de análisis con estándares, el propio instrumento, el rango de masas de iones, la metodología, las condiciones de medición e incluso el operador, pueden inducir variabilidad en los espectros obtenidos. De ahí la importancia de subrayar la estandarización de las condiciones experimentales para mejorar la reproducibilidad espectral y la comparabilidad de los resultados (Keys, 2004. Hettick, 2004. Parisi, 2008).

Tampoco parece haber consenso entre el análisis de células enteras (bacterias suspendidas en una solución y/o depositadas directamente sobre el contenedor de muestra) o extractos de las mismas, para mejorar los datos de reproducibilidad de m/z (Hsieh, 2008), aunque numerosos autores abogan por la inclusión, dentro de los protocolos específicos de mejora de la calidad del espectro, el uso de agentes químicos para romper las paredes celulares y extraer las proteínas intracelulares, sobre todo en la identificación de levaduras (Emonet, 2010).

Otros autores estudian estrategias que van dirigidas a la optimización del proceso, no solo en la fase preanalítica (edad de cultivo, medio de crecimiento, matriz, composición del disolvente, preparación de muestra y metodología), sino también en la fase postanalítica. Esta fase incluye la revisión de los puntos de corte del software Biotyper para mejorar el porcentaje de microorganismos correctamente identificados y la calidad del espectro, ya que éste debe concentrar un máximo de 100 picos con una señal mínima, excediendo una relación definida de señal/ruido (Zhang, 2014).

1.3.1. APLICACIÓN DE MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Estudios recientes muestran como esta nueva tecnología ofrece una extraordinaria fiabilidad en la identificación de distintos tipos de microorganismos, entre los que se encuentra los patógenos humanos más frecuentes, como una gran variedad de bacterias Gram positivas (Ferreira, 2010), *Staphylococcus* sp (Carbonnelle, 2007. Dubois, 2010), *S. aureus* (Szabados, 2010), Bacilos gram negativos no fermentadores (Mellman, 2008), bacterias anaerobias (Stingu, 2008. LaScola, 2011. Vega, 2012), *Francisella tularensis* (Seibold, 2010), *Listeria* sp (Barbuddhe, 2008), *Brucella* sp (Ferreira, 2010), *Nocardia* sp (Verroken, 2010), *Legionella* sp (Gaia, 2011), *Acinetobacter* sp (Álvarez-Buylla, 2012), levaduras (Van Veen, 2010. Ferreira, 2013) y hongos filamentosos (Cassagne, 2011).

Pese a su extraordinaria fiabilidad en la caracterización de mayoría de las especies patógenas humanas, algunos grupos específicos de los microorganismos citados, como algunos hongos y micobacterias, parecen mostrar mayores dificultades de identificación. Probablemente estas diferencias están relacionadas con los métodos de extracción de proteínas usados, que no son los más adecuados para ello, y con las bases de datos utilizadas, que pueden ser mejorables en algunos aspectos, sobre todo en lo que se refiere al número de espectros disponibles por especie.

Un caso especial lo constituyen las bacterias estrechamente relacionadas como los estreptococos del grupo *viridans*, que incluyen actualmente más de 30 especies y en las que la secuencia de nucleótidos de su ARNr 16S, especialmente en *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae* y *S. pneumoniae*, coinciden en un 99%. MALDI-TOF tiene serias dificultades para diferenciar *S. pneumoniae* y *S. mitis* (Emonet, 2010). Sin embargo, otras publicaciones demuestran la diferencia en espectros de masa del grupo de Lancefield de estreptococos bajo condiciones experimentales cuidadosamente estandarizadas (Friedrichs, 2007. Lartigue, 2013).

Otro grupo de microorganismos en los que se demuestra la eficacia de MALDI-TOF como herramienta de identificación en el laboratorio de Microbiología, son las micobacterias, donde se observan picos de masa bajos (menor de 2 KDa), y que corresponden a lípidos y componentes de la pared celular como ácidos micólicos (Hettick, 2004).

En este punto, cabe destacar que este sistema puede usarse para microorganismos clasificados en la categoría tres de bioseguridad, bajo condiciones de trabajo que aseguren la inactivación de los mismos. Entre los procedimientos de inactivación, que se clasifican en físicos, químicos y mecánicos, se encuentra la inactivación por ácido trifluoroacético al 80% durante 30 minutos, que es el mejor método bactericida. Además, para la inactivación de esporas, existe un protocolo que combina el tratamiento básico de rutina con procedimientos de centrifugación y filtración (Lasch, 2008).

Actualmente está claramente demostrado que la EM MALDI-TOF es una excelente alternativa a los métodos convencionales de identificación por algunas de sus ventajas como su flexibilidad, alta automatización, instrumentación sencilla, simplicidad en su forma de uso, precisión, coste mínimo de consumibles, alto rendimiento, gran libertad para el investigador para realizar diferentes ensayos, rapidez a la hora de la obtención de resultados y mejora

continua de la base de datos (Vorn, 1994. Ragoussis, 2006. Barbuddhe, 2008. Williamson, 2008. Stevenson, 2010. Dubois, 2010. Emonet, 2010. Sauer, 2010. LaScola, 2011).

1.3.2. IDENTIFICACIÓN DIRECTA A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS

Algunos autores plantean protocolos para la identificación directa de microorganismos desde muestras clínicas. Es el caso de Burillo y colaboradores, que obtuvieron buenos resultados desde **muestras de orinas**, útil en el 96.1% de los casos. El pequeño inconveniente que surgía en el algoritmo era la necesidad de una tinción de Gram previa para seleccionar las muestras según su carga bacteriana. Sin embargo, fue capaz de detectar mezclas de dos microorganismos. Nuestro grupo también obtuvo buenos resultados en la identificación directa desde muestras de orina, aunque reiteramos la importancia de una carga alta de microorganismos (mayor de 100.000 UFC/ml), con un umbral requerido distinto entre diferentes especies (Ferreira, 2010).

La EM MALDI-TOF también ha sido capaz de identificar microorganismos causantes de bacteriemias directamente desde **hemocultivos** positivos con una alta fiabilidad (LaScola, 2009. Drancourt, 2010). Aunque también se presentan otros estudios en los que se advierte la necesidad de una alta carga bacteriana para obtener un espectro aceptable. Además la hemoglobina y las proteínas del suero pueden interferir con los patrones del espectro del microorganismo (Stevenson, 2010).

Existen diversos protocolos de extracción a partir de muestras de sangre positivas, aunque se plantea la posibilidad de sembrar en medios de agar sangre e incubar entre dos y tres horas para obtener una capa fina de colonias suficiente para la detección de patógenos directos desde sangre de paciente sépticos (Emonet, 2010).

1.3.3. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS POR EM MALDI-TOF

La EM MALDI-TOF se presenta como una nueva perspectiva en el campo del diagnóstico microbiológico, pero quedan algunas cuestiones por resolver. Y es que esta tecnología aunque se ha consolidado como una herramienta de identificación rápida y fiable de

microorganismos, no ofrece, *a priori*, información del perfil de sensibilidad, lo que constituye una gran limitación con respecto a los sistemas convencionales.

Se ha conseguido desarrollar métodos que permiten conocer con fiabilidad la producción de enzimas capaces de hidrolizar determinados antimicrobianos a partir de los cocientes m/z generados por la molécula de antimicrobiano intacta y por la molécula hidrolizada, y la presencia de determinados mecanismos de resistencia, como VanB, a partir de la presencia de picos específicos (Lupo, 2013). Por otra parte, en el caso de determinados mecanismos de resistencia como las beta lactamasas de espectro extendido (BLEEs), la tendencia actual es a no considerar resistencia si no se alcanzan determinados niveles de CMI, aunque la enzima esté presente, con lo que la mera detección de hidrólisis, si ésta no es cuantificable y extrapolable a CIMs, no sería suficiente para emitir un informe de resistencia (Muñoz-Bellido, 2015).

Una nueva tecnología desarrollada por Bruker, plantea la incorporación al medio de cultivo aminoácidos marcados isotópicamente junto con el antimicrobiano a probar. Los microorganismos sensibles no se multiplicarán o lo harán lentamente, y por lo tanto apenas incorporarán estos aminoácidos marcados. Los microorganismos resistentes se multiplicarán de manera mucho más activa, e incorporarán mayores cantidades de estos aminoácidos marcados, que al tener tamaños distintos generarán perfiles diferentes a los sensibles. Se ha demostrado su utilidad en la identificación de SARM, y en detección de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos y fluorquinolonas (Sparbier, 2013)

Otra alternativa recientemente propuesta es la EM MALDI-TOF cuantitativa. Se basa en la incubación del microorganismo en presencia y ausencia de los antimicrobianos a probar, y la cuantificación de picos menores en ambas circunstancias. Se trata de un método que se mostrado sensible y específico frente a *Klebsiella* sp productora de carbapenemasas (Lange, 2014).

1.3.4. DETECCIÓN DE CLONES POR EM MALDI-TOF

Las aplicaciones de EM MALDI-TOF, como ya se ha constatado, no se ciñe a la mera identificación de microorganismos, sino que se han abierto nuevas perspectivas sobre su utilidad en otras áreas. Una de estas aéreas es el estudio epidemiológico. Con frecuencia, el

perfil proteico que se genera, posee una serie de características de género y especie, que podríamos denominar perfil primario, y que sería los picos principalmente valorados de cara a la identificación. Sin embargo, suelen existir otra serie de picos secundarios, más variables dentro de una misma especie, menos útiles en la identificación, pero supuestamente con una similitud paralela a la proximidad genética, el cual se llamaría perfil secundario. Este hecho permitiría establecer niveles de proximidad entre los aislados equiparables a los que actualmente se establecen mediante técnicas genéticas, pero de forma más rápida y barata (Muñoz-Bellido, 2012).

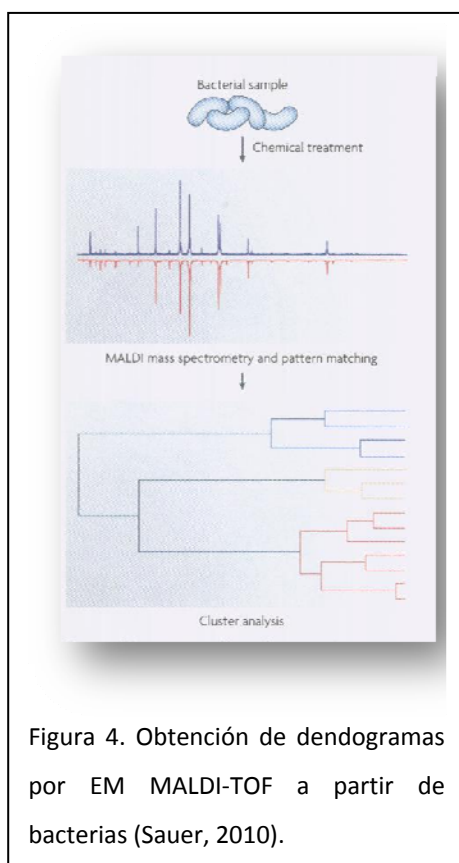


Figura 4. Obtención de dendogramas por EM MALDI-TOF a partir de bacterias (Sauer, 2010).

La mayoría de los artículos publicados desde el año 2000 avalan esta hipótesis. Edward-Jones y colaboradores, discriminaron entre clones de SAMS y SAMR (Edwards-Jones, 2000). Otros autores lo intentaron también para *S. aureus* (Walker, 2002. Jackson, 2005. Josten, 2013) y clones SAMR (Ueda, 2015). Del mismo modo Barbuddhe en el 2008, demostró la correlación entre EM MALDI-TOF y PFGE para aislamientos de *Listeria* sp. Otros estudios parciales como los realizados por Sauer en 2010 y por Sandrin en 2013 sugieren que este hecho podría ser demostrable.

Sin embargo, el equipo de Moliner y colaboradores, concluyó que los serogrupos de *Legionella* sp no podían ser discriminados por EM MALDI-TOF, ya que los espectros de las especies de *Legionella* sp son demasiado similares para ser discriminados. La razón radica en que las diferencias en el serogrupo se basan en la variación del antígeno principalmente LPS y proteínas de la membrana externa.

Autores como Parisi, proponen un análisis lineal discriminatorio para la construcción de modelos estadísticos para la diferenciación entre cepas bacterias.

2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

El estudio de epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas tiene como objetivo determinar la relación entre diferentes aislados de la misma especie. Se obtiene información útil en brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes permitiendo detectar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y el vehículo de transmisión, además de evaluar las medidas de control para evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva (Fernández-Cuenca, 2004).

Se define como clon al conjunto de microorganismos que se originan de un mismo progenitor. Este concepto es impreciso, ya que engloba en realidad dos conceptos: el de clon filogenético, o grupo clonal de microorganismos que se originaron de un ancestro común hace millones de años, y el de clon epidémico, que son microorganismos que ha sufrido pequeñas diferencias en poco tiempo y causan brotes epidémicos (Prats, 2005).

Existen dos grandes sistemas de marcado epidemiológico, **fenotípico** y **genotípico**, que varían en:

- ✓ tipabilidad o porcentaje de cepas susceptibles a ser analizadas por el sistema usado
- ✓ poder de discriminación o capacidad para identificar como distintas dos cepas que son realmente distintas
- ✓ reproducibilidad de los resultados o porcentaje de cepas de una especie que dan el mismo resultado al repetir la prueba
- ✓ complejidad de la prueba
- ✓ coste, tanto económico como laboral
- ✓ tiempo que se requiere desde que se inicia el proceso hasta que se obtienen resultados.

Una técnica de tipado se considera exitosa cuando es simple, barata, reproducible, con suficiente poder de discriminación y ampliamente disponible. La elección de la técnica de

tipado depende del propósito del estudio, de las facilidades disponibles y de la utilidad de datos generados. Todos los laboratorios con personal y recursos financieros suficientes deben proporcionar la tipificación molecular de microorganismos ya que repercuten de forma directa y significativa en el cuidado del paciente (Mehndiratta, 2012).

La técnica fenotípica más usada es el antibiograma, que evalúa la clonalidad a partir del patrón de sensibilidad o resistencia antibiótica. Su poder de discriminación depende del nivel de resistencia natural de cada especie y del número de antibióticos estudiados. La obtención de resultados es rápida, barata y disponible en cualquier laboratorio de microbiología. Sin embargo su poder de discriminación es bastante pobre, ya que el antibiograma es una característica relativamente inestable, que está influida por el ambiente local, presión selectiva, adquisición o pérdida de plásmidos con genes de resistencia y otros mecanismos genéticos como activación de genes reprimidos (Labarca, 2002). Este método solo ha tenido éxito en el *screening* de cepas epidémicas (Mehndiratta, 2012).

Los métodos genotípicos son caros y exigentes, pero poseen mayor poder discriminatorio. Entre ellos se encuentra la técnica considerada de referencia en la mayoría de los casos, la electroforesis en gel por campo pulsado (**Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE**). Es una variación de la electroforesis en gel de agarosa convencional, en la cual la orientación del campo eléctrico a través del gel se cambia periódicamente. Esta modificación permite que grandes fragmentos generados por macrorrestricción con enzimas de baja frecuencia de corte, se separen de acuerdo a su tamaño minimizando la superposición de los mismos. La selección de las enzimas de restricción es importante para la generación de patrones de bandas tan simples como sea posible, y por tanto más fáciles de interpretar, pero al mismo tiempo con una capacidad de discriminación suficiente. Es una técnica altamente discriminatoria y reproducible, aunque los procedimientos son complejos, los equipos y los reactivos son caros, y el procedimiento completo requiere varios días para su finalización (Fernández-Cuenca, 2004).

El polimorfismo de los patrones de amplificación obtenidos mediante iniciadores específicos de secuencias repetidas (**rep-PCR**), se basa en la amplificación de fragmentos del genoma que se encuentra entre dos secuencias repetidas (**repetitive extragenic palindromic**). Es una

técnica más sencilla, ya que no requiere de enzimas de restricción ni electroforesis especial. Es rápida, ya que se pueden obtener resultados en menos de 24 horas, tiene un coste menor y genera patrones de bandas sencillas para bacterias como *A. baumannii*. Aun así, su poder de discriminación es menor al de PFGE (Vila, 1996).

Existe un método de tipado genotípico basado en el análisis de la secuencia de ADN bastante extendido en el estudio de la evolución clonal de SAMR llamado **MLST** o **Multilocus Sequencing Typing** que determina la secuencia de siete genes conocidos como “housekeeping”. Las variaciones en los distintos locus se detecta de forma directa mediante la comparación con perfiles alélicos definidos y disponibles en una base de datos accesibles en internet (www.mlst.net) (Tenover, 1994. Vázquez, 2004).

3. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

3.1. RESEÑA HISTÓRICA

Desde que fuera descubierto por el cirujano escocés A. Ogston en 1.880, *Staphylococcus aureus* ha demostrado una gran ubicuidad y una alta capacidad patógena, causando desde infecciones cutáneas leves hasta bacteriemias y shock séptico. A principios de 1940, dos años antes de la introducción de la penicilina, la tasa de mortalidad de los individuos con una infección por *S. aureus* era aproximadamente del 80% (Skinner, 1941). En 1942, se observó el primer aislado de *S. aureus* resistente a la penicilina a nivel hospitalario. Más tarde, también apareció en la comunidad (Lowy, 1998).

3.2. ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

El género *Staphylococcus* se incluyó tradicionalmente en la familia *Micrococcaceae*. Sin embargo, estudios recientes de homología genética, han demostrado que está más relacionado con los géneros *Gemella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus* dentro de la familia *Staphylococcaceae* (clasificación de la LPNS, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclatura).

El género *Staphylococcus* actualmente incluye 42 especies diferentes. Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de piel y mucosas, tanto de humanos como de animales. Las especies de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warnerii*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*. Éste último supone un punto capital en patología infecciosa.

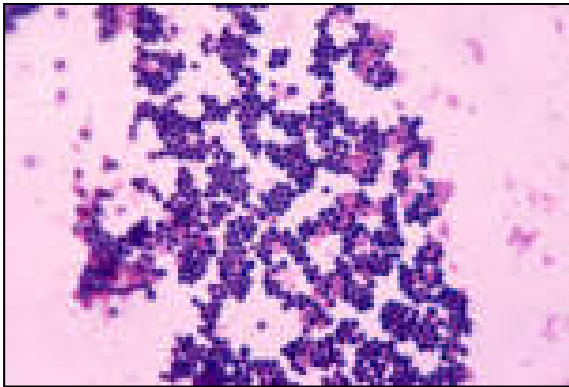


Figura 5. Tinción de Gram de una muestra de sangre donde se observa la agrupación en racimos del género *Staphylococcus*.

El nombre del género procede del griego *staphylé* que significa “racimo”, y es que morfológicamente son cocos esféricos Gram positivos que se agrupan en forma irregular o de racimo (figura 5). Son bacterias inmóviles, no formadoras de esporas, generalmente no encapsuladas y anaerobias facultativas. La mayoría de las especies producen la enzima catalasa, propiedad que se utiliza para diferenciarlos de los estreptococos.

Las colonias, tras 18-24 horas de incubación, crecen de forma lisa, con bordes enteros y con una coloración amarillenta o dorada, debido a la producción de un pigmento carotenoide. Casi todas las cepas crecidas en medios de cultivo con sangre poseen un halo de hemólisis completa alrededor de la colonia, o beta-hemólisis (figura 6).

Una de las características más importantes que permite diferenciar a *S. aureus* del resto de las especies de estafilococos es la producción de la enzima coagulasa, que le confiere capacidad para coagular el plasma. Además son bacterias muy resistentes, capaces de crecer en medios con elevada salinidad (7.5% de NaCl), y que toleran el calor y la desecación. Estas propiedades son transcendentales a la hora de entender aspectos epidemiológicos.

3.3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Los medios no selectivos más usados para la detección de esta bacteria en los laboratorios son agar sangre y agar chocolate, donde *S. aureus* crece apropiadamente. El medio selectivo de Chapman o manitol salado, contiene una alta concentración de sal que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y las colonias de *S. aureus* emergen de color amarillo por la acidificación del medio provocada por la fermentación del manitol (Finegold, 1961).

Existe un morfotipo de *S. aureus* llamado **variantes de colonia pequeña (VCPSA)**, descritas por primera vez en 1932 por Hoffstadt y col. Poseen características fenotípicas diferentes del morfotipo habitual, ya que son de crecimiento lento, tamaño reducido (aproximadamente diez veces menor que las colonias habituales), escasa pigmentación, hemolisis reducida y positividad débil para las pruebas de la catalasa y coagulasa (Kipp, 2005). Las causas de este cambio en el crecimiento son mutaciones en la cadena respiratoria y otros mecanismos aún desconocidos.



Figura 6. Colonias pigmentadas y beta-hemolíticas de *S.aureus* en un medio de agar sangre.

Debe sospecharse en infecciones silentes o recurrentes como fibrosis quística y osteomielitis, donde actúan como reservorio de resistencia a la meticilina (Linksvon, 2008). Su baja prevalencia se debe a la dificultad de detección en cultivos mixtos, ya que quedan enmascaradas por las colonias de *S. aureus* de tamaño normal (Delgado, 2014).

La identificación de ambos morfotipos puede realizarse mediante pruebas bioquímicas convencionales como fermentación de azúcares, uso de aminoácidos y otras determinaciones presentes en sistemas comerciales automatizados.

La identificación directa en muestras clínicas puede realizarse mediante técnicas de amplificación genética, como PCR usando genes específicos de *S. aureus*, concretamente los genes del ARN ribosómico 16S y 23S.

Para establecer la relación clonal de aislados de *S. aureus* se usan los siguientes métodos moleculares:

- **PFGE** o electroforesis en campo pulsante (método de referencia para la tipificación molecular). Es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (Tenover, 1994. Golding, 2015)
- **REP-PCR** o amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos. Un tipo de PCR que emplea *primers* diseñados para hibridar con secuencias repetidas intercaladas en el genoma (Crnich, 2014).
- **MLST** o Multilocus Sequence Typing, mide directamente las variaciones de la secuencia de ADN de determinados genes denominados en conjunto *housekeeping*, y caracteriza cepas por sus perfiles alélicos únicos. Permite conocer los linajes de cepas aisladas (Enright, 2000).

3.4. PATOGENIA Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

La patogenicidad de las infecciones producidas por *S. aureus* está estrechamente relacionada con los factores de virulencia que expresa este microorganismo y con la alteración de los mecanismos de defensa del huésped.

S. aureus puede colonizar zonas como la piel y el tracto gastrointestinal. Esta colonización favorece además la transmisión entre individuos en la comunidad y en el medio hospitalario. Cuando la integridad de las barreras mecánicas se ve comprometida, bien por lesiones traumáticas o bien por actuaciones quirúrgicas, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos.

Aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente de *S. aureus* en fosas nasales y un 60% lo es de manera intermitente.

La supervivencia y la invasión del huésped, se produce por la suma de los factores de virulencia coordinados por un sistema de comunicación celular llamado *quorum sensing* (QS), mediado por pequeñas proteínas que activan y regulan genes llamados *agr* que controlan los agentes de virulencia (Yarwood, 2003).

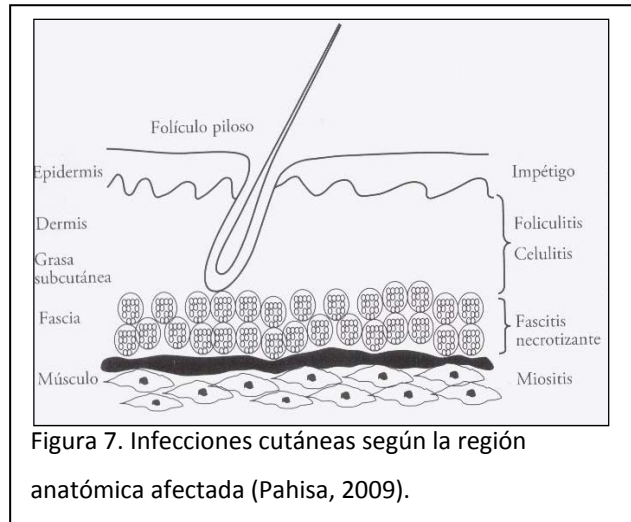
Los factores de virulencia más relevantes intervienen son:

1. **Adherencia bacteriana** mediante una proteína llamada proteína A y otras proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, factor de agregación o *clumping factor*.
2. **Penetración e invasión tisular** mediante enzimas como fibrolisinas, proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C y elastasas.
3. **Persistencia bacteriana:** el péptidoglicano de la pared celular le confiere resistencia, capacidad de formación de biocapas polisacáridicas y formación de variantes de colonia pequeña.
4. **Evasión de los mecanismos de defensa del huésped:** mediante la cápsula polisacárida, proteína A, proteínas de adherencia extracelular y citocinas como leucocidina de Panton Valentine.
5. **Producción de toxinas** que favorecen la invasión y patogenia: enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1), toxina citolítica y toxina exfoliativa o epidermolítica.

Las infecciones por *S. aureus* pueden presentar cuadros clínicos muy diferentes. Tras la introducción en el organismo del huésped, pueden desarrollar infecciones superficiales y benignas o profundas y graves, generalmente supurativas y acompañadas de la formación de abscesos.

Infección de piel y partes blandas. Frecuentemente se inician a partir de una lesión cutánea como heridas traumáticas, úlceras por presión, en usuarios de drogas por vía parenteral (ADVP) o procedimientos invasivos como el uso de catéteres intravenosos. Además, actúan como factores predisponentes circunstancias como inmunosupresión, diabetes, enfermedades neurológicas, vasculopatías, alteraciones en el drenaje linfático y enfermedades cutáneas. Los síndromes clínicos son muy característicos, afectando a diferentes zonas anatómicas (figura 7):

- Epidermis: impétigo.
- Dermis superficial: foliculitis.
- Dermis profunda: forúnculos, hidrosadenitis supurativa y mastitis.
- Tejido celular subcutáneo: erisipelas, celulitis, y fascitis necrosante tipos I y II.
- Músculo: piomiositis.



Bacteriemias y endocarditis. Se consideran la segunda causa de bacteriemia de forma global y la primera a nivel nosocomial. *S. aureus* constituye el agente etiológico más frecuente en todos los tipos de endocarditis infecciosa aguda, que afectan sobre todo a válvula mitral y aórtica (nativas o protésicas). El foco inicial de infección se desconoce en gran parte de los casos (40-50%), aunque las ocurridas en el ámbito hospitalario se relacionan con procedimientos invasivos, mientras las originadas en la comunidad suelen asociarse a infecciones de piel y aparato respiratorio. Aunque su frecuencia es menor, en general las bacteriemias comunitarias por *S. aureus* se asocian con un riesgo más alto de complicaciones y de mortalidad. La endocarditis se considera la complicación más relevante de la bacteriemia, observada en el 5-21% de los casos.

Infección de vías respiratorias. La neumonía y su complicación más relevante, el empiema, se producen por aspiración de secreciones orales o por diseminación hematológica. A nivel comunitario se asocia a cuadros víricos, mientras que a nivel hospitalario se asocia a la ventilación mecánica prolongada, al uso de corticoides y antibióticos y EPOC. *S. aureus* es la segunda causa después de *A. baumannii*, de neumonías asociada a ventilación mecánica (NAVM) en UCIs (Estudio ENVIN, 2014).

Infecciones osteoarticulares. La mortalidad asociada a este tipo de infecciones no es elevada. Sin embargo, se observan secuelas importantes y alteraciones funcionales. *S. aureus* es capaz de producir artritis séptica (37-56%) por diseminación hematológica o por contigüidad en pacientes de cualquier edad. Además produce osteomielitis, espondilodiscitis e infecciones de prótesis (Post, 2014).

Otras. Infección del tracto urinario, infección del sistema nervioso central (menigitis, abscesos, empiema subdural), cuadros producidos por toxinas como síndrome de la piel escaldada o dermatitis exfoliativa, síndrome del shock tóxico (intoxicación multisistémica que cursa con fiebre, hipotensión, vértigo ortostático, exantema macular descamativo, vómitos, diarrea, fallo renal, fallo hepático y fracaso multiorgánico), y toxiinfección alimentaria. Ésta última se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxina termoestable preformada. Cursa con vómitos, diarrea y dolor cólico abdominal (Deurenberg, 2008).

3.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Durante las últimas décadas, la resistencia de *S. aureus* a diferentes familias de antibióticos ha evolucionado hasta convertirse en un problema de salud a nivel mundial. La evolución de *S. aureus* a lo largo del tiempo, ha demostrado con claridad la capacidad de adaptación de este microorganismo a las condiciones del medio.

Los primeros aislados resistentes a la penicilina aparecieron poco después de la introducción de ésta en el arsenal terapéutico hace más de 50 años. La enzima responsable de la hidrólisis del anillo beta-lactámico se denominó penicililasa o beta-lactamasa y viene codificada en un plásmido (Kirby, 1944).

La metilina es una penicilina semisintética que fue desarrollada en 1959 para resistir a la acción hidrolítica de esta enzima, mediante la adición de distintas cadenas laterales a la estructura principal del beta-lactámico, el ácido-6-aminopenicilánico (6-APA), que suponen un impedimento estérico para el adecuado acoplamiento entre la enzima (beta-lactamasas) y el sustrato (penicilina).

Más adelante, en 1960, se describieron los primeros casos de resistencia a meticilina, mediados principalmente por la producción de una proteína similar a las **PBPs** (penicillin binding protein) convencionales, pero con una afinidad muy reducida por los beta-lactámicos, a la que se denominó **PBP 2a** o **PBP 2'**.

En condiciones normales, las PBP son peptidasas localizadas en la membrana de la bacteria para catalizar la reacción de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular. En *S. aureus* sensibles a la meticilina (MSSA), el beta-lactámico se une de forma covalente a las PBP inactivando la enzima, e impidiendo el proceso de transpeptidación, que se traducirá en la muerte posterior de la bacteria.

Las cepas conocidas como *S. aureus* resistentes a la meticilina, o SAMR, sintetizan una PBP modificada (PBP 2a) que, al poseer una baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, no se une a ellos, con lo que la síntesis de la pared celular no se ve interrumpida. Esta modificación les confiere resistencia a beta-lactámicos, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas. Se combina también con la resistencia a otros grupos de fármacos como macrólidos, tetraciclinas, lincosaminas, aminoglucósidos, fluorquinolonas y cloranfenicol.

La proteína PBP2a viene codificada por el gen *mecA*, localizado en un elemento genético móvil de entre 21 y 67kb llamado cassette cromosómico estafilocócico (SCC *mec*). Existen distintos tipos dependiendo del tamaño molecular y composición genética.

Se han constatado otros mecanismos de resistencia a la meticilina no mediados por el gen *mecA*:

- Las cepas denominadas **BORSA** (*borderline* oxacillin-resistant *S.aureus*) son capaces de producir grandes cantidades de la penicililasa plasmídica característica de *S. aureus*. Presentan un CIM de meticilina entre 4 y 8µg/ml. La sensibilidad a este antimicrobiano podría recuperarse con un inhibidor de beta-lactamasa (Tomasz, 1989. Henze, 1995).
- Las cepas de *S. aureus* denominadas **MOSA** (modified *S.aureus*), poseen un bajo nivel de resistencia a meticilina. No son productoras de beta-lactamasas, sin embargo presentan una cierta modificación en la afinidad de sus PBPs (Chambers, 1990).

En 1977 comienza la descripción de los primeros casos de aislados de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, que recibieron el nombre de **VISA** o **GISA** (*S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina o glucopéptidos). Aparecían con CMI's entre 4 y 8 µg/ml, y se asociaban a una mutación cromosómica que afectaba a la estructura de la pared celular. Esta alteración se traducía en la síntesis de grandes cantidades de peptidoglicano, aumentando la presencia de residuos D-Ala-D-Ala libres. Estos residuos eran capaces de unirse a vancomicina, atrapándola y bloqueándola, e impidiendo así su actuación sobre la pared. Los aislados que presentaban valores de CMI superiores o iguales a 32 µg/ml, se denominaron **VRSA** o *S. aureus* resistentes a vancomicina. Esta alta resistencia se debe al gen *vanA* de enterococo, que llega a *S. aureus* mediante la transferencia de un plásmido conjugativo que incluye un transposón Tn 1546. Este gen codifica cambios en la estructura del peptidoglicano, modificando el extremo D-Ala-D-Ala (diana de glucopéptidos) por D-Ala-D-Lactato que posee una baja afinidad por estos antibióticos.

El primer caso descrito de una posible transferencia de un plásmido conjugativo, portador de un Tn1546 asociado a resistencia a vancomicina, de *Enterococcus faecalis* a *S. aureus*, fue en una coinfección por ambos microorganismos en un pie diabético (Chang, 2003), si bien otros autores ya habían demostrado esta posibilidad de transferencia *in vitro* (Noble, 1992).

El perfil de multiresistencia de SAMR es preocupante, ya que SAMR suele ser resistente a macrólidos, fluorquinolonas y aminoglucósidos. Recientemente se ha descrito la pérdida de sensibilidad a los nuevos antibióticos introducidos en la práctica clínica como linezolid (Melka, 2004), daptomicina (Mangali, 2005) e incluso cefalosporinas de quinta generación con alta afinidad por la PBP2a, como ceftarolina (Banerjee, 2008).

Tabla 2. Mecanismos de resistencia que *S.aureus* a las diferentes familias de antibióticos.

ANTIBIÓTICO	DIANA	MECANISMO RESISTENCIA
B-lactámicos	PBPs	Modificación y disminución de afinidad de PBPs (PBP 2a)
Gluco péptidos	Transpeptidación	Alteración de peptidoglicano y Tn 1546
Quinolonas	ADN girasa	Mutación del gen de ADN girasa (gyr A, gyr B), gen topoisomerasa V, bombas de expulsión
Ácido fusídico	Factor de elongación	Alteración factor de elongación y disminución de permeabilidad
Macrólidos	Subunidad 50S ARNr	Metilación de ARNr y bombas de expulsión
Aminoglucósidos	Subunidad 30S ARNr	Modificación por transferasas
Rifampicina	ADN polimerasa	Alteración del ADN polimerasa (gen rif)
Cotrimoxazol	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	Producción de dihidrofolatoreductasa (gen orfA) y sobreproducción ácido-para-aminobenzoico
Tetraciclinas	Subunidad 30S ARNr	Protección ribosomal (gen tet) y bombas de expulsión
Mupirocina	Isoleucil-ARNt-sintetasa	Producción de sintetetas modificadas por gen mup A y gen ile S

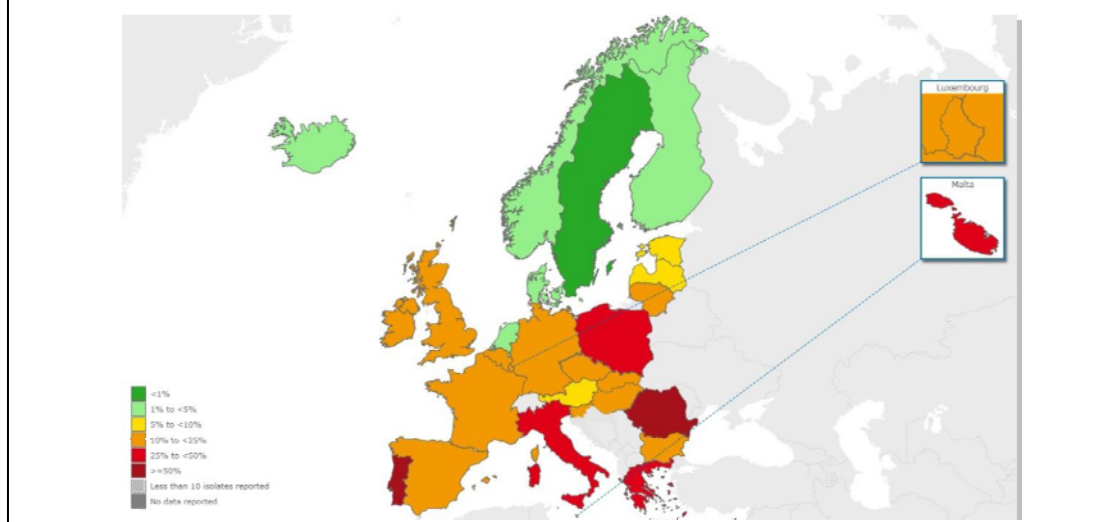
La resistencia a linezolid está ligada a mutaciones ribosomales y a la adquisición del gen *cfr*, responsable de la producción de una enzima metil-transferasa que interacciona con ARNr 23S modificándolo. Este gen se encontró inicialmente en estafilococos coagulasa negativos de origen animal (Shen, 2013). El primer brote detectado en España fue en 2008 en el hospital de San Carlos de Madrid, donde se detectaron 15 pacientes infectados con el mismo clon de SAMR que también eran resistentes a linezolid con CMI entre 16-32 µg/ml. Todos los aislados fueron susceptibles a tigeciclina, vancomicina y daptomicina (Morales, 2010).

Los mecanismos que utiliza *S. aureus* para superar la actividad de daptomicina son aún desconocidos, aunque se relaciona con el engrosamiento de la pared celular y mutación en genes relacionados con la membrana celular. Se debe sospechar este tipo de resistencia cuando la CMI observada sea igual o superior a 1 µg/ml (Mangali, 2005. Bayer, 2013). En la tabla 2 se muestran las diferentes familias de antibióticos, la diana frente a los que van dirigidos y los mecanismos de resistencia que *S. aureus* desarrolla.

3.6. EPIDEMIOLOGÍA

SAMR constituye uno de los patógenos con mayor trascendencia clínica de la historia en todo el mundo. Según la Agencia Europea de Vigilancia de Resistencia Bacteriana (EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System), el número de aislados de SAMR se ha estabilizado incluso ha disminuido en los últimos cuatro años. Aunque este hecho proporcione razones para el optimismo, SAMR sigue siendo una prioridad de salud pública sobre todo mientras el porcentaje permanezca en el 25% en siete de los 29 países colaboradores, principalmente en el sur y el este de Europa. Estos datos se observa en la figura 8.

Figura 8. Porcentaje(%) de MRSA invasivos (sangre y LCR), EU/EEA, 2012. Annual epidemiological report 2014, ECDC 2015.

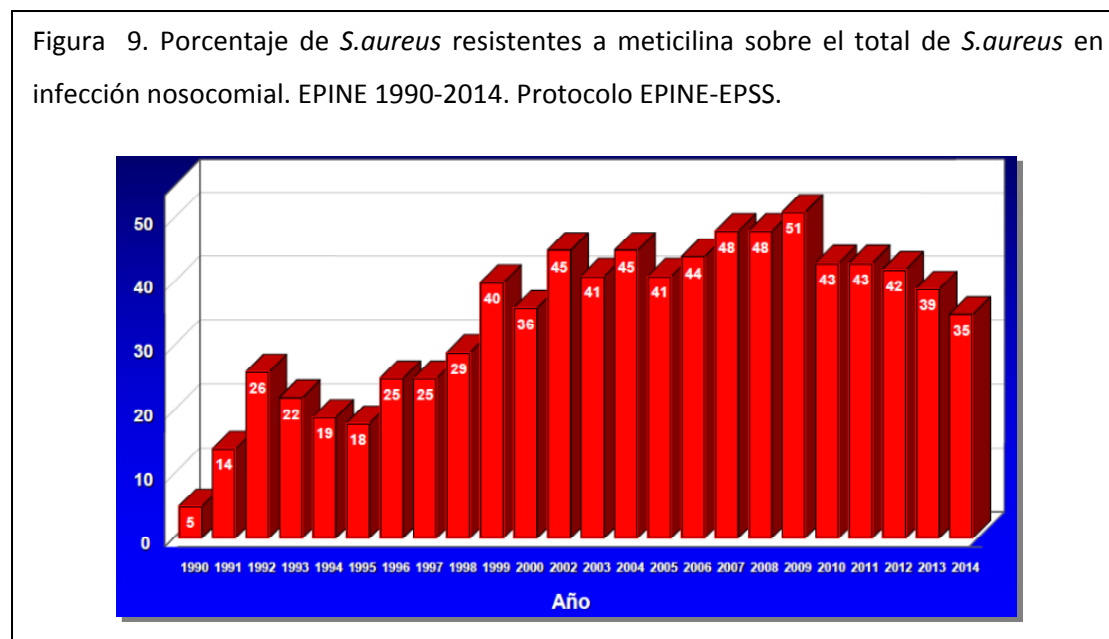


En España los primeros brotes de SAMR se comunicaron a finales de la década de 1980 (Pérez, 1998).

Una de las causas principales que se barajan en la explicación de la infección por microorganismos resistentes a antibióticos es el consumo desmesurado de los mismos, favorecido por una larga estancia en centros hospitalarios, en especial en áreas como UCI, Cirugía General y Digestiva y Medicina interna (Lavery, 2006).

La evolución de la prevalencia de SAMR en hospitales españoles puede consultarse en los informes recogidos por el grupo de estudio de prevalencia de infecciones nosocomiales en España (EPINE).

En la figura 9 se reflejan los datos desde el año 1990 hasta 2014.



Desde 1994, el grupo de Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial en UCI (ENVIN-UCI), evalúa la incidencia de la patología infecciosa en pacientes críticos, con la participación de 192 unidades de cuidados intensivos y más de 70.000 pacientes. Este grupo ha documentado la disminución de la prevalencia de infecciones adquiridas en UCI desde el 15% en 2009 hasta el 10% en 2014. Se cree que este hecho es repercusión directa de los programas de control de infección “Bacteriemia Zero”, “Neumonía Zero” y el recientemente incorporado “Resistencia Zero”. Dentro de estas infecciones, *S. aureus* ocupó la segunda posición en la etiología de la NAVM (12.4%) y de ellos 2.2% fueron SAMR. Un porcentaje similar fue encontrado en los SAMR causantes de bacteriemia primaria (2.3%).

Kock y col realizaron una revisión sobre las infecciones causadas por SAMR, destacando que el impacto económico que supone el exceso de días de hospitalización, tratamiento y medidas preventivas dirigidas a este microorganismo ronda los 380 millones de euros anuales en Europa. Por otra parte, el riesgo de mortalidad es 5.6 veces mayor en pacientes infectados con SAMR que en pacientes infectados por SAMS.

El estudio genético de las cepas de SAMR condujo al conocimiento del gen *mec*, que es parte de un elemento cromosómico móvil de 21-67 Kb llamado *SCCmec*. Según su composición genética y tamaño, se clasifican fundamentalmente en cuatro tipos: tipo I (34 Kb), tipo II (53 Kb), tipo III (67 Kb), tipo IV (21-24 Kb) y tipo V (28 Kb). Los tipos I, II y III se habían considerado tradicionalmente como clones distribuidos a nivel nosocomial que poseían otros genes que conferían multirresistencia y clonalidad. Los factores de riesgo asociados a infecciones causadas por SAMR de estos tipos eran hospitalización reciente, cirugía y pacientes portadores de catéteres.

A nivel comunitario, eran los tipos IV y V los que producían, en individuos previamente sanos, desde infecciones de piel y partes blandas como forúnculos o abscesos, hasta neumonía necrotizante. Debido a su pequeño tamaño eran fácilmente transmisibles, aunque afortunadamente paucirresistentes o sensibles a múltiples antibióticos y policlonales (Zang, 2005). Estos tipos, además del gen *mecA*, poseen otros genes como *lukS-PV* y *luk F-PV*, que codifican la toxina de Panton-Valantine, asociada a la producción de citotoxicidad, daño tisular y necrosis.

Las diferencias claramente establecidas entre clones de SAMR radican en la virulencia de los mismos y su espectro de resistencia (Rasigade, 2013).

La última década ha desdibujado la separación habitual de clones distribuidos a nivel hospitalario y a nivel comunitario. Este cambio quedó demostrado con la aparición y difusión de clones tipo IV en hospitales (Cantón, 2013). La mayoría de los clones circulantes en EEUU, Europa y Australia son los denominados USA 300 (ST8) y USA 400 (ST1). En España además se encuentran ST 5 y ST 80, que poseen resistencia a eritromicina, clindamicina y tetraciclinas (Cercenado, 2008). Este cambio puede deberse a la competencia entre los clones que comparten el mismo nicho, ya demostrado entre cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Iwase, 2010).

Los seres humanos se comportan como un reservorio natural de *S. aureus*, siendo las fosas nasales su nicho ecológico, ya que posee una gran afinidad por las células epiteliales nasales. También se encuentra en piel de axilas, región perineal, y mucosas orofaríngea, genital y gastrointestinal (Fitzferald, 2014). Se han clasificado los estados de portador nasal como portador persistente, intermitente o no portador. La diferencia entre portador persistente y portador intermitente radica en que los primeros varían con frecuencia de clon y tienen un mayor número de unidades formadores de colonias, mientras que en los intermitentes

ocurre lo contrario. Ello implica una mayor dispersión, transmisión y contaminación del entorno inanimado.

La prevalencia de la colonización nasal varía entre el 25 y el 55% de la población estudiada, siendo de ellos 10-35% portadores persistentes y 20-70% intermitentes. Se ha comprobado que la persistencia puede durar desde meses hasta un año, con cambios clonales a lo largo del tiempo (Tong, 2015).

Existen determinantes del microorganismo que ayudan a la fijación de las células epiteliales como el ácido teicoico de la pared celular, las proteínas fijadoras de fibronectina y los polisacáridos capsulares, y determinantes del huésped como diabetes, artritis reumatoide, cirrosis hepática, hemodiálisis, VIH, infección viral del tracto respiratorio, ADVP y el haber recibido tratamientos antibióticos previos, sobre todo con fluorquinolonas (LeBlanc, 2006).

La introducción en hospitales se produce por pacientes colonizados y asintomáticos, o bien por miembros del personal sanitario que son portadores nasales. Dentro del ámbito hospitalario, se transmite a través de las manos del propio personal y por la contaminación de objetos inanimados (Ho, 2015).

3.7. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

El tratamiento de elección en cualquier infección estafilocócica de gravedad moderada o alta producida por una cepa sensible a la meticilina es cloxacilina. Constituyen tratamientos alternativos aceptables amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefalosporinas de primera generación (cefazolina), cefalosporinas de segunda generación (cefuroxima) y cefalosporinas de tercera generación (cefditoren). Si la infección cursa con criterios graves de sepsis o shock séptico, o la CMI de vancomicina es igual o superior a 1.5 mg/l, hay que considerar el empleo de asociaciones de antibióticos potencialmente sinérgicos con cloxacilina, como daptomicina, aminoglucósidos (gentamicina), o fosfomicina. La neumonía, meningitis, endoftalmitis, así como las infecciones producidas por cepas productoras de toxina de Pantón-Valantine, debe tratarse con linezolid.

Otros fármacos potencialmente activos son: clindamicina, levofloxacino, moxifloxacino, doxiciclina, minociclina y carbapenemas. Vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, cotrimoxazol,

ceftarolina y la asociación de imipenem con fosfomicina son alternativas para el tratamiento de la infección por cepas MRSA.

La infección cutánea localizada puede tratarse con la aplicación tópica de mupirocina, retapamulina, bacitracina o ácido fusídico (Mensa, 2013).

El cumplimiento de las normas básicas de higiene de manos, uso de guantes y uso de mascarillas es una condición previa obligada para evitar el riesgo de salpicaduras de líquidos biológicos durante el cuidado de los pacientes. La recomendación evidenciada y unánime es el frotado de manos con solución alcohólica, ya que ofrecen con respecto al lavado con jabones antisépticos, mayor eficacia en la reducción de flora bacteriana transitoria, mayor facilidad de cumplimiento y mayor tolerancia.

No existe evidencia científica sólida sobre la utilidad del aislamiento de paciente con SAMR, aunque a veces es recomendada, considerando siempre los recursos tanto estructurales de los centros asistenciales como económicos. La detección de pacientes colonizados contribuye directamente a la disminución o erradicación de SAMR. Para ello es necesaria la realización de cultivos de vigilancia activa o cribado, aunque estos han sido siempre motivo de debate, bien por los pacientes a los que deben ir dirigidos, bien por el tiempo e intervalo óptimos entre las muestras.

En general, se recomienda realizar cultivos de cribado a pacientes en alto riesgo de colonización, como son los pacientes previamente colonizados, con múltiples ingresos y procedentes de centros con elevada prevalencia de SAMR. Además es recomendable realizar un cribado universal en pacientes de UCI, compañeros de habitación de pacientes colonizados o infectados y en situaciones de brote. Otros pacientes considerados de alto riesgo por asociación con complicaciones graves son: neonatos, grandes quemados, trasplantados, pacientes sometidos a cirugía torácica o traumatológica, y pacientes nefrológicos, incluyendo hemodializados. El cribado del personal sanitario se realizará solo en caso de brote, cuando exista sospecha de su implicación en el mismo. Las muestras se recogerán de fosas nasales, faringe, aspirado traqueal (en paciente intubados) y piel perineal.

El tratamiento de descolonización incluye pautas de mupirocina nasal. En caso de recaídas frecuentes o resistencia a la mupirocina, se recomienda ácido fusídico tópico o bacitracina tópica con cotrimoxazol por vía oral. La descontaminación cutánea se llevará a cabo

mediante el baño o ducha con solución jabonosa de gluconato de clorhexidina al 4% o lavado con esponjas desechables impregnadas en clorhexidina al 2%.

Las recomendaciones para la limpieza y desinfección medioambiental son las generales para limpieza y desinfección de superficies en áreas de cuidados de pacientes. Raramente se necesita el cierre de la unidad. No está recomendada la realización de cultivos ambientales sistemáticos, aunque pueden utilizarse para comprobar la calidad de la limpieza (Rodríguez-Baño, 2008).

Las estrategias incluidas en las perspectivas de futuro abarcan el desarrollo de nuevos fármacos antibióticos antiestafilocócicos como beta-lactámicos con afinidad por **PBP2a** (ceftarolina, ceftobiprol), antibióticos con actividad sobre la membrana (daptomicina), así como moléculas que interfieran en la etiopatogenia, dirigidas a bloquear los reguladores de tipo *agr* y a las adhesinas de superficie. Las vacunas para prevenir las neumonías en están en periodo de investigación experimental, y se basan en el uso de una forma mutada de la hemolisina estafilocócica.

4. ACINETOBACTER BAUMANNII

4.1. RESEÑA HISTORICA

Acinetobacter baumannii ha surgido en la última década como un patógeno de gran relevancia, fundamentalmente en pacientes hospitalizados.

Constituye un verdadero problema dentro de las infecciones nosocomiales multirresistentes, debido a su capacidad para acumular mecanismos de resistencia a diversas familias de antimicrobianos.

Originalmente se identificó a principios de siglo XX. Sin embargo, no fue hasta la aparición del control moderno de la infección cuando se determinó su papel como patógeno oportunista ubicuo. Los pacientes comúnmente afectados son aquellos que poseen una enfermedad subyacente, sometidos a cirugía y/o procedimientos invasivos, a uso de antibióticos de amplio espectro y aquellos que sufren ingresos hospitalarios prolongados.

A nivel taxonómico, se clasificaron erróneamente como miembro de la familia *Neisseriaceae* por su forma de cocobacilo Gram negativo en la fase estacionaria, y su forma de bacilo en la fase de crecimiento rápido.

4.2. ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Son microorganismos aerobios estrictos, capsulados e inmóviles. Desde el punto de vista bioquímico se caracterizan porque no fermentan la glucosa, no reducen los nitratos a nitritos, son catalasa positivos, oxidasa negativos e indol negativos. Su gran versatilidad para usar distintas fuentes de carbono y energía les permite ampliar su hábitat en la naturaleza y crecer en medios habituales del laboratorio.

Las colonias en medios de agar sangre tienen una morfología típica, blanca o de color crema, mucoide con superficie lisa de 1-2 mm de diámetro.

El género *Acinetobacter* incluye más de 30 especies entre las que se encuentra *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. lwoffi*, *A. haemolyticus*, *A. johnsoni*, *A. junii*,.... La mayoría de estas especies no se asocian a enfermedad en el ser humano, sino que son organismos ambientales. *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y *A. lwoffi* son los más frecuentes en clínica. Concretamente *A. baumannii* se aísla en más del 80% de las infecciones causadas por *Acinetobacter* sp, especialmente en Unidades de Cuidados Intensivos (Manchanda, 2010, DiNocera, 2011).

Las distintas especies saprofitas de vida libre ubicuas en la naturaleza se encuentran en hábitats como agua, suelo e incluso piel humana. Son considerados flora normal de piel, mucosas, faringe y tracto respiratorio alto, tracto final de la uretra, tracto gastrointestinal y otras localizaciones, más comúnmente en pacientes hospitalizados (75%) que en individuos sanos (43%) (Doughari, 2011).

Los reservorios son poco conocidos, aunque pueden sobrevivir amplios periodos de tiempo tanto en superficies secas como húmedas. Es el microorganismo Gram negativo más persistente en la piel del personal sanitario.

A. baumannii se considera un patógeno oportunista con virulencia limitada aunque las infecciones invasivas se asocian con una alta morbilidad y mortalidad en pacientes

predispuestos. La tasa bruta de mortalidad en pacientes de UCI oscila entre el 30 y el 75% (Pérez, 2011).

Los factores de riesgo específicos asociados a infecciones nosocomiales incluyen la duración de estancia hospitalaria, ingreso en UCI o unidades de quemados, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, cirugía, heridas, nutrición parenteral, ventilación mecánica, uso de catéter intravenoso o urinario y colonización e infección previa por *Acinetobacter* sp.

4.3. PATOGENIA Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

La transmisión tiene lugar por contacto de persona a persona y por contaminación previa de agua, comida y equipos hospitalarios. La interpretación del significado de aislados en muestras clínicas suele ser dificultosa, debido a la amplia distribución de *Acinetobacter* sp en la naturaleza y su capacidad de colonización de tejidos sanos o dañados.

Los mecanismos exactos de patogenia involucrados han sido poco estudiados, aunque se han identificado algunos factores de virulencia:

1. **Capacidad de supervivencia** en ambientes secos durante largos periodos de tiempo.
2. Producción de **capsula polisacárida** e hidrofobicidad de la superficie celular. Juega un papel muy importante en la adhesión de bacterias, no solo en tejidos necrosados, sino también en superficies inanimadas como catéteres y prótesis. Además, protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los neutrófilos.
3. Producción de **sideróforos** o proteínas de unión al hierro, responsables de la captación del mismo.
4. Producción de **proteínas de membrana externa** (OMP) tipo A, que atacan a células epiteliales, y **fimbrias**, que participan activamente en la adhesión bacteriana y en el desarrollo de **biofilms** o **biopelículas**. Estas biopelículas constituyen un núcleo colonial de bacterias que funciona con un sistema circulatorio primitivo que bombea fluidos y nutrientes a través de canales en la matriz por cambios en la fuerza iónica del medio extracelular (Pour, 2011). Su superficie hidrofóbica con lipopolisacárido (LPS) inicia la adherencia en células epiteliales humanas o dispositivos médicos, comenzando la colonización e infección. En esta situación, las especiales condiciones

metabólicas y atmosféricas en que se desarrolla el microorganismo pueden hacer que antibióticos que se muestran activos *in vitro*, sean sin embargo ineficaces en la resolución del proceso infeccioso (Manchanda, 2010).

A. baumannii puede estar implicado en numerosos cuadros clínicos: bacteriemias asociadas a catéter, neumonía asociadas a ventilación mecánica (NAVM), meningitis, infección del tracto urinario (ITU), peritonitis, colangitis, infección de piel, tejidos blandos y heridas, ventriculitis, endocarditis, osteomielitis y abscesos entre otros (Pérez, 2011).

4.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Desde al año 2011, el término acuñado como “resistencia a múltiples antibióticos” se modificó por iniciativa de de los Centros de Europa y Estados Unidos para el Control y Prevención de Enfermedades: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) y Center for Disease Control and Prevention (CDC) (Magiorakos, 2012). Para *Acinetobacter* sp se propusieron las siguientes definiciones:

- **Multirresistente** (MDR): no susceptible a, al menos, tres o más clases de antimicrobianos.
- **Extremadamente resistente** (XDR): susceptible, como máximo, a dos clases de antimicrobianos.
- **Panresistente** (PDR): no susceptible a ningún agente antimicrobiano.

Los mecanismos de resistencia, ya sean adquiridos o intrínsecos, se clasifican en tres amplias categorías:

1. Inactivación del antimicrobiano mediante **enzimas modificadoras**.
2. Disminución de la concentración intramicrobiana de antibióticos por sobreexpresión de **bombas de expulsión** o por disminución de la permeabilidad de la membrana externa (Vila, 2011).
3. **Mutación en sitios diana** o de funcionalidad celular, siendo más característica la alteración de proteínas de unión a penicilina (PBP) (Manchanda, 2010).

Un ejemplo de la resistencia del primer caso sería la producción de beta-lactamasas de tipo AmpC, que por lo general se encuentran reprimidas. Cuando se añade un promotor de la secuencia de inserción *ISAb₁*, el gen *ampC* aumenta su expresión, dando lugar a la síntesis de mayores cantidades de beta-lactamasa, causando así resistencia a cefalosporinas. La adquisición de otras beta-lactamasas como metalo-betalactamasas es considerada de mayor relevancia ya que confiere resistencia a carbapenems. También poseen beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), pero con menos frecuencia que otros bacilos gram negativos. En la familia de los aminoglucósidos la producción de enzimas inactivantes, como la amoniglucósido-3'-fosfotransferasa VI, es el mecanismo de resistencia más frecuente.

La eliminación por bombas de expulsión suele actuar en beta-lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y tigeciclina (Navon, 2007). La disminución de la permeabilidad de la membrana externa se produce por disminución en el número de porinas, o por mutación de las proteínas que forman las porinas, obstaculizando el paso del antibiótico al espacio periplásmico. Este mecanismo confiere resistencia fundamentalmente a antimicrobianos de carácter hidrofílico, incluidos los beta-lactámicos.

En el tercer caso, la mutación en sitios diana suele presentarse en la resistencia a quinolonas mediante mutación en los genes *gyrA* y *parC* (Vila, 1996). Para la colistina, la mutación se encuentra en genes que codifican las proteínas PmrA y PmrB.

Estas resistencias se han asociado a elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción. Muestran dependencia al uso de antibióticos, que juega un papel esencial en la emergencia global y diseminación de la resistencia en *A.baumannii*. La evolución histórica de los antimicrobianos se relaciona estrechamente con la presión selectiva por el uso de los mismos en el ámbito hospitalario (Pérez, 2011).

El grupo de estudio de Infecciones Hospitalarias de la SEIMC, bajo el proyecto GEIH-REIPI- Ab 2010, realizó un estudio nacional multicéntrico en 43 hospitales españoles, donde se incluyeron 456 aislados y se evaluaron 18 antimicrobianos. Los porcentajes de aislados resistentes en comparación con los del primer estudio, realizado en el año 2000 fueron: carbapenémicos (82-86% vs. 43-48%), ceftazidima (99% vs. 83%), sulbactam (65% vs. 53%) y colistina (3% vs. 0%). Se observó sin embargo una reducción de la resistencia a

aminoglucósidos (particularmente gentamicina: 70% vs. 96%), tetraciclina (83% vs. 91%) y rifampicina (30% vs. 51%). Por tanto, se observó de forma significativa un incremento en la resistencia a los carbapenémicos, ceftazidima y sulbactam mientras que para los aminoglucósidos, tetraciclina y rifampicina las resistencias han disminuido. Colistina continuó siendo el antimicrobiano con mayor actividad.

Según este estudio, el 94% de los aislados de *A. baumannii* presentaron multiresistencia, de los cuales el 12% fueron aislados estrictamente MDR, el 86% aislados XDR y el 2% a aislados PDR.

4.5. EPIDEMIOLOGÍA

Desde la década de 1970, las infecciones por *A. baumannii* se han convertido en el problema nosocomial más común encontrado en climas templados. Su presencia, como ya se ha mencionado anteriormente, se debe a su capacidad de supervivencia en ambientes húmedos y secos, y al rápido desarrollo de resistencia frente a un amplio número de antimicrobianos (Towner, 2009).

La aparición de un brote a nivel hospitalario, promueve la revisión de los procedimientos de control de infección que implican el lavado de manos, el aislamiento del paciente, los cuidados en la ventilación mecánica y la limpieza general. Además es conveniente repasar los hábitos locales de prescripción de antibióticos (Vila 2011).

Una vez que *A. baumannii* se ha introducido en un hospital, se observan con relativa frecuencia brotes causados por varios clones. Posteriormente, se establece endemicidad de múltiples cepas, aunque solo una de ellas suele predominar en cada momento (Miyakis, 2011). Aun así, existen autores que afirman que una cepa endémica puede evolucionar y causar brotes localizados en pacientes vulnerables (Villegas, 2003).

La aparición de brotes monoclonales en diferentes hospitales sugiere la extensión de los mismos entre instituciones, presumiblemente en asociación con el movimiento de pacientes, del personal, o bien con la exposición a la contaminación de una fuente común como alimentos o equipos.

Los brotes causados por grupos de cepas de *A. baumannii* con alto grado de similitud pertenecen fundamentalmente a tres líneas clonales principales, que internacionalmente se han denominado I, II y III. El linaje predominante es el II, cuya expansión global se ha asociado con la producción de la carbapenemasa de clase D OXA-48 (DiNocera, 2011. Pérez, 2011).

Las herramientas moleculares epidemiológicas aplicadas pueden ayudar a conocer el origen de las infecciones causadas por *A. baumannii*, puesto que los brotes clonales típicos se asocian a un reservorio común (Villar, 2014, Pérez, 2011). Sin embargo, en la mayoría de los hospitales la situación es más compleja, ya que la epidemiología de este microorganismo suele ser difícil de describir debido a la aparición de clones de forma esporádica o de forma epidémica, con reservorios ambientales o de los propios pacientes colonizados. La coexistencia de ambas fuentes de la bacteria desafía la eficacia de las medidas de control, a la vez que supone un reto para la identificación genómica de *A. baumannii* multirresistente.

La tipificación molecular demuestra la expansión de algunos clones., La técnica más utilizada, al menos como técnica inicial, es la **Rep-PCR** (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR), que consiste en un tipo de PCR que genera amplificadores de diferentes tamaños a partir de *primers* diseñados para hibridar con secuencias repetidas extragénicas intercaladas a lo largo del genoma. Es una técnica con alto poder discriminatorio, útil en la evaluación de la transmisión de *A. baumannii* multirresistente dentro de áreas específicas en cortos periodos de tiempo (Villar, 2014).

La rápida detección de estas cepas panresistentes es crítica y beneficiosa en el cuidado de pacientes, ya que requieren un diagnóstico precoz, un tratamiento antibiótico optimizado y una prevención en la expansión de dichos aislados (Kempf, 2012).

El pronóstico de los pacientes infectados con esta bacteria suele presentar altas tasas de mortalidad, aunque no está claro si se atribuyen a la infección por *A. baumannii* multirresistente, o a la enfermedad concurrente que lo acompaña. Aun así, hemocultivos positivos y signos de sepsis generalmente presagian un mal pronóstico.

4.6. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Actualmente, tal y como han determinado la casi totalidad de los investigadores, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* son resistentes a aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenems. Éstos últimos históricamente, habían proporcionado la mejor respuesta en la terapia de infecciones causadas por *A.baumannii* multirresistente, pero la producción de carbapenemasas , enzimas capaces de hidrolizar el anillo beta-lactámico del carbapenem, principalmente las de clase D (OXA) y clase B (metalo beta-lactamasa), modificaron este hecho (Kempf, 2012).

El inhibidor de beta-lactamasas sulbactam tiene excelente actividad bactericida frente a cepas de *Acinetobacter*, está disponible sólo en combinación con ampicilina, y su eficacia es comparable a imipenem.

Los nuevos fármacos disponibles en el mercado: Doripenem, Ceftobiprol y Ceftarolina, no tienen actividad frente a *A.baumannii* (Vila, 2011).

Las alternativas usadas son:

1. **Tigeciclina**: derivado de minociclina, bacteriostático que se une a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria e inhibe la síntesis de proteínas. Usado en cepas XDR, aunque puede no ser apropiado para los casos de bacteriemia puesto que entra rápidamente en los tejidos después de la administración, manteniendo bajas concentraciones séricas. La experiencia clínica con tigeciclina es limitada, por lo que solo se usará cuando sean inefectivos otros antibióticos.
2. **Colistina**: polimixina E que actúa como detergente catiónico y altera la membrana de la célula bacteriana, aumentando la permeabilidad y provocando la muerte dependiendo de la concentración de antibiótico. Este fármaco se usa con éxito para el tratamiento de neumonías, bacteriemias y meningitis causadas por *A.baumannii*. Los datos disponibles sugieren que la colistina intravenosa sigue siendo una opción efectiva para los pacientes con infecciones por *Acinetobacter*- sensibles a colistina y resistentes a otros agentes. El efecto adverso más frecuente, la nefrotoxicidad, obliga a ajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal. Se puede administrar en forma nebulizada en casos de infección o colonización bronquial en el paciente intubado, en forma intratecal en caso de meningitis y en forma de lavados en infección de cavidades.

Debido a esta escasez de nuevos compuestos antimicrobianos se ha probado el tratamiento combinado como una estrategia para aumentar la probabilidad de cobertura antibiótica empírica, para disminuir el riesgo de resistencia emergente, y para mejorar los resultados en infecciones resistentes, pero no hay datos clínicos definitivos. Los antimicrobianos más frecuentemente usados formando diversas combinaciones son carbapenemas, ampicilina-sulbactam, rifampicina, amikacina y colistina (Manchanda, 2010).

En los casos en los que solo se detecta colonización, no se requiere tratamiento específico, solo precauciones apropiadas de aislamiento tras la identificación de *A.baumannii* multirresistente.

5. *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

5.1. RESEÑA HISTÓRICA Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de los Legionarios fue descrita por primera vez en el año 1977 cuando se reconoció a *Legionella pneumophila* como agente causal del brote de neumonía ocurrido durante la celebración de una convención de la Legión Americana en un hotel de Filadelfia en 1976. Se diagnosticaron 182 casos, de los cuales 147 necesitaron ingreso hospitalario, y 29 de ellos fueron mortales (Fraser, 1977; McDade, 1977). El Centro de Control de Enfermedades de EEUU (CDC) aisló una bacteria de las muestras pulmonares procedentes de autopsias de estos pacientes, a la que llamó *Legionella pneumophila*.

Posteriormente, se han descrito brotes de forma retrospectiva en otros países, incluido España. El primero registrado fue en un hotel de Benidorm en el año 1937 (Boyd, 1978). Después se detectaron otros más importantes en cuanto al número de afectados se refiere: 91 casos en Almuñécar en 1991 (BMS, 1991), 224 casos en Alcalá de Henares en 1997 (CNE, 1997), y 56 y 54 casos en Barcelona en 1988 y 2000, respectivamente (Caylá, 1989; Jousá, 2002). Aunque sin duda el brote más relevante en cuanto a magnitud y repercusión socioeconómica y sanitaria, fue el ocurrido en Murcia en el año 2001, en el que se confirmaron 449 casos y se mantuvieron en sospecha más de 800 (García-Fulgueiras, 2003).

A partir de la alarma suscitada ante este último brote, generado como consecuencia de la contaminación de torres de aire acondicionado de grandes edificios, el Estado creó una normativa básica de prevención y control de la legionelosis, publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo en el primer Real Decreto (RD) al respecto (RD. 909/2001 del 27 de julio). En él se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Posteriormente, se sustituyó por el RD.865/2003 del 4 de julio y actualmente se encuentra regulada como Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) individualizada a través del RD.69/2006 del 5 de octubre, donde además se enuncia la Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León.

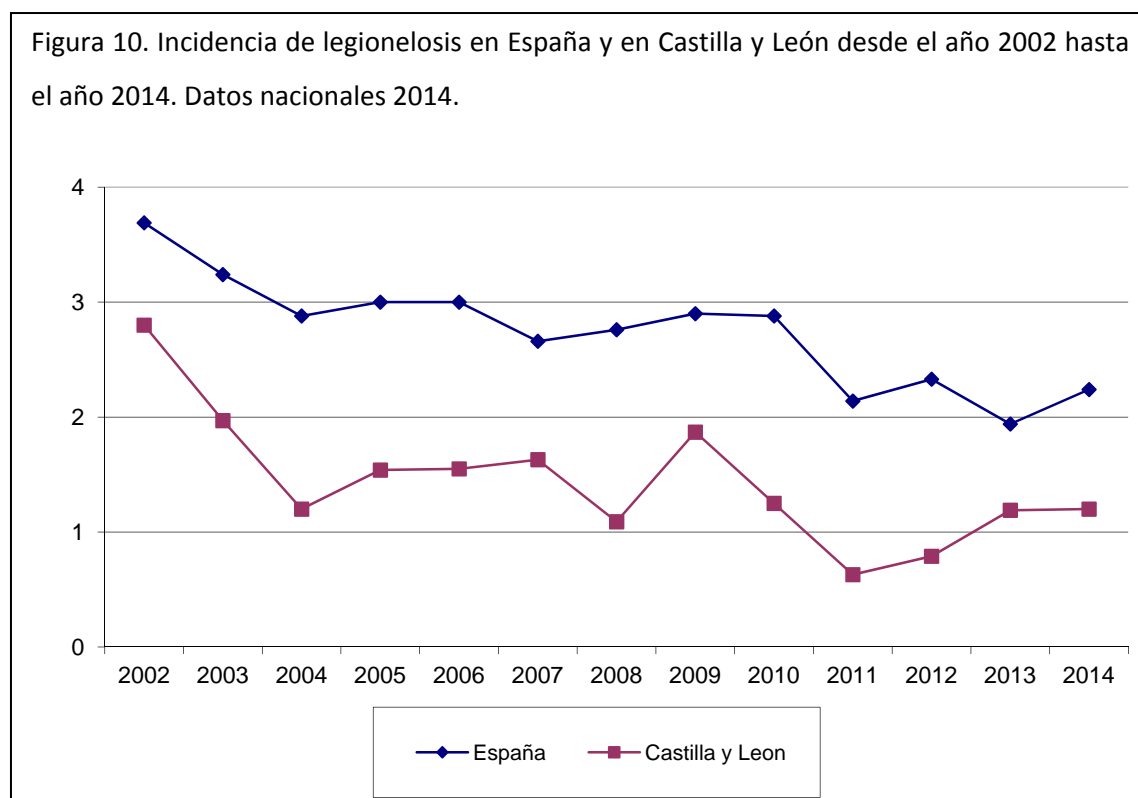
Los objetivos que se incluyen en esta red de vigilancia son:

- Detectar casos y brotes
- Identificar las fuentes de infección
- Conocer la incidencia y tendencias

- Detectar cambios en el patrón epidemiológico
- Adoptar medidas de control y prevención
- Obtener información para evaluar los programas de prevención.

Su finalidad es detectar la aparición, frecuencia, distribución y variación de este problema de salud y de sus factores determinantes, para contribuir a la aplicación de medidas de control de los sistemas sanitarios, ya que suponen un riesgo para la salud de los individuos y de la comunidad en su conjunto (Bocyl nº 197, RD. 69/2006, Consejería de Sanidad).

A pesar de la aplicación de este RD, la legionelosis sigue siendo un problema sanitario importante en nuestro país, presentando la mayor tasa de incidencia registrada en Europa. En el año 2014, se han notificado 30 casos de legionelosis en Castilla y León, lo que supone una tasa de 1.20 casos por 100.000 habitantes, ligeramente superior a la tasa registrada el año anterior (1.19 casos por 100.000 habitantes), aunque inferior a la tasa nacional (2.24 casos por 100.000 habitantes). Figura 10.



5.2. ETIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

La familia *Legionellaceae* comprende de más de 50 especies y 70 serogrupos. El 90% de las infecciones en seres humanos son causados por 16 serogrupos de *L. pneumophila*. En concreto, los más frecuentes son los serogrupos 1, 4 y 6, y de ellos, el serogrupo 1 es el responsable del 84% de los casos en todo el mundo (Newton, 2010).

Son bacilos finos Gram negativos, no formadores de esporas y no capsulados, que miden 0.3-0.9 μm de ancho y 2-20 μm de largo. En una tinción de Gram, se aprecian con dificultad ya que se colorean débilmente. Los requerimientos nutricionales de este microorganismo son complejos, por ello no crece en medios de cultivo habituales. El más usado es el agar tamponado con extracto de levadura, carbón y α -cetoglutarato o BCYE- α (Buffered Charcoal Yeast Extract).

El hábitat natural de *L. pneumophila* es el agua, siendo capaz de sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales: temperatura entre 0 y 63 $^{\circ}\text{C}$, pH entre 5 y 8.5, oxígeno disuelto entre 0.2-15 mg/l. Pueden tolerar concentraciones de cloro letales para otras bacterias, por lo que se pueden encontrar en sistemas de distribución de agua potable y ecosistemas artificiales como torres de refrigeración, cabezales de ducha, grifos, *spas*, ventiladores respiratorios, etc, donde el microorganismo puede desarrollarse y proliferar de forma significativa (Blyth,2009).

En la actualidad, se sabe que la colonización de los sistemas de distribución de agua por *L. pneumophila* depende de una combinación de varios factores: temperatura del agua, acúmulo de sedimento y microbiota comensal: algas, amebas o protozoos (Rivera, 2007).

5.3. PATOGENIA Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

La transmisión es aérea, por vía respiratoria, fundamentalmente por inhalación de aerosoles de agua contaminada. No se ha demostrado la transmisión de persona a persona. También se ha incluido la aspiración como mecanismo de transmisión, aunque no está totalmente esclarecida. Se cree que pueda deberse a la entrada de *L. pneumophila* en el pulmón a partir de una eventual colonización orofaríngea (Arvand, 2011).

La patogenia de *L. pneumophila* no se conoce con exactitud, aunque se cree que tiene una relación directa con su capacidad de invadir y multiplicarse en células eucariotas como fagocitos, células epiteliales y fibroblastos humanos. La adhesión de la bacteria a las células del hospedador es mediada por vellosidades, proteínas de choque térmico y proteínas de membrana (Hilbi, 2010).

El estudio a nivel molecular, a través de secuencias genómicas, nos llevan a factores de virulencia que permiten entender la evolución y emergencia de este microorganismo como patógeno respiratorio (Newton, 2010).

La inmunidad mediada por células es el principal mecanismo de defensa contra *Legionella* sp, aunque se detectan anticuerpos de tipo IgM e IgG a pocas semanas después de la infección (Jamilloux, 2012).

L. pneumophila es el agente causal de las legionelosis adquiridas tanto en la comunidad como a nivel hospitalario (Roig, 2003). La morbi-mortalidad varía en función del estado basal de la salud del paciente, de la prontitud del tratamiento específico y de la presentación de la enfermedad: esporádica, nosocomial o formando parte de un brote (Blyth, 2009).

Existen dos presentaciones clínicas resumidas en la tabla 3:

1. **Fiebre de Pontiac.** Consiste en un proceso gripal agudo de evolución limitada sin neumonía. Su periodo de incubación es corto (24-72 horas) y los síntomas más frecuentes son: malestar general, mialgias, fiebre y cefaleas. La recuperación completa se produce en una semana sin necesidad de tratamiento antibiótico.

Figura 11. Radiografía de tórax donde se observan infiltrados bilaterales. Fuente CDC.



2. **Enfermedad de los legionarios.** Se trata de una neumonía atípica que requiere un diagnóstico diferencial con las causadas por otros microorganismos como *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* y virus respiratorios. El periodo de incubación es de 10 días, y los

signos y síntomas en fase inicial van desde malestar, fatiga, anorexia y dolor precordial, hasta hemoptisis y tos relativamente no productiva con fiebre, que puede llegar a infiltrados pulmonares diseminados y fracaso multiorgánico. El hallazgo analítico más característico es una marcada hiponatremia, con niveles de sodio sistémico por debajo de 130mg/100ml. La radiología torácica puede mostrar infiltrados multilobulares (figura 11), aunque no existen datos radiológicos específicos que permitan diferenciarla de neumonías de otra etiología (Carratalá, 2010).

Tabla 3. Resumen de las presentaciones clínicas de legionelosis.

	Fiebre de Pontiac	Enfermedad Legionarios
Hallazgos clínicos	fiebre, malestar, mialgia	fiebre, tos, neumonía
Periodo de incubación	24-72 horas tras exposición	2-14 días tras exposición
Tasa de ataque	>90%	<5%
Aislamiento del microorganismo	nunca	posible
Resultado	rara hospitalización (mortalidad 0%)	frecuente hospitalización (mortalidad 5-30%)

La imposibilidad de distinguir entre enfermedad de los legionarios y otras formas de neumonía por hallazgos radiológicos y clínicos, hace esencial el uso de métodos microbiológicos para poder realizar un diagnóstico etiológico (Blyth,2009).

5.4. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

- **Cultivo.** El cultivo de secreciones respiratorias (esputo, aspirado transtraqueal, lavado broncoalveolar y liquido pleural) se realiza en el medio BCYE (Cho, 2012). Es un microorganismo de crecimiento lento (3-5 días), tras los cuales aparecen colonias típicas con aspecto de vidrio esmerilado (figura 12).

Figura 12. Crecimiento de *L.pneumophila* en medio BCYE.



Se sigue considerando como el método de referencia por su elevada especificidad (100%) (Luck, 2010), aunque su sensibilidad varía desde el 20% al 80% (Javed, 2010).

- **Antígeno urinario.** Consiste en la detección de un antígeno del lipopolisacárido (LPS) de la pared de *Legionella* en muestras de orina, mediante un ensayo inmunocromatográfico. La limitación de este método radica en que está disponible solamente para las cepas del serogrupo 1 con lo que, eventualmente, cuadros por otros serogrupos podrían quedar sin diagnóstico. A pesar de esto, existen autores que apoyan la idea de su aplicación en todos los pacientes con neumonía (Hollenbeck, 2011. Carratalá, 2010). Se obtiene un diagnóstico precoz con una alta fiabilidad (Especificidad: 100% y Sensibilidad: 80-90%) (Benito, 2003), y es recomendado por las guías IDSA de neumonías adquiridas en la comunidad (Mandell, 2007).
- **Pruebas serológicas.** El diagnóstico requiere el aumento de títulos de anticuerpos del orden de cuatro veces en suero de fase de convalecencia con respecto a suero en fase aguda, observable tras seis semanas de evolución. Algunos autores sugieren que un título único de 1/256 podría ser aceptable como criterio de diagnóstico definitivo (Benito, 2003). Los métodos más empleados son los de enzoinmunoanálisis y los de inmunofluorescencia indirecta (Javed, 2010).

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Se basa en la detección de ADN bacteriano, utilizando para ello fundamentalmente tres dianas: gen *mip*, gen 5S-ARNr y gen 16-ARNr. Se obtienen resultados rápidos y muestra ventajas con respecto al resto de los métodos diagnósticos especialmente cuando la muestra contiene microbiota abundante y diversa (Rafiee, 2014). Esta técnica no ha demostrado poseer mayor sensibilidad que el cultivo, aunque se aplica directamente sobre muestras respiratorias (Coscolla, 2009. Hilbi, 2010).

La comparación de los métodos de diagnóstico se recoge en la tabla 4.

A pesar de todas las técnicas disponibles, en la actualidad existen un número significativo de casos de legionelosis que no son detectados (Luck, 2010).

TEST	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Cultivo	20-80 %	100 %
Ag Urinario	70-100 %	100 %
Serología	80-90 %	>99 %
PCR	desconocida	desconocida

Tabla 4. Comparación de los métodos de detección de *L. pneumophila* en el laboratorio.

5.5. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

La legionelosis es un problema de salud pública significativo en muchos países (Carratalá, 2010), aunque la extensión de este problema no siempre es bien apreciada debido a que la enfermedad de los legionarios es infradiagnosticada (Arvand, 2011). Como ya hemos comentado anteriormente, la legionelosis puede ser nosocomial o adquirida en la comunidad, y atendiendo a su naturaleza se presenta como casos esporádicos o brotes.

El tratamiento en las formas leves incluye azitromicina o claitromicina, y en las formas graves con neumonía cavitada y/o paciente inmunodeprimido se utiliza una fluorquinilona (levofloxaciono o cirpofloxacino) asociada o no a azitromicina. La alternativa más frecuentemente usada es trimetoprim-sulfametoxazol asociado a un macrólido con rifapicina.

Factores que favorecen la legionelosis.

1. Pacientes de riesgo. Se consideran pacientes de riesgo aquellos que siguen una terapia de inmunosupresión, con neoplasias, quimioterapia citotóxica, diabetes mellitus insuficiencia renal terminal, uso continuado de corticoides, receptores de trasplante de órgano sólido, hábito tabáquico, enfermedad pulmonar crónica, ancianos y alcohólicos (Martson, 1994. Roig, 2003. Benito, 2003. Sabria, 2002. Hilbi, 2010. Viasus, 2013).
2. Instalaciones de riesgo. Los casos de legionelosis que se ha producido con mayor frecuencia hasta la fecha se han asociado a los sistemas de distribución de agua. En el ambiente hospitalario el reservorio principal es el sistema de agua caliente, aunque también se puede implicar el circuito de agua fría (Arvand, 2011). Otras instalaciones asociadas a la aparición de esta enfermedad son torres de refrigeración, centros termales, piscinas climatizadas, equipos de terapia respiratoria, humidificadores, fuentes ornamentales, sistemas de riego por aspersión y equipos de extinción de incendios. Por el contrario, no suponen ningún riesgo los aparatos de aire acondicionado domésticos ni de vehículos, ya que no producen aerosoles. Las causas más probables de la contaminación del agua incluyen el diseño de los sistemas de distribución de agua, su antigüedad y el material de fabricación. Se debe impedir el estancamiento o áreas sin salida de agua con el fin de prevenir la acumulación de microorganismos y nutrientes que estimule su crecimiento.

Otras variables relacionadas con la colonización por *L. pneumophila* son:

- La capacidad de esta bacteria para crecer dentro de amebas de vida libre. Llega a someterse a modificaciones fisiológicas y a convertirse en una cepa más resistente y más virulenta. Por eso es importante la elección del método desinfectante eficaz frente a amebas que actúan como reservorios y frente a *Legionella* sp que vivan dentro de ellas (Dupuy, 2011).
- La formación de *biofilms* o biopelículas. Son comunidades particularmente relevantes para *Legionella* sp, ya que este microorganismo es capaz de sobrevivir en un estado de vida libre con baja actividad metabólica, quedando protegida frente a biocidas, hipercloración e hipercalentamiento (Fields, 2002, Rivera, 2007. Marchesi, 2011).

El conocimiento por parte de los clínicos de la colonización de los sistemas de distribución de agua está bien establecido. La conciencia de la presencia de esta bacteria aumenta y mejora así el diagnóstico de una infección nosocomial, ya que se considera la aplicación de pruebas de laboratorio como la detección del antígeno en muestras de orina a todos los pacientes con neumonía (O'Neill, 2005. Rivera, 2007. Carratalá, 2010).

No existe un método ideal para garantizar la total desinfección, y se acepta que la eliminación de *Legionella* sp una vez que ha colonizado un suministro de agua es extremadamente difícil. Para garantizar la ausencia de este microorganismo, en primer lugar se debe evitar la entrada del mismo en el sistema, se debe garantizar la circulación continua del agua caliente para evitar en todo lo posible el estancamiento o áreas sin salida. Por último, se debe tener en cuenta que la termotolerancia de *L. pneumophila* obliga a mantener la temperatura de los circuitos de distribución de agua caliente lo suficientemente alta como para prevenir su crecimiento y multiplicación (superior a 55°C), aun asumiendo que cualquier aumento de la temperatura supone una disminución en la vida media de las cañerías, un aumento de deposiciones calcáreas y una disminución de la capacidad de desinfección del cloro debido a su evaporación (Peiro, 2005).

Los métodos básicos de desinfección se clasifican según su naturaleza (química y térmica), y según su lugar de aplicación (localizado o extendido a la totalidad del suministro).

Las técnicas químicas más usadas incluyen iones metálicos como cobre y plata, agentes oxidantes como compuestos halogenados de cloro, bromo, yodo, ozono, peróxido de hidrogeno, agentes no oxidantes como cetonas, aminas, guanidas, tiocianatos, tiocarbonatos, y por último luz ultravioleta. La desinfección térmica más efectiva es la que se realiza a una temperatura superior a 60°C (Kima, 2002).

Los métodos localizados se llevan a cabo mediante luz ultravioleta, ozonización y sistemas de calentamiento instantáneo. Los métodos aplicados en la totalidad del suministro de agua se realizan mediante hipercloración, ionización cobre-plata y erradicación térmica (Peiro, 2005).

Las medidas de emergencia que se pueden utilizar durante un brote incluyen sobrecalentamiento en combinación con hipercloración. Es un proceso laborioso y efectivo solo a corto plazo, ya que se produce la recolonización en semanas o meses (Sabria, 2002).

METODOLOGÍA DE AGRUPAMIENTO (*CLUSTERING*).

El agrupamiento o *clustering* es una de las tareas más habituales en minería de datos. Se trata, simplemente, de encontrar grupos dentro de un conjunto de individuos. El concepto de distancia juega un papel crucial en este agrupamiento, ya que es lo que permite que individuos próximos vayan a parar al mismo grupo (Hernández Orallo J, Ramírez Quintana MJ, Ferri Ramírez C. Introducción a la minería de datos. Pearson Education SA, Madrid, 2004). Se trata de una metodología clave en el inicio y en la génesis de los estudios de epidemiología, en especial de los de epidemiología molecular. Sin embargo, habitualmente utilizamos procedimientos o *softwares* ya descritos o elaborados, sin conocer exactamente sus fundamentos matemáticos.

Sin embargo, a la hora de intentar poner en marcha métodos de agrupamiento epidemiológicos con unos fundamentos completamente diferentes, es obligado un conocimiento de los fundamentos informáticos y estadísticos que se encuentran detrás de estos procedimientos.

A la hora de establecer estos agrupamientos jerárquicos, hay dos cuestiones fundamentales: la distancia entre cada uno de los valores observados, y la distancia entre los grupos una vez formados. Cada uno de estos dos extremos puede medirse de varias formas, de modo que métodos distintos de medida pueden generar agrupamientos muy diferentes. En nuestro caso, y puesto que disponemos ya de métodos moleculares que reflejan de forma muy fiel la proximidad biológica entre los microorganismos y sus grupos jerárquicos, se trata de determinar qué métodos de valoración de los datos proteómicos reflejan un agrupamiento similar, que permita suponer que el agrupamiento, ya sólo sobre la base de datos proteómicos, será fiable a la hora de valorar nuevos brotes epidémicos.

Existen varios métodos de medir la distancia entre dos puntos:

- Distancia euclídea. Si existen dos puntos $P = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ y $Q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ en un espacio de n dimensiones, la distancia euclídea se define como $\sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + \dots + (p_n - q_n)^2}$. Es la medida que más se asemeja al concepto coloquial de distancia.
- Distancia coseno (distancia en función del producto vectorial). En este caso, la distancia entre dos datos se define por el coseno del ángulo entre los vectores desde el origen a los datos correspondientes.

- Método de Minkowski. Si existen dos puntos $P = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ y $Q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ en un espacio de n dimensiones, la distancia de Minkowski se define como $\sqrt[a]{(p_1 - q_1)^a + (p_2 - q_2)^a + \dots + (p_n - q_n)^a}$. De hecho, el método euclídeo sería simplemente un caso especial de método Minkowski ($n=2$)
- Método Chebichev. Se trata también de un caso especial de distancia Minkowski ($a \rightarrow \infty$). Si existen dos puntos $P = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ y $Q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ en un espacio de n dimensiones, la distancia de Chebichev se define como $\max(|p_1 - q_1|, |p_2 - q_2|, \dots, |p_n - q_n|)$.
- Método de Spearman. En este caso, el valor absoluto de los datos (lo que equivaldría a la intensidad de los picos) no es importante; sólo se valora en función de su relación con la intensidad del resto de los picos. El método ordena los picos en función de su intensidad, y sólo se valora la correlación entre los mismos, pero no su intensidad absoluta.
- Correlación. La distancia de correlación de dos variables se obtiene dividiendo la covarianza de la distancia por el producto de las variaciones estándar de las distancias. Con este método, entre dos puntos que estén a la misma distancia euclídea de los integrantes de un cluster, siempre se considerará más próximo el que tenga un vector semejante a los de los integrantes del cluster que el que tenga un vector distinto.

Métodos de agrupamiento.

- *Agrupamiento simple (single linkage)*. Según este método la distancia entre dos grupos se asimila a la distancia entre los dos elementos más próximos de los mismos.
- *Agrupamiento completo (complete linkage)*. En este caso, la distancia entre dos grupos se asimila a la distancia entre los dos elementos más distantes de ambos grupos.
- *Agrupamiento promedio (average linkage)*. En este caso, la distancia entre dos grupos se calcula como la media de las distancias de cada elemento de un grupo con cada uno de los elementos del otro grupo.
- *Método de Ward*. Este método utiliza el criterio de la varianza mínima. Es el método más utilizado en datos de imagen como MALDI-Imaging, pero es menos utilizado para datos de MALDI-TOF convencionales.

-
- *Agrupamiento centroide (centroid linkage)*. Es un método sencillo y fácil de aplicar, lo que ha hecho que se convierta en el método de agrupamiento jerárquico más usado en biología. Asumiendo que $X_i \in R^p$, y que $d_{ij} = \|X_i - X_j\|_2$, y que \bar{X}_G y \bar{X}_H sean las medias grupales para los grupos G y H, $d_{\text{centroide}}(G,H) = \|\bar{X}_G - \bar{X}_H\|_2$. Este método tiene no obstante varios inconvenientes, ya que puede dar lugar a inversiones que dificulten significativamente la interpretación, una transformación monótona puede dar lugar a un agrupamiento completamente distinto, y no hay criterios definitivos de interpretación.
 - *Agrupamiento minimax (minimax linkage)*. Es un método descrito más recientemente que los anteriores. Definamos el radio de un grupo de puntos G en torno a X_i como $r(X_i, G) = \max_{j \in G} d_{ij}$. Entonces, $d_{\text{minimax}}(G, H) = \min_{i \in G \cup H} r(X_i, G \cup H)$. Este método evita buena parte de los inconvenientes referidos anteriormente para el agrupamiento centroide.

JUSTIFICACIÓN

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF se ha confirmado en los últimos años como un sistema de identificación altamente fiable para una gran variedad de microorganismos, tanto desde cultivo como incluso, en algunos casos, de muestra directa, basado en su capacidad para generar y comparar perfiles proteicos de los mismos. Algunos estudios han sugerido que ésta tecnología podría permitir una tipificación de los microorganismos equiparable a la que se consigue con las técnicas habitualmente usadas en epidemiología molecular. Sin embargo, los estudios disponibles son escasos, parciales, en algunos casos contradictorios y, desde luego, no definitivos.

Dada las características de sencillez, rapidez y reproducibilidad de la espectrometría de masas, y en concreto de la EM MALDI-TOF, es posible considerar la posibilidad de su aplicación en la detección de clones y/o líneas clonales entre aislados de la misma especie. Por lo general, la EM MALDI-TOF genera perfiles proteicos relativamente complejos, en los que sólo los picos más característicos y estables a nivel de género o de especie se utilizan para la identificación de los microorganismos. Cabe la posibilidad de que el resto de picos sean no obstante asimismo característicos a niveles inferiores al de especie, permitiendo así establecer una categorización de proximidad filogenética entre los aislados paralela a la que se establece ahora por métodos de epidemiología molecular (

Este trabajo pretende explorar las posibilidades de desarrollar una herramienta novedosa que, a partir de los datos generados por la EM MALDI-TOF, permita una clasificación filogenética de los microorganismos similar a los métodos de referencia establecidos en epidemiología molecular (PFGE, MLST, Rep-PCR...).

Si la hipótesis propuesta revela un nuevo método con una capacidad de discriminación y reproducibilidad similares a las de las técnicas de tipificación vigentes, aunque sólo sea para algunos grupos de microorganismos, nos encontraremos ante un avance importante en el análisis de las enfermedades infecciosas. Ha de tenerse en cuenta que las técnicas epidemiológicas actualmente vigentes son, con frecuencia, técnicas laboriosas, costosas, que requieren infraestructuras complejas y caras y personal con formación específica para su uso e interpretación. Por tanto, no están al alcance de numerosos centros, que dependen para la detección y seguimiento de hipotéticos brotes epidémicos de centros de referencia. La posibilidad de detectar y estudiar estos brotes con la misma tecnología que se usa ya en numerosos centros para la identificación de microorganismos, puede ampliar el número de

centros capaces de estudiar y seguir sus propios brotes, y mejorar notablemente el conocimiento que se tiene de los mismos.

Con este objetivo, el estudio se ha planteado sobre tres microorganismos muy distintos, pero que comparten el factor común de encontrarse entre los principales problemas infecciosos desde el punto de vista epidemiológico: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) y *Legionella pneumophila*.

El análisis de brotes epidémicos tanto nosocomiales como adquiridos en la comunidad mediante este procedimiento, permitiría la detección de casos, la observación de cambios en el patrón epidemiológico, la identificación de la fuente de infección y el conocimiento de la incidencia y tendencia; necesario para adoptar finalmente medidas de control y prevención.

El objetivo principal que se plantea, es la determinación de la capacidad de la EM MALDI-TOF para proporcionar de manera rápida, fiable y reproducible, la proximidad entre aislamientos clínicos de la misma especie, y establecer su utilidad en la investigación de brotes epidémicos. Este desarrollo de un ensayo simple, robusto, barato y automático para la discriminación entre cepas, puede suponer un progreso indudable en el control y manejo de las enfermedades infecciosas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CEPAS

- **SAMR**

Cepas. Se recogieron un total de 37 aislados de *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SAMR) a partir de muestras clínicas remitidas y procesadas de manera rutinaria en el Departamento de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) durante un período de tres meses.

Incubación y cultivo. Todos los aislados fueron recuperados en medios de cultivo comerciales de agar sangre de oveja al 5% y agar chocolate (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia), incubados en una atmósfera aeróbica a 35°C durante 24-48 horas.

Identificación bioquímica. Después de la tinción de Gram y determinación de la actividad de la catalasa y coagulasa, los aislados fueron identificados mediante el panel para Gram positivos de microdilución en caldo del sistema comercial semiautomatizado Wider (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además, todas las cepas de SAMR fueron aglutinadas con la técnica rápida de aglutinación con partículas de látex (Pastorex™ Staph-Plus, BioRad Francia) para confirmar su identificación. Se congelaron en viales de 1.5 ml de caldo nutritivo para una posterior recuperación de las mismas.

- ***Acinetobacter baumannii***

Cepas. Se recogieron 18 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* pertenecientes al menos a 2 brotes epidémicos identificados en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, de Murcia, y 11 aislamientos procedentes de un brote epidémico producido en el Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz.

Incubación y cultivo. Se emplearon medios no selectivos (agar sangre), que se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis.

Identificación bioquímica. La identificación se llevó a cabo en el laboratorio de origen mediante el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia), siendo su identificación corroborado posteriormente en el CAUSA mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, usando un espectrómetro AutoFlex III y el *software* Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania).

- ***Legionella pneumophila***

Cepas. Se estudiaron 38 aislamientos de *Legionella pneumophila* serotipo I, procedentes del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Incubación y cultivo. Se empleó el medio de cultivo selectivo BCYE- α . Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas en condiciones de aerobiosis con un 5% de CO₂.

Identificación bioquímica. La identificación se llevó a cabo siguiendo la metodología habitual, mediante aglutinación con antisueros específicos, y se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, usando un espectrómetro AutoFlex III y el *software* Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania).

2. ESTUDIO MOLECULAR

- **Extracción de material genético.**

Las cepas fueron recuperadas desde el vial de almacenamiento mediante su siembra en placas de agar sangre e incubadas en aerobiosis a 35°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una dilución de 1 de McFarland recogiendo aproximadamente $\frac{1}{4}$ de un asa de siembra de 10 μ l, en 1ml de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf de 1.5ml. Se calentaron al baño María (100°C) durante 10 minutos para permitir la rotura de la pared celular y posterior salida del contenido celular. Se centrifugó a 30.000g durante 1 minuto para eliminar todos los restos celulares, y se recogió el sobrenadante con el material genético, que se almacenó en un tubo Eppendorf de 100 μ l a -80°C.

- **Cuantificación de ADN.**

El estudio de cuantificación y pureza del material genético se llevó a cabo usando la capacidad de las bases nitrogenadas para absorber luz ultravioleta a una determinada longitud de onda (260nm), diferente para las proteínas (280nm). Se usó un espectrofotómetro óptico (BioMate3[®], Thermo Spectronic), y el valor de densidad óptica (DO) se expresó en μ g/ml.

- **MLST** (Multilocus Sequencing Typing).

La amplificación de siete genes codificantes de siete enzimas metabólicos de SAMR se realizó con un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf Ibérica). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes en concentraciones que se resumen en la tabla 1:

Taq ADN polimerasa (50 unidades/ml), nucleótidos o dNTPs (400µM cada uno), cloruro de Magnesio o MgCl₂ (3mM), incluidos en la mezcla comercial PCR MasterMix® 2X (Promega, USA).

Tabla 1. Concentraciones de los componentes en la PCR.

REACTIVOS	VOLUMENES DE REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
PCR Master Mix, 2X	25 µl	1 X
Primer directo (6,25 µM)	2 µl	0,25 µM
Primer inverso (6,25 µM)	2 µl	0,25 µM
ADN	2 µl	1 µM
H ₂ O	19 µl	<250 ng (50-100 µg/ml)

- ADN de cada cepa problema
- Iniciadores o primers descritos por Enghirt y col, 2000. (Tabla 2.)
- Agua hasta completar el volumen final de 50µl.

Tabla 2. Secuencias de primers usados en la PCR: carbamato kinasa (*arcC*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol kinasa (*glpF*), guanilato kinasa (*glpF*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), trifosfato isomerasa (*tpi*), acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqil*).

<i>GEN</i>	<u>Secuencia primer directo</u>	<u>Secuencia primer inverso</u>	<u>Tamaño amplificado</u>
<i>arcC</i>	5' TTGATTCACCAGCGCGTATC 3'	5' AGGTATCTGCTTCAATCAGCG 3'	456 pb
<i>aroE</i>	5' ATCGGAAATCCTATTTACATTC 3'	5' GGTGTTGTATTAATAACGATATC 3'	456 pb
<i>glpF</i>	5' CTAGGAAGTCAATCTTAATCC 3'	5' TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC 3'	465 pb
<i>gmK</i>	5' ATCGTTTTATCGGGACCATC 3'	5' TCATTAAC TACAACGTAATCGTA 3'	429 pb
<i>pta</i>	5' GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG 3'	5' GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA 3'	474 pb
<i>tpi</i>	5' TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA 3'	5' TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC 3'	402 pb
<i>yqil</i>	5' CAGGCATACAGGACACCTATTGGC 3'	5' CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC 3'	516 pb

Las condiciones de PCR para los 7 enzimas, salvo *tpi*, fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación que incluyen 1 minuto a 94°C para la desnaturalización, 1 minuto a 55°C para la hibridación o anillamiento, y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión. Termina con un último ciclo para la elongación final de 5 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

Para la enzima *tpi*, las condiciones fueron similares salvo la temperatura de hibridación, que fue de 50°C.

o Electroforesis en gel

Los productos obtenidos en la PCR se estudiaron por electroforesis en gel de agarosa para confirmar la amplificación de los genes. Esta técnica se basa en el movimiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico. Así pues, los ácidos nucleicos, cargados negativamente debido a su esqueleto de grupos fosfato, migrarán hacia el polo positivo o ánodo.

Para la preparación de agarosa al 2%, se disuelven 4g de agarosa (Promega, USA) en 200ml de buffer TBE al 0,5X (Promega, USA). La mezcla se calentó hasta que la agarosa se disolvió completamente. Para la visualización de los amplificados se añadió 10µl de bromuro de etidio, agente intercalante en el ADN y visible a la luz ultravioleta. La electroforesis se realizó en una

cubeta horizontal minicell®(BioRad) con 500ml de solución tampón TBE 0,5X . Cada pocillo del gel se cargó con 5µl de amplificado, 5µl de agua y 2µl de tampón de carga (Promega®, USA). El primer pocillo, se cargó con un patrón de peso molecular de 100-1200 pb (Promega®, USA). El campo eléctrico aplicado fue de 82 voltios a voltaje constante durante 90 minutos. El gel se analizó en un transiluminador y los datos se procesaron con el analizador de imágenes Scian Image (TPI®, Madrid).

Cuantificación de ADN

En primer lugar se llevó a cabo la limpieza del material genético mediante un preparado comercial que hidroliza restos de ADN utilizando enzimas hidrolíticas, exonucleasas y fosfatasa alcalina: EXOSAP-IT® (BioRad, USA). Para ello, fue necesario añadir 2µl de este compuesto a 5µl de amplificado e incubar en el termociclador a 37°C durante 15 minutos y a continuación a 80°C durante 15 minutos. El amplificado original se diluyó en agua (1/40), y se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro óptico (BioMate3®, Thermo Spectronic). El valor se expresó en µg/ml.

○ **Secuenciación de ADN**

El material genético limpio se diluyó en agua según su concentración anterior hasta obtener una concentración final de 20ng/µl. De esta dilución se tomaron 5 µl y se añadió 3 µl de primer diluido (1/10).

La secuencia del ADN problema se descifró con un secuenciador automático 377 DNA Sequencer ABI PRISM (Applied Biosystems, USA), que se basa en el marcaje fluorocrómico diferencial de los *primers* y posterior separación electroforética de los amplificados. Se separan cuatro alícuotas del primer directo, y cada alícuota se marca con fluorocromo: fluoresceína, NBD y rojo de Tejas o tetrametilrodamina. En cada alícuota se realiza una PCR a la que se le añade un único didesoxinucleótido (ddNTP), en una proporción tal que se detiene la polimerización en las distintas posiciones en las que se halla incorporado el ddNTP. Las cuatro reacciones de PCR se mezclan y se realiza una electroforesis en una sola calle. El resultado es el gel de poliacrilamida con un continuo de bandas de distintos colores según el ddNTP en el que se ha detenido la reacción. Por último, una célula fotométrica analiza las señales de color y se transmiten los datos a un ordenador. La secuencia en forma de cromatograma, se interpreta y estudia por el programa informático “**chromas.exe**”, que desvela la lectura de la secuencia. Posteriormente, se consultó el programa BLAST, perteneciente al NCBI y disponible de forma libre en Internet

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en GeneBank (NCBI, NIH, USA) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

Se identificaron los cambios de los nucleótidos, las inserciones y las deleciones existentes en todas las cepas a estudio. Para cada gen se obtuvo un alelo, y un perfil alélico que confirma el tipo secuencial correspondiente en cada cepa (Sequence Type, ST).

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii* y *Legionella pneumophila*, se llevó a cabo el análisis de ADN mediante macrorrestricción y electroforesis en campo pulsante (PFGE). Esta técnica consta de varias fases.

1. Extracción de ADN cromosómico bacteriano.

Se realiza una suspensión de microorganismos a partir de un medio sólido. Para los cultivos se emplearon medios no selectivos, como agar sangre para *A.baumannii*, y medio selectivo BCYE (Bufer Charcoal Yeast Extract), para *L .pneumophila* Se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis para *A.baumannii* y a 37°C, en atmósfera aerobia con un 5% de CO₂, durante 72 horas, para *L. pneumophila*. La suspensión preparada con la ayuda de un asa de siembra, se homogenizó mediante vórtex y se centrifugó a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos. El *pellet* seco se resuspendió y se midió el inóculo mediante espectrofotometría para su posterior estandarización. A continuación, se mezclaron volúmenes iguales del inóculo y agarosa fundida, que se dejó solidificar en un molde adecuado. Así, se inmovilizó un número de células bacterianas similar para cada cepa a estudiar.

Los bloques se sumergieron en solución de lisis durante 5 horas a 37 °C, de tal manera que permita la rotura de las células.

Una vez que las células fueron lisadas, se lavaron con tampón TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) durante 30 minutos. Esta operación se repitió 4 o 5 veces, para conseguir arrastrar fuera del bloque de agarosa los restos celulares. Posteriormente, los bloques se conservaron, hasta su utilización, en tampón TE a 4°C.

2. Fragmentación del ADN cromosómico.

Se seleccionaron enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, según la bibliografía científica publicada, donde se tiene en cuenta la longitud y la secuencia del lugar de restricción de la enzima. Para preparar la solución de restricción, se añadieron 40ml de tampón de restricción con albúmina bovina sérica (BSA) a la enzima. Para *A. baumannii* se empleó la enzima **SmaI** (10unidades/reacción) con 0.8µg (200µg/ml), y para *L. pneumophila*, **sfiI** durante 8-10 horas a 50°C. Se transfirieron 40µl de esta solución y se incubaron 18 horas en el termobloque a 25°C.

3. Separación de los fragmentos obtenidos mediante PFGE.

Para conseguir dividir el cromosoma bacteriano en patrones sencillos de 10-20 bandas, se utilizó esta técnica especial de electroforesis. Se preparó el gel de agarosa al 1% (1 gramo de agarosa, 5ml de tampón TBE 10X y 95ml de agua bidestilada).

Se dejó enfriar durante 30 minutos y se vertió cuidadosamente al bloque preparado en el apartado anterior. Cuando la agarosa solidificó, se añadió en la cubeta de electroforesis 2l de tampón TBE 0,5X. A continuación se puso en marcha el sistema controlando los pulsos y la temperatura de electroforesis; en el caso de **SmaI**, los pulsos son de 0,5 a 15 segundos a 14°C, manteniendo el ángulo de reorientación en 120°. Para **Apal**, las condiciones varían: 1-30s a 14°C.

Una vez finalizado los ciclos de PFGE, se extrajo el gel y se sumergió en una solución de bromuro de etidio, para su posterior visualización en el transiluminador de luz ultravioleta.

3. ESTUDIO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

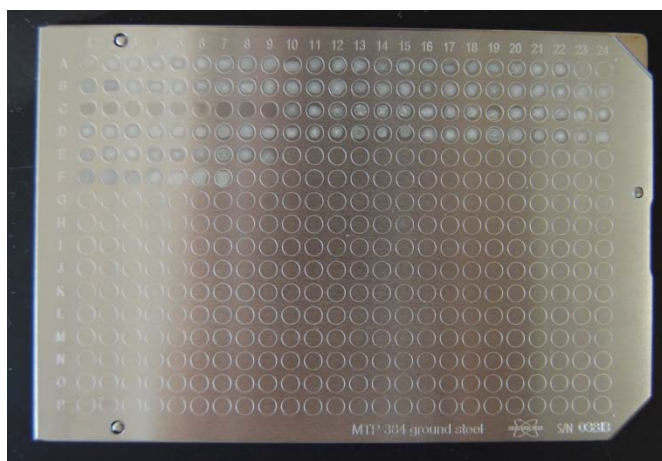
□ Extracción de proteínas

Las cepas fueron descongeladas de los viales de almacenamiento y sembradas en medio sólido. Para SAMR se usó agar sangre incubado en aerobiosis a 37°C durante 24 horas. De igual forma se sembró para *A. baumannii*. Para *L.pneumophila* se usó BCYE incubado en atmósfera aerobia en un 5% de CO₂ durante 72 horas. a 37°C.

Una vez crecidas, se procedió a la ejecución del protocolo de extracción de proteínas proporcionado por el fabricante. Se transfieren mediante asa de siembra entre cinco y diez colonias de la placa a un tubo de extracción Eppendorf. Se mezcla con 300 µl de agua grado HPLC libre de ARNasa. A continuación se añaden 900 µl de etanol absoluto a la suspensión de células y posteriormente se centrifuga a velocidad máxima (13.000rpm) durante dos minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron al *pellet* seco 50 µl de ácido fórmico al 70%. Se resuspendió el sedimento mediante vortex y se agregaron 50 µl de acetonitrilo. Tras centrifugar

de nuevo a velocidad máxima durante dos minutos, se recogieron aproximadamente 20-30 µl de sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf. De éste, se transfirió 1,2 µl de muestra a ocho pocillos de la placa metálica *ground steel*[®] y se dejó secar al aire a temperatura

Figura 1. Placa metálica *ground Steel*[®].



ambiente. Cada pocillo de la placa se cubrió con 1,2 µl de solución matriz y se dejó de nuevo secar a temperatura ambiente.

La matriz es una solución saturada de ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y ácido hidroxifluoroacético al 2,5%.

□ Separación de especies moleculares según su relación masa/carga

Las medidas se realizaron en un espectrómetro de masas **MALDI-TOF-TOF Autoflex III®** (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) equipado con un haz de láser de 200 Hz. Los espectros se grabaron en el modo lineal positivo a la frecuencia de láser de 200Hz dentro de un rango de masa desde 2.000 a 20.000 Da. Los parámetros que se fijaron para el espectrómetro fueron los siguientes:

- voltaje IS1 fue de 20 Kv
- voltaje de IS2 fue de 18.6 Kv
- voltaje de la lente fue de 6 Kv
- tiempo de retardo de extracción fue de 40ns

El protocolo de trabajo de MALDI Biotyper proporciona la acumulación de 500 (10 X 50) disparos de láser en diferentes lugares de la muestra.

Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla de calibrantes estándar compuesto por un extracto de *E.coli* DH5 α y proteínas adicionales (ARNasa A y Mioglobina) para cubrir un intervalo de 4 a 17 KDa.

Las masas de calibración fueron como sigue: RL36, 4364.3Da; RS22, 5095.8Da; RL34, 5380.4 Da; RL33meth,6254.4 Da; RL32, 6315 Da; RL29,7273.5 Da; RS19, 10299.1 Da; RNasaA, 13682.2 Da; Mioglobina, 16952.5 Da.

□ Análisis de espectros y valoración de datos

Para el análisis automatizado de los datos, los espectros obtenidos se procesaron con el programa **MALDI Biotyper 3.0®** (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) mediante configuración predeterminada.

El *software* realiza la normalización, alisado, extracción de línea base y reducción de picos, creando una lista de los picos más significativos del espectro (valores m/z a una intensidad dada, con el umbral a un mínimo del 1% del pico más alto y un máximo de 100 picos). Para la identificación de bacterias desconocidas, cada pico de la lista generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 3.0 usando un algoritmo de comparación integrada en el *software*.

Una vez generado el espectro e importado al programa, el proceso total de identificación se realiza automáticamente sin intervención alguna del usuario.

La identificaciones de MALDI-TOF se clasifican de la siguiente forma:

1. **Fiable a nivel de especie.** Cuando la puntuación en la comparación entre el perfil del microorganismo problema y la base de datos es mayor o igual a 2.
2. **Fiable a nivel de género.** Cuando la puntuación es mayor o igual a 1.7 y menor a 2.
3. **No fiable.** Cuando la puntuación es menor de 1.7, considerando se este caso como identificación fallida.

ELABORACIÓN DEL DENDROGRAMA MEDIANTE MALDI-TOF.

Para la construcción de un árbol epidemiológico o **dendrograma**, se registraron 24 espectros de cada aislado bacteriano (tres medidas independientes en los ocho pocillos de cada cepa).

La estimación manual y visual del espectro de masas se llevó a cabo mediante el programa **Flex Analysis 3.0®** (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Este programa realiza el alisado y extracción de la línea de base, comprobando la existencia de líneas planas, ruido de fondo o espectros sueltos con picos extremadamente diferentes del resto de espectros registrados, teniendo en cuenta que la desviación de la masa dentro del espectro establecido debería ser menos de 500ppm.

Finalmente, se seleccionaron 20 espectros, eliminando los espectros cuestionables de la colección. Para crear la lista de picos de espectros se usó el programa BioTyper® como se ha descrito anteriormente.

El *software* permite diferentes modalidades de análisis de los datos obtenidos. El estudio se llevó a cabo, en todos, los casos, mediante todas las modalidades permitidas por el *software*, con el objeto de analizar si alguna modalidad de análisis permite obtener resultados similares a los obtenidos mediante epidemiología molecular.

RESULTADOS

Acinetobacter baumannii.

- De entre los aislamientos procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, las 10 primeras cepas enviadas (20, 101, 103, 105, 106, 107, 108, 110, 111, 113) correspondían a aislamientos clínicos procedentes de diferentes muestras clínicas que fueron recogidas de diferentes pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) durante los meses de Enero, Febrero, Marzo y Abril de 2007. Todas se clasificaron como pertenecientes al mismo clon tanto mediante PFGE-RFLP (Clon A) y REP-PCR (Patrón 1) y presentaron idéntico perfil de sensibilidad antibiótica.
- Las siguientes 8 cepas estudiadas (300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 309) corresponden a aislamientos clínicos procedentes de diferentes muestras clínicas que fueron recogidas de diferentes pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) durante los meses de Enero, Febrero, Marzo y Abril de 2009. Todas se clasificaron como pertenecientes al mismo clon mediante PFGE-RFLP (Clon B) y REP-PCR (Patrón 2) y presentaron idéntico perfil de sensibilidad antibiótica.
- Se incluyeron asimismo en el estudio 11 aislamientos procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz, que habían sido agrupadas mediante PFGE en dos clones distintos, que agrupaban por una parte a los aislamientos 981305, 981346 y 981415, y por otra parte a los aislamientos 981593, 877307, 877292, 975184, 877306, 852702, 979841 y 972453.

La jerarquización obtenida en relación con los dos grupos de aislamientos, con orígenes geográficos distintos, aparece recogida en las figuras 1 a 35. Como puede observarse en estas figuras la jerarquización clonal es idéntica, en la mayor parte de los casos, a la determinada mediante PFGE en ambos grupos. La jerarquización se mantiene de forma muy estable, con independencia del método de medida de distancia entre puntos y de jerarquización clonal utilizados, si bien algunos métodos, fundamentalmente los basados en medida euclidiana de las distancias, parecen tener una capacidad de discriminación algo mayor, y otros subagrupan algunas cepas de forma distinta.

Figura 1. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento promediado (*average*).

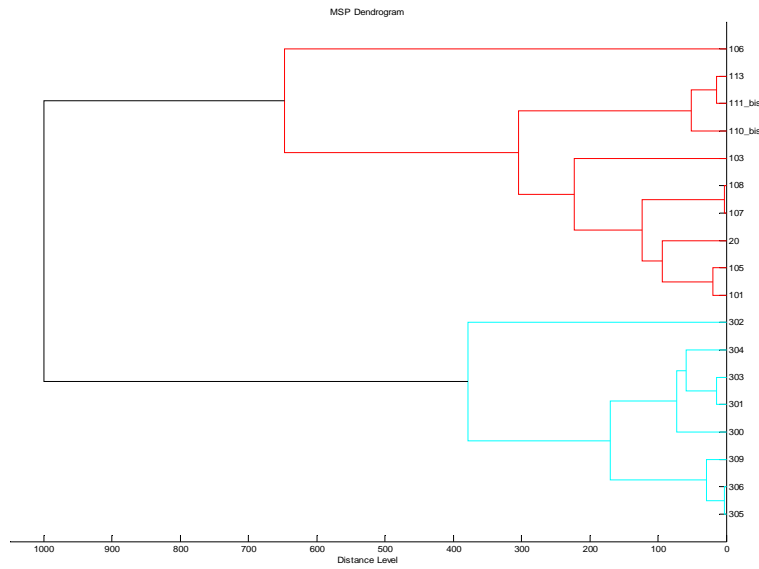


Figura 2. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento completo.

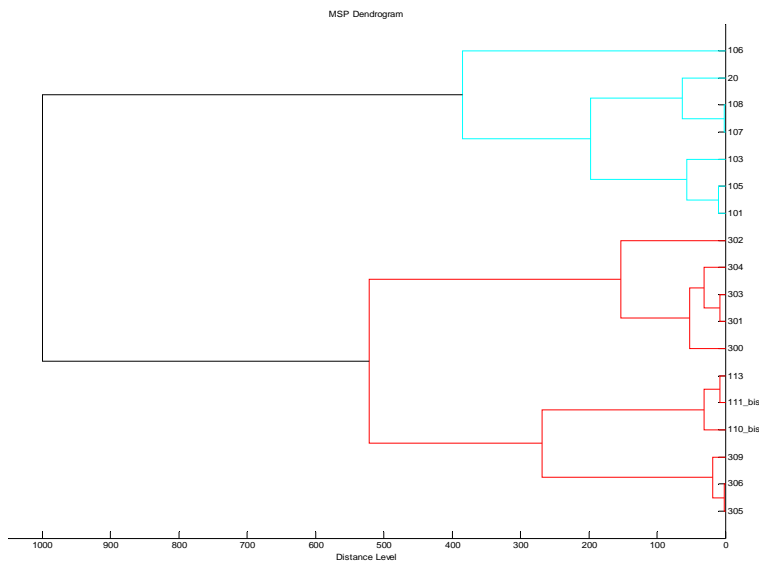


Figura 3. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento simple.

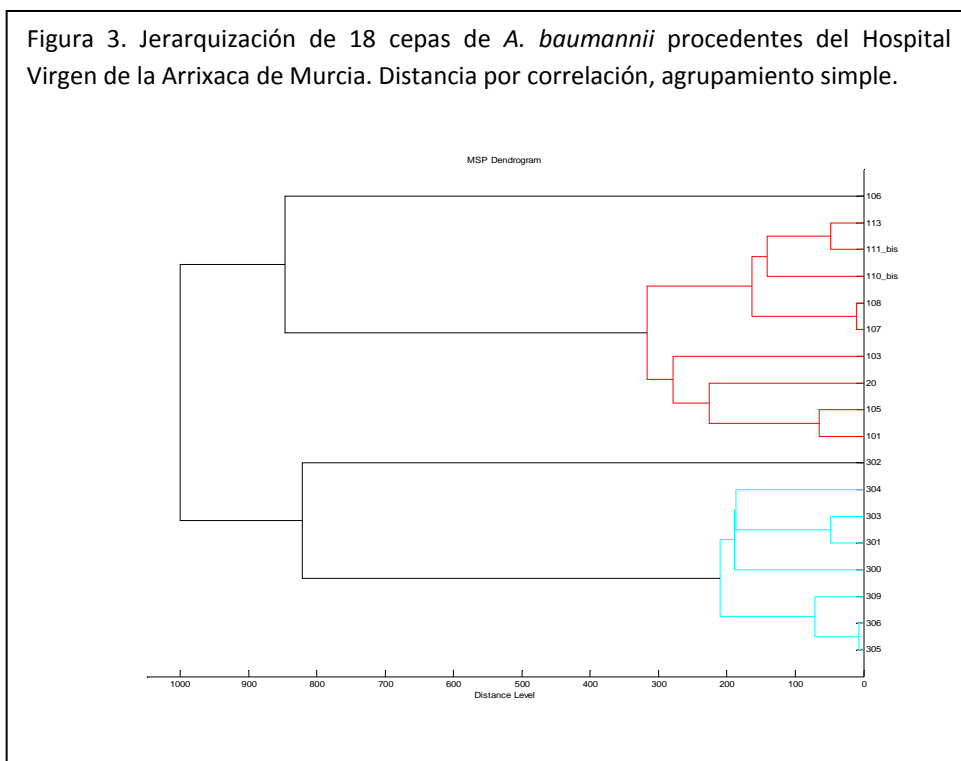


Figura 4. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento centroide.

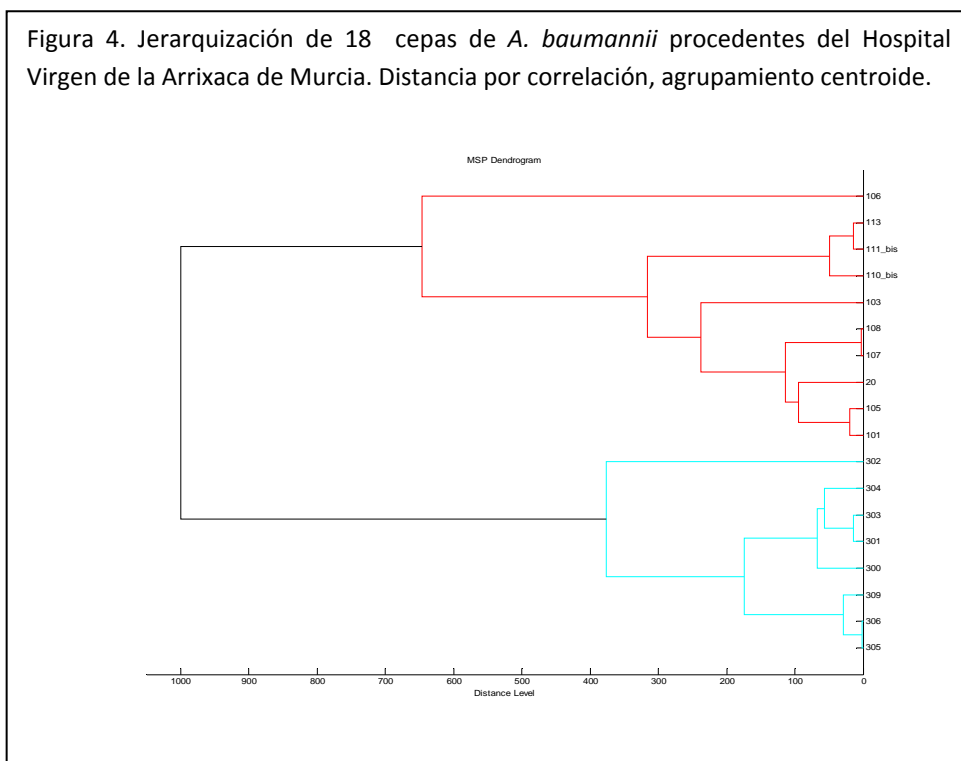


Figura 5. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento por mediana.

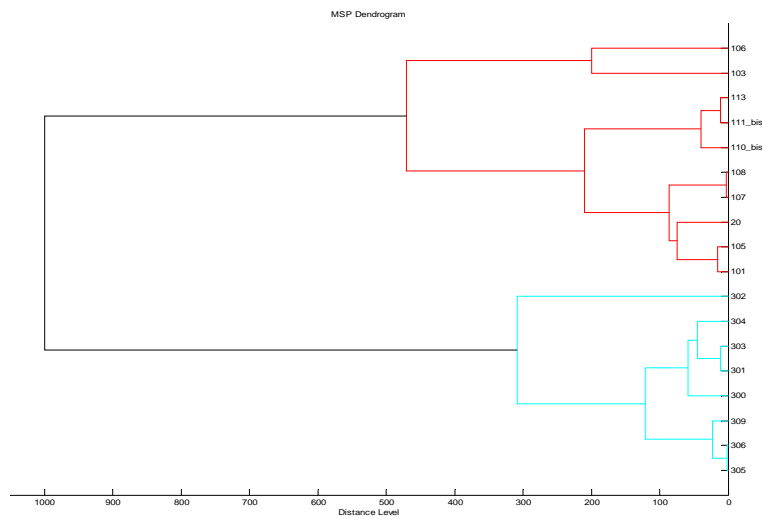


Figura 6. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento por método de Ward.

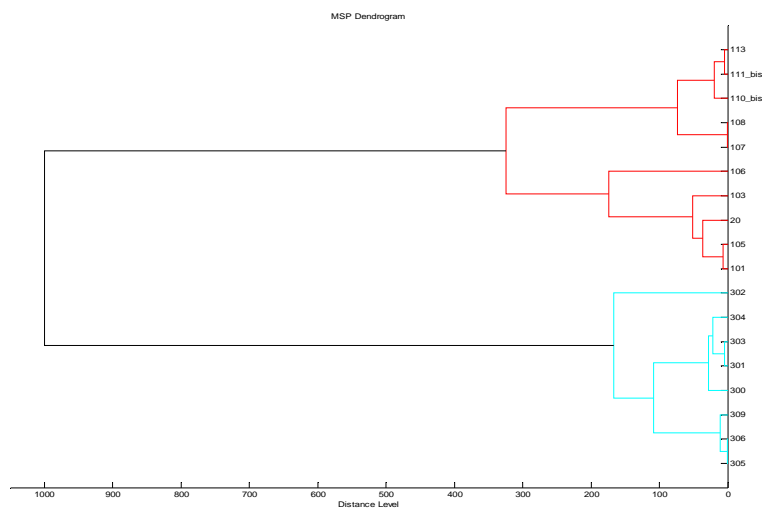


Figura 7. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por correlación, agrupamiento *weighted*.

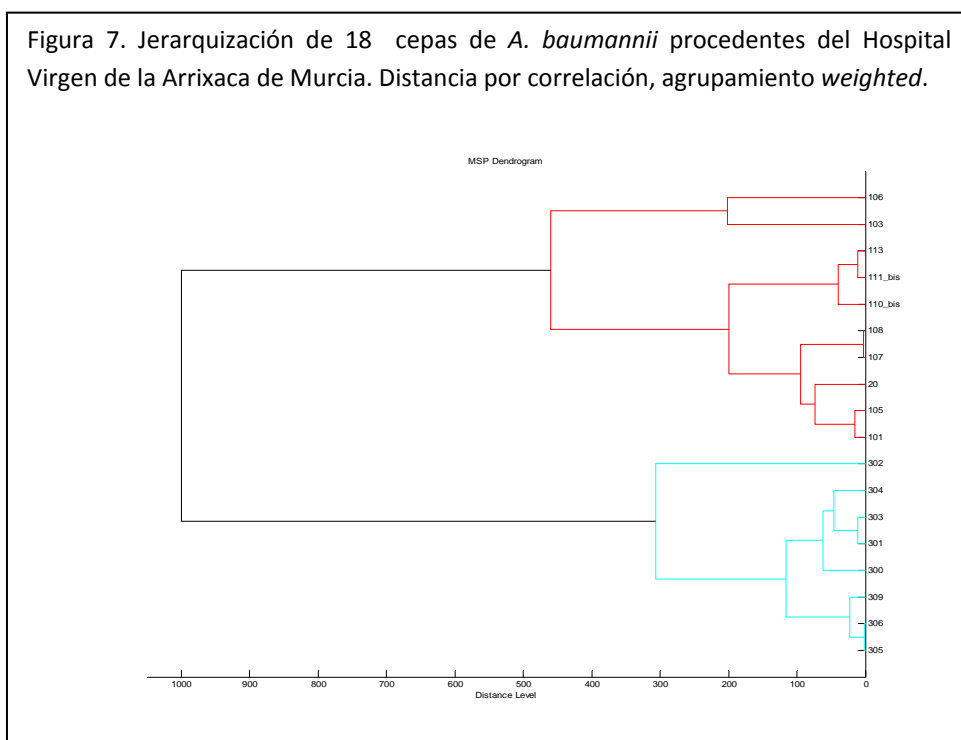


Figura 8. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento centroide.

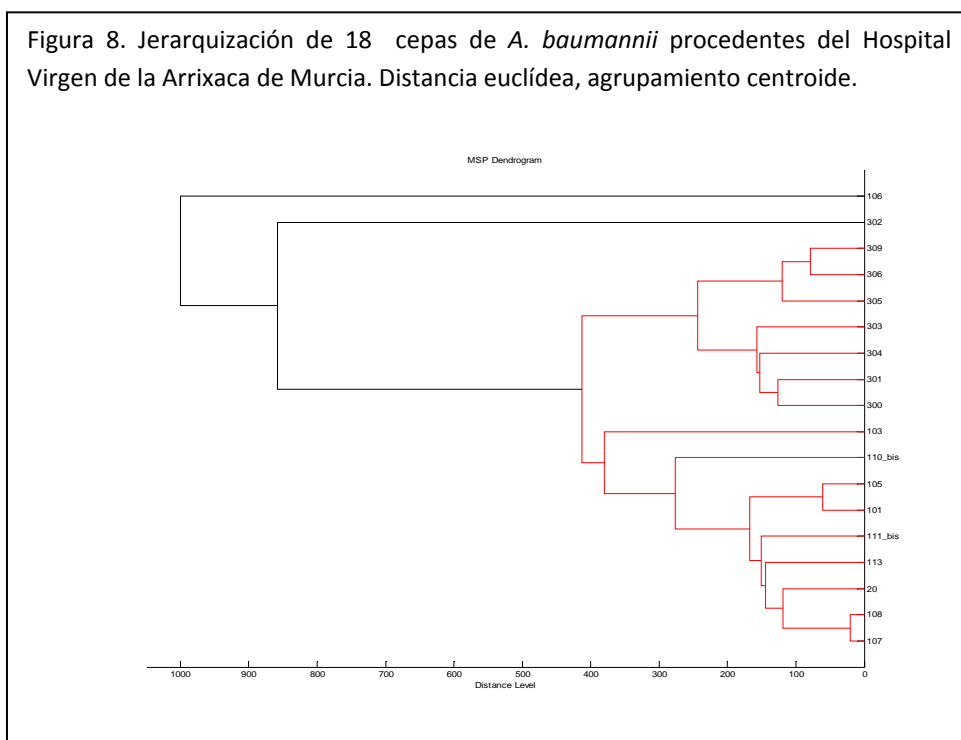


Figura 9. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento por el método de Ward.

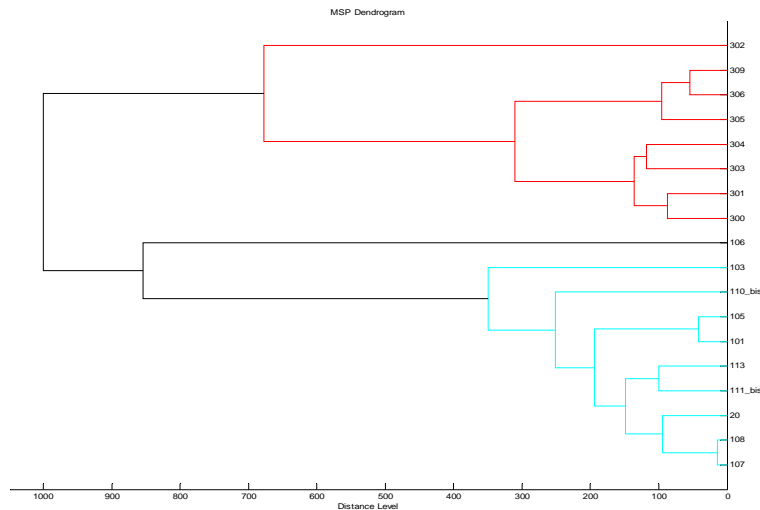


Figura 10. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento promediado (*average*).

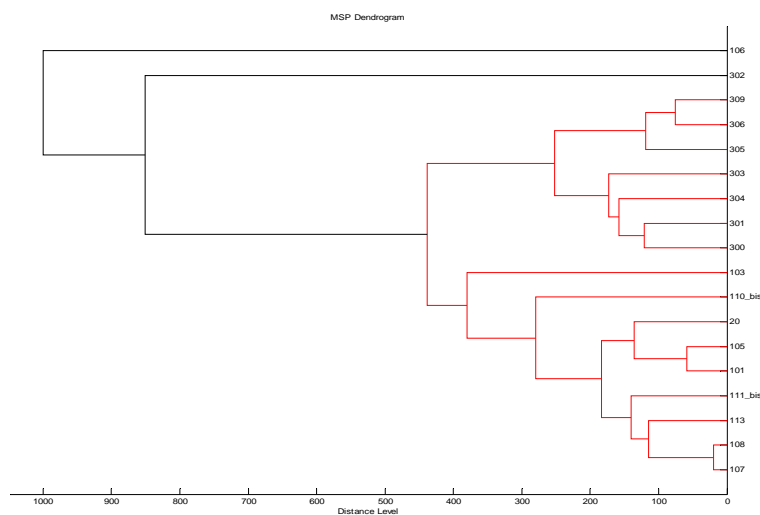


Figura 11. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento por mediana.

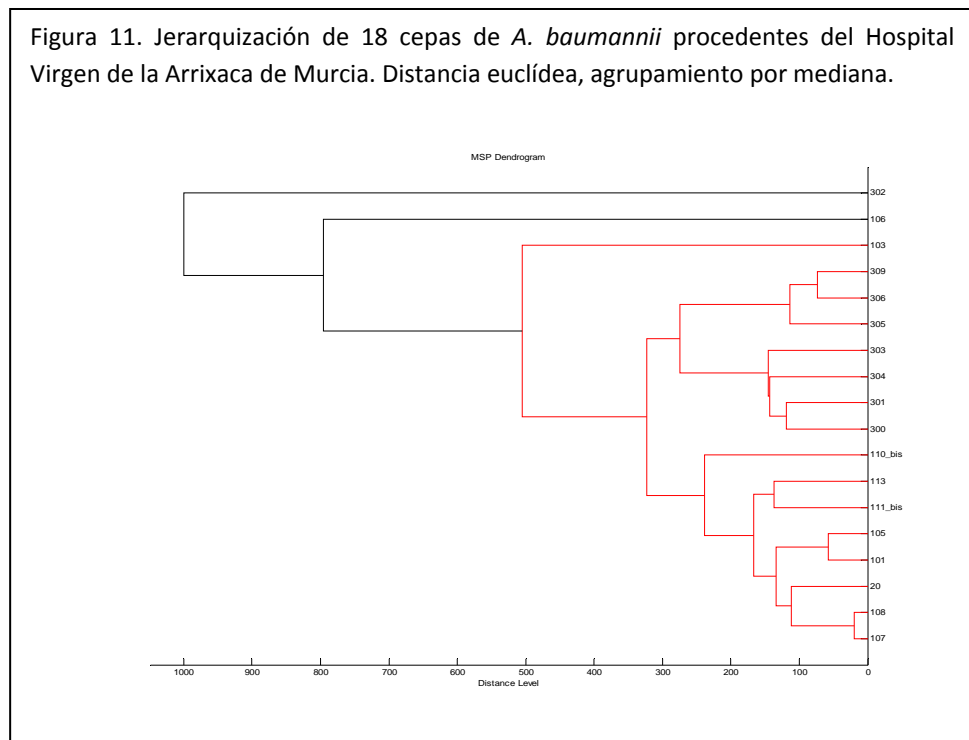


Figura 12. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento simple.

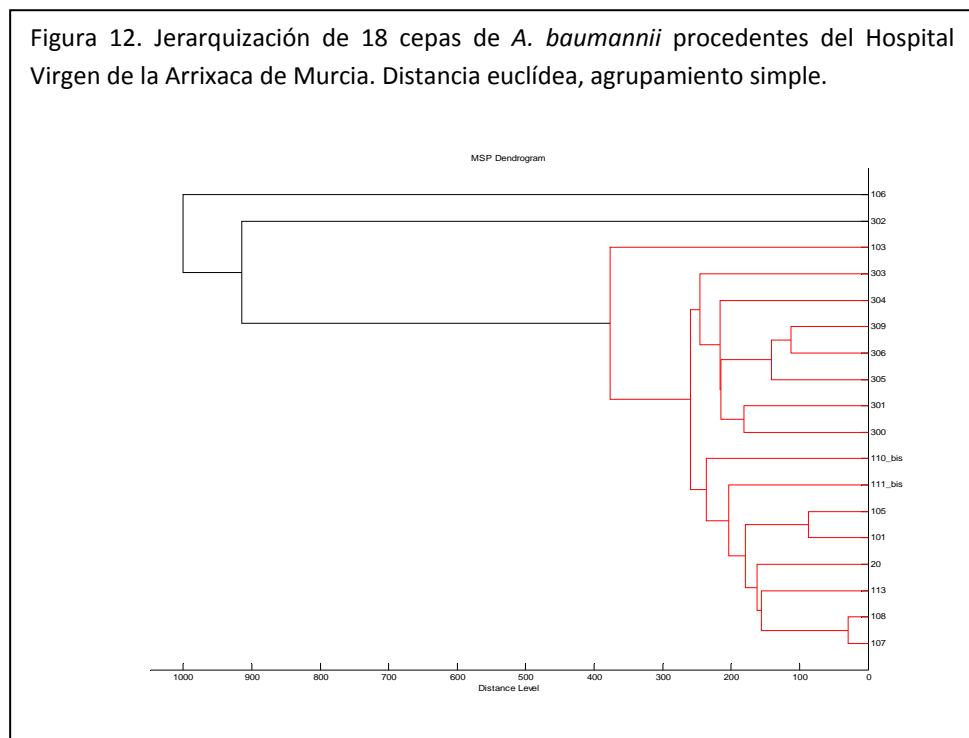


Figura 13. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia euclídea, agrupamiento *weighted*.

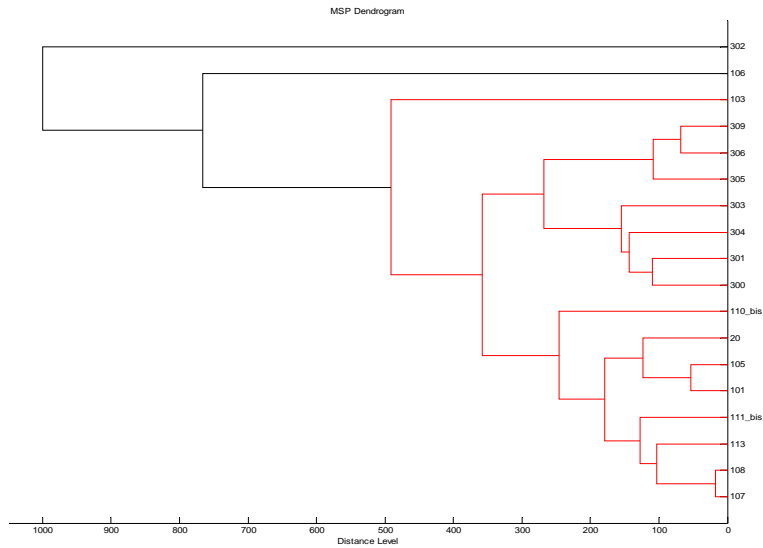


Figura 14. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento promediado (*average*).

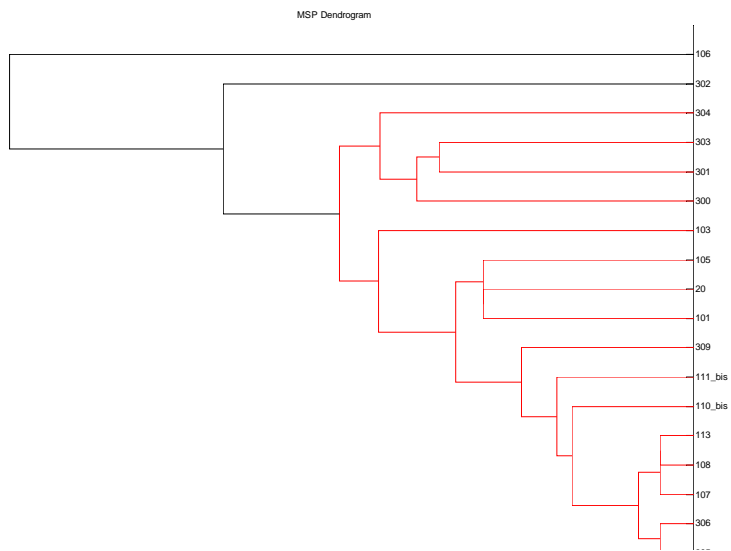


Figura 15. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento centroide.

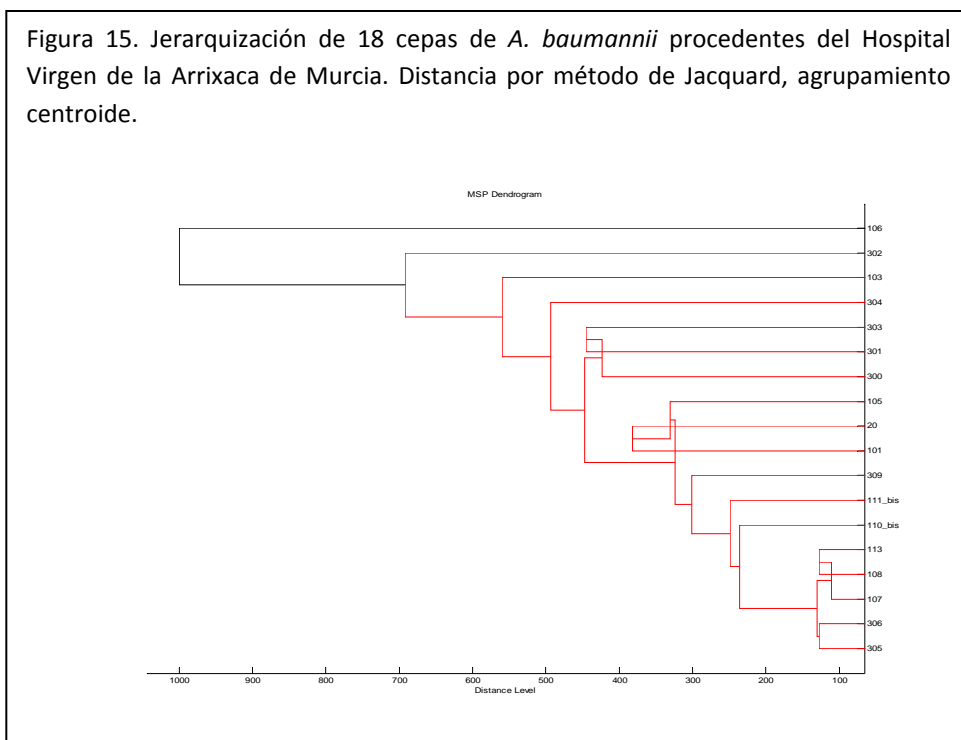


Figura 16. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento completo.

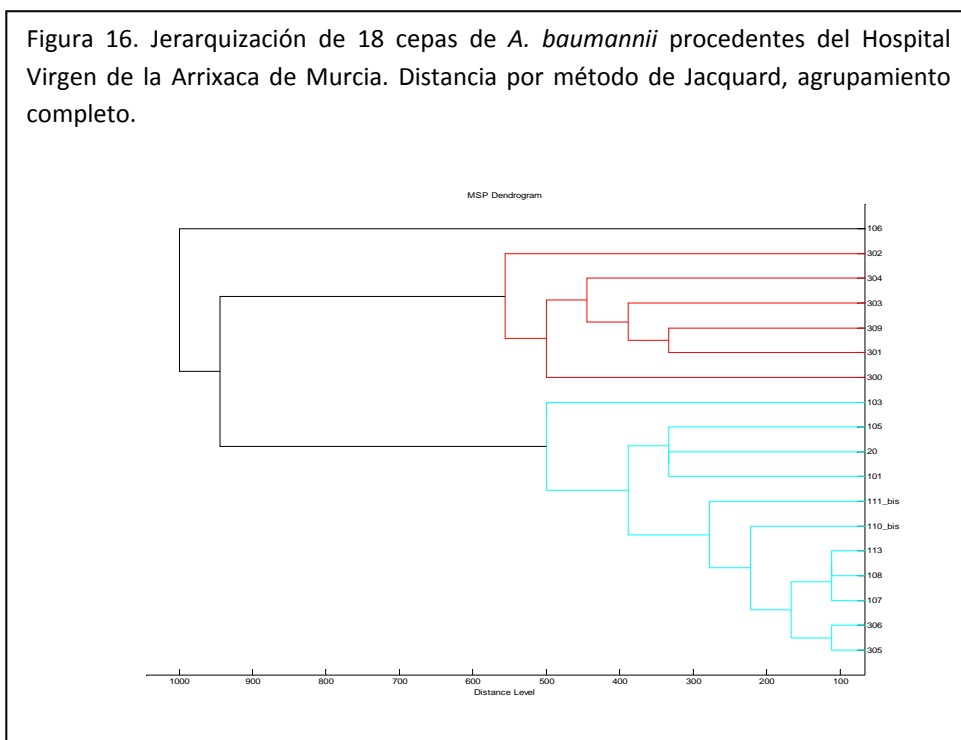


Figura 17. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento por mediana.

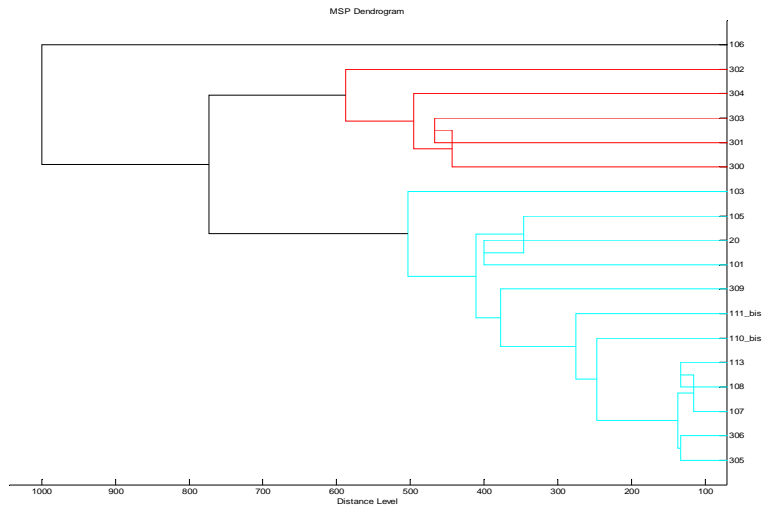


Figura 18. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento por método de Ward.

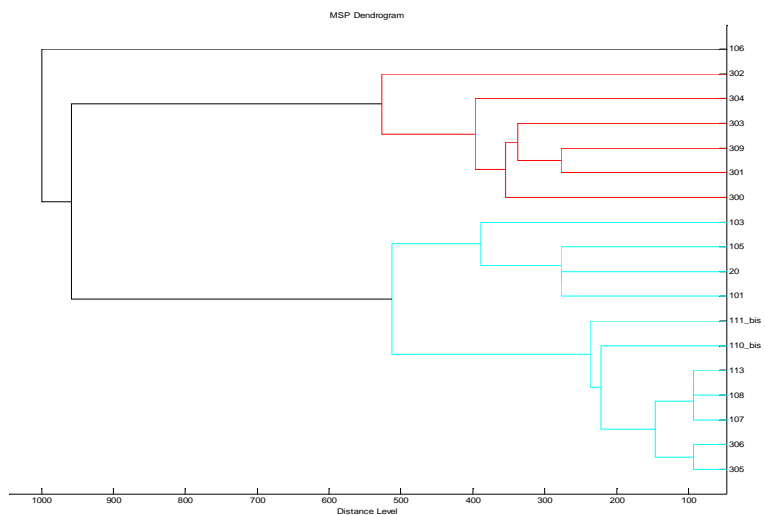


Figura 19. Jerarquización de 18 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento *weighted*.

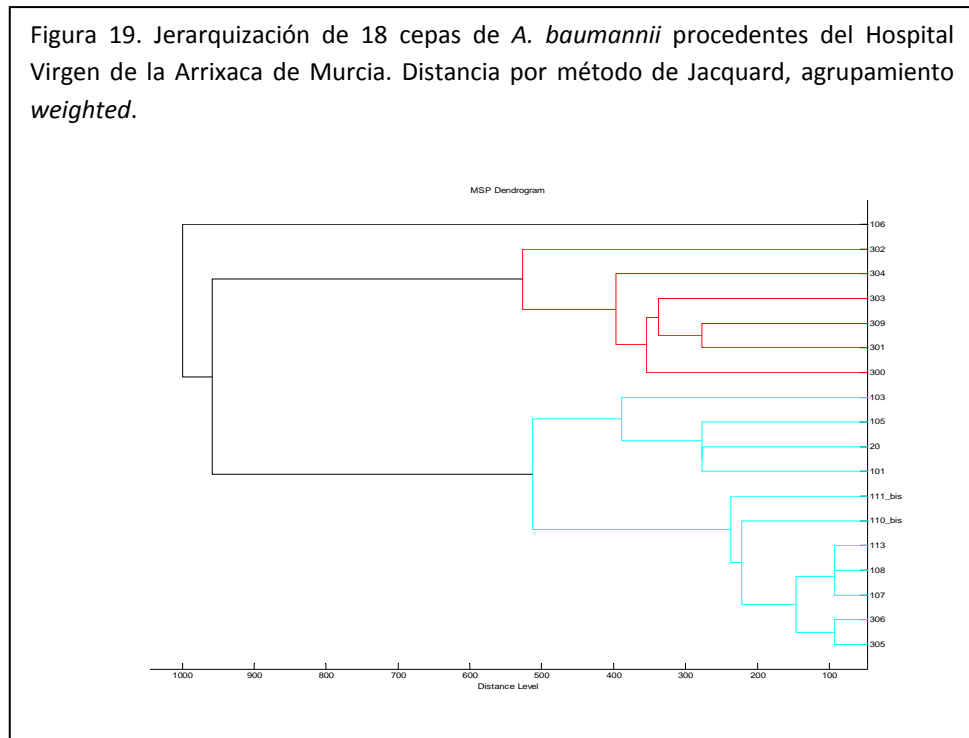


Figura 20. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento simple.

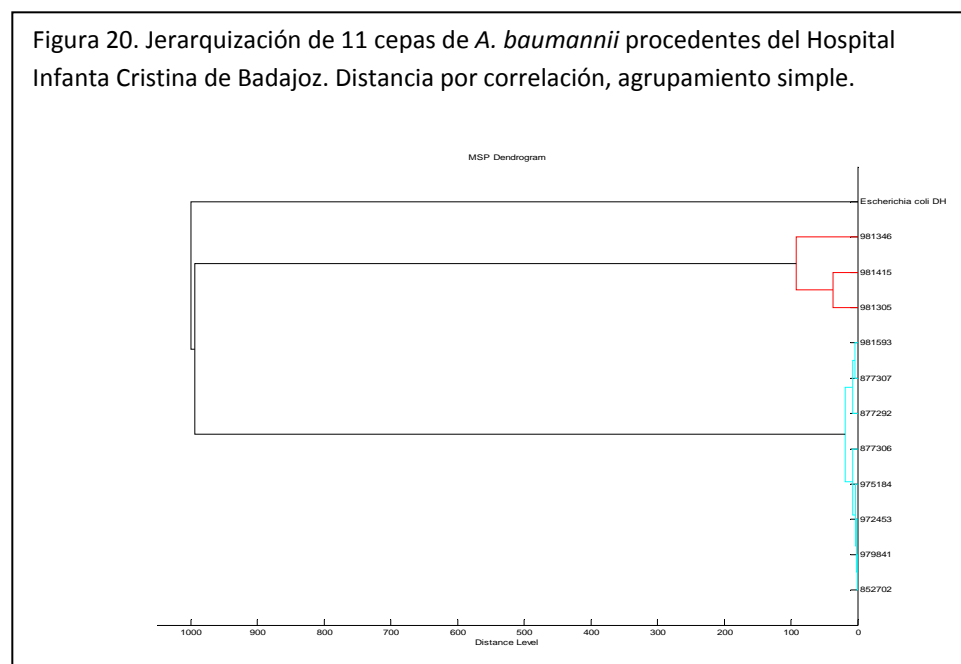


Figura 21. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento centroide.

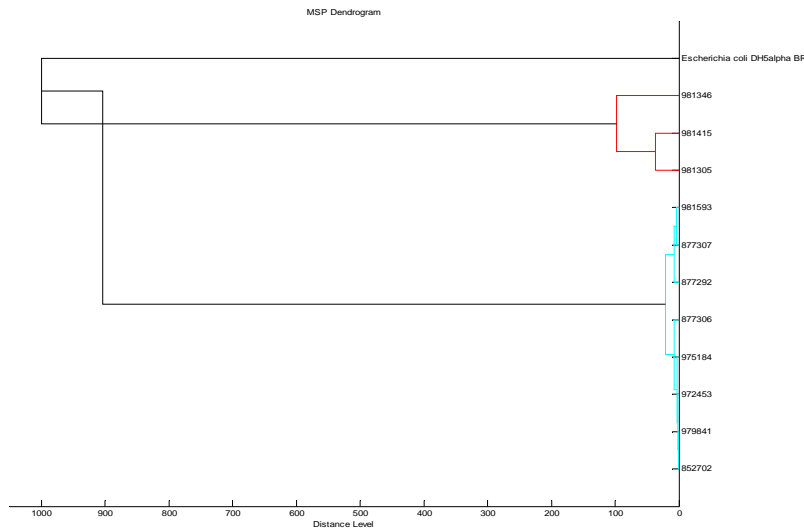


Figura 22. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento promedio (average).

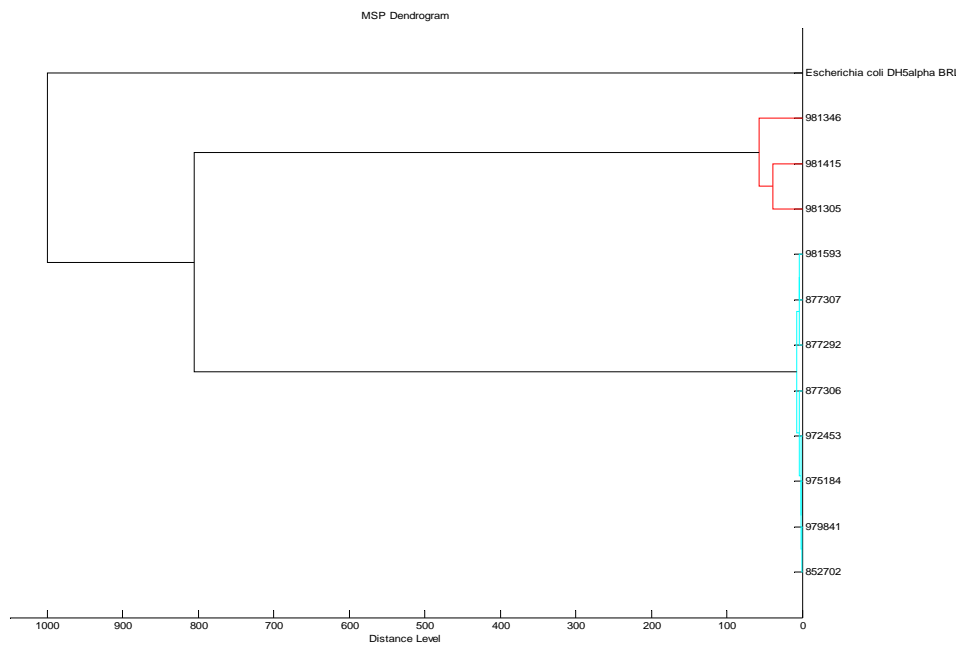


Figura 23. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento por mediana.

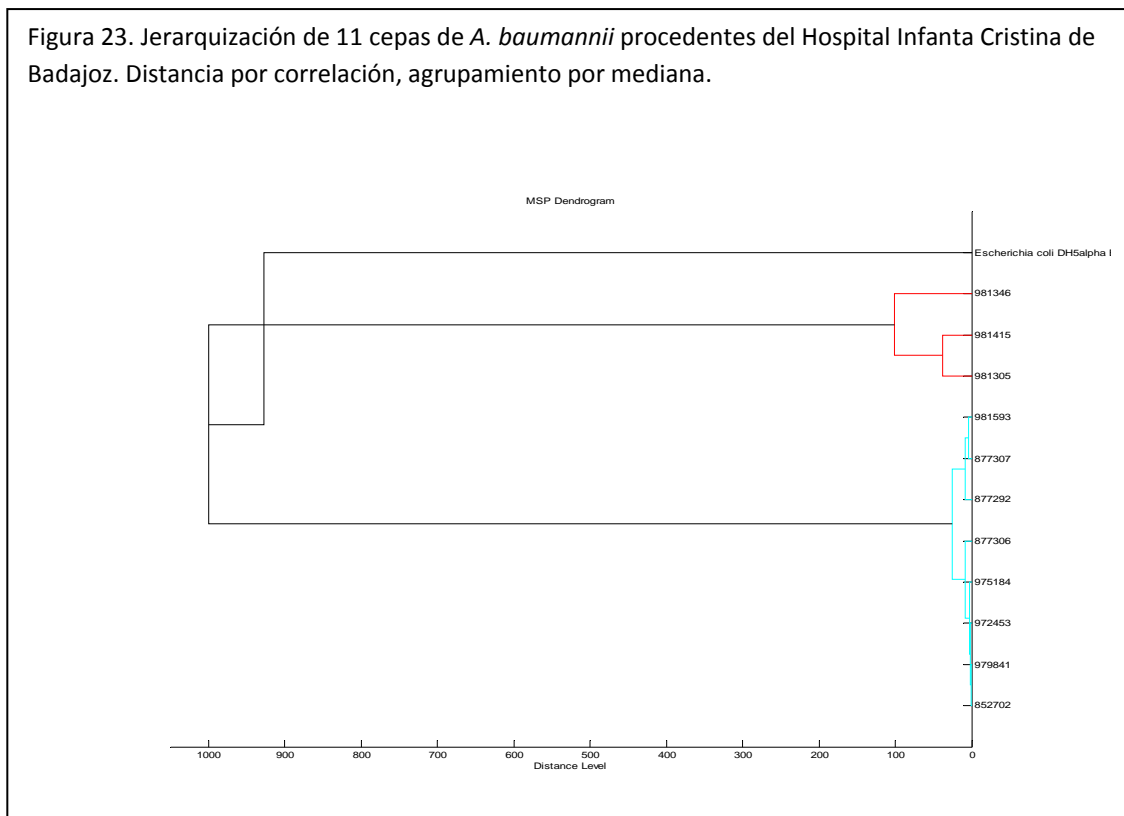


Figura 24. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento por método de Ward.

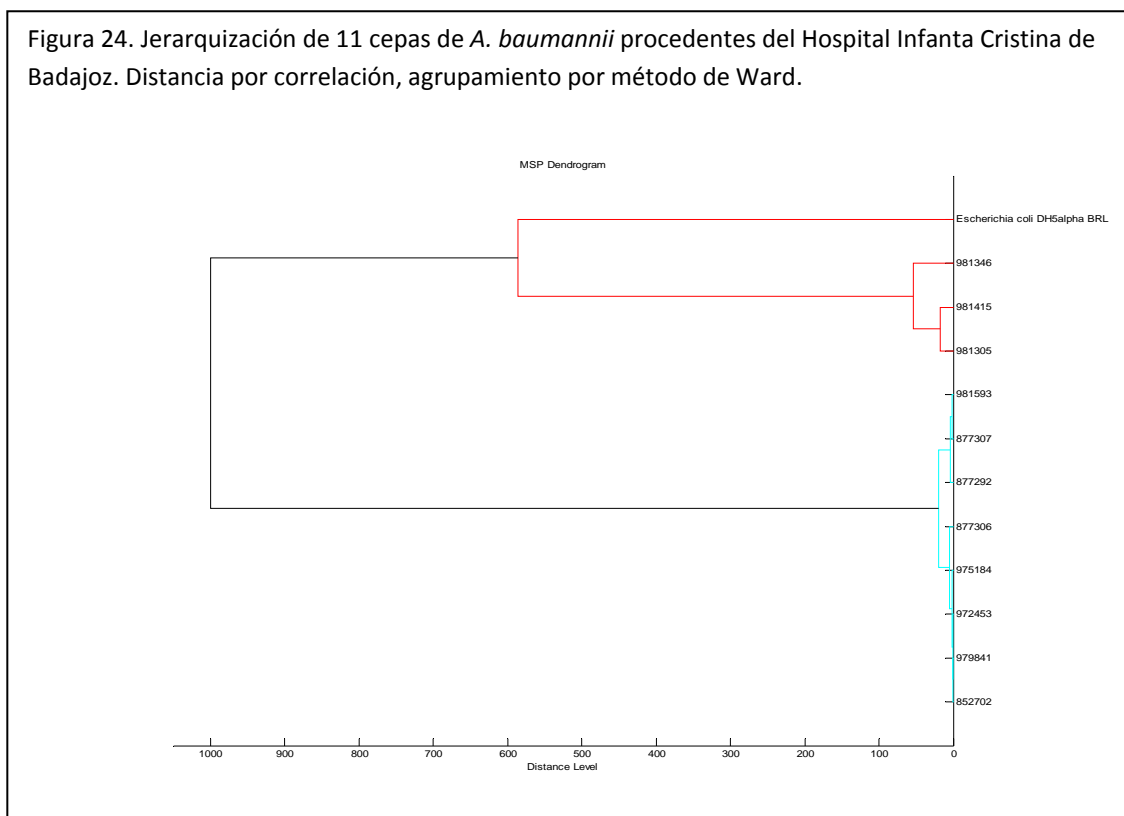


Figura 25. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por correlación, agrupamiento *weighted*.

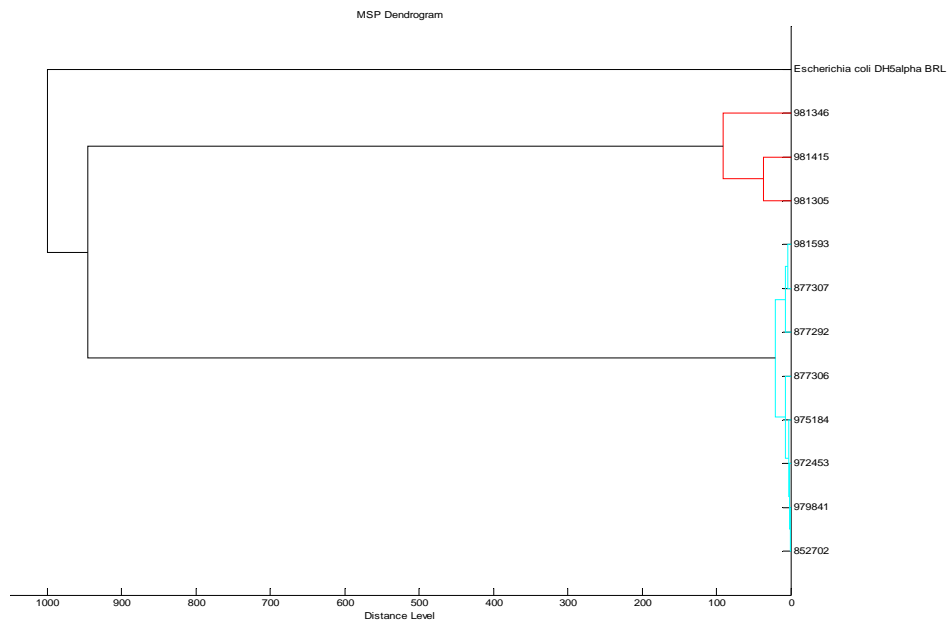


Figura 26. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento centroide.

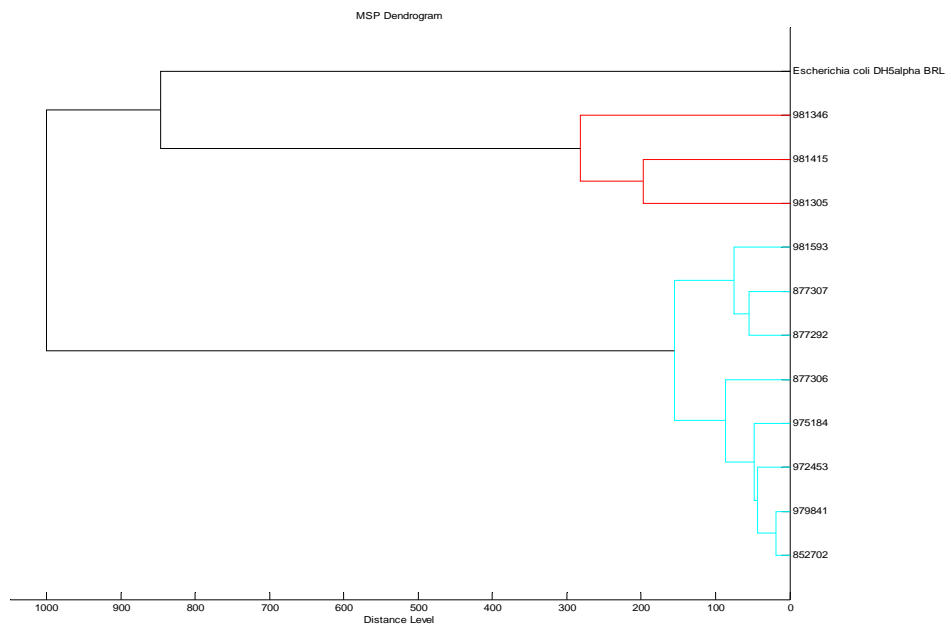


Figura 27. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento promedio (*average*).

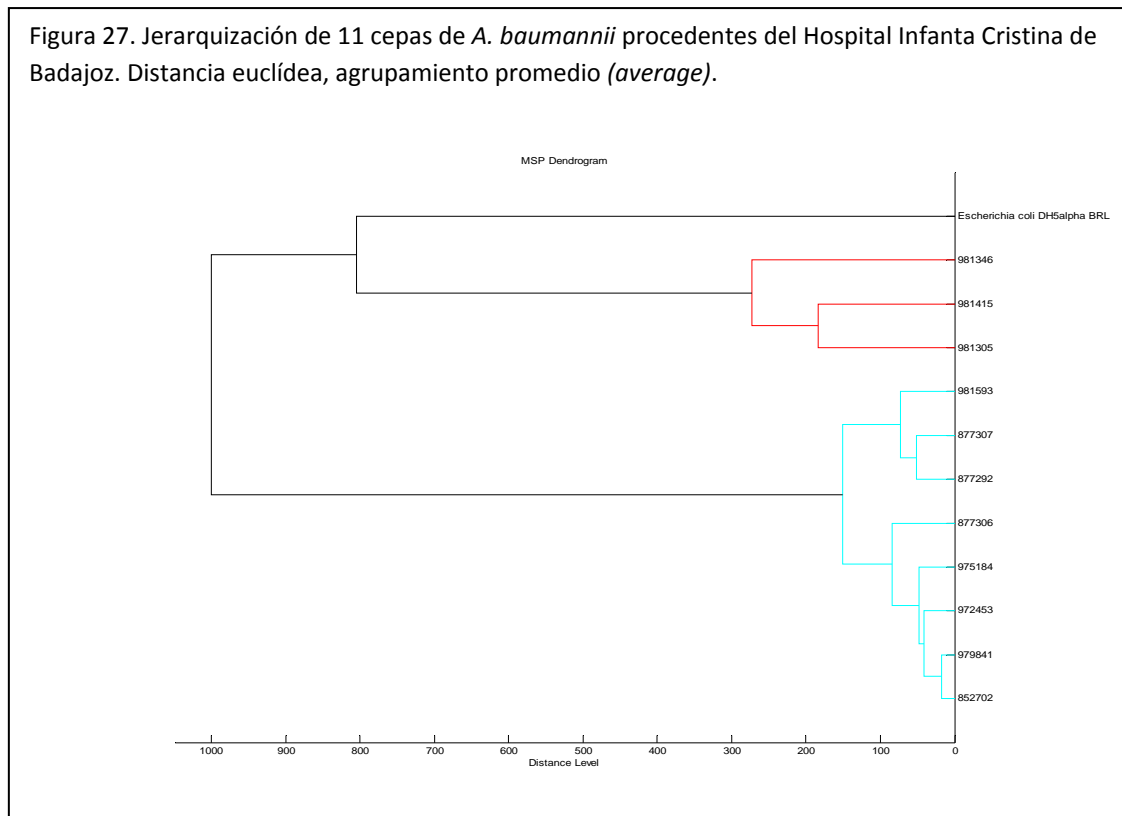


Figura 28. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento por mediana.

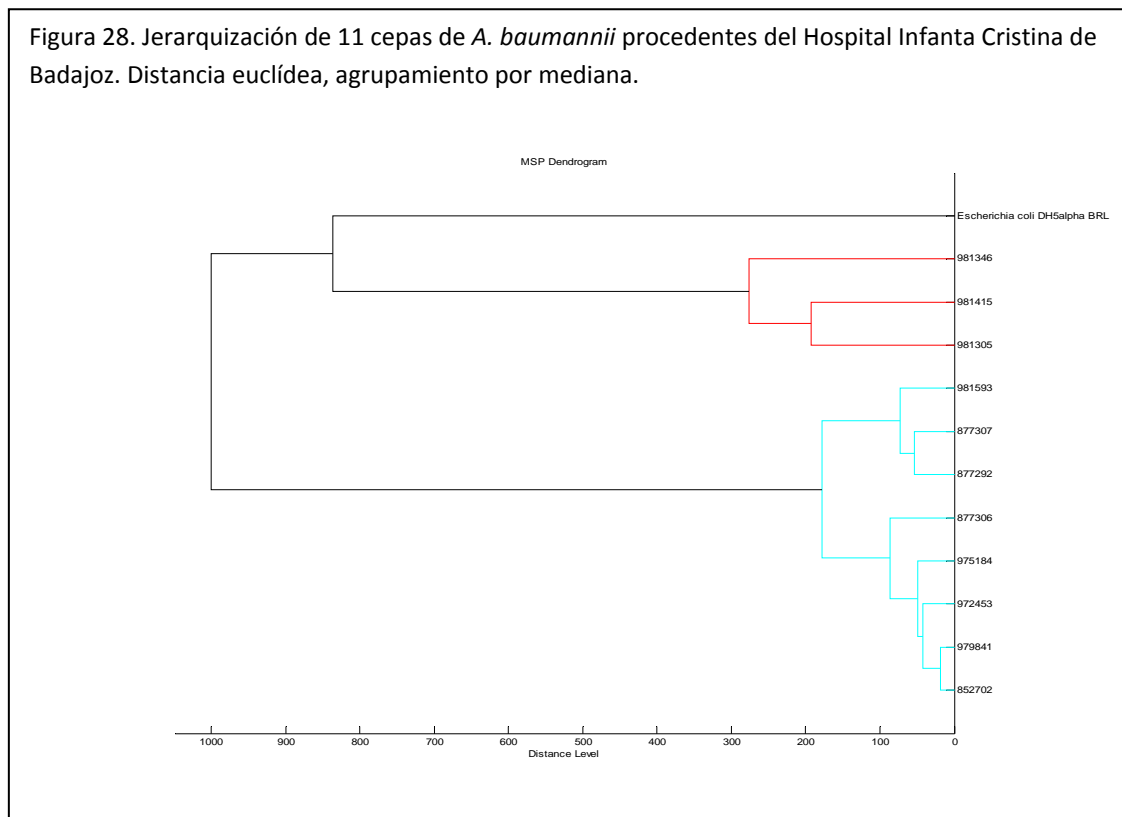


Figura 29. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento simple.

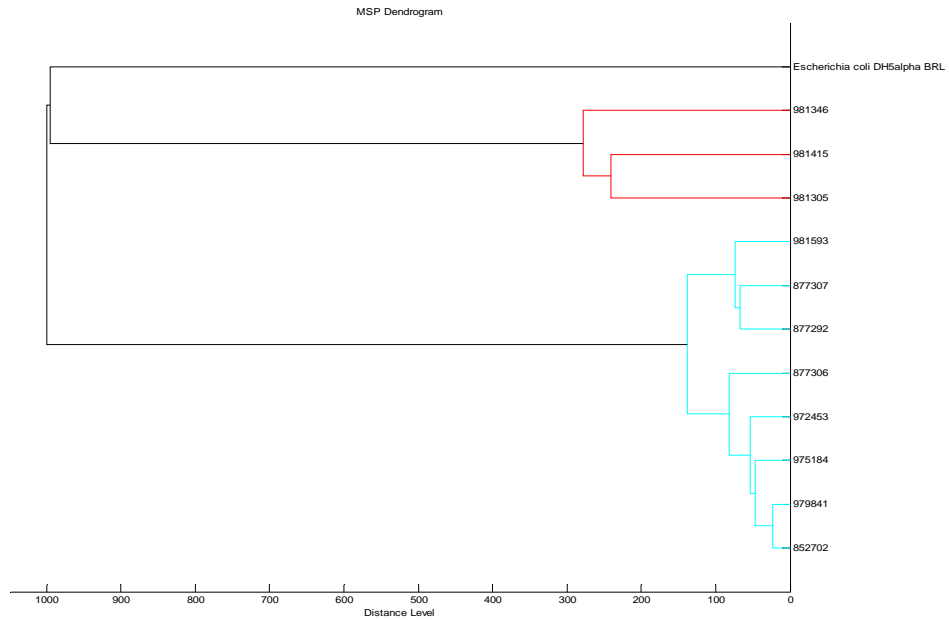


Figura 30. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento por método de Ward.

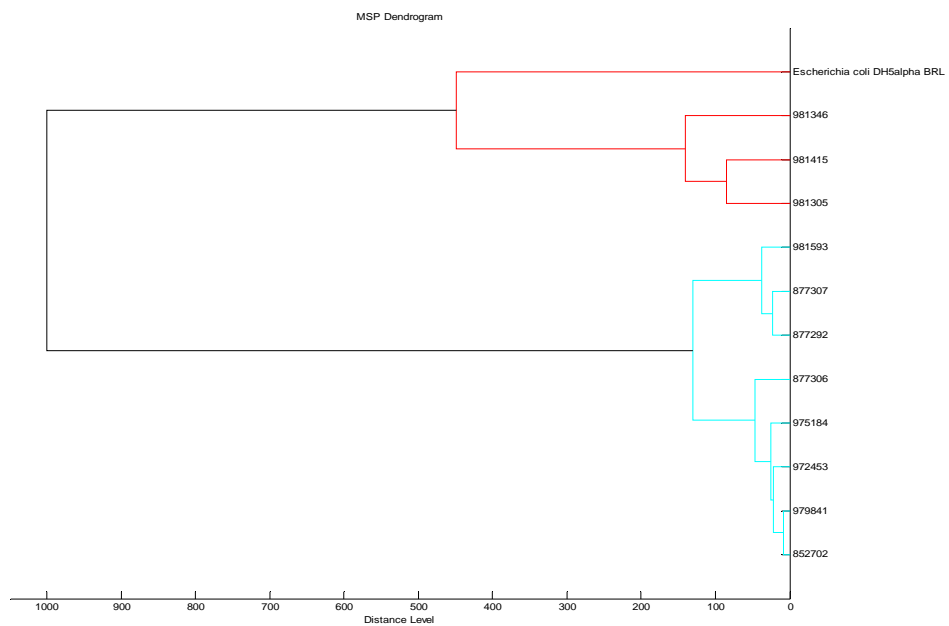


Figura 31. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia euclídea, agrupamiento *weighted*.

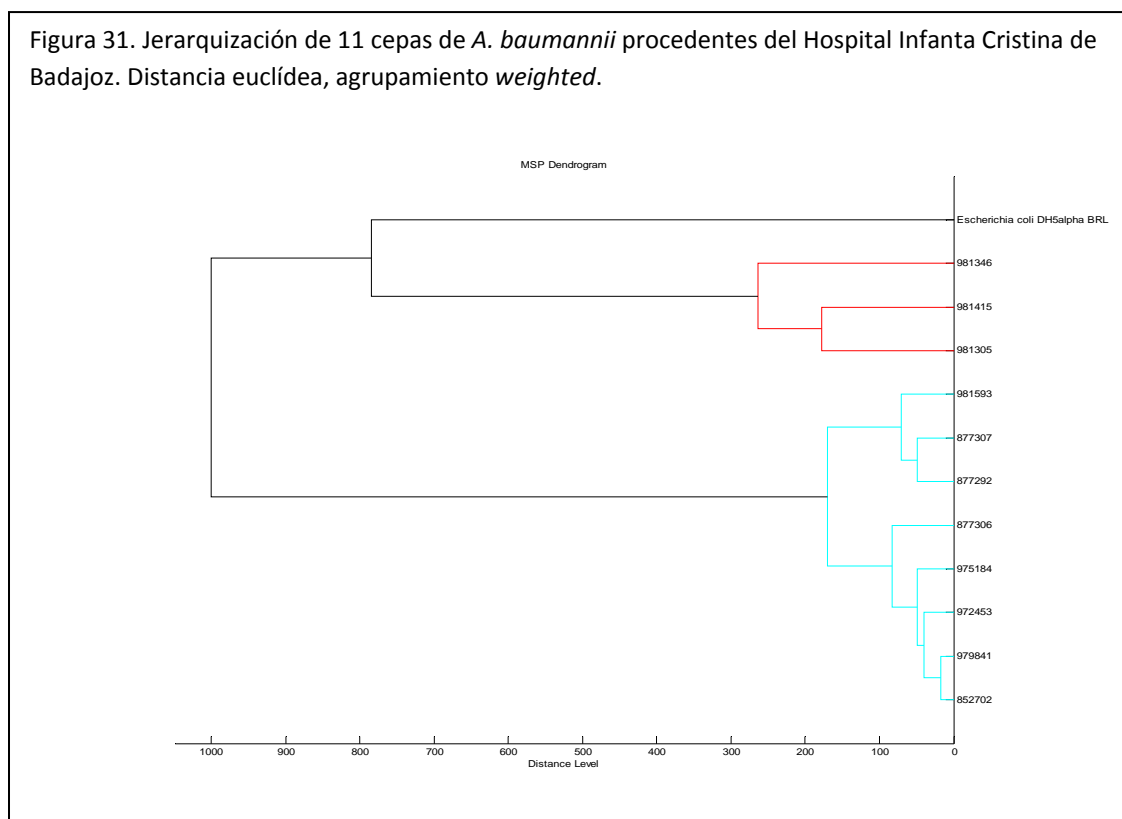


Figura 32. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento promediado (*average*).

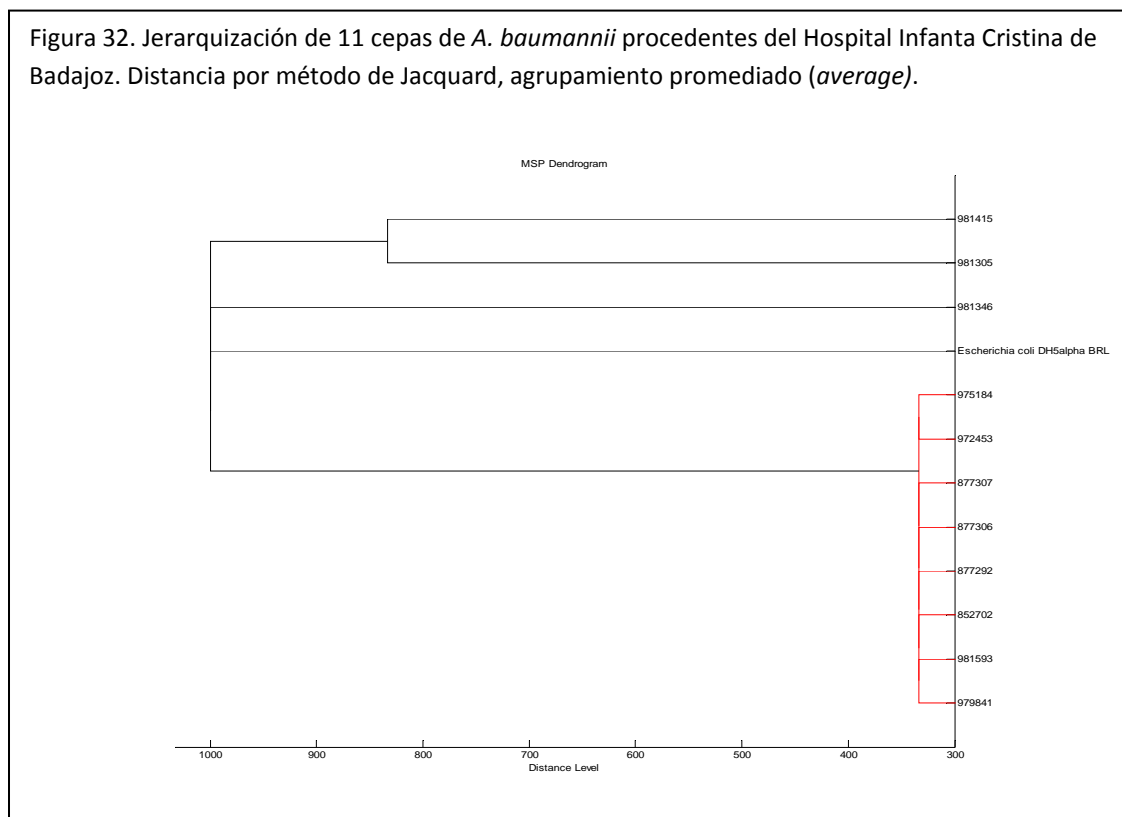


Figura 33. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento centroide.

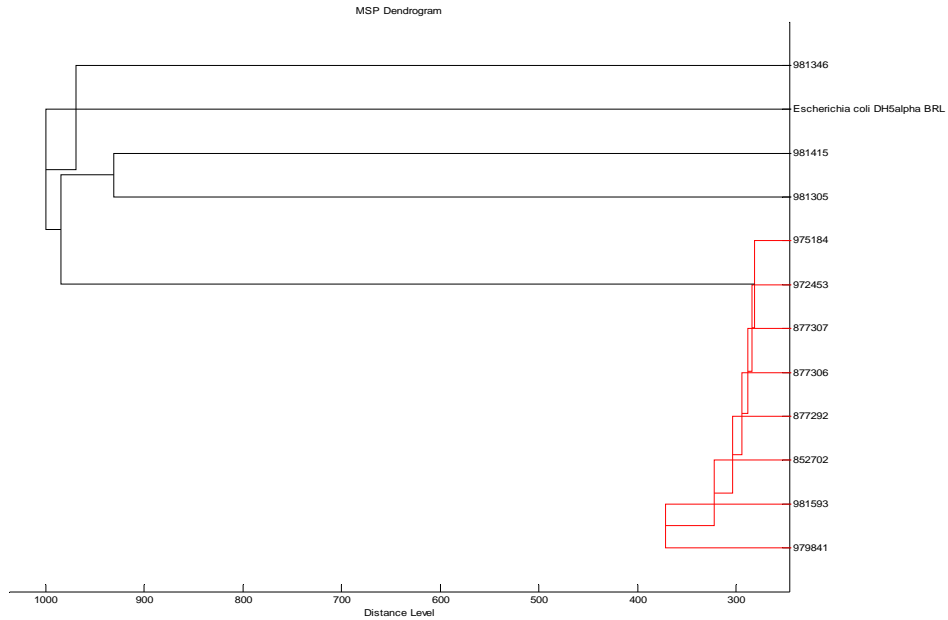


Figura 34. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento completo.

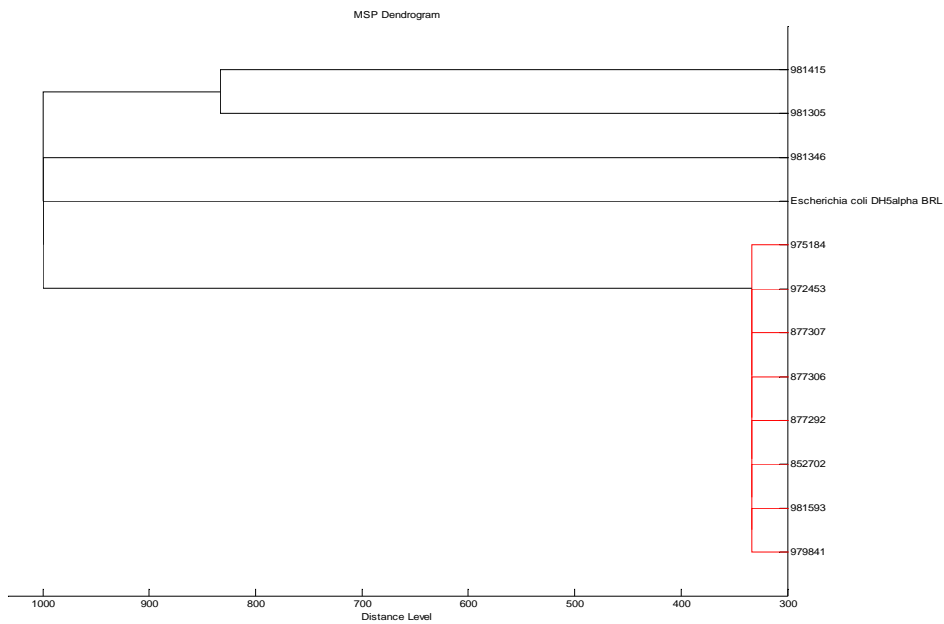
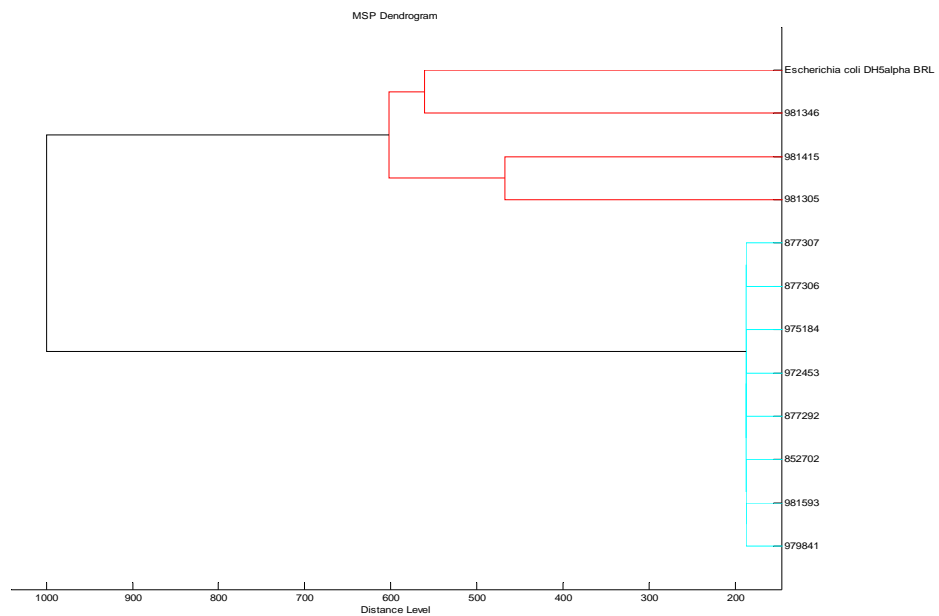


Figura 35. Jerarquización de 11 cepas de *A. baumannii* procedentes del Hospital Infanta Cristina de Badajoz. Distancia por método de Jacquard, agrupamiento por método de Ward.



Legionella pneumophila serogrupo 1.

Las cepas estudiadas de *L. pneumophila* serogrupo 1 se agruparon, mediante PFGE, es 11 clusters (tabla 1).

Tabla 1. Clusters establecidos en los aislamientos de *L. pneumophila* estudiados mediante PFGE.

nº aislamiento	Cluster	nº aislamiento	Cluster
6	TD	75	TC
7	TD	29	TF
20	TD	56	TG
21	TD	4	18
22	TD	5	18
24	TD	8	18
30	TD	10	18
31	TD	16	18
32	TD	23	18
35	TD	53	18
36	TD	54	18
37	TD	58	18
38	TD	13	19
39	TD	14	19
40	TD	19	19
41	TD	55	19
46	TD	9	17
47	TD	12	17
48	TD	15	17
49	TD	17	17
59	TD	50	17
62	TD	52	17
67	TD	11	16
70	TD	18	16
71	TD	2	AA
72	TD	1	AA
74	TD	25	AA
76	TD	42	AA
77	TD	43	AA
78	TD	44	AA
79	TD	64	AA
60	TH	65	AA
63	TH	66	AA
68	TH	81	AA
69	TH	82	AA
73	TH		
26	TB		
80	TB		

El agrupamiento con medida de distancias mediante correlación y clusterización simple, completa, promediada (*average*), *weighted*, por centroide, por mediana y por el método de Ward, mostró un agrupamiento muy distinto del obtenido mediante PFGE, tal como se refleja en las figuras 36 a 55.

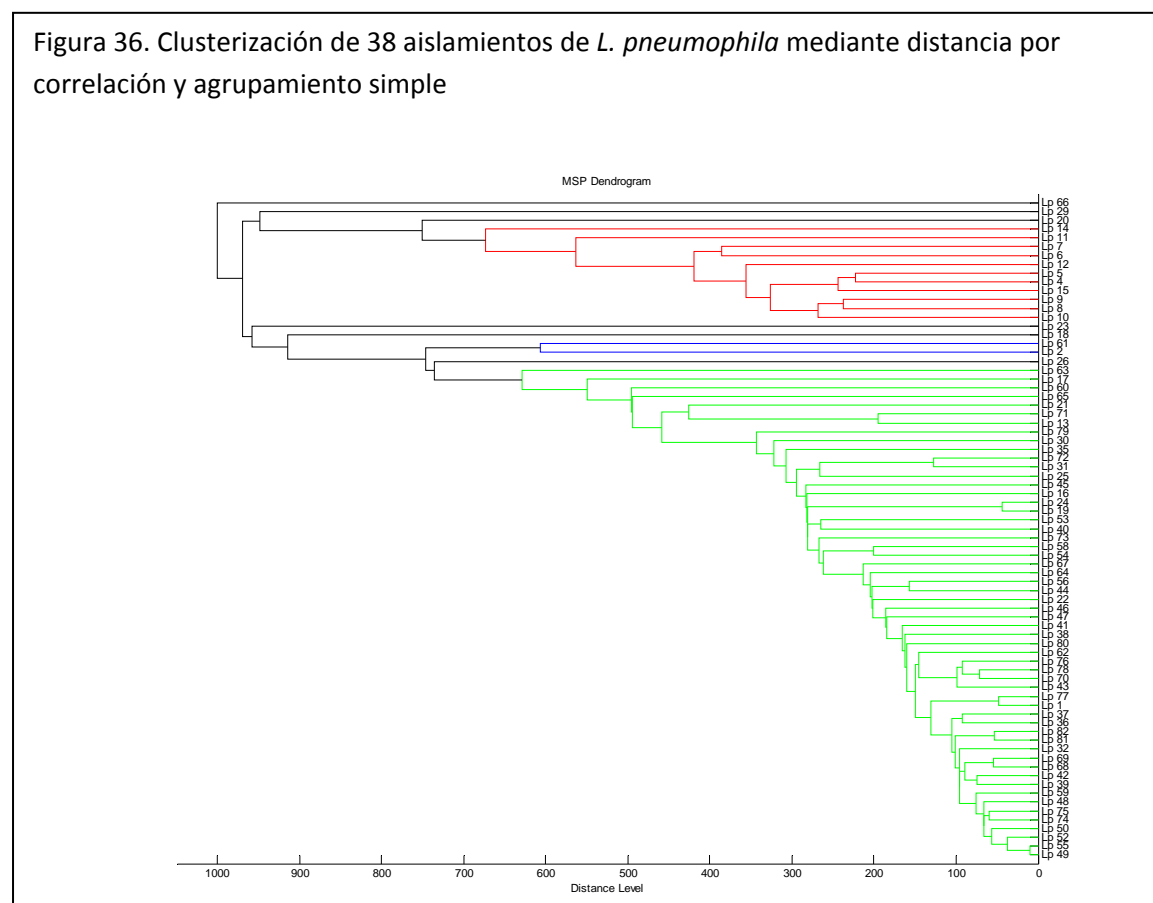


Figura 37. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento promediado

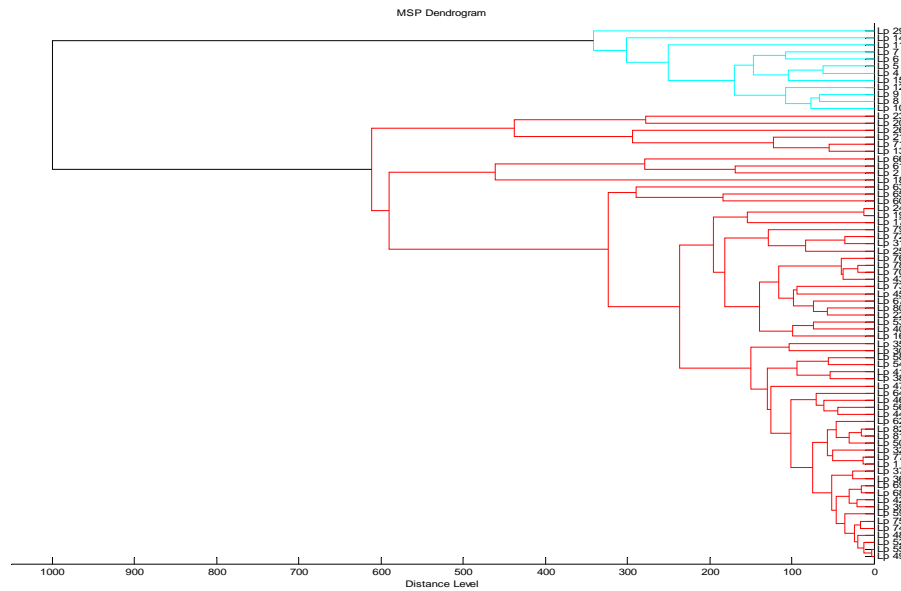


Figura 38. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento completo

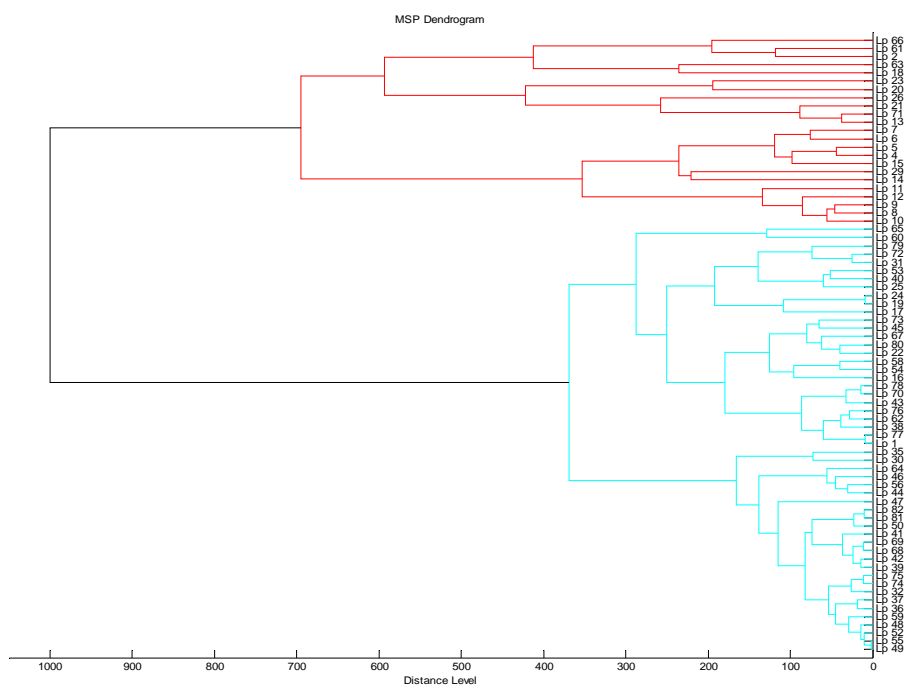


Figura 39. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento *weighted*

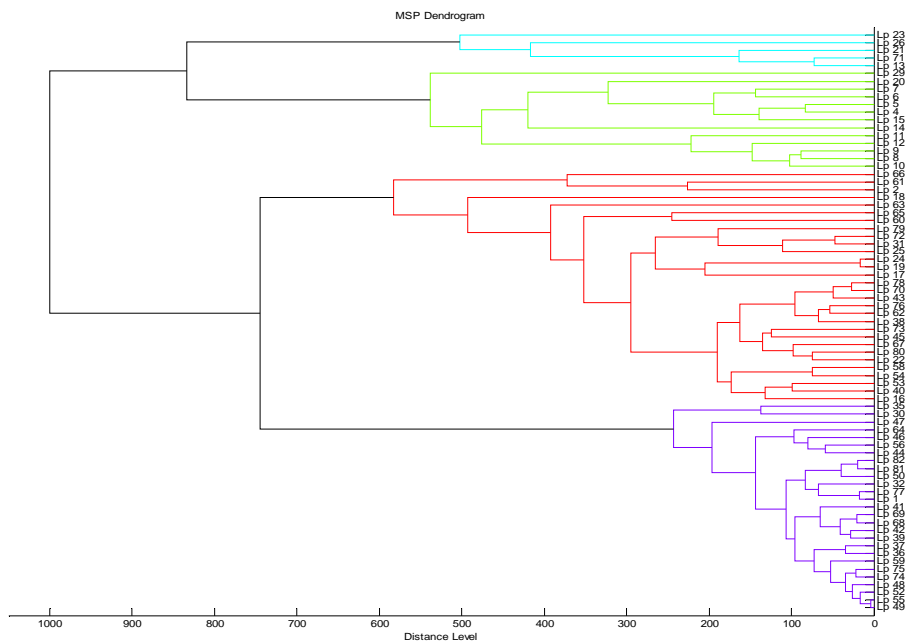


Figura 40. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento centroide

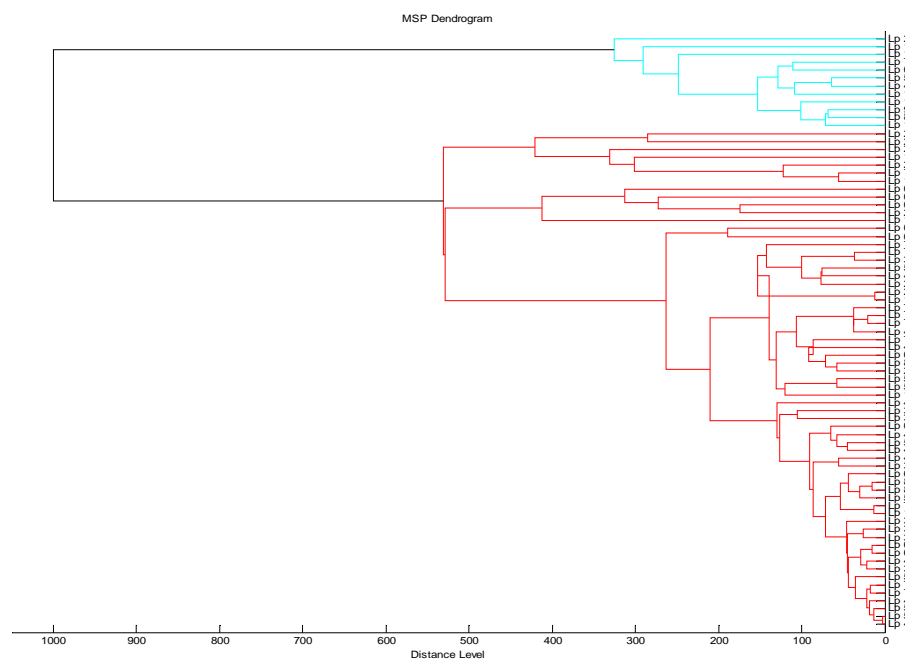


Figura 41. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento mediante mediana

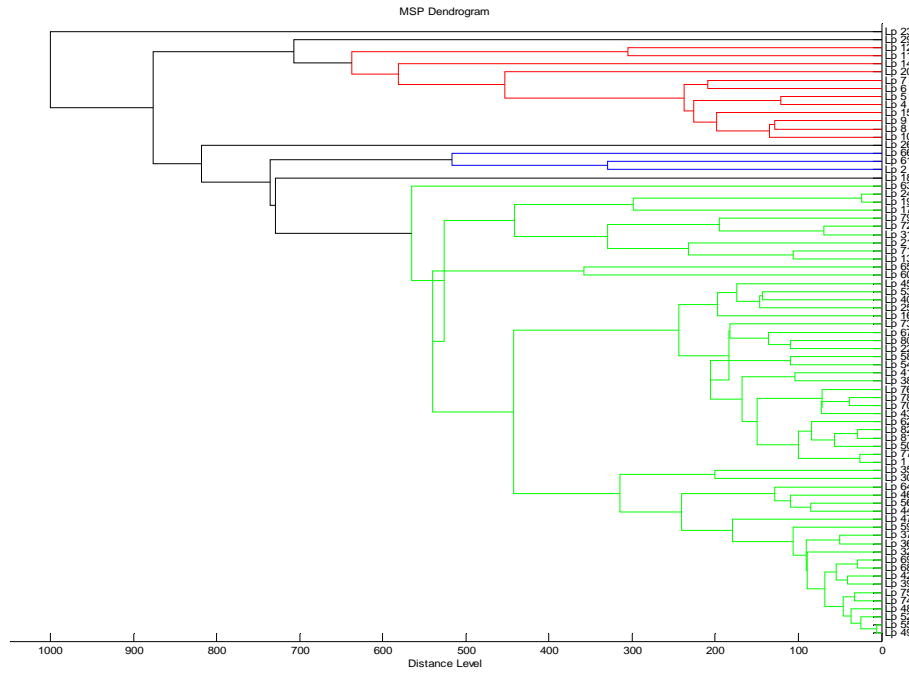
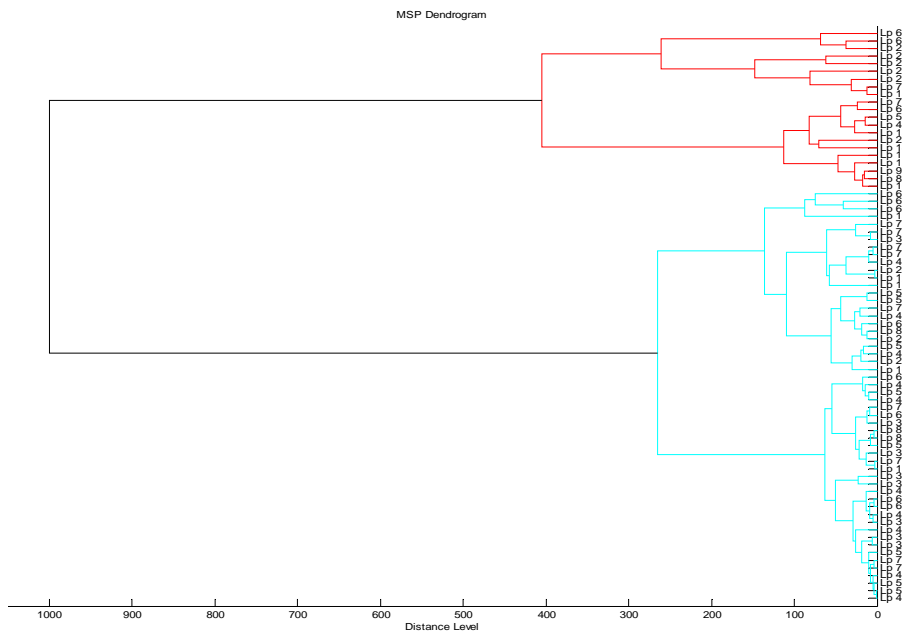


Figura 42. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por correlación y agrupamiento de Ward



El agrupamiento con medida de distancias euclídea y clusterización simple, completa, promediada (*average*), *weighted*, por centroide, por mediana y por el método de Ward, mostró asimismo importantes diferencias con el obtenido mediante PFGE, tal como se refleja en las figuras x a x.

Figura 43. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento simple

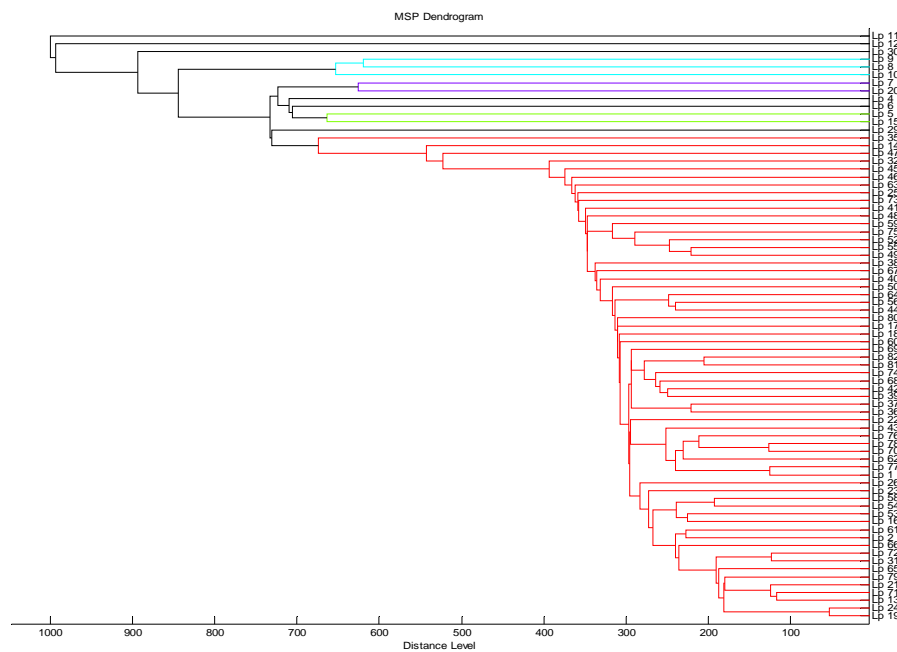


Figura 44. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento promediado (*average*)

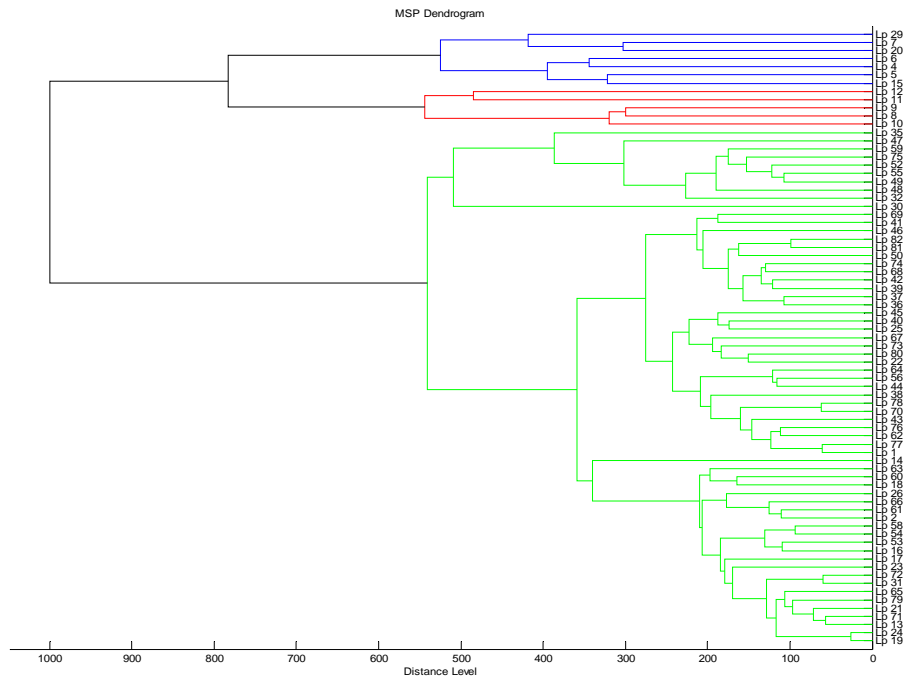


Figura 45. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento *weighted*

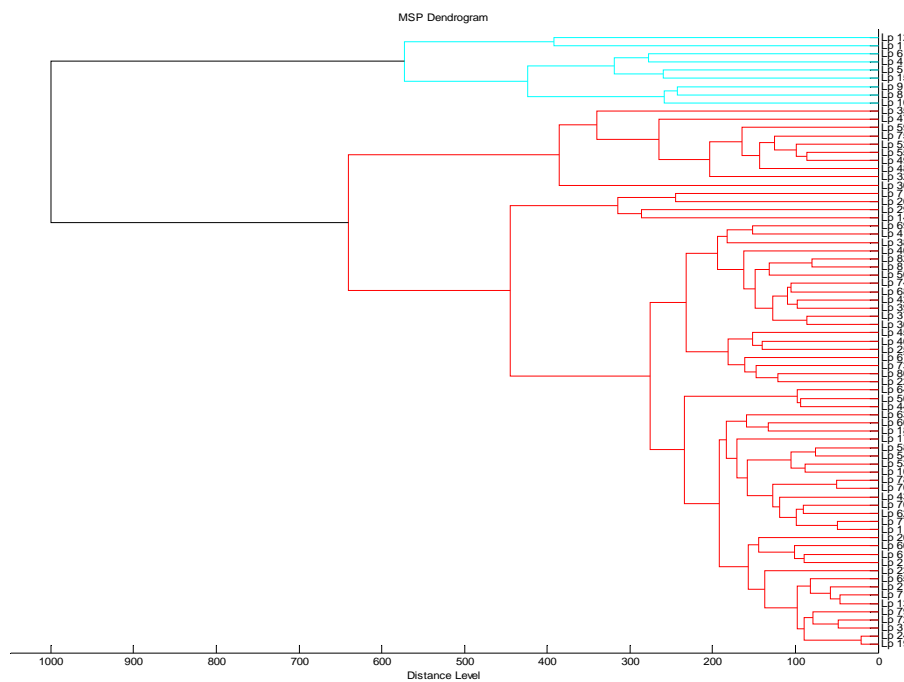


Figura 46. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento completo

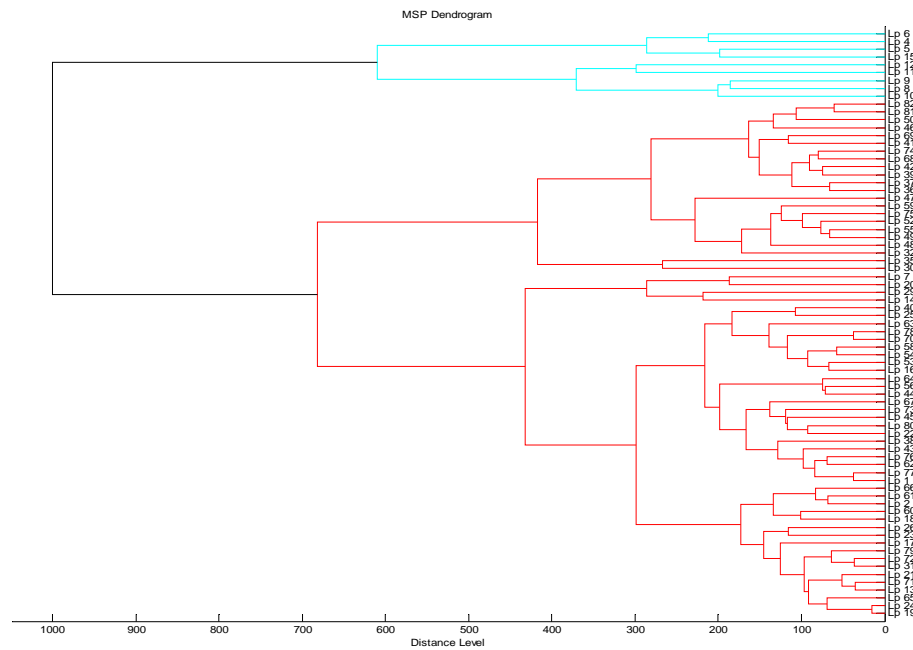


Figura 47. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento por mediana

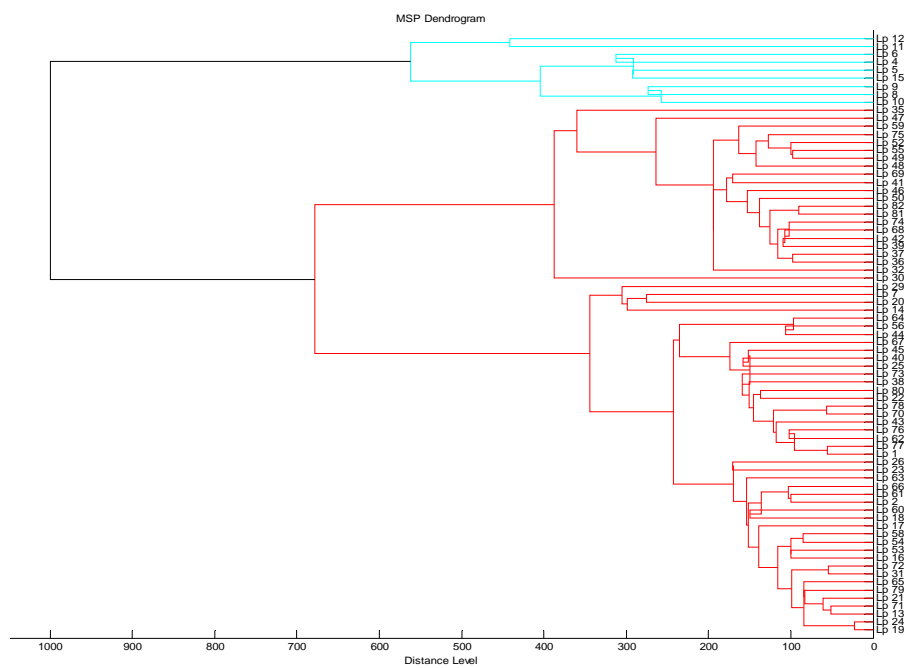


Figura 48. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento por centroide

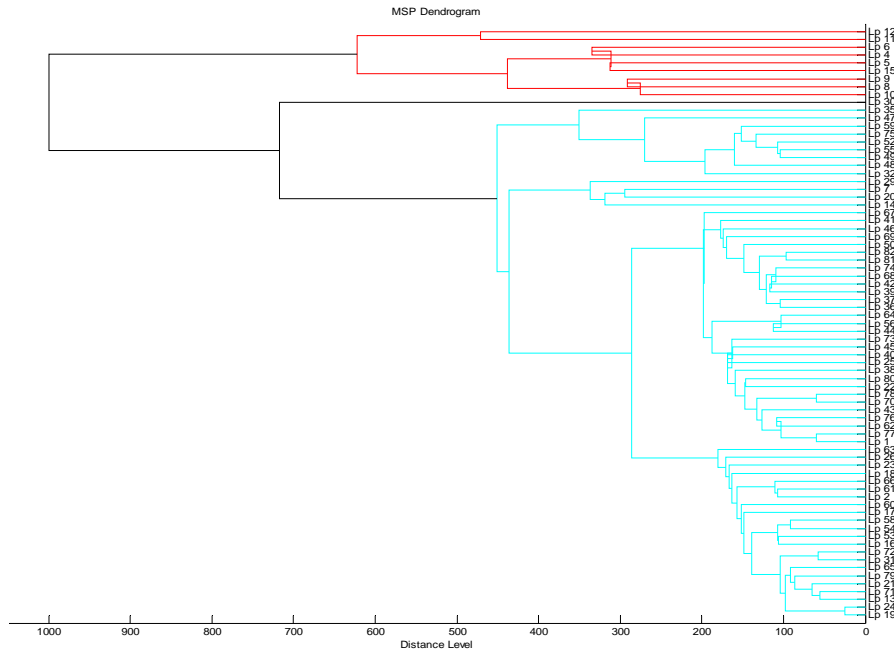
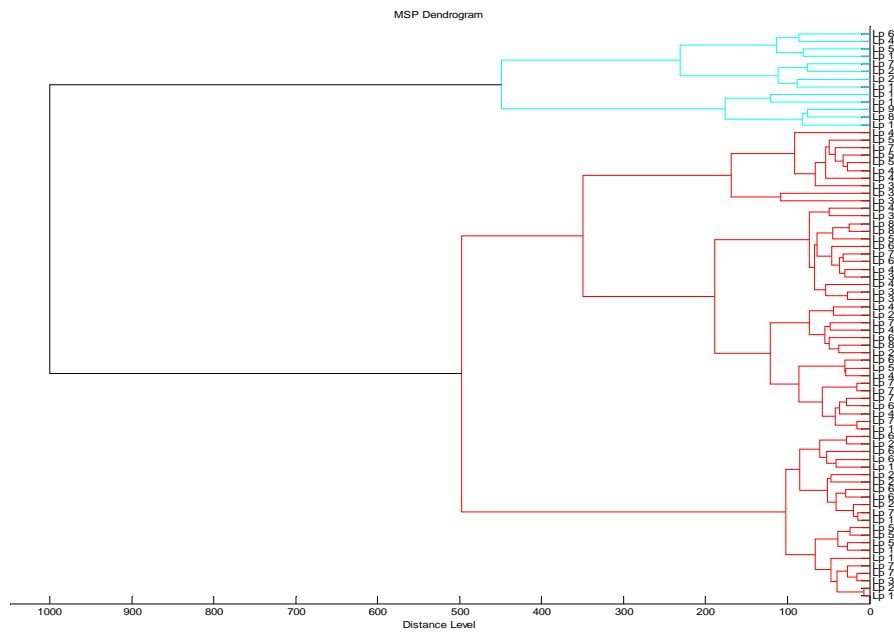


Figura 49. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia euclídea y agrupamiento por método de Ward



El agrupamiento con medida de distancias por el método de Jaccard y clusterización promediada (*average*), completa, weighted, por centroide, por mediana y por el método de Ward, mostró asimismo importantes diferencias con el obtenido mediante PFGE, tal como se refleja en las figuras x a x.

Figura 50. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por el método Jacquard y agrupamiento por promedio (*average*)

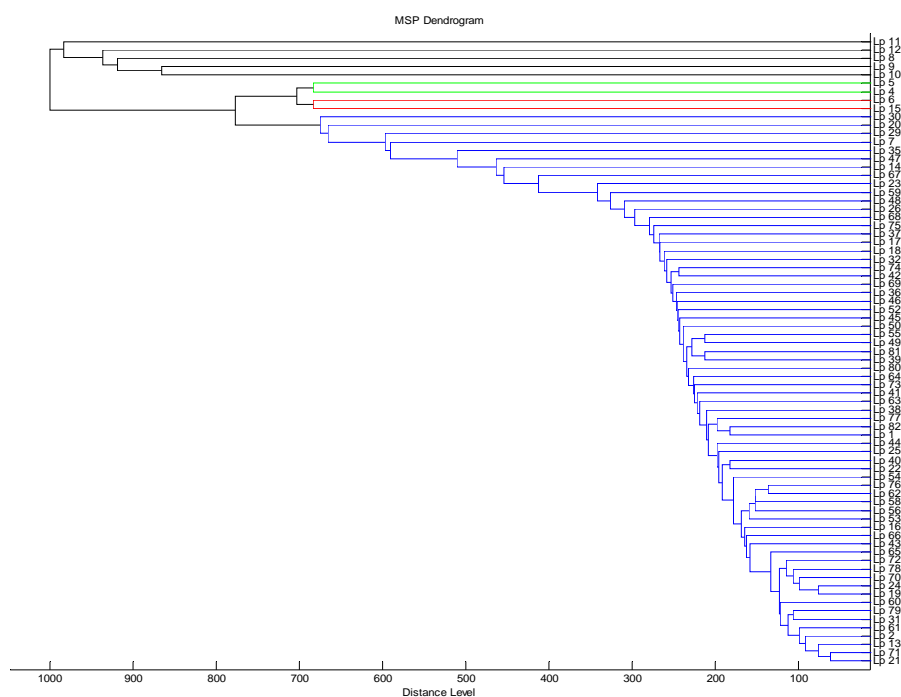


Figura 51. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por el método Jacquard y agrupamiento completo

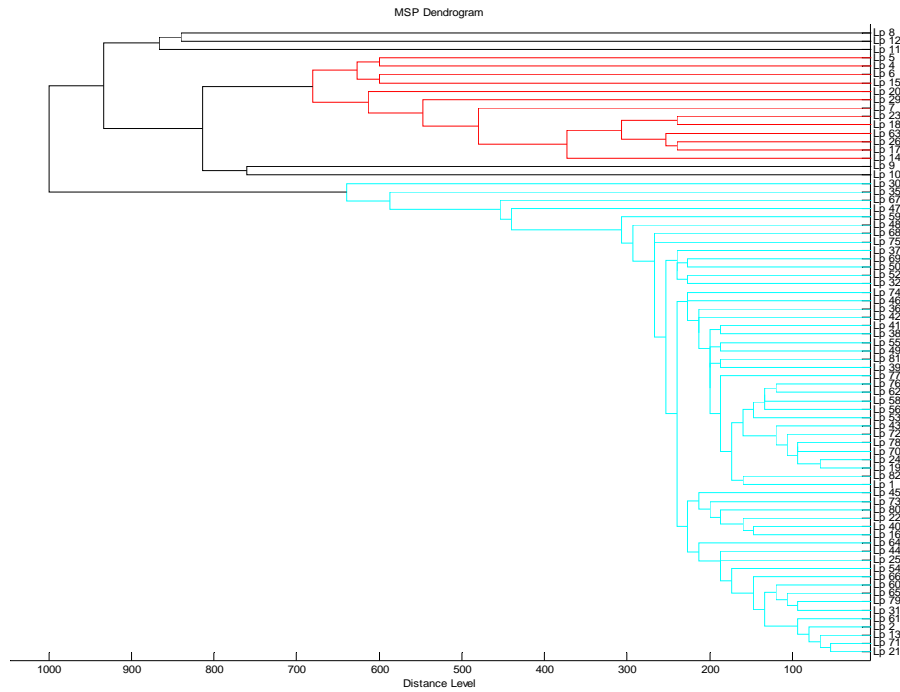


Figura 52. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por el método Jacquard y agrupamiento weighted

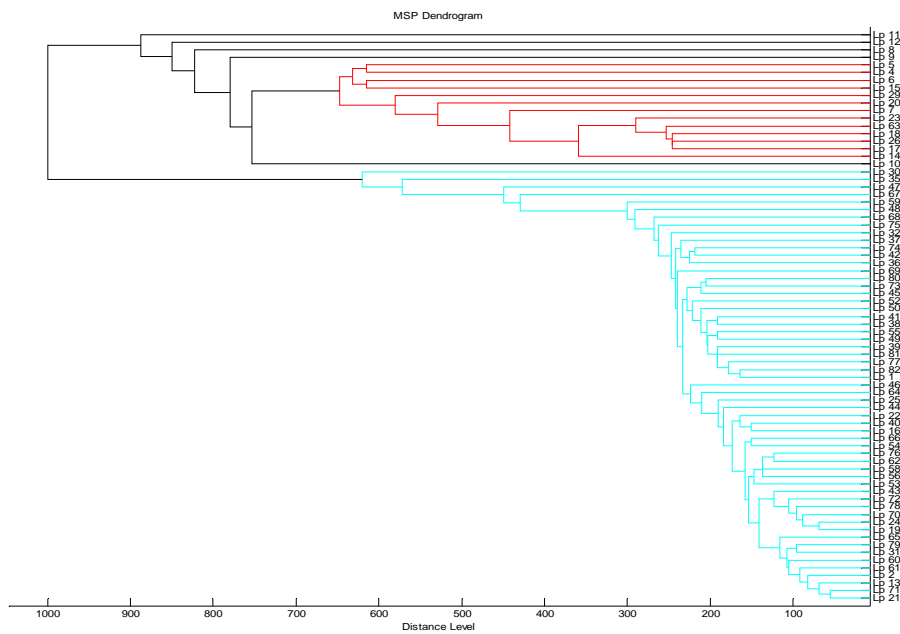


Figura 53. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por el método Jacquard y agrupamiento basado en centroide

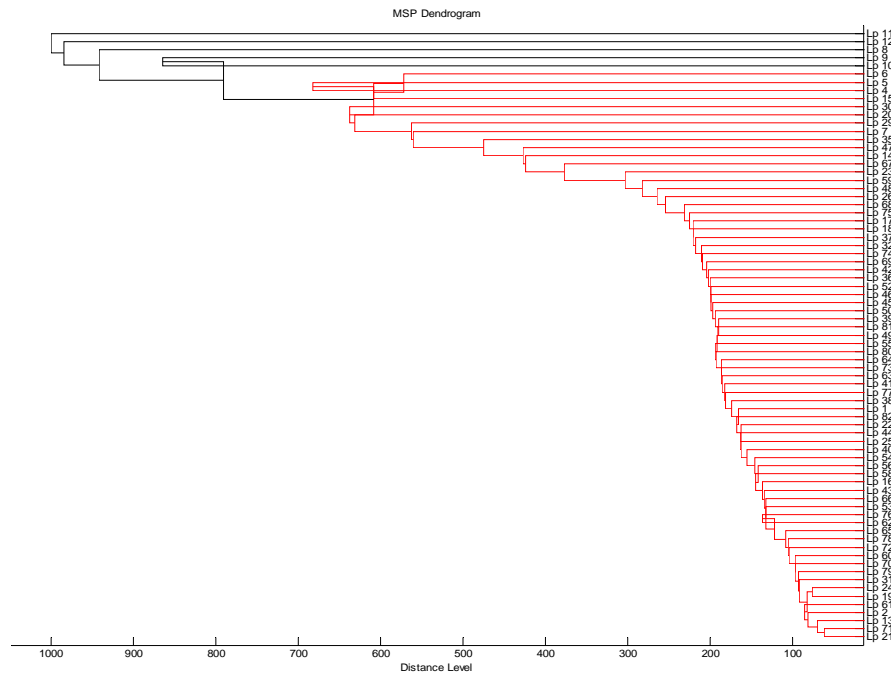
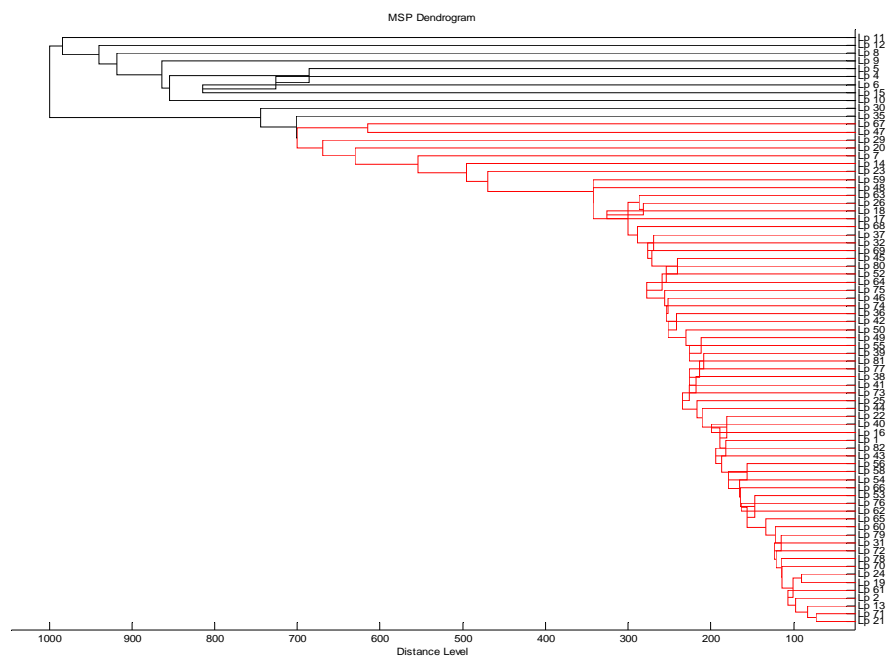


Figura 54. Clusterización de 38 aislamientos de *L. pneumophila* mediante distancia por el método Jacquard y agrupamiento basado en mediana



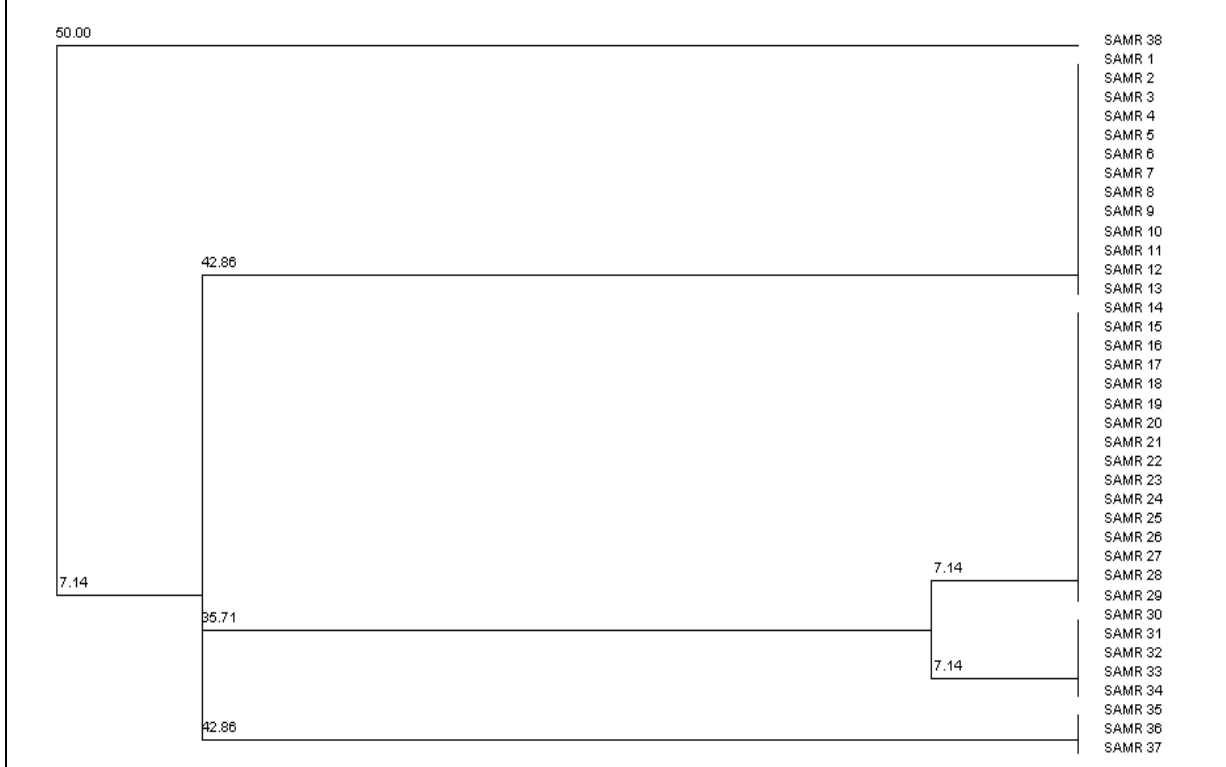
En cuanto a los 38 aislamientos de SARM utilizados, los perfiles alélicos obtenidos mediante Multilocus Sequence Typing (MLST) aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil de alelos obtenidos mediante MLST para los 38 aislamientos de SARM estudiados

Nº aislamiento	ST	nº alelo gen 1	nº alelo gen 2	nº alelo gen 3	nº alelo gen 4	nº alelo gen 5	nº alelo gen 6	nº alelo gen 7
1 al 13	217	7	6	1	5	8	5	6
14 al 29	125	1	4	1	4	12	1	54
30 al 34	5	1	4	1	4	12	1	10
35 al 37	8	3	3	1	1	4	4	3
38	30	2	2	2	2	6	3	2

Como se observa en dicha tabla, todos los aislamientos se distribuyeron en cinco perfiles alélicos. La mayoría de los perfiles eran diferentes en todos o casi todos los alelos del perfil, mientras el segundo y el tercer grupo, que incluían respectivamente a 16 y cinco aislamientos, diferían sólo en el alelo del gen nº 7. La representación gráfica de esta distribución aparece en la figura 56.

Figura 56. Dendrograma de los alelos obtenidos mediante MLST para los 38 aislamientos de SARM estudiados



Como en el caso de *Legionella*, los datos obtenidos mediante EM MALDI-TOF se ajustan escasamente a esta distribución. Sin embargo, mientras en el caso de *Legionella* la jerarquización generada era muy estable con independencia del método de medida de distancias entre puntos y del método de jerarquización utilizado, en el caso de SARM la metodología utilizada genera importantes diferencias de jerarquización en función del método de medida de distancia entre puntos utilizado, aunque no del método de jerarquización. Así, en los dendrogramas obtenidos mediante correlación se generan dos *clusters*, que incluyen 13 y 25 aislamientos respectivamente, incluyendo ambos aislamientos pertenecientes a los cuatro clusters obtenidos mediante MLST. Por el contrario, el aislamiento más claramente diferenciado en MLST, el nº 38, aparece en éstos muy próximos a los aislamientos 20 y 22, pertenecientes al segundo cluster obtenido mediante MLST.

Figura 57. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento completo

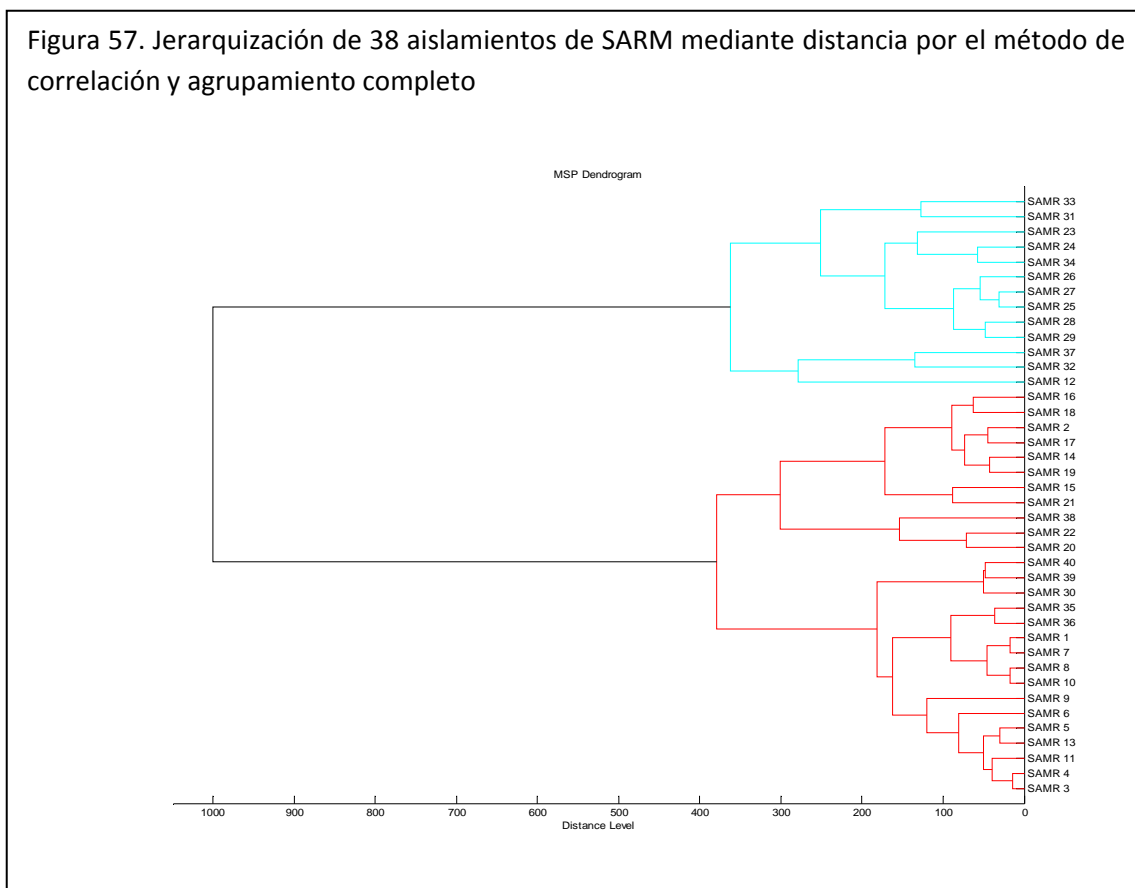


Figura 58. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento promediado (*average*)

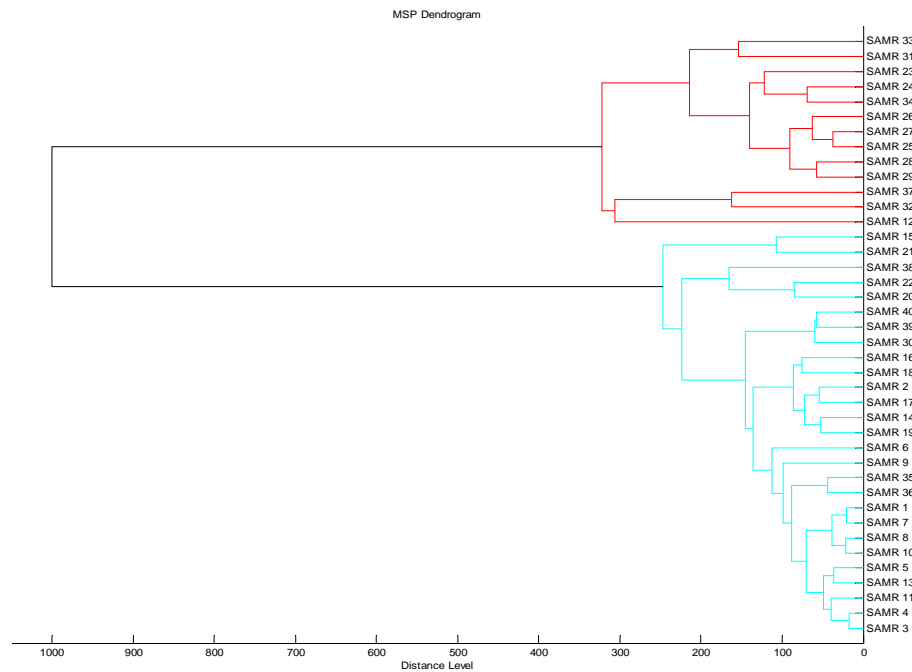


Figura 59. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento simple

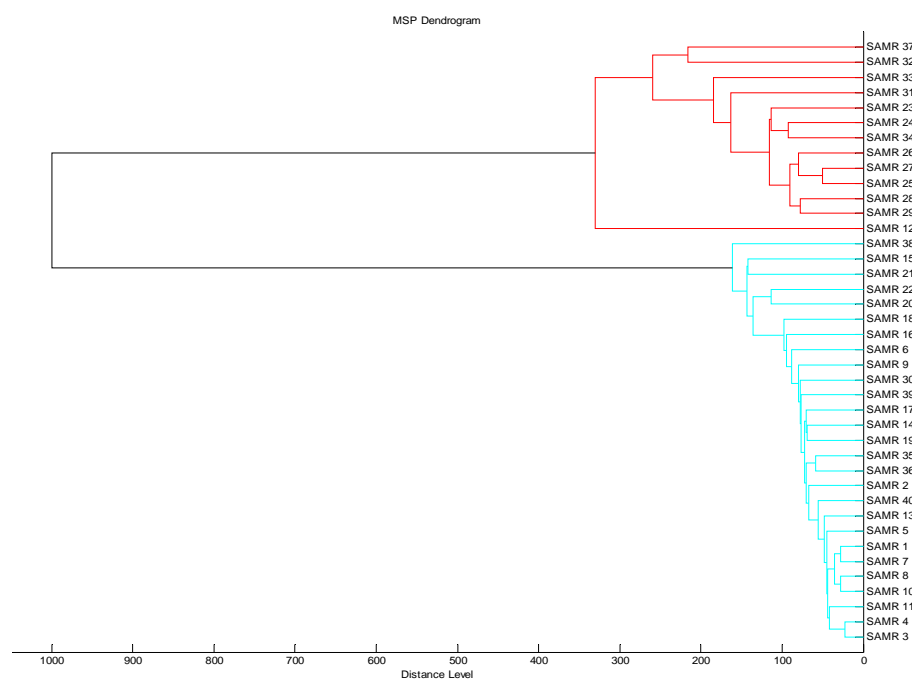


Figura 60. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento centroide

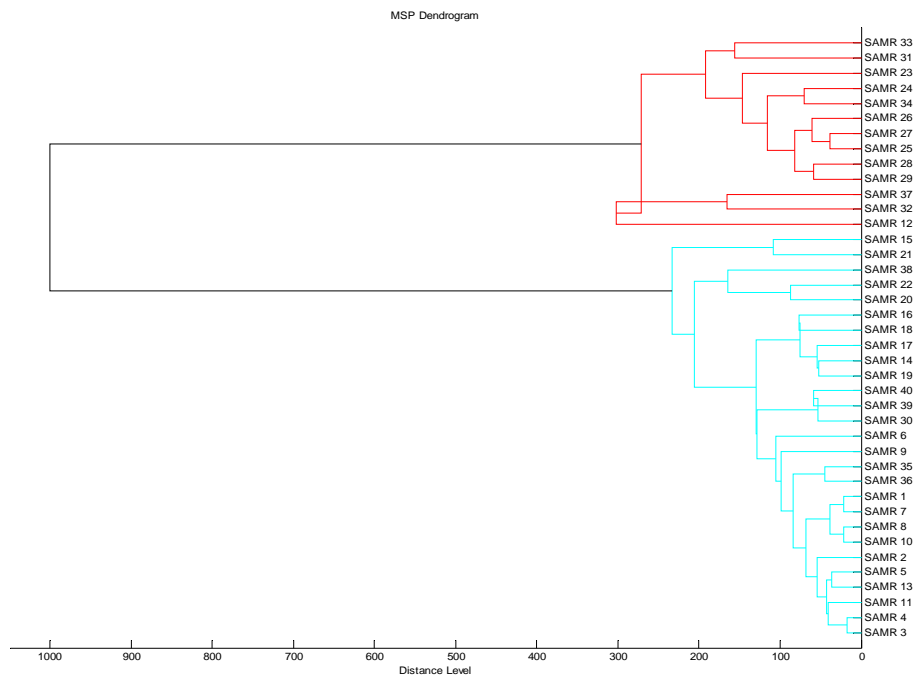


Figura 61. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento por mediana

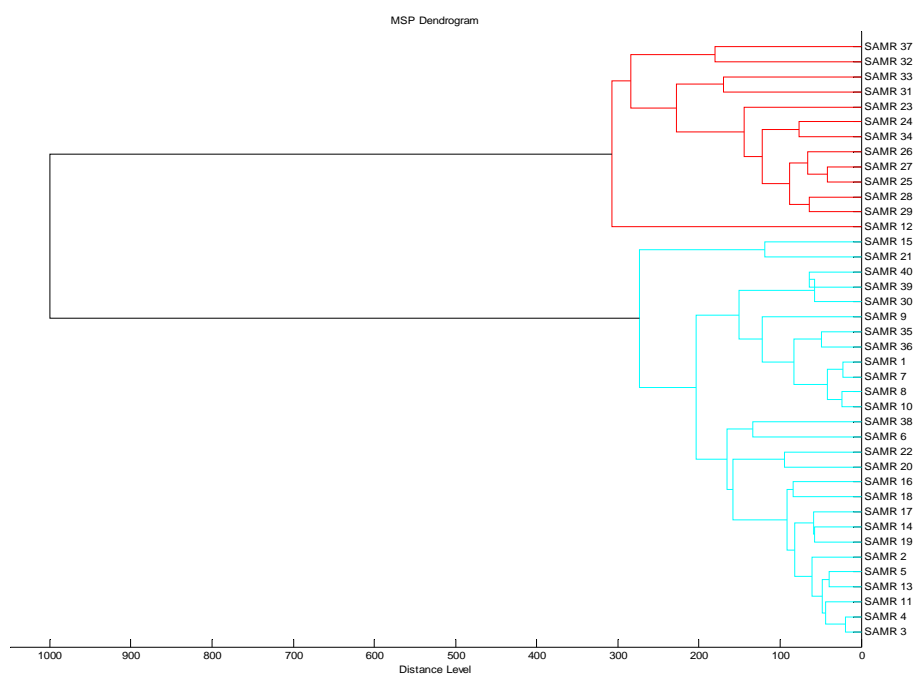


Figura 62. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento por el método de Ward

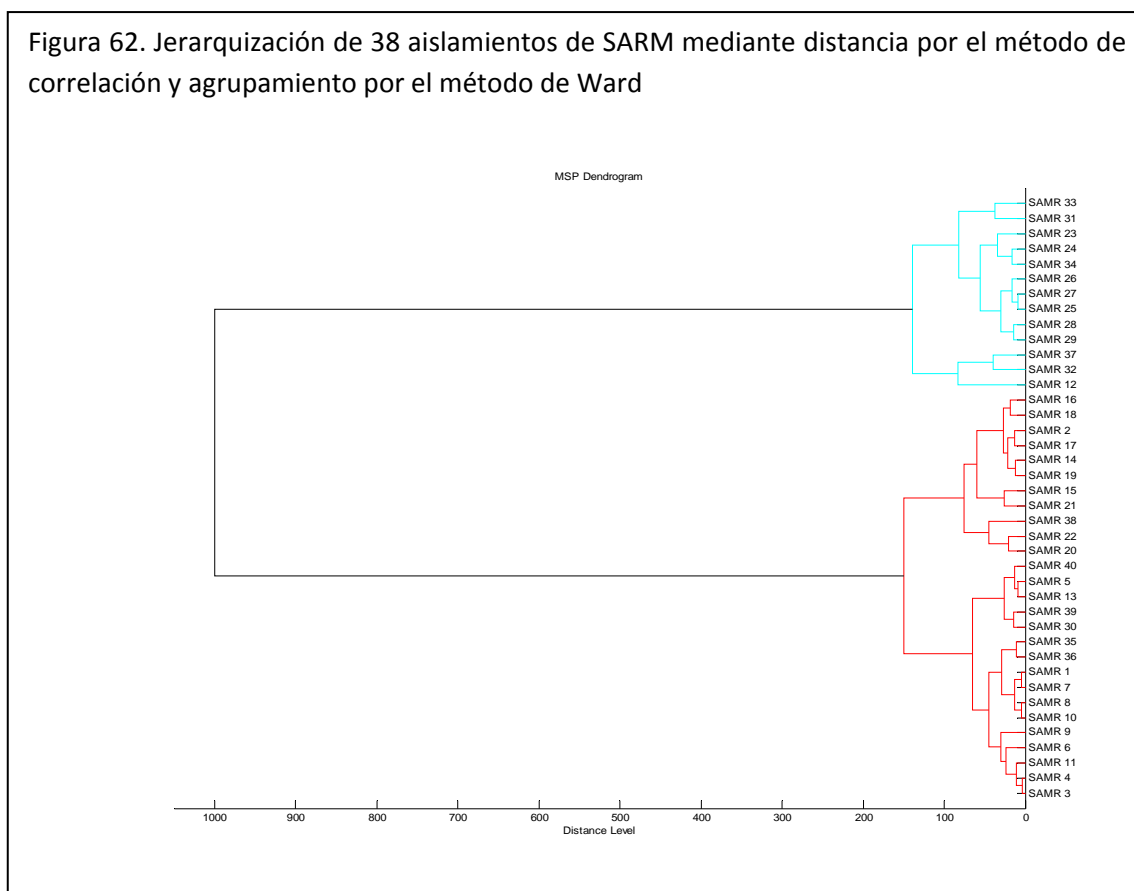
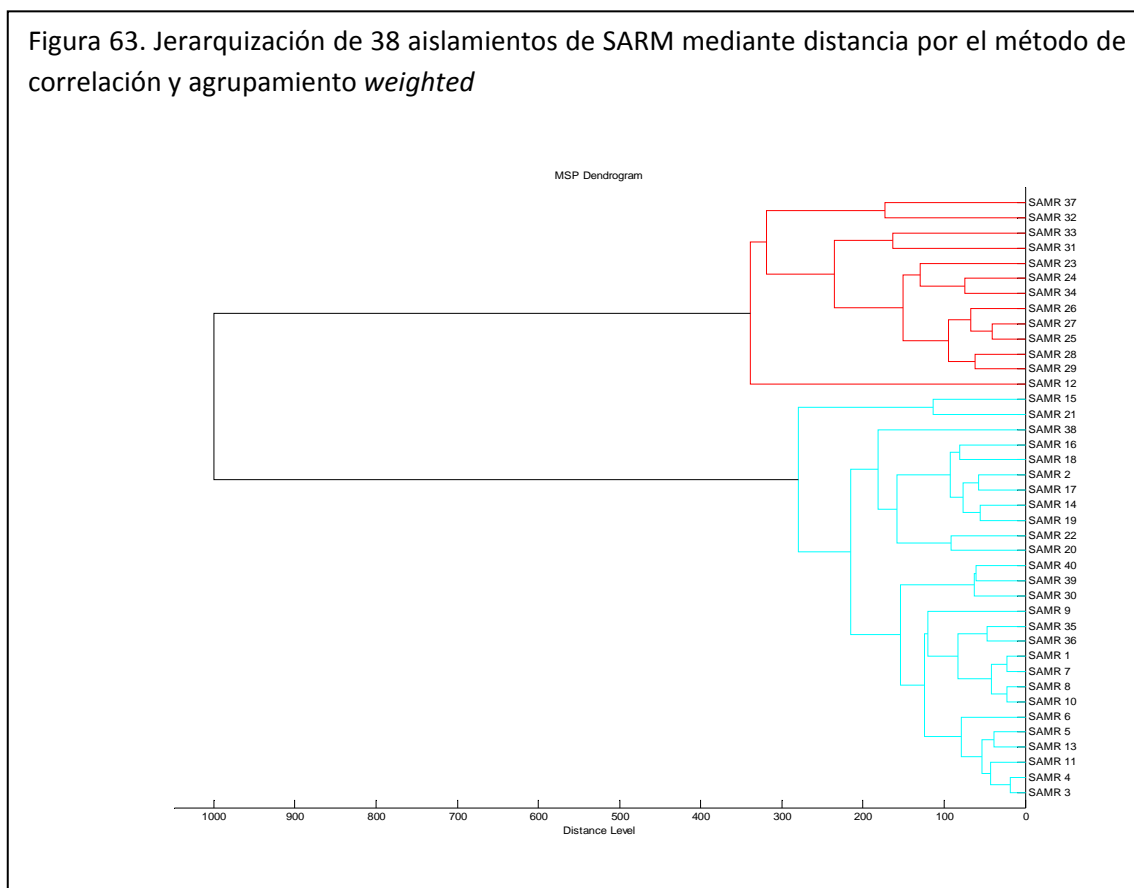


Figura 63. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de correlación y agrupamiento *weighted*



Por el contrario, cuando se utiliza la distancia euclídea para la medida de la distancia entre puntos, se genera un dendrograma en el que el aislamiento nº 38 está claramente separado del resto, como ocurre el MLST, y no aparece una jerarquización tan marcada en dos grupos entre los otros aislamientos. Por otra parte, los niveles de proximidad que establece entre ellos son completamente dispares con respecto al MLST, en cuanto que establece diferencias entre aislamientos perteneciente al mismo cluster MLST, mientras da como virtualmente idénticos a aislamientos pertenecientes a clusters MLST diferentes (figuras 64-67). La medida de distancias entre puntos por el método de Jacquard da lugar a una jerarquización muy similar a la que se obtiene mediante distancia euclídea (figuras 68-73).

Figura 64. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia euclídea y agrupamiento centroe

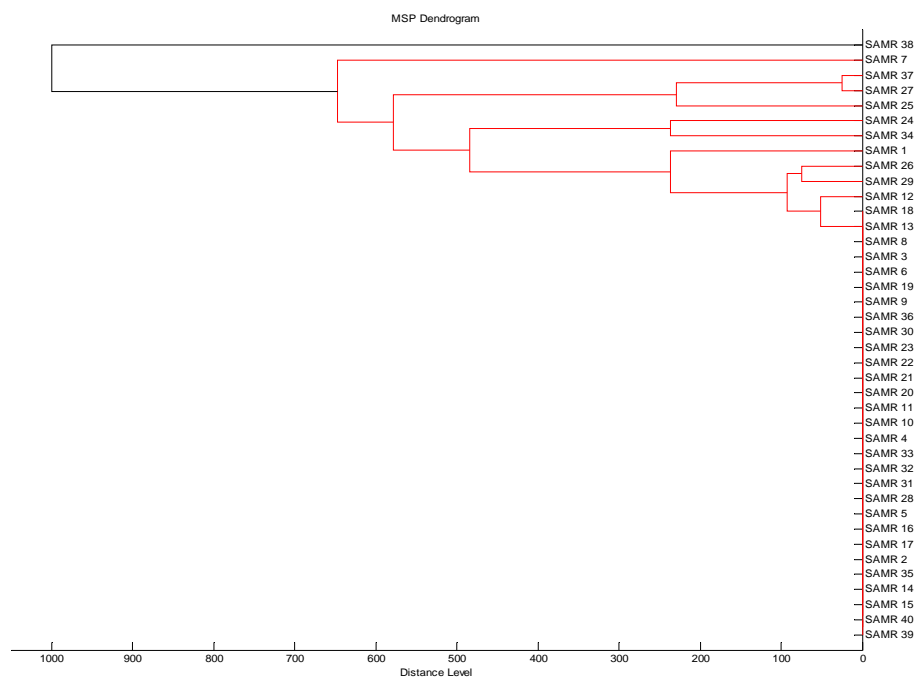


Figura 65. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia euclídea y agrupamiento por el método de Ward

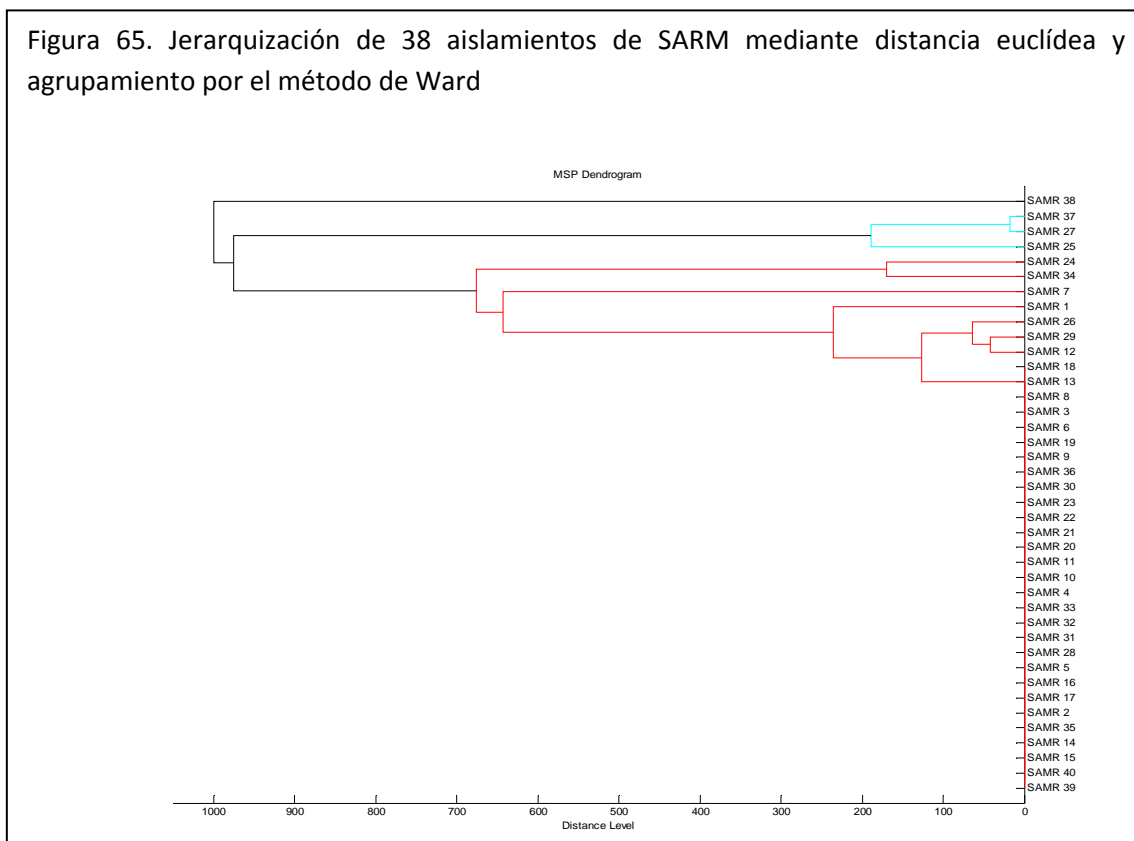


Figura 66. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia euclídea y agrupamiento promedio (*average*).

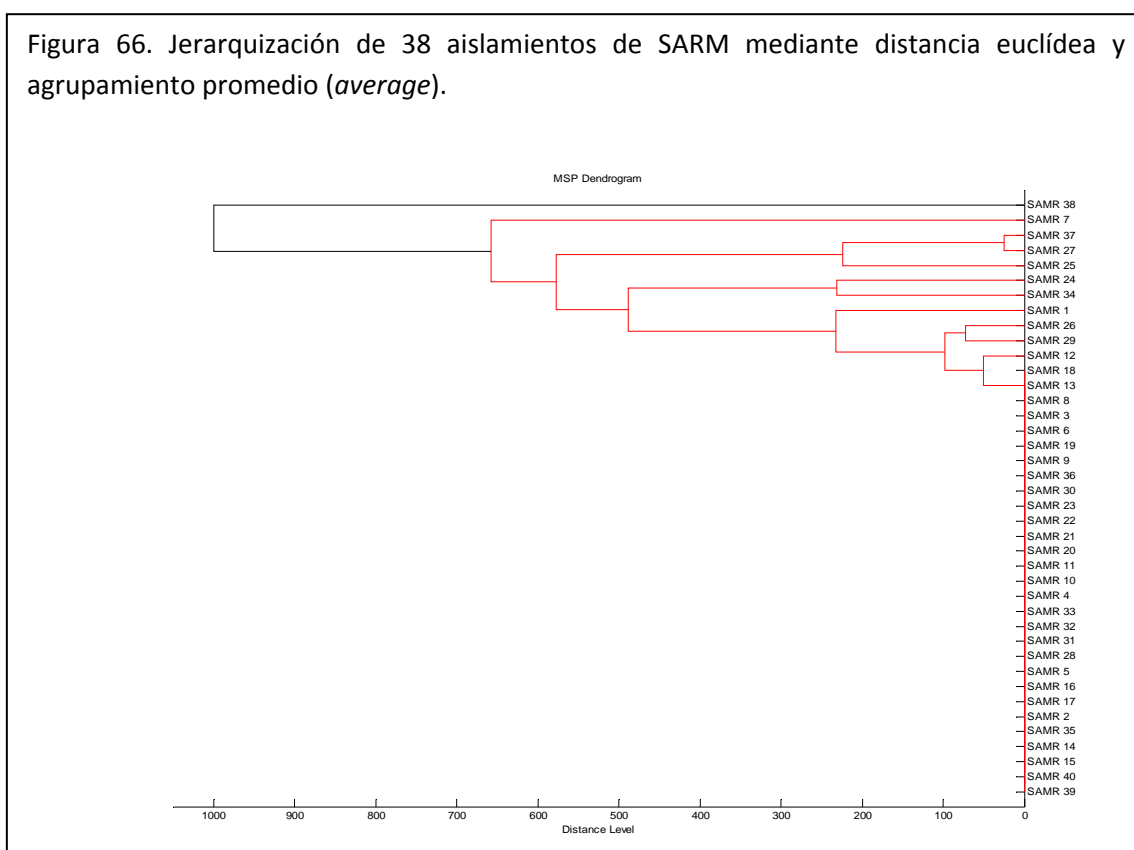


Figura 67. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia euclídea y agrupamiento *weighted*.

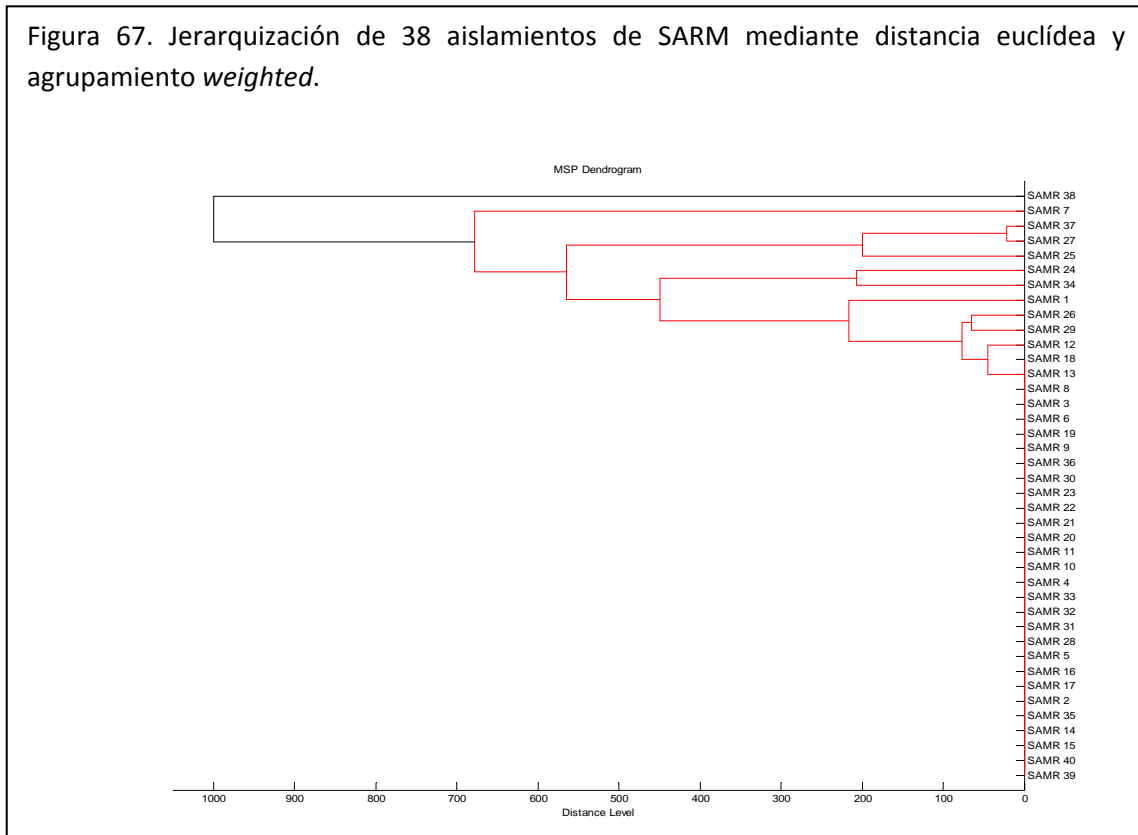


Figura 68. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard y agrupamiento promedio (*average*).

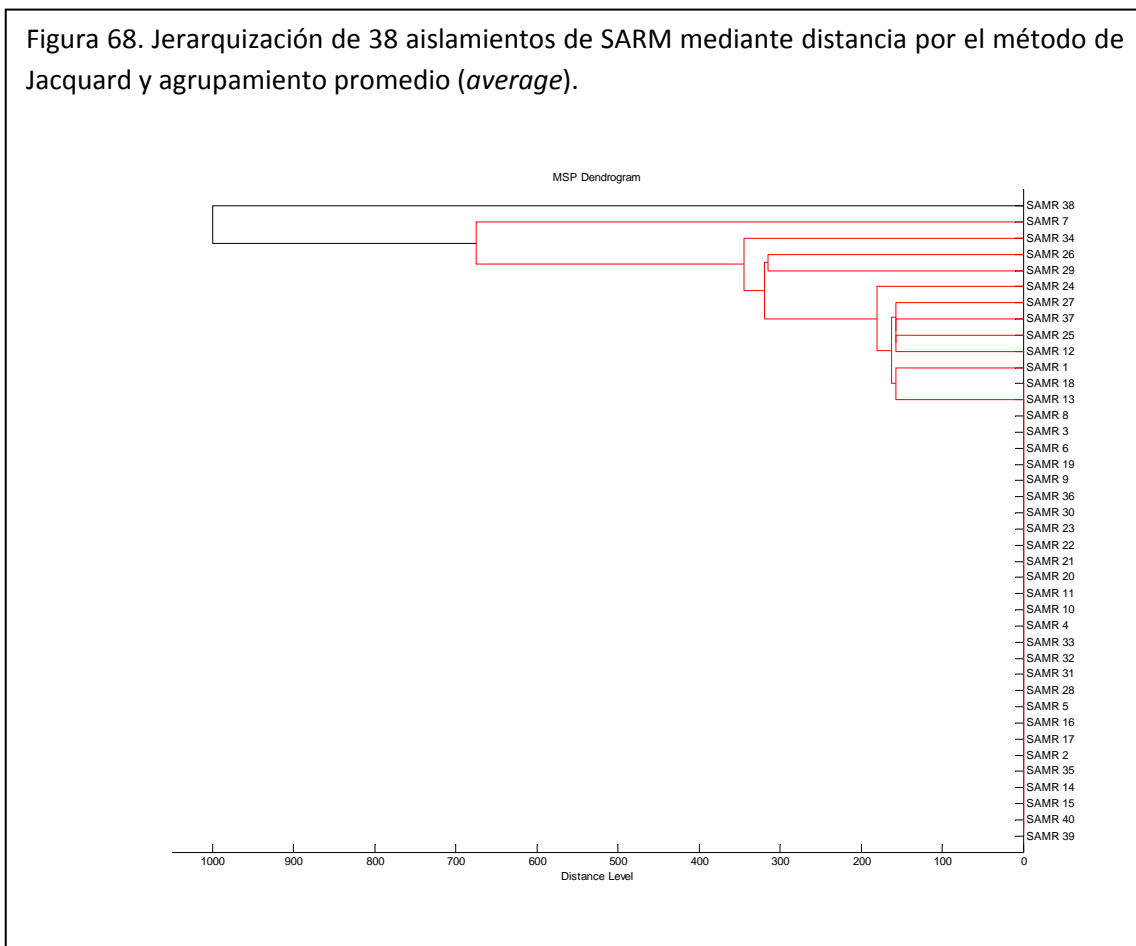


Figura 69. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard y agrupamiento centroide.

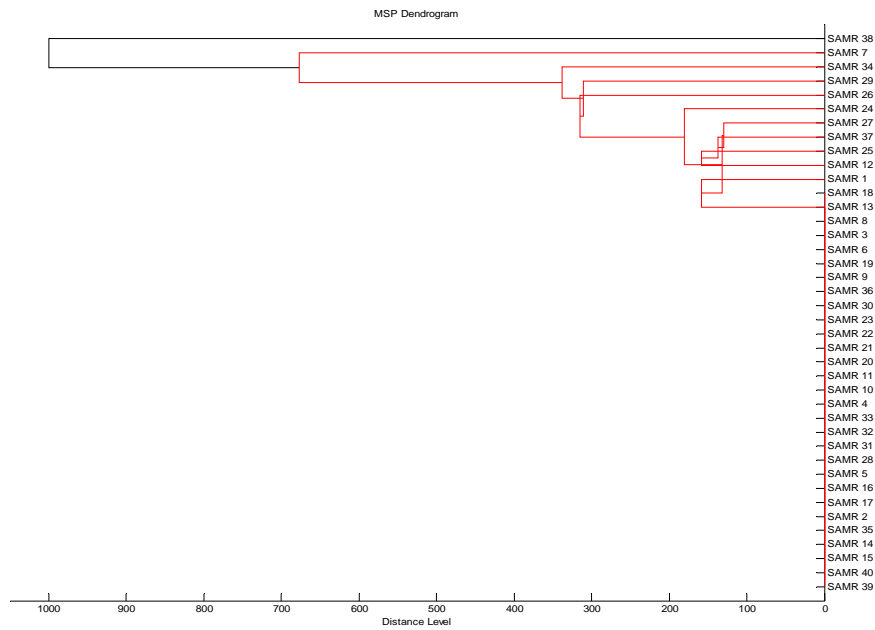
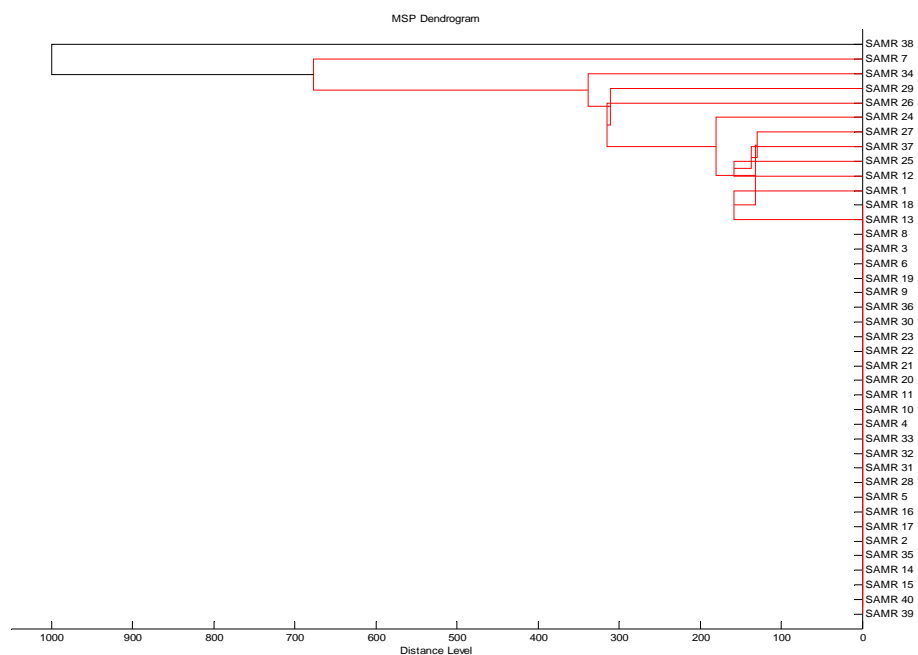


Figura 70. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard



d y agrupamiento completo.

Figura 71. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard y agrupamiento por mediana.

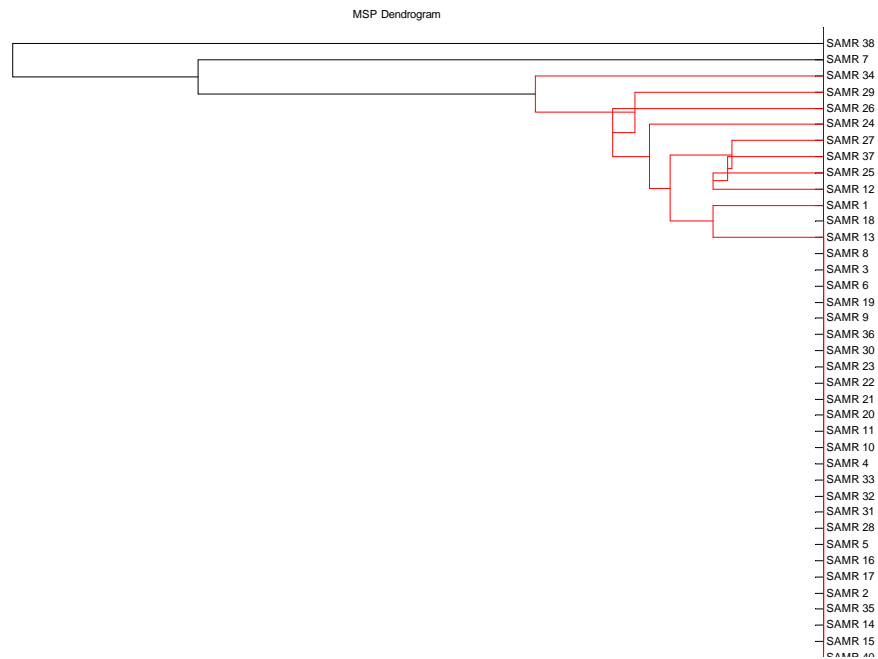


Figura 72. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard y agrupamiento por el método de Ward.

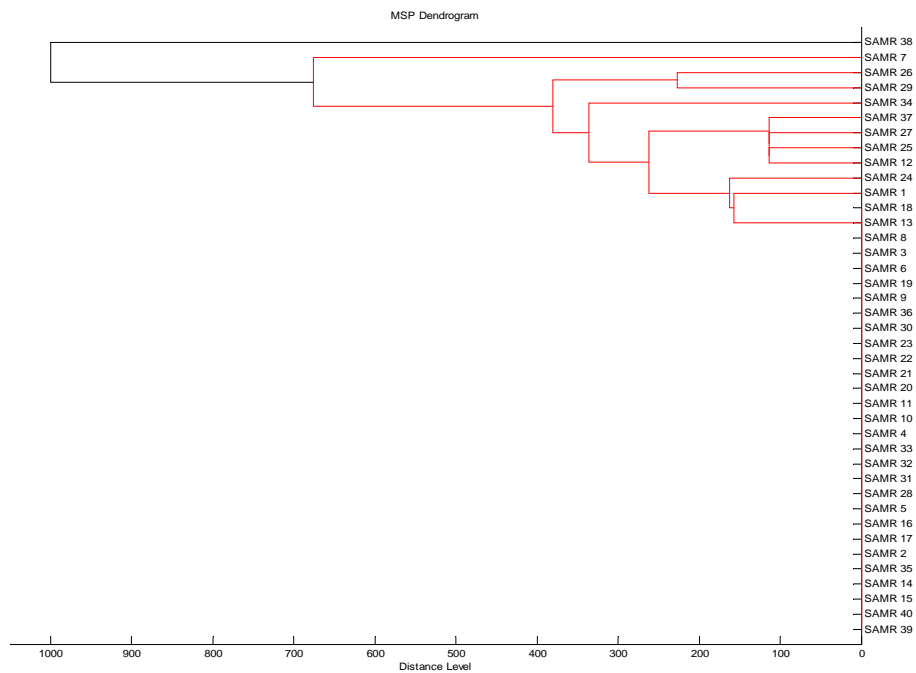
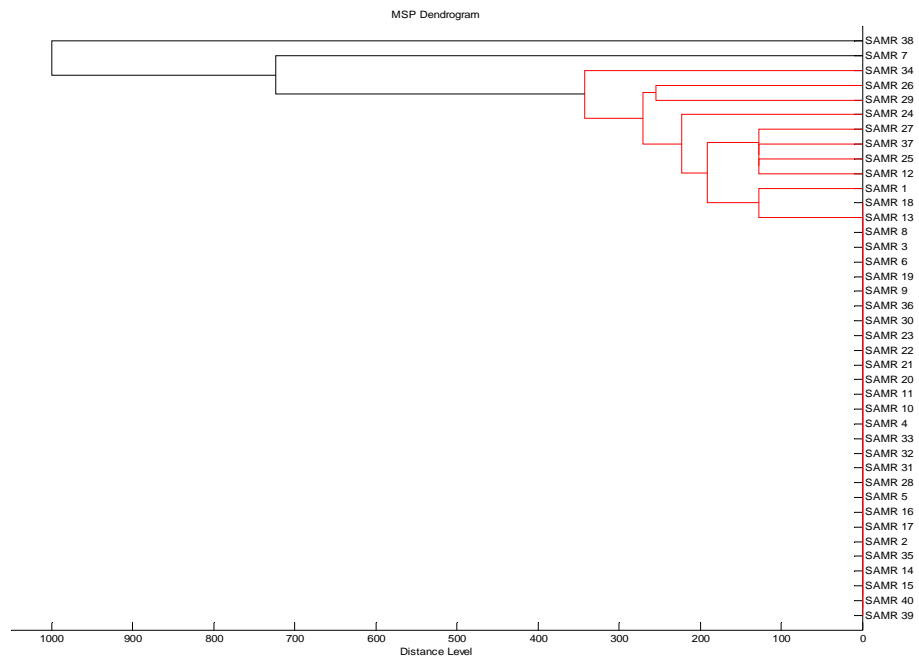


Figura 73. Jerarquización de 38 aislamientos de SARM mediante distancia por el método de Jacquard y agrupamiento *weighted*.



DISCUSIÓN

La taxonomía es la clasificación sistemática de los microorganismos en base a propiedades cuantificables. Inicialmente se utilizaron, con este objetivo, características macroscópicas y microscópicas, metabólicas y antigénicas, para finalmente imponerse en las últimas décadas las características genéticas. Actualmente técnicas como el *multilocus sequence typing* (MLST) *random extragenic palindromic-PCR* (REP-PCR) y sobre todo *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) se han configurado como las técnicas de referencia tanto a fines taxonómicos como para el subtipado de bacterias para estudios epidemiológicos. Por tanto, cualquier técnica que se pretenda aplicar con estos fines tiene, en este momento, que compararse con los métodos genómicos.

Actualmente la EM MALDI-TOF está ampliamente aceptada como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana. Sin embargo, la EM MALDI-TOF proporciona un perfil proteico del microorganismo bastante más amplio y complejo que el que se utiliza a efectos de identificación. A efectos de identificación se utilizan aquellos picos que se corresponden con proteínas presentes en cantidades moderadas o altas, y de forma estable en un género o especie. Los picos proteicos presentes de manera inconstante en una especie pueden responder, en teoría, a diversos factores ajenos a características intrínsecas del microorganismo (medios y condiciones de cultivo, tiempo de crecimiento, factores ambientales), pero podrían también responder a características intrínsecas de grupos de microorganismos, a un nivel inferior al de especie, y por tanto podrían permitir establecer un agrupamiento equivalente al que permiten las técnicas genéticas antes citadas (Muñoz Bellido, 2015).

La posible aplicación de los perfiles bacterianos obtenidos mediante espectrometría de masas a la tipificación y jerarquización bacteriana con fines epidemiológicos lleva años planteada (Murray 2010; Muñoz Bellido 2012). Sin embargo, hasta el momento se han realizado escasos estudios explorando estas posibilidades, y la mayor parte de ellos sobre especies distintas y con diferentes metodologías, lo que dificulta su comparación.

Hace ya más de 15 años que se publicaron los primeros estudios en los que se pretendía tipar cepas de *S. aureus* mediante MS MALDI-TOF, y diferenciar cepas sensibles a meticilina de cepas resistentes (Edward Jones, 2000; Walker, 2002; Jackson, 2005). Aunque los resultados iniciales parecían prometedores, no se han confirmado posteriormente en otros estudios, y actualmente la utilidad del método descrito por estos autores permanece en el aire.

Del mismo modo, se ha publicado la posibilidad de subtipar cepas de *S. pneumoniae*, incluyendo microorganismos no encapsulados o no tipables, mediante EM MALDI-TOF (Williamson, 2008), aunque tampoco ha habido estudios posteriores que corroboren la utilidad del método.

Existe también un estudio (Barbuddhe, 2008) que demuestra que la EM MALDI-TOF es capaz no sólo de identificar correctamente las diferentes especies de *Listeria*, sino también de subtipar todos los aislamientos estudiados con una concordancia absoluta con la clasificación jerárquica obtenida mediante PFGE.

Sin embargo, otros estudios, como los realizados por Tanigawa en relación con *Lactococcus* (Tanigawa, 2010), han demostrado que el método era capaz de identificar las diferentes especies con gran eficacia, pero no de subtiparlas con un nivel de fiabilidad equiparable al de MLST.

Del mismo modo, algunos autores han intentado identificar aislamientos de *Salmonella* a nivel de serotipo mediante MALDI-TOF (Leuschner, 2003; Dieckmann, 2008).

Estos estudios plantean por primera vez los problemas metodológicos que plantea la obtención de resultados reproducibles. Mientras la identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF es un método muy robusto, que no requiere habitualmente un cuidado minucioso de las condiciones y parámetros del estudio para obtener buenos resultados, la tipificación de microorganismos es probablemente mucho más exigente.

Esto tampoco debe sorprendernos, ya que no es muy distinto a lo que ocurrió con las técnicas genéticas hasta su implantación; aún ahora no hay un método de referencia generalizado. Para algunos microorganismos se considera más adecuado MLST, para otros REP-PCR, y para otros sigue siendo insustituible la PFGE. Incluso dentro de los propios estudios de PFGE, diferentes microorganismos requieren distintas enzimas de restricción, distintas condiciones de electroforesis, etc..

En el caso de la EM MALDI-TOF, parámetros técnicos tanto del desarrollo del microorganismo (medio de cultivo utilizado, condiciones y tiempo de cultivo) como de la preparación y desarrollo de la EM (concentración de la matriz, procedimiento de preparación de la muestra, mezcla de matriz y solvente, concentración de ácido añadida a la matriz...) pueden influir en el espectro proteico obtenido. Por último, el software utilizado es probable que también influya en los datos obtenidos. La existencia de tantas variables obliga a buscar y mantener

condiciones de estudio muy específicas para conseguir una reproducibilidad adecuada de los estudios.

Así, en uno de los estudios mencionados sobre *Salmonella* se observa que, para este microorganismo, el ácido sinapínico genera espectro más complejos, y por tanto más informativos que otras matrices (Dieckmann, 2008).

En el presente estudio se incluyeron *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y *A. baumannii* por tratarse probablemente de los dos microorganismos que causan mayores problemas epidémicos en nuestro medio a nivel hospitalario.

Se incluyó asimismo *L. pneumophila* como microorganismo capaz de dar lugar a brotes epidémicos esporádicos, en los cuales es fundamental el subtipado para el estudio del brote.

Los datos obtenidos con *Acinetobacter* en el presente estudio son prometedores, en cuanto que guardan una gran similitud con la jerarquización obtenida por los métodos moleculares convencionales. La agrupación clonal obtenida en las cepas procedentes de Murcia y en las procedentes de Badajoz se ajusta perfectamente a la obtenida mediante PFGE en la mayor parte de los casos. No obstante, se observan excepciones.

Como se observa en las imágenes del capítulo de resultados, la medida de distancia entre puntos por correlación, tanto con jerarquización por promedio como simple, centroide, método de Ward, mediana y *weighted* establece una jerarquización prácticamente idéntica a la PFGE, con la única diferencia de que con varios de estos métodos establece, dentro de ambos clones, un aislamiento que muestra mayor distancia con el resto (106 y 302 respectivamente), pero manteniéndolo siempre dentro del mismo clon.

Sin embargo, cuando se hace un agrupamiento completo, se establecen dos subgrupos dentro del clon B que incluyen las cepas 110, 111 y 113, pertenecientes al clon A según la PFGE.

Del mismo modo, la utilización de la distancia euclídea introduce alguna diferencia menor. Así con una jerarquización centroide, promediada, por mediana, simple y *weighted*, agrupa los aislamientos de forma idéntica a la PFGE, con la diferencia de que los aislamientos 106 y 302, que ya en otros métodos aparecían separados del resto, aunque dentro del mismo clon, aquí aparecen como aislamientos completamente separados. Sin embargo, usando distancia euclídea y jerarquización por el método de Ward, los resultados son prácticamente idénticos a los

obtenidos cuando la distancia se determina por correlación, con estos dos aislamientos, más distanciados que el resto, pero incluidos en el clon correspondiente.

La medida de distancias por el método de Jacquard es la que, al menos con algunos métodos de jerarquización, establece una clonalidad menos clara entre las cepas. Así, el método de jerarquización promediado y el centroide dan lugar a una diferenciación más escalonada entre los aislamientos, además de una localización anómala de algunos con respecto a la clonalidad de referencia de la PFGE.

Otros métodos de jerarquización, como el agrupamiento completo, el agrupamiento por mediana, por el método de Ward o *weighted*, dan por el contrario una jerarquización más clara, pero también con más incongruencias que los otros métodos con respecto a la PFGE.

En relación con los aislamientos procedentes del hospital Infanta Cristina de Badajoz, la PFGE estableció claramente dos clones, que abarcaban respectivamente 3 y 8 aislamientos. En este caso, todos los métodos de medición de distancia, independientemente del método de jerarquización utilizado, han ofrecido un resultado idéntico al obtenido por PFGE. La única matización que se puede hacer en este aspecto es que, aparentemente, la capacidad de discriminación entre aislamientos de los métodos basados en distancia euclídea es mayor, y de nuevo el que ofrece unos resultados algo más pobres es el método de Jacquard, en cuanto que discrimina menos distancias dentro de cada clon.

Esta capacidad de discriminación puede ser importante, en cuanto que algunos estudios (Mencacci, 2013) establecen similitudes entre la proximidad porcentual observada mediante REP-PCR y la observada mediante MALDI-TOF. Así, el estudio citado observa que una similitud en torno al 75% correspondería a la unión en un tronco común en el dendrograma a nivel más o menos del nivel de distancia 100, y una similitud en torno al 55% al nivel de distancia 200.

Quedan no obstante varias cuestiones pendientes para dilucidar definitivamente la utilidad de esta metodología en epidemiología molecular de este grupo de microorganismos. Por una parte, es necesario estudiar grupos de microorganismos más amplios, obtenidos a lo largo de periodos de tiempo más prolongados y con relaciones clonales más complejas para ver el nivel de fiabilidad de esta metodología en estas condiciones. Por otra parte, la exigencia de la PFGE en cuanto a las condiciones de realización de la técnica, que supone un inconveniente relativo por lo que supone de incremento de la laboriosidad de la misma, es al mismo tiempo una de sus grandes ventajas, al facilitar la comparabilidad entre resultados obtenidos en tiempos y

localizaciones dispares, siempre que la metodología utilizada haya sido la misma. Queda todavía por demostrar cómo influye esta circunstancia en la utilidad de la epidemiología a partir de los espectros de EM MALDI-TOF. Probablemente habrá que definir todavía unas condiciones de obtención y procesamiento de la muestra (tiempo de cultivo, medio de cultivo, extracción, etc.) que permitan una reproducibilidad adecuada.

En este aspecto, las pocas publicaciones disponibles son contradictorias. Una publicación realizada en 2013 (Mencacci, 2013) sobre 35 aislamientos organizados en tres clusters mediante rep-PCR, y estudiados mediante jerarquización promediada, encuentra una alta similitud entre la jerarquización proporcionada por ambos métodos.

Por el contrario, un segundo estudio publicado en 2015 (Sousa, 2015) sobre 58 aislamientos pertenecientes a varios clones de difusión mundial (ST98, ST103, ST208, ST218), refleja una insuficiente capacidad del método para discriminar entre microorganismos pertenecientes a diferentes clones. Estos autores refieren encontrar una gran similitud entre microorganismos pertenecientes al mismo clon, pero también entre microorganismos pertenecientes a diferentes clones, de modo que, basados solamente en la presencia/ausencia de picos concretos, no son capaces de encontrar correlación alguna, incluso probando aislamientos ya conocidos como pertenecientes a genotipos distintos. Con el software basado en MatLab^R utilizado por estos autores, el sistema fue capaz de predecir adecuadamente el agrupamiento de hasta el 70% de los aislamientos de algunos genotipos, como el ST98, pero en la mayoría no pasó del 50%.

En el caso de *L. pneumophila* serogrupo 1, ninguno de los métodos de minería de datos aplicados parecen ofrecer resultados equiparables a los obtenidos mediante PFGE. Solamente existe un estudio previo en relación con la posibilidad de utilizar MALDI-TOF para la tipificación de aislamientos de *Legionella* (Fujinami, 2011). El estudio utiliza el software FlexAnalysis y MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) al igual que en el estudio realizado por nosotros. Dicho estudio introduce 10 cepas tipo de *L. pneumophila*, y dos grupos de aislamientos ambientales procedentes de dos colecciones de aislamientos procedentes de colecciones de agua naturales y geográficamente distantes, con 6 y 7 aislamientos respectivamente. En este estudio las cepas tipo quedan separadas claramente mediante PFGE, con niveles de similitud en el dendrograma inferiores al 70%, y agrupa claramente en dos *clusters* las 7 cepas de uno de los grupos y 5 de las 6 del otro, quedando una de las del último con un nivel de similitud de alrededor del 70% con ambos grupos.

El dendrograma obtenido a partir de los datos de la EM MALDI-TOF mediante el software Biotyper establece claramente tres *clusters*. Uno de ellos incluye a 8 de las 10 cepas tipo, con un nivel de similitud bajo, otro con 6 de los 7 aislamientos del primer grupo, junto con uno del 2º grupo y dos cepas tipo, y un 3º con 5 de los 6 aislamientos del 2º grupo y uno de los del 1º. Además, el nivel de similitud interno dentro de cada uno de los *clusters* puede variar bastante entre lo observado a partir de la PFGE y lo observado a partir de la EM MALDI-TOF. Por tanto, pese a los comentarios optimistas de los autores en la discusión de este estudio, los datos de este estudio pueden calificarse sólo de discretos en cuanto a la similitud observada, aunque desde luego justifican un estudio más amplio con un mayor número de aislamientos.

Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio muestran una discordancia importante entre la jerarquización de los aislamientos obtenidos mediante PFGE y la obtenida por EM MALDI-TOF. En general, la EM MALDI-TOF establece un menor número de *clusters*, y la distribución de aislamientos en los *clusters* es muy diferente de la que establece la PFGE. Así, por ejemplo, los aislamientos incluidos en el *cluster* 17 mediante PFGE, aparecen sistemáticamente distribuidos en dos o tres *clusters* distintos mediante EM MALDI-TOF, agrupándose por separado habitualmente los aislamientos 9, 12 y 15 y por otra parte el 17, unido o no al aislamiento 50 y 52. Del mismo modo, los cuatro aislamientos que aparecen situados, mediante PFGE, en el *cluster* 19 (13, 14, 19 y 55), aparecen sistemáticamente dispersos en distintos *clusters* mediante EM MALDI-TOF.

Por el contrario, aislamientos pertenecientes a *clusters* distintos mediante PFGE, como el 49 (*cluster* TD) y el 55 (*cluster* 19), aparecen como casi idénticos mediante EM MALDI-TOF.

Sin embargo, sí es cierto que la jerarquización realizada a partir de la EM MALDI-TOF es considerablemente robusta, en cuanto que se mantiene bastante estable, al menos dentro de cada método de medida de distancia entre puntos, con independencia del protocolo de agrupamiento que se aplique. Así, el grupo que se establece como un *cluster* más claramente diferenciado en todos los agrupamientos a partir de datos de MALDI-TOF (aislamientos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15) se mantiene bastante estable.

Estas discordancias pueden tener varias explicaciones. Por una parte, ha de tenerse en cuenta que se están valorando parámetros biológicos distintos. Mientras la PFGE establece la jerarquización en función del número y tamaño de los fragmentos del genoma generados por la acción de un enzima de restricción, mientras que el caso de la EM MALDI-TOF se establece

en función del tamaño y cantidad de diferentes proteínas dentro de un rango de cocientes m/z. Mientras en el primer caso ya conocemos, por la experiencia acumulada, que existe una importante correlación entre la similitud de los fragmentos generados y la proximidad entre los aislamientos, no tiene por qué ser exactamente así en el caso de la EM MALDI-TOF.

Hay que tener en cuenta que las proteínas, pero sobre la cantidad de las mismas que se produzcan son probablemente un factor más sujeto a cambios que los fragmentos genómicos obtenidos en la PFGE. Seguramente cambios en las condiciones de cultivo, en este caso no en cuanto a medio, pero sí en cuanto a duración, condiciones, etc., puede influir también en los resultados.

Con respecto a los resultados obtenidos para SARM, el MLST generó cinco clones, compuestos por entre 1 y 16 aislamientos y con similitudes entre clones máximas del 93% y mínimas del 50%.

Los métodos basados en medida de distancia mediante correlación establecen dos clones, uno de los cuales agrupa a la mitad de los aislamientos del clon 3 y al clon 4, mientras los clones 1, 2, parte del 3 y el 5 aparecen en un segundo grupo. No obstante, dentro de este grupo se pueden establecer dos subclones, uno que agrupa a la otra mitad del clon 3, y otro que agrupa a la mayoría del clon 1 y el 5. Esta distribución se mantiene uniforme en todas las jerarquizaciones establecidas a partir de distancias medidas por correlación, con la única diferencia de que la subclonalidad en el segundo grupo es más evidente en unos métodos de jerarquización que en otros.

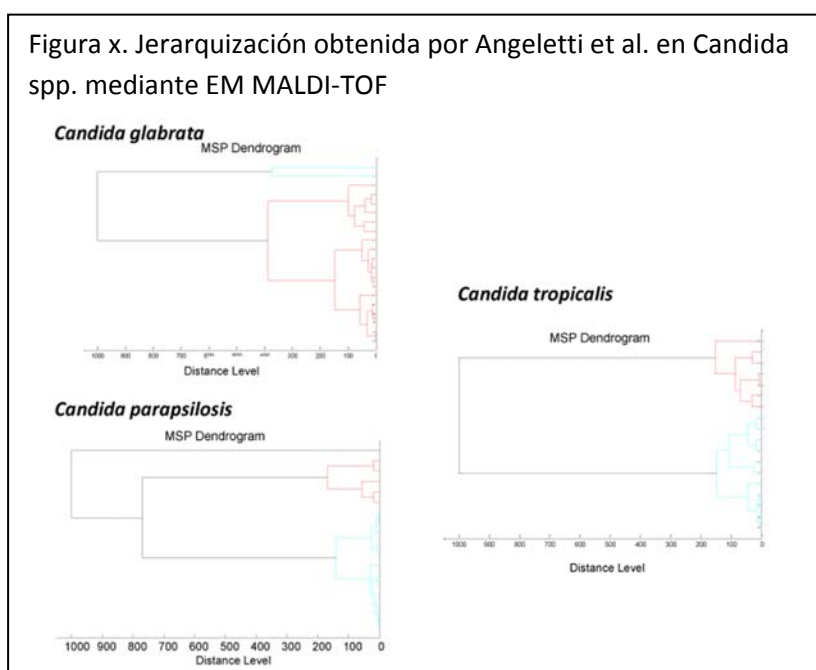
Los métodos de jerarquización basados en distancia euclídea establecen, al igual que el MLST, una clara distancia entre la cepa 38 y el resto. Sin embargo, parecen luego adolecer de una insuficiente capacidad de discriminación, ya que agrupan como idénticos a 28 aislamientos pertenecientes, según el MLST, a cuatro clones distintos.

Los métodos de jerarquización basados en distancia de Jacquard se comportan de forma muy parecida, con 12 aislamientos que se organizan en clones prácticamente individuales, mientras el resto de los aislamientos aparecen como prácticamente idénticos, a pesar de pertenecer, según el MLST, a cuatro clones distintos.

Un estudio reciente (Camoiez, 2015) sobre 95 aislamientos pertenecientes a los principales linajes epidémicos en el hospital de Bellvitge (CC5, CC8, CC22 y CC398), sin embargo, refiere una correlación mucho mayor entre los datos obtenidos mediante técnicas genéticas y la jerarquización obtenida mediante MALDI-TOF. Es cierto que estos autores parten de un planteamiento distinto, ya que identifican una cepa de referencia de cada complejo clonal como perfil de referencia dentro del software de identificación, y posteriormente enfrentan otros estafilococos contra esos representantes de cada complejo clonal como se hace habitualmente para las identificaciones convencionales. No obstante, los resultados avalan la utilización alternativa de este planteamiento para la jerarquización.

Los intentos de utilización de la EM MALDI-TOF con el objetivo de conseguir métodos de subtipado de microorganismos equiparables a los métodos moleculares siguen apareciendo tanto para especies completas como para grupos de microorganismos portadores de factores de patogenicidad o resistencia a antimicrobiano concretos.

Así un estudio reciente aplica también la EM MALDI-TOF también a la identificación y jerarquización de más de 150 aislamientos del género *Candida* (Angeletti, 2015a). Los autores obtienen resultados excelentes desde el punto de vista de la identificación, lo cual no hace sino corroborar resultados obtenidos previamente (Ferreira, 2013; Galán, 2015). Utilizan para los estudios de jerarquización el software Biotyper 3.1 de Bruker Daltonics, con el sistema de comparación que usa por defecto, que es la medida de distancia entre puntos por correlación con jerarquización mediante un algoritmo basado en promedios (*average linkage algorithm*).



De acuerdo con este estudio, *Candida albicans* aparece jerarquizada en una serie de clusters diferentes según hospitales y también en función del tiempo. Una distribución similar se observó para *Candida parapsilosis*, aunque no para *Candida glabrata* ni *tropicalis*. Este estudio tiene la gran limitación de la inexistencia de un método genético de referencia que se pueda utilizar como parámetro de comparación a la hora de determinar la validez de estos aislamientos. Sin embargo, el hecho de que la jerarquización se corresponda con el hospital de origen y con el momento de los aislamientos sugiere que la jerarquización obedece a una proximidad epidemiológica real de los mismos.

Otro estudio reciente (Quirino, 2014) aplica la metodología MALDI-TOF, utilizando el software nativo, sin uso de ningún otro software adicional, para tipar *Ochrobactrum anthropi*, un microorganismo infrecuente como patógeno humano, pero causante de infecciones asociadas a dispositivos externos de creciente descripción, probablemente asociadas a su capacidad de adherencia a la silicona. El uso de medida de distancia por correlación y jerarquización por promedio, usados también en este estudio, ofrece una clasificación similar a la obtenida por REP-PCR, aunque con algunas diferencias que son complicadas de interpretar porque existen pocos estudios relativos a la fiabilidad de los métodos genéticos también en este grupo de microorganismos.

Otros autores (Groves, 2015) han planteado otro tipo de estrategia para la jerarquización de microorganismos. Así, estudios recientes sugieren que la utilización de una metodología mixta, en la que los amplificadores obtenidos mediante PCR con primers utilizados habitualmente para MLST son después estudiados mediante EM MALDI-TOF. Estos autores obtienen unos resultados prometedores con *Streptococcus suis*, pero el método no ha sido todavía probado con otros microorganismos.

Quizá una de las aplicaciones en las que la jerarquización de aislamientos mediante EM-MALDI-TOF está siendo más investigada en el seguimiento de brotes epidémicos ocasionados por microorganismos portadores de mecanismos de resistencia a antimicrobianos concretos. Así una publicación reciente es capaz de diferenciar dos clones dentro de un pequeño brote de *E. coli* productor de BLEEs, mediante un algoritmo basado en distancia euclídea y jerarquización simple, con resultados prácticamente idénticos a los de la PFGE (Egli, 2015). Otro estudio reciente sobre un grupo de aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas, realizado mediante medida de distancia entre puntos por correlación con jerarquización mediante un algoritmo basado en promedios (*average linkage algorithm*), clasifica los

aislamientos claramente en dos grupos clonales, que tienen una correlación temporal, pero la correlación con la clasificación obtenida mediante MLST es mediocre (Angeletti, 2015b).

La metodología bioinformática utilizada es probablemente uno de los extremos más pendientes de definir en este momento. El estudio sobre *Candida* al que se hace referencia más arriba (Angeletti, 2015a) utiliza un algoritmo basado en distancia por correlación y jerarquización promediada, este último sobre aislamientos productores de BLEE utiliza distancia euclídea con jerarquización simple, y otros estudios utilizan otras metodologías sin que hay un criterio claro sobre cual utilizar. Evidentemente, deben ser criterios que estén claramente definidos *a priori*, y no *a posteriori*, una vez observados y comparados los resultados.

Probablemente los algoritmos no puedan ser los mismos para cualquier aplicación epidemiológica basada en MALDI-TOF, del mismo modo que la metodología de epidemiología molecular de referencia no es la misma para todos los microorganismos. Sin embargo, sí se tendrán que ir definiendo unos criterios estables y preestablecidos que definan la metodología a utilizar en cada tipo de estudio de forma uniforme y global.

Un problema similar ocurre con la identificación de microorganismos con características de patogenicidad determinadas. Así recientemente se ha utilizado la EM MALDI-TOF para identificar un clon de *E. coli*, el ST 131, perteneciente al filogrupo B2, y que ha sido uno de los principales responsables de la diseminación de *E. coli* productor de BLEEs en la última década (Lafolie, 2015). Estos autores basan la pertenencia a este grupo en la presencia de una serie de picos específicos mediante algoritmos concretos, y consiguen una sensibilidad y una especificidad altas, en torno o por encima del 90%. Sin embargo, además de que será probablemente necesario ampliar el número de aislamientos probados (el estudio prueba 105 aislamientos pertenecientes tanto a este como a otros tipos de secuencia) para comprobar su validez, y comprobar su estabilidad en el tiempo, va a ser necesario buscar algoritmos de uso más universal, que permitan confirmar la pertenencia a clones o grupos concretos de diferentes microorganismos con mínimas modificaciones técnicas, para que esta tecnología sea operativa en este campo.

En otro estudio también relativo a la asignación de *E. coli* a diferentes filogramas (Sauget, 2014). Estos autores plantean dos estrategias, una mediante un dendrograma creado con el software Biotyper de Bruker Daltonics, y otra con el software ClinProTools. Con el primero, se consigue una sensibilidad del 96% con una especificidad del 84% en cuanto a la asignación al filogrupo B2 o al resto. Sin embargo, el resto de filogramas no hubo posibilidad de distinguirlos entre ellos.

Los estudios realizados con ClinProTools permitieron una mayor diferenciación entre los grupos distintos del B2, pero la eficacia no fue tampoco del 100%.

Esta misma estrategia la aplican los mismos autores (Cabroler, 2015) para identificar la pertenencia de aislamientos de *P. aeruginosa* a clones de alto riesgo. Identifican una serie de picos o combinaciones de picos característicos de cada clon, y a partir de ellos intentan asignar aislamientos no tipados a clones concretos. Como en el caso de *E. coli*, algunos clones son bastante bien diferenciados, mientras que la asignación de otros tiene un valor predictivo positivo bajo, inferior al 60%, aunque un valor predictivo negativo alto.

Estrategias similares se han utilizado para reconocer microorganismos implicados en brotes epidémicos por la presencia de picos característicos. Así algunos autores han desarrollado un método rápido capaz de detectar cepas portadoras de un plásmido codificador de carbapenemasas por la presencia de un pico específico (Lau, 2014). Una circunstancia similar se da en los estudios realizados por Matsumura (Matsumura, 2014) para la identificación de *E. coli* ST 131 y ST405, productores de BLEEs.

Sin embargo, se trata de un procedimiento poco aplicable en epidemiología a nivel general, ya que el procedimiento de detección e identificación del pico específico asociado a la presencia del plásmido es lento y complejo, y el método permite además identificar específicamente a los microorganismos asociados a ese brote epidémico concreto, pero tiene una utilidad mucho menor a efectos epidemiológicos a nivel general. Por otra parte, ha de tenerse en cuenta que los plásmidos son elementos genéticos con un intercambio de información extremadamente activo, en los que la entrada o salida de información puede modificar las características de las proteínas codificadas y por tanto de los picos detectados, alterando la capacidad de detección, que ha de considerarse por tanto posiblemente útil para situaciones epidémicas concretas, pero probablemente limitado en el tiempo.

Por otra parte, en estudios como el de Matsumura es prácticamente imposible comparar los STs objeto de estudio con todo el resto de STs, con lo que no es posible asegurar al 100% que un aislamiento portador del pico asociado al ST pertenezca al mismo. Si se corrobora su estabilidad, sería más factible lo contrario, es decir, asegurar que un microorganismo no portador de ese tipo no pertenezca a esos serotipos.

En todo caso, parece que esta tecnología funciona mejor cuando se trata de reconocer la pertenencia a grupos específicos, que software como ClinProTools pueden aprender a reconocer, en general a partir de la presencia de picos específicos. Sin embargo, el agrupamiento y jerarquización internos de grupos de microorganismos de origen desconocido parece tener más dificultades.

CONCLUSIONES

-
1. La EM MALDI-TOF demostró ser equiparable a las técnicas establecidas como referencia, PFEG y Rep-PCR, en el estudio de la proximidad entre aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*.
 2. Esta agrupación parece además mantenerse de forma bastante robusta con independencia de la metodología estadística y de minería de datos utilizadas, que introducen solamente diferencias menores en la jerarquización.
 3. Dadas las discrepancias entre las publicaciones, se imponen estudios más amplios con el fin de determinar la fiabilidad del método a mayor escala, y la posible influencia, no estudiada de los medios, condiciones y tiempos de cultivo en los resultados obtenidos.
 4. La jerarquización obtenida en aislamientos de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 se ajusta mucho menos a la jerarquización obtenida por métodos moleculares.
 5. Las diferentes estrategias de minería de datos utilizadas alteran sólo moderadamente la jerarquización, que en ningún caso se aproxima a las obtenidas por métodos moleculares.
 6. Por tanto, discrepamos de lo publicado por Fujinami con respecto a la utilidad de esta metodología para la jerarquización de *Legionella*, al menos con la estrategia de minería de datos usada. Cabe la posibilidad de que otros *software* diseñados específicamente puedan aproximarse más a la jerarquización molecular.
 7. Los datos obtenidos tampoco sugieren que se trate de una metodología útil, en este momento y con el *software* utilizado, para la jerarquización de *S. aureus* resistente a meticilina. La clasificación obtenida discrepa sensiblemente de la obtenida mediante MLST con todas las aproximaciones bioinformáticas utilizadas.
 8. Se requieren todavía amplios estudios para valorar la posible utilización de esta tecnología para la jerarquización de microorganismos, incidiendo probablemente en una protocolización exhaustiva de medios, tiempos y condiciones de cultivo, así como de la aproximación bioinformática utilizada, que probablemente tendrá que ser diferente para distintos grupos de microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo J. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques?. *Infect Genet Evol.* 2012: 345-349.
2. Anbumani S, Gururajkmuar A, Chaudhury A. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical and environmental sources in a tertiary care hospital. In *Jour Medi Res.* 2010: 761-764.
3. Angeletti S, Presti AL, Cella E, Dicuonzo G, Crea F, Palazzotti B, Dedej E, Ciccozzi M, De Florio L. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize candida clinical isolates. *J Microbiol Methods.* 2015: S0167-7012: 30106. [Epub ahead of print]
4. Angeletti S, Dicuonzo G, Lo Presti A, Cella E, Crea F, Avola A, Vitali MA, Fagioni M, De Florio L. MALDI-TOF mass spectrometry and *bla*_{KPC} gene phylogenetic analysis of an outbreak of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains. *New Microbiol.* 2015 Oct 20; 38 (4). [Epub ahead of print]
5. Anhalt J, Selau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975; 47: 219-225.
6. Arvand M, Jungkind K, Hack A. Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimension? *Euro Surveil.* 2011; 16: 1-6.
7. Barbuddhe S, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domamn E, Chakraborty T, Hain T. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008: 5402-5407.
8. Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y AcadSci.* 2013; 1277:139–58.
9. Benito J, Montejo J, Cancelo L. Neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* sergrupo 1. Estudio de 97 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2003: 394-400.
10. Birren B, Lai E. Pulsed-field gel electrophoresis. A practical guide. San Diego, CA, EEUU: Academic Press Inc; 1993.
11. Biswas S, Rolain J. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods.* 2013; 92:14-24.
12. Bizzini A, Durssel C, Bille J. Performance of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010: 1549-1554.

13. Blanc D. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol.* 2004; 193-197.
14. Blyth C, Adams N, Chen S. Diagnosis and typing methods for investigating *Legionella* infection. *N S W Public Health B.* 2009; 20: 157-161.
15. Cabrolier N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 3095-3098.
16. Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2015, doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.009.
17. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp). *Enferm Infec Microbiol Clín.* 2013; 31: 543-551.
18. Carbonnelle E, Beretti J, Cotty S, Quesne G. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2007: 2156-2161.
19. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem.* 2011;44: 104-9.
20. Carratalà J, Garcia-Vidal C. An update on *Legionella*. *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23: 152-7.
21. Cassagen C, Ranque S, Norman AC, Fourguet P, Thiebault S, Planard C, Hendrickx M, Piarroux R. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Plos One.* 2011. 6(12): e28425.
22. Castellano M, Perozo A, Vivas L. Tipificación molecular y fenotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SAMR) en un hospital universitario. *Rev Chil Infect* 2009; 26: 39-48.
23. Cercenado E, Ruiz-Gopegui E. *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina de origen comunitario. . *Enferm Infec Microbiol Clín.* 2008; 26: 19-24.
24. Chambers H, Sachdeva M, Kennedy S. Binding affinity for penicillin-binding protein 2a correlates with in vivo activity of beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 1990; 162:705-710.
25. Chambers H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mechanisms of resistance and implications for treatment. *Postgrad Med.* 2001: 43-50.

-
26. Chambers H. Methicilin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 781-791.
27. Chang M, Dawn M, Sievert M, Jeffrey C, Hageman M. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the van A resistance gene. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1342-1347.
28. Cho M, Kim H, An D, Lee M, Noh SA, Kim MN, Chong YP, Woo JH. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. *Ann Lab Med.* 2012; 32:133-8.
29. Claydon M, Davey S, Edwards-Jones V, Gordon D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotech.* 1996; 14: 1584-1586.
30. Coscolla M, González-Candelas F. Direct sequencing of *Legionella pneumophila* from respiratory samples for sequence-based typing analysis. *Clinical Microbiol.* 2009; 47: 2901-2905.
31. Crnich C, Duster M, Warrack S, Maki D, Safdar N. Comparison of pulsed-gel electrophoresis and a commercial repetitive-element PCR method for assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clustering in different health care facilities. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 2027–2032.
32. Degand N, Carbonelle E, Dauphin B. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clinical Microbiol.* 2008: 3361-3367.
33. Delgado M, Fernández P, Batista N, Pascual A. Variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: utilidad de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32: 96–98.
34. Deurenberg R, Stobberingh E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008; 8:747-63.
35. Di Nocera P, Rocco F, Glannouli M, Triassi M. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 224.
36. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of Salmonellae at the species and subspecies levels by whole cell matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 7767–7778.

37. Doughari H, Ndakidem P, Human S. The ecology, biology and the pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 2011; 26: 101-112.
38. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:1620-1625.
39. Dubois D, Leyssene D, Chacornac J, Kostrzewa M, Schmit P, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 941-945.
40. Dupuy M, Mazoua S, Berne F, Bodet C, Garrec N, Herbelin P. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res.* 2011; 43: 1087-1094.
41. Edwards-Jones V, Claydon M, Evason D, Walker J, Fox A, Gordon B. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal Med Microbiol.* 2000; 49: 295-300.
42. Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli*--a novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS One.* 2015;10 :e0120624.
43. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab.* 2009; 55:289-96.
44. Emonet S, Shah H, Cherkaoui A, Schrenze J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 1604-1613.
45. Enright M, Day N, Davies C. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 1008-1015.
46. Enright M, Spratt B. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 1999; 7: 482-487.
47. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva (ENVIN). 2014.
48. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015.

-
- 49.Fenselau C, Demirev P. Characterization of intact microorganisms by maldi mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.*2001; 20: 157-171.
- 50.Fernández F, Tomás M, Caballero F, Bou G, Martínez L, Vila. J. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010).
- 51.Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2004; 22: 335-360.
- 52.Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González M, Cembrero D, Herrero A, Muñiz MC, González-Buitrago J, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J ClinMicrobiol.*2010; 48: 2110-2115.
- 53.Ferreira L, Vega S, Sanchez J, Gonzalez S, Mengotto F, Orduña A, Gonzalez J, Muñoz J. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLOS One.* 2010; 5(12): e14235.
- 54.Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Vega S, González M, García MI, Rodríguez S, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Identification of fungal clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26: 193-197.
- 55.Fields B, Benson R, Besser R. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 506-526.
- 56.Finegold S, Sweeney E. New selective and differential medium for coagulase-positive staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation. *J Bacteriol.*1961; 81:636-641.
- 57.Fitzgerald JR. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. *Infect Gen Evol.* 2014; 21: 542-547.
- 58.Fraser D. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J.* 1977; 297: 1189-1197.
- 59.Friedrichs C, Rodolf A, Chhatwal G, Schellenberger W, Eschrich K. Rapid identification of viridians streptococci by mass spectrometric discrimination. *JClinMicrobiol.*2007; 45: 2392-2397.
- 60.Fujinami Y, Kikkawa H, Kurosaki Y et al. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res* 2011; 166: 77-86.

61. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, Rodríguez-Iglesias M. Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33: 372-378.
62. Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González P, Jiménez P, Rodríguez M, López R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandron B, Pelaz C. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 915-921.
63. Golding G, Campbell J, Spreitzer D, Chui L. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol*. 2015;1301:85-93.
64. González Buitrago JM, Ferreira L. Proteómica clínica. Barcelona: Edición Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2006.
65. Groves MD, Jordan D, Chapman TA, Jassim RA. Multilocus sequence typing of Australian *Streptococcus suis* type 2 by MALDI-TOF mass spectrometry analysis of PCR amplicons. *Vet Microbiol*. 2015;177:394-397.
66. Grundmann H, Towner K, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 3071-3077.
67. Henze U, Berger-Bächi B. *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 and intrinsic beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:2415.
68. Hettick J, Kashon M, Simpson J, Siegel P, Mazurek G, Weissman D. Proteomic profiling of intact mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004; 76: 5769-5776.
69. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E. Update on Legionnaires disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Molecular Microbiol*. 2010; 76:1: 1-11.
70. Ho J, Boost M, O'Donoghue M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28:603-61.
71. Hoffstadt RE, Youmans GP. *Staphylococcus aureus*: Dissociation and its relation to infections and to immunity. *J Infect Dis*. 1932;51:216-42.
72. Hollenbeck B, Dupont I, Mermel L. How often is a work-up for *Legionella* pursued in patients with pneumonia? A retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2011: 11-237.
73. Hsieh S, Tseng C, Lee Y. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7: 448-456.

-
74. <http://www.bacterio.net/List of Procaryotic Names with Standing in Nomenclatura>.
75. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada H, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010; 465:346-349.
76. Jackson K, Edwards-Jones V, Sutton C, Fox A. Optimization of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*. 2005; 62:273-84.
77. Jamkilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F. *Legionella*, Legionnaires' disease. *Med Sci*. 2012; 28: 639-645.
78. Jarman K, Cebula S, Saenz A. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000; 72: 1217-1223.
79. Javed S, Chaudhry R, Passi K. Sero diagnosis of *Legionella* infection in community acquired pneumonia. *Indian J Med Res*. 2010; 131: 92-96.
80. Josten M, Reif M, Szekat C, Al-sabit N, Roemer T, Sparbier K, Kostrzewa M, Rodhe H, Sahl H, Bierbaum G. Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51:1809-1817.
81. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988; 60: 2299-2301.
82. Kemp M, Jensen KH, Dargis R. Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria. *Future Microbiol*. 2010 Jul;5(7):1101-7.
83. Kempf M, Bakour S, Flaudrops S. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Plos One*. 2012; 7: e31676.
84. Keys C, Dare D, Sutton H, Wells G, Lunt M, Mckenna T, Mcdowall M, Sah H. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol*. 2004; 4: 221-242.
85. Kima B, Andersona J, Muellera S, Gainesb W, Kendallb A. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research*. 2002; 18: 4433-4444.

- 86.Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J ClinMicrobiol*.2005; 43:1956–9.
- 87.Kirby W. Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*.*Science*.1944; 99: 452-453.
- 88.Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15: 397-402.
- 89.Kmeid JG, Youssef MM, Kanafani ZA, Kanj SS. Combination therapy for Gram-negative bacteria: what is the evidence? *.Expert Rev Anti InfectTher*. 2013; 11:1355.
- 90.Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Witte W, Friedrich AW. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* .*Euro Surveill*.2014; 19:20860.<http://www.eurosurveillance.org>.
- 91.Labarca J. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev ChillInfect*; 19: 157-160.
- 92.Lafolie J, Sauget M, Cabrolie N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies?. *J Hosp Infect*. 2015; 90:2082-12.
- 93.Lange, C Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative MALDI-TOF MS for rapid resistance detection. *J ClinMicrobiol*. 2014; 52: 4155–4162.
- 94.Lartigue M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol*. 2013; 13:230-235.
- 95.Lasch P, Nattermann H, Echard M, Stammler M, Grunow R, Bannert M, Appel B, Naumann D. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal Chem*. 2008; 80: 2026-2034.
- 96.LaScola B, Fournier P, Raoult D. Burden of enaming anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era.*Anaerobe*.2011; 106-112.
- 97.Lau AF, Wang H, Weingarten RA, Drake SK, Suffredini AF, Garfield MK, Chen Y, Gucek M, Youn JH, Stock F, Tso H, DeLeo J, Cimino JJ, Frank KM, Dekker JP. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-

- plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:2804-2812.
- 98.Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Mohler MJ, Wendel CS, Lipsky BA. Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29:1288-93.
- 99.LeBlanc L, Pepin J, Toulouse K. Fluorquinolones and risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1398-1405.
- 100.Leuschner RGK, Beresford-Jones N, Robinson C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol* 2003; 38: 24–31.
- 101.Linksvon E. *Staphylococcus aureus* small-colony variants: a challenge to microbiologist and clinicians. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31: 507-510.
- 102.Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res.* 2002; 36: 4433-4444.
- 103.Lowy D. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 1998; 339:520-532.
- 104.Luck C. *Legionella*- a case for culture. *In J Med Res.* 2010; 131: 736-738.
- 105.Luck P, Dinger E, Helbig J, Thurm V, Heuchel H, Presch C, Ott M. Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994; 13: 565-571.
- 106.Machanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis.* 2010; 2: 291-304.
- 107.Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:268.
- 108.Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:S27-72.
- 109.Mangali A, Bica I, Snyderman D. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriemia. *Clin Infect Dis.* 2005;40: 1058-1060.

110. Marchesi I, Marcgegiano P, Bargellini S, Cencetti S. Effectiveness of different methods to control *Legionella* in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *J Hosp Infect.* 2011; 77: 47-51.
111. Marlein G, Josten M, Klanke U, Müller E. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2912-2917.
112. Martson B, Lipman H, Breiman R. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* 1994; 154: 2417-2422.
113. Marvin L, Roberts M, Fay L. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta.* 2003; 337:11-21.
114. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 1034-1040.
115. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tair TR, Redus MA, Dowdel WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in the other respiratory disease. *N Engl J.* 1977; 297: 1197-1203.
116. Mehndiratta P, Bhalla P. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. *In J Med Microbiol.* 2012; 30: 16-23.
117. Meka V, Gold H. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1010-1015.
118. Mellman A, Cloud J, Maier T, Keckevoet I, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Hall G, Wilson D, LaSala P, Kostrzewa M, Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008; 50: 1946-1954.
119. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, Cacioni M, Buzi S, Nardelli E, Bistoni F, Sanguinetti M, Vecchiarelli A. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 603-606.
120. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez-Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, Gomez J, Parra J, Candel J, Aranza J, Garcia JE, Marco F, Soy D, Grau S, Arias J, Foturn J, Aristides C, Picazo J. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter.* 2013; 26: 1-84.

-
- 121.Mesa M, Soriano A, Llinares P, Barberán J y col. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. RevEspQuimioter.2013; 26: 1-84.
- 122.Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece.Clin Infect Dis. 2011; 53: 177-184.
- 123.Moliner C, GinevraC, Jarraud S. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry.J MedMicrobiol.2010; 59: 273-284.
- 124.Morales G, Picazo J, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2010;50:821–5.19.
- 125.Muñoz Bellido JL, Silvia Vega S, Ferreira L, Sánchez Juanes F, González Buitrago JM. Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30: 383-393.
- 126.Muñoz-Bellido JM, González-Buitrago JM.MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Current situation and future perspectives. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015; 33: 369-371.
- 127.Murray P. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 1626-1630.
- 128.Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J AntimicrobChemother.2007; 59:772-775.
- 129.Newton H, Ang D, Van Driel I. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 274- 298.
- 130.Noble W, Virani Z, Cree R. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*.FEMS Microbiol Lett. 1992 Jun 1;72:195-8.
- 131.O’Neill E, Humhpreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence?. J Hosp Infect.2005; 59: 273-279.
- 132.Olive M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J ClinMicrobiol.1999; 37: 1661-1669.
- 133.Pahisa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Barcelona: IGG Marge, SL. 2009
- 134.Parisi D, Magliulo M, Nanni P. Analysis and classification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and a chemometric approach. Anal Bioanal Chem. 2008; 391: 2127-2134.

135. Pavlovic M, Huber I, Konrad R, Busch U. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *OpMicrobiol J*. 2013; 7:135-141.
- 136.
137. Peiro E, Darpo J, Santos JM, Ezpeleta C, Pérez B. Evaluation of the effectiveness of the Pastormaster method for disinfection of Legionella in a hospital water distribution system. *JHosInfec*. 2005; 60: 150–158.
138. Perez F, Ponce-Terashima R, Adams M. Are we closing on an “elusive enemy”? The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 2011; 2: 86-90.
139. Porras I, Cañueto J, Ferreira L, García MI. Dermatofitosis humana. Primera descripción en España y diagnóstico mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. *EnfermInfeccMicrobiolClin*. 2010; 28:747-748.
140. Post V, Wahl P, Ochsner P, Zimmerli W, Corvec S, Loiez C, Richards R, Moriarty T. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Inter J Med Microbiol*. 2014; 304: 565- 576.
141. Posteraro B, De Carolis E, Vella A. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics*. 2013; 10:151-64.
142. Prasad P, Sun J, Danner RL, Natanson C. Excess deaths associated with tigecycline after approval based on non inferiority trials. *Clin Infect Dis* 2012; 54:1699.
143. Quirino A, Pulcrano G, Rametti L, Puccio R, Marascio N, Catania MR, Matera G, Liberto MC, Focà A. Typing of *Ochrobactrum anthropi* clinical isolates using automated repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction DNA fingerprinting and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 74.
144. Rafiee M, Jahangiri-rad M, Hajjara H. Detection and identification of Legionella species in hospital water supplies through polymerase chain reaction (16S ARNr). *J Environ Health Science E*. 2014; 12:83.
145. Ragoussis J, Elvidge G, Kaur K. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLOS Genet*. 2006; 7: e100.
146. Rasigade P, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013; 21, 2014, 510–514.
147. Risch M, Radjenovic D, Han J, Wydler M, Nydegger U, Risch L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly*. 2010; 140: w13095.

-
148. Rivera J, Aguilar M, Granizo J, Vos- Arenilla A, Gimenez M, Aguilar J, Prieto J. Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. *J Hosp Infect.* 2007; 67: 360-366.
149. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Álvarez-Lerma F y col. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *EnfermInfeccMicrobiolClin* 2008; 26:285-98
150. Roig J, Sabria M, Pedro-Botet M. *Legionella* spp.: community acquired and nosocomial infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16: 145-151.
151. Sabria M, Yu V. Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:368-73.
152. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 74-82.
153. Sauget M, Nicolas-Chanoine MH, Cabrol N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304: 977-9883.
154. Schlebusch S, Price G, Hinds S. First outbreak of PVL-positive non multiresistant MRSA in a neonatal ICU in Australia: comparison of MALD-TOF and SNP-plus-binary genotyping. *J ClinMicrobiol Infect Dis.* 2010; 29: 1311-1314.
155. Sedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 2011; 30:417-34.
156. Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Spletsoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J ClinMicrobiol.* 2010; 48: 1061–1069.
157. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola , Fournier, P, Rolain J, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 543-51.
158. Seng P, Rolain J, Fournier P. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010; 5:1733-54.
159. Skinner D, Chester S, keefer M. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med.* 1941; 68:851-875.
160. Skoog A, James Roller F, Crouch S. Principios del análisis instrumental. 2000.

161. Snelling A, Gerner-Smidt P, Hawkey P, Heritage J, Parnell P, Porter C, Bodenham A, Inglis T. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1193-1202.
162. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray. PR, Baron. EJ, Jorgensen. JH. *Manual of Clinical Microbiology.* 8ª edición. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003; pp 139-161.
163. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol.* 2015 19; 6: 481.
164. Sparbier k, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 3741–3748.
165. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg.* 2011; 66:267-73.
166. Stevenson L, Drake S, Murray P. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 444-447.
167. Stingu C, Rodolff A, Jentsch H. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF MS. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 372-376.
168. Szabados F, Woloszyn J, Richter C, Kaase M, Gatterman S. Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J Med Microbiol.* 2010; 59: 787-790.
169. Tanigawa K, Kawabata H, Watanabe K. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 4055– 4062.
170. Tenover F, Arbeit R, Goering R. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233–2239.

-
171. Ternover F, Arbeit R, Archer G, Biddle J. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1994; 407-415.
172. Ternover F, Arbeit R, Goering R. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect C Hos Epidemiol*. 1997; 18: 426-439.
173. Ternover F, Arbeit R, Goering R. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produce by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233-2239.
174. Tomasz A, Drugeon H, de Lencastre H. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:1869.
175. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:1869-74.
176. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28:603-661
177. Towner K. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009; 73:355-363.
178. Ueda O, Tanaka S, Nagasawa Z, Hanaki H, Shobuike T, Miyamoto H. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Hosp Infect*. 2015; 90: 147-155.
179. Van Baar B. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electro spray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev*. 2000; 24:193-219.
180. Van Belkum A, Kluytmans J, Leeuwen W, Bax R. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1995: 1537-1547.
181. Van Veen S, Claas E, Kuijper E. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 900-907.
182. Vazquez J, Berrón S. Multilocus sequencing typing: el marcador molecular de la era de internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22: 113-120.

- 183.Vega S, Ferrreira L, González M, Sánchez F, García MI, García JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30: 597-601.
- 184.Verroken A, Jansen M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T, Wauters G, Glupczynski Y. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J ClinMicrobiol*.2010; 48: 4015-4021.
- 185.Viasus D, Di Yacovo S, Garcia-Vidal C, Verdaguer R, Manresa F, MD, Dorca F, Gudiol F, CarratalaJ.Community-AcquiredLegionellapneumophilaPneumonia. *Medicine*.2013; 92:51-60.
- 186.Vila J, Marcos A, Jimenez de Anta M. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J Med Microbiol*.1996; 44: 482-489.
- 187.Vila J, Pachón J. *Acinetobacter baumannii* resistant to everything: what should we do?.*Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 955-956.
- 188.Villar M, Cano M, Gato E, Garnacho-Montero J, Cisneros J, Ruiz, C, Fernández-Cuenca F. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. GEIH/GEMARA/REIPI-Ab20101 Group. *Medicine*.2014; 93: 202-210.
- 189.Vindel A, Cuevas O, Cercenado E. Methicilin-reisistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J ClinMicrobiol*.2009; 47: 1620-1627.
- 190.Vorm O, Roepstoff P, Mann M. Improved resolution and very high sensivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal Chem*. 1994; 66: 3281-3287.
- 191.Walker J, Fox A, Edwards-Jones V, Gordon D. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods*.2002; 48:117-26.
- 192.
- 193.Welker M, Moore E. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol*. 2011; 34:2-11.
- 194.Wieser A, Schneider L, Jung J. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*.2012; 93:965-74.
- 195.Williamson Y, Moura H, Woolfitt A, Piekle J, Barr J, Carvahlo G, Ades E, Carlone G, Sampson J. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates

-
- by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 5891-5897.
196. Wojewoda C. Pathology consultation on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for microbiology. *Am J Clin Pathol.* 2013; 140: 143-8.
197. Yarwood M, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 2003; 112:1620-5.
198. Yates J. Mass spectrometry from genomics to proteomics. *TIG* 2000; 16: 1.
199. Zhang L, Borrer, C, Sandrin T. A designed experiments approach to optimization of automated data acquisition during characterization of bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 2014; 9(3): e92720.

ANEXOS

Anexo I. Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extracto

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (antes NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards)

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Da: Daltons

dNTP: desoxinucleósido 5´-trifosfato

DO: densidad óptica

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

EM: Espectrometría de masas

KDa: Kilodaltons

LPS: Lipopolisacárido

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

ml: mililitro

µg: microgramo

µl: microlitro

MLST: Multilocus Sequence Typing

nm: nanómetros

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Pm: Peso molecular

RD: Real Decreto

rep-PCR: repetitive extragenic palindromic- PCR

r.p.m: revoluciones por minuto

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilin resistente

SLST: Single locus Sequence Typing

TBE: Tris borato EDTA

TOF: Time of Flight

VCPSA: variantes de colonia pequeña de *S. aureus*

VNIVERSITAS
STVDII
SALAMANTINI

