

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL
DIAGNÓSTICO**



“Determinación de fenotipos de resistencia a
antimicrobianos en aislamientos clínicos
bacterianos mediante espectrometría de masas
MALDI-TOF cuantitativa”

TESIS DOCTORAL

SARA HERNÁNDEZ EGIDO

2018

AGRADECIMIENTOS

Sin duda ninguna estas son las páginas de la tesis que más trabajo me ha costado escribir. Es difícil agradecer en tan poco espacio a todos los que han formado parte de esto. Porque no ha sido sólo un trabajo científico si no que ha tenido mucha implicación personal.

En primer lugar querría agradecerle al Dr. Juan Luis Muñoz Bellido, por ser la persona que comenzó este proyecto, siempre he pensado que detrás de una gran idea como esta hay personas con mentes privilegiadas y no tengo ninguna duda de que la tuya lo es. Gracias por haber llevado adelante este trabajo, por buscar soluciones cuando no sabíamos que más hacer, por haber conseguido que llegará al final, por haberme permitido formas parte de todo esto. Gracias por haberme permitido cumplir un sueño.

Gracias al Dr. Fernando Sánchez Juanes. Gracias por haber trabajado mano a mano desde un primer momento, tiempo en el que creo que he aprendido mucho de ti, gracias por haber repetido una y otra vez lo que fuera necesario para hacer las cosas bien, pero sobre todo por las largas conversaciones en el laboratorio para conseguir que no tirara la toalla.

Gracias a Ana de Luis Reboredo y Ana Belén Gil González, por haber desarrollado toda la parte informática del trabajo. Me sigue fascinando vuestra capacidad para crear lo que habéis creado. Gracias.

Fue un placer pasar mis cuatro años de residencia el Hospital Clínico de Salamanca, lugar donde creo que he no sólo he crecido como microbióloga, sino también como persona. Muchas gracias a todos mis compañeros desde el Jefe de Servicio, facultativos, técnicos y administrativos. Pero sobre todo de una forma especial a los residentes, a las mayores Lourdes, Marisa, Luci, Noelia y María, porque cada día tengo más claro que si soy como soy trabajando es gracias a lo que aprendí de vosotras. Todavía recuerdo el primer día que llegué y María y Noelia me tendieron la mano y me inculcaron esa ilusión por la microbiología, gracias. A los pequeños Alicia y Antonio, espero haberos sabido trasmitir por lo menos una parte de lo que a mí me enseñaron, con eso me conformo. A ti Alicia, que te voy a decir, si este trabajo es tan tuyo como mío, gracias por hacer posible su continuidad pero sobre todo gracias por ayudarme, por escucharme y por levantarme siempre que lo he necesitado y por ser más que una compañera de trabajo, por ser una amiga de verdad. Gracias Natalia, compañera de experiencia de tesis, muchas conversaciones que siempre ayudan a llevarlo mejor. Sobre todo gracias por tu paciencia en este último período.

No puedo seguir sin nombrar a unas personitas que estoy segura que si no hubieran estado todo hubiera sido diferente. Nieves y Ana, unos ejemplos a seguir como profesionales y sobre todo como personas, empezasteis siendo mis adjuntas, adjuntas de las que aprender, pasasteis a ser compañeras, poco a poco sentía que me cuidabais y me aconsejabais dentro de mi vida microbiológica y ahora os tengo en mi vida en general para lo que necesite, y yo estaré para lo que necesitéis. Gracias amigas.

Mi rincón de paz, Maite, Mar, María José y Anarbella. No sabéis cuanto echo de menos el irme un ratito a "PCR" y desconectar. Siempre que lo he necesitado me habéis recibido con los brazos abiertos, me habéis escuchado, me habéis aconsejado y os habéis alegrado por mí en todo lo bueno que ha ido pasando. Sin dobleces, simplemente vosotras, no cambiéis nunca. Os llevaré donde vaya. Gracias por todo.

Y no me olvido de ti, Mónica te lo dije cuando te marchaste de Salamanca, fuiste mi primera adjunta, y la culpable de que me apasione la microbiología de esta manera. Me enseñaste muchas cosas, no sólo profesionales, me inculcaste ilusión por el trabajo y por la tesis, así que gran parte de culpa de haber conseguido cumplir mi sueño es tuya. Gracias.

Una de las ventajas que tiene ser sustituta es que vas conociendo a mucha gente, trabajas en muchos sitios diferentes e intentas aprender todo lo que cada uno de ellos te puede aportar. No puedo acabar mis agradecimientos sin nombrar tres sitios que pase lo que pase recordare siempre. Toledo, gracias César por darme mi primera oportunidad como Microbióloga, fue más corto de lo que me hubiera gustado pero supuso una recarga de energía conoceros y trabajar con vosotros. Torrelavega, un laboratorio pequeño pero todo corazón, gracias a todas.

Y por supuesto Leganés, tan sólo dos meses duró mi rotación como residente y os basto para confiar en mí. Me habéis tratado siempre como si fuera mi casa, como si fuera una más y formara parte de vuestro equipo y al final así ha sido. Gracias a todos, en especial a Marisol Cuétara y Pilar Reyes, sin ninguna duda sois las personas que más han apostado por mí conociéndome tan poco. Marisol me sigue fascinando tus ganas de saber y de trabajar. Gracias por elegirme, sabes que me hubiera encantado que en vez de sustituirte, hubiéramos trabajado codo con codo, ojalá algún día pueda ser así, me encantaría seguir aprendiendo de ti.

Como dije al principio la tesis ha sido un trabajo que ha supuesto un largo camino. Los caminos se construyen, en gran parte, gracias a las personas que rodean a cada uno, y yo en ese sentido me siento muy afortunada.

A mis amigos, gracias por preocuparos, por animarme, porque a pesar de que no entendíais nada, os habéis mantenido en la postura de que lo conseguiría y al final ha llegado, sin vosotros esto no hubiera sido posible. Sois la mejor familia elegida que se puede tener.

A mi familia. A mis padres, gracias, pero no sólo por haber estado ahí, gracias por haberme enseñado tantas cosas, porque si soy como soy es gracias a la educación y los principios que vosotros nos habéis enseñado. Tenéis que estar orgullosos pero no de mí, de vosotros, porque María y yo lo estamos. Responsabilidad, trabajo, constancia, respeto y un sin fin de buenos adjetivos acompañan a todo lo que nos habéis transmitido. Soy consciente de que si para mí ha sido duro para vosotros más, pero ya está, lo he conseguido o mejor dicho lo hemos conseguido. Gracias. Os quiero mucho.

María, tan distintas y a la vez tan iguales. Menos mal que supieron repartir las virtudes a cada una y sin ninguna duda a ti te dieron la tranquilidad y la fuerza. Y eso es lo que me has aportado en todo este tiempo. Gracias por todo, a ti debería ponértelo en mayúsculas, porque sin ti estos últimos años no hubieran sido lo mismo. Tu confianza y tu ilusión porque todo va a salir bien, hace que yo también lo crea. Eres la mejor hermana que se puede tener. Te quiero

A ti, Jorge, muchas gracias. Has vivido todo esto en primera persona, te has convertido en mi compañero de viaje. Sacas lo mejor de mí y sin ninguna duda confías en mí mucho más de lo que yo lo hago. Eres mi calma, lo sabes. Gracias por sacarme una sonrisa en todo momento, por animarme a seguir y por no dejarme caer. Estoy segura que este viaje que acabamos de empezar va a estar lleno de cosas bonitas, ya te lo dije “juntos es mejor”. Siempre.

Y finalmente de una manera muy especial, gracias África, apareciste hace muy poquito tiempo y me has demostrado más que nadie. Contigo, con tan sólo un añito, he aprendido a valorar lo que realmente es importante. Ojalá aprenda a ser en la vida la mitad de valiente que has sido tú siendo tan pequeña.

Gracias a todos los que de alguna manera habéis formado parte de esto.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	17
1. Instrumentación.....	20
2. Metodología	22
3.1. Aplicaciones en el laboratorio de microbiología clínica.....	24
3.2. Identificación desde cultivo.....	28
3.2.1. Bacterias gram positivas.....	28
3.2.2. Bacterias gram negativas.....	31
3.2.3. Bacterias anaerobias.....	34
3.2.4. Micología	35
3.2.5. Micobacterias.....	37
3.3. EM MALDI-TOF de muestra directa.....	39
3.3.1. Identificación directa a partir de muestra de orina.....	40
3.3.2. Identificación directa a partir de hemocultivos.....	42
3.3.3. Identificación directa a partir de otras muestras.....	49
3.4. EM MALDI-TOF y resistencias.....	50
3.4.1. Detección de enzimas hidrolizantes.....	51
3.4.1.1. Enzimas beta lactamasas de espectro extendido (BLEE)	51
3.4.1.2. Enzimas carbapenemasas.....	55
3.4.1.3. Enzimas modificantes de aminoglucósidos.....	60
3.4.2. Perfil proteico bacteriano	60
3.4.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilin resistente.....	60
3.4.2.2. <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina...	63
3.4.2.3. <i>Bacteroides fragilis</i> portador gen <i>cfiA</i>	64
3.4.2.4. Otros mecanismos.....	65
3.5. EM MALDI TOF cuantitativo para obtener perfiles de resistencia	68
3. Coste-efectividad de la aplicación de MALDI TOF e impacto clínico	70
II. OBJETIVOS	75
lii. MATERIAL Y MÉTODOS	77

1.	Selección de cepas.....	79
1.1.	Estudios de sensibilidad a ciprofloxacino.....	79
1.2.	Estudio de sensibilidad a cefotaxima	80
1.3.	Estudio de sensibilidad a imipenem.....	81
1.4.	Estudios de sensibilidad a ceftazidima, piperacilina-tazobactam y gentamicina.	82
1.5.	Estudios de sensibilidad a ceftriaxona.....	83
1.6.	Estudios de sensibilidad a ceftriaxona, piperacilina-tazobactam y cefotaxima con 3 horas de incubación.....	83
2.	Inoculación de hemocultivos simulados.....	84
3.	Inoculación de hemocultivos reales.	85
4.	Tiempo de incubación mediante EM MALDI-TOF.....	85
5.	Selección de antimicrobianos y cálculo de las concentraciones de antimicrobianos.....	86
6.	Estudio de sensibilidad mediante EM MALDI TOF.....	87
7.	Análisis de los datos mediante EM MALDI TOF.....	88
8.	Sensibilidad antibiótica.....	89
9.	Desarrollo de software.....	89
IV.	RESULTADOS.....	93
1.	Ciprofloxacino.....	95
2.	Cefotaxima.....	100
3.	Ceftazidima.....	105
4.	Ceftriaxona.....	111
5.	Piperacilina- tazobactam.....	113
6.	Hemocultivos a 3horas.....	118
7.	Imipenem.....	120
8.	Gentamicina.....	124
V.	DISCUSIÓN.....	127
VI.	CONCLUSIONES.....	145
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	149
VIII.	ANEXOS.....	173

ABREVIATURAS

- ATB: Antibiograma
- AUC: Área bajo la curva
- BGNNF: Bacilos gram negativos no fermentadores
- BHI: caldo Brain Heart
- BLEE: β - lactamasa de espectro extendido
- CAZ: ceftazidima
- CIP: ciprofloxacino
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- CMT: *complex mutant TEM*
- CRO: ceftriaxona
- CTX: cefotaxima
- EM: espectrometría de masas
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
- HCCA: alfa-ciano-4-hidroxicinámico
- IMP: imipenem
- IRT: *inhibitor resistant TEM*
- IS: Secuencia de insercción
- KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases
- LCR: líquido cefalorraquídeo
- *m/z*: masa/carga

- MALDI-TOF: *Matrix – assisted laser desorption ionization- time of flight*
- MBL: metalo β - lactamasas
- MLST: Tipificación multilocus de secuencias
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- P/T. piperacilina-tazobactam
- RG: Crecimiento relativo
- SARM: *Staphylococcus aureus* meticilin resistente
- SASM: *Staphylococcus aureus* meticilin sensible
- SDS: dodecilsulfato sódico
- TFA: ácido trifluoroacético
- UFC: unidades formadoras de colonias
- VPR: valor predictivo de resistencia
- VPS: valor predictivo de sensibilidad

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

La identificación de *microorganismos* y el estudio de la sensibilidad de los mismos a los antimicrobianos en Microbiología Clínica se han llevado a cabo, a lo largo de los años, mediante métodos clásicos, según las características morfológicas de las colonias, tinciones, cultivo en diferentes medios selectivos y diferentes atmósferas, así como pruebas bioquímicas convencionales (Ferreira *et al.*, 2010). La mayoría de estas pruebas ya se encuentran automatizadas en sistemas integrados, que facilitan tanto la realización de las mismas como su lectura, además de reducir la influencia del factor humano en su interpretación.

Todo esto ha ayudado a que la microbiología cobre cada día más importancia en el manejo de pacientes de determinadas unidades clínicas, en las cuales las infecciones graves, y por tanto el uso de antimicrobianos, son situaciones habituales (Rodríguez Baño *et al.*, 2012). El uso inadecuado de los antimicrobianos, ya sea en cuanto a su indicación, dosificación o duración, tiene como consecuencia el aumento de la resistencia a los mismos, reduciendo las opciones terapéuticas. Esta situación hace cada vez más perentoria la necesidad de disponer de métodos que permitan conocer la sensibilidad a antimicrobianos de los microorganismos patógenos con la mayor rapidez posible, con el objeto de reducir en lo posible la utilización de pautas terapéuticas puramente empíricas, que suponen una presión selectiva mayor, un mayor riesgo de efectos secundarios y un mayor gasto sanitario. Para ello es imprescindible determinar cuál es el agente etiológico implicado con la mayor brevedad, lo que ayudará a que el tratamiento antibiótico sea lo más dirigido y efectivo y se evite la aparición de resistencias (Collignon *et al.*, 2002).

Con los métodos convencionales que se han utilizado hasta la fecha en la rutina de los laboratorios, el tiempo de respuesta es mayor de lo que sería deseable. La obtención de un cultivo puro, permite conseguir la identificación del agente etiológico así como la sensibilidad del mismo a los diferentes antimicrobianos, en un tiempo estimado entre 48 y 72h, según los requerimientos del microorganismo, desde la obtención de la muestra del paciente (Muñoz Bellido *et al.*, 2012).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Los sistemas automatizados, permiten reducir el tiempo de espera para la obtención de un resultado. Dentro de los más utilizados se encuentran los sistemas Vitek 2 Compact (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia), MicroScan (MicroScan Systems, INC., Renton, EE.UU.) o Phoenix (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE. UU.), con los que en un periodo de 6-12h desde el inóculo del panel, y unas 24-48 horas desde la recogida de la muestra, es posible disponer de datos fiables sobre identificación y sensibilidad. Acortar estos tiempos con este tipo de técnicas es difícil, ya que se trata de técnicas que dependen del crecimiento del microorganismo, tanto para la identificación (técnicas basadas en actividad enzimática y en utilización de sustratos) como para los estudios de sensibilidad (técnicas de microdilución).

Un sistema dedicado a la identificación y estudio de la sensibilidad de los microorganismos ha de cumplir una serie de requisitos: ha de ser capaz de detectar cualquier microorganismo, que lo haga desde cultivo pero también pueda utilizarse de muestra clínica directamente, que el tiempo de obtención de resultados sea un periodo corto (6h), que tenga capacidad para detectar resistencias, factores de virulencia o toxinas, y finalmente que la relación coste-efectividad sea adecuada (Jordana-Lluch *et al.*, 2012). De todos estos factores, en el momento actual, habría dos puntos prioritarios: conseguir sistemas de identificación y de estudio de sensibilidad que ofrezcan una fiabilidad, al menos, similar a la de los sistemas vigentes, pero disponible en 2-3 horas, y conseguir que estos sistemas sean funcionales directamente desde muestra, fundamentalmente desde hemocultivos.

Este objetivo se consiguió parcialmente con la aparición y difusión de las técnicas moleculares, con importantes limitaciones, como eran, al menos inicialmente, el panel de diagnósticos disponibles y su precio. Se cubrió de manera mucho más completa con la espectrometría de masas (EM), que en 10 años se ha convertido en una técnica imprescindible en los laboratorios de Microbiología. Aplicada a lo largo del siglo XX a campos muy diversos, el desarrollo de técnicas como la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix – assisted laser desorption ionization- time of flight*) han permitido que su uso se amplíe a campos como la microbiología (Clark *et al.*, 2013). Se ha demostrado ampliamente su utilidad para la identificación de bacterias convencionales, micobacterias y hongos, con gran rapidez y una fiabilidad semejante a la secuenciación del RNA 16S (Ferreira *et al.*, 2010; Anhalt *et al.*, 1975; Fenselau *et al.*, 2001; Seng *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010). Son muchos los estudios que demuestran las posibilidades de esta herramienta en otros ámbitos como su implicación en el manejo de la

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

sepsis (Rodríguez *et al.*, 2016), estudios de tipificación (Culebras *et al.*, 2016) así como detección de mecanismos de resistencia (Oviaño *et al.*, 2016).

Los trabajos más antiguos medían proteínas con pesos moleculares más bajos (Claydon *et al.*, 1996) que los sistemas más modernos, en los que actualmente se utilizan intervalos de 2.000-20.000 Da. En este intervalo se encuentran las proteínas ribosómicas obtenidas de extractos bacterianos completos (Mellmann *et al.*, 2008). Estas proteínas son abundantes en la célula bacteriana y se ionizan positivamente, lo que favorece su detección mediante MALDI-TOF y confiere mayor robustez a la identificación.

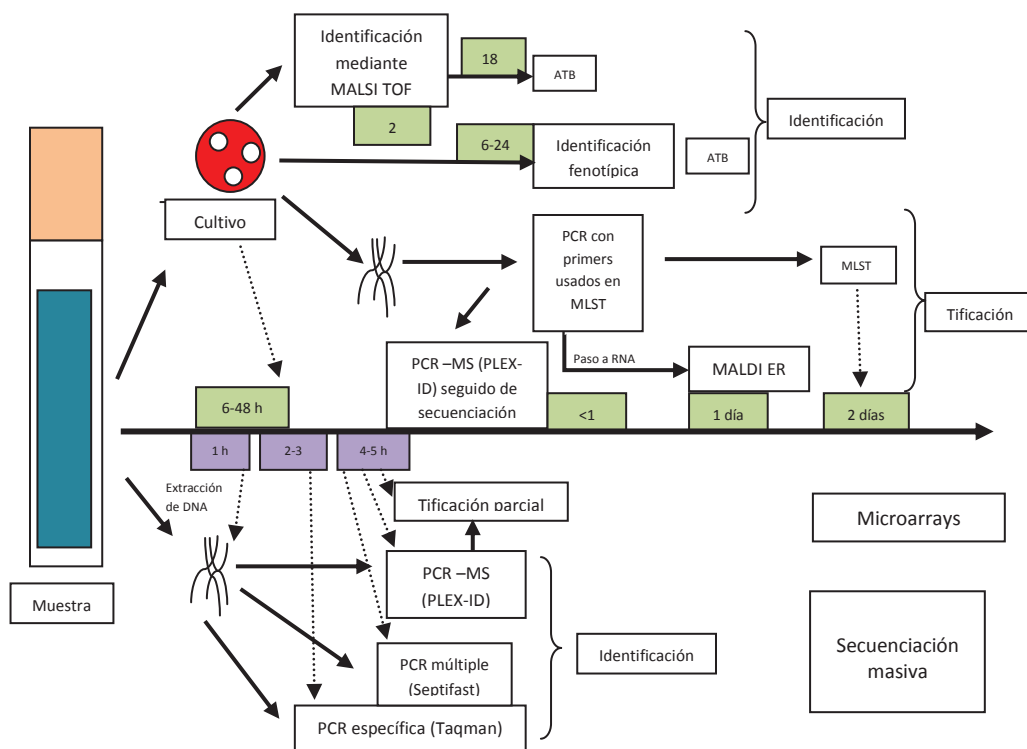


Figura 1. Adaptada de Emonet *et al.*, 2010. Tiempos de las diferentes metodologías para identificación en microbiología.

1. Instrumentación

La espectrometría de masas, como se ha avanzado, es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar la masa molecular de iones libres, lo que requiere trabajar en condiciones de alto vacío. Los espectrómetros de masas están formados por tres elementos básicos. En primer lugar la *fente de ionización* donde, a partir de la muestra, se forma un haz de iones en estado gaseoso. En segundo término el *analizador o tubo de vuelo TOF*, que separa los iones formados en función de su relación "masa/carga" (m/z) y, por último, el *detector* de los iones previamente separados. La información final que proporciona esta técnica es la relación m/z de los distintos iones formados y la cantidad relativa en la que están presentes.

Fuente de ionización

La muestra se pone en contacto con una matriz orgánica que cristaliza en contacto con el aire, de manera que al cristalizarse las moléculas de la muestra quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Posteriormente es irradiada por un láser, que actúa como fuente de ionización ya en el interior de la cámara de vacío. Todo esto ocurre sobre un soporte que es lo que conocemos como placa, que es de un material conductor, de manera que el láser causa una desestructuración de la matriz, generando la formación de iones.

Existe un campo eléctrico que acelera los iones formados hacia el analizador de masas y éstos se separarán en función de su relación m/z . Para que se produzca una ionización eficiente de la muestra los pulsos del láser deben ser de energía entre 10^6 y 10^7 W/cm², y de una duración de 1 a 5 ns. Cada muestra se expone a 240 disparos. Sin la matriz no podría llevarse a cabo este proceso ya que gracias a ella se absorbe la energía del láser.

Analizador de masas

Existen varios tipos de analizadores que se pueden utilizar como herramienta asociada a la espectrometría de masas. En los laboratorios de microbiología, el más común es el analizador de tiempo de vuelo tipo TOF. Como ya se ha señalado, los iones generados gracias al láser van

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

a ser separados según la relación m/z . Esta relación suele ser equivalente a la masa molecular (m) del analito, ya que la mayoría de los iones generados poseen una sola carga ($z=1$) (Jordana-Lluch *et al.*, 2012), y de ella depende el tiempo que tardará en llegar un ion al detector. Este tiempo es conocido como tiempo de vuelo.

Detector

Es una superficie de material semiconductor donde impactan los iones. En ocasiones, puede existir un complemento conocido como reflector que, compensando las velocidades de los iones, consigue aumentar la resolución. Los iones llegan al detector con diferentes tiempos de vuelo, que como se ha señalado dependen a su vez de la relación m/z . Esta ratio va a ser utilizada para crear el espectro de masas. Su valor se representa en el eje de ordenadas frente al término intensidad en el eje de abscisas, que se define como el número de iones de una determinada ratio m/z que han impactado sobre el detector.

Con cada disparo se genera un espectro de masas. Por tanto, si por cada muestra se realizan 240 disparos, se obtendrán 240 espectros. No obstante, la representación que se obtiene finalmente es un sumatorio de todos estos espectros. Para obtener este espectro único se suman las intensidades de los picos idénticos de cada uno de los espectros obtenidos por cada muestra (March *et al.*, 2012).

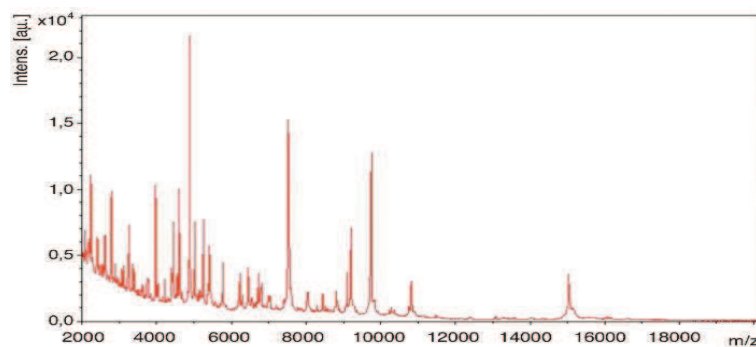


Figura 2. Perfil de picos obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

2. Metodología

2.1. Preparación de la muestra para la identificación (Vega Castaño *et al.*, 2012)

A continuación se especifica el protocolo general que nuestro grupo de forma habitual en la práctica diaria aunque, ocasionalmente, circunstancias como el tipo de microorganismo o el tipo de estudio a realizar obliga a introducir variaciones.

Método directo

1. Se deposita una pequeña cantidad de una colonia directamente sobre la placa *ground steel* del espectrómetro de masas, formando una delgada película. Sobre ella se aplica 1µl de la solución matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético (TFA) al 2,5%, y se deja secar a temperatura ambiente.

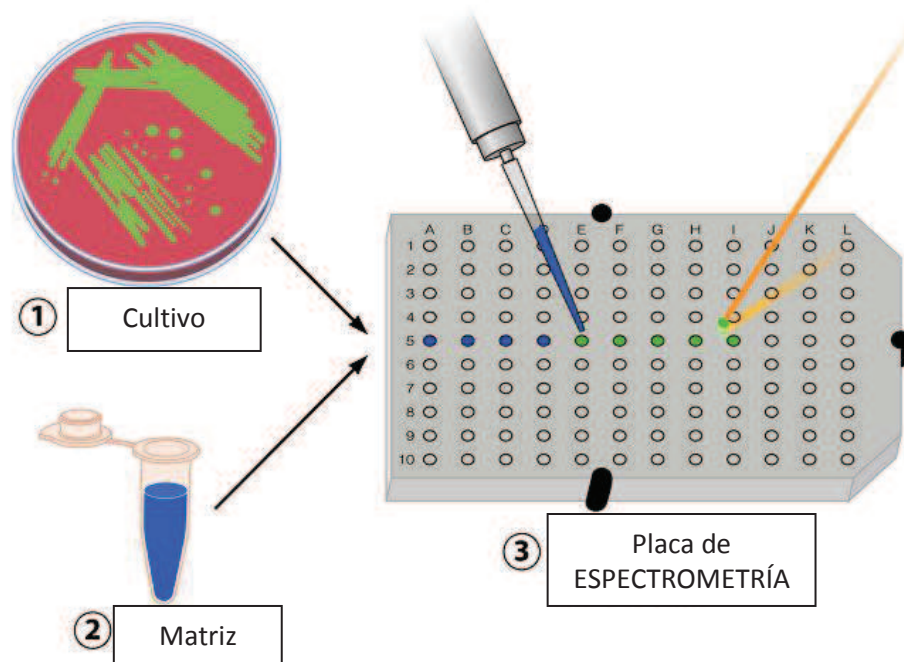


Figura 3. Adaptada de Clark *et al.*, 2013. Esquema metodología MALDI-TOF.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

- 2. Espectrometría de masas.** Se utiliza un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Se obtienen los espectros entre 2 y 20 kDa de forma automática, trabajando en modo lineal positivo a una frecuencia de 200 hertzios. Los parámetros que fijamos para el espectrómetro son IS1 a 20 kV, IS2 a 18,6 kV, lente a 6 kV, PIE a 40 ns. El protocolo de trabajo del MALDI Biotyper proporciona la adquisición óptima de la muestra (acumulación de 240 disparos del láser en diferentes lugares de la muestra). Los espectros se calibran externamente utilizando una mezcla comercial de calibradores (extracto de *Escherichia coli* DH5 más 2 proteínas adicionales: RNAasa A y mioglobina para cubrir un intervalo de 4 a 17kDa).

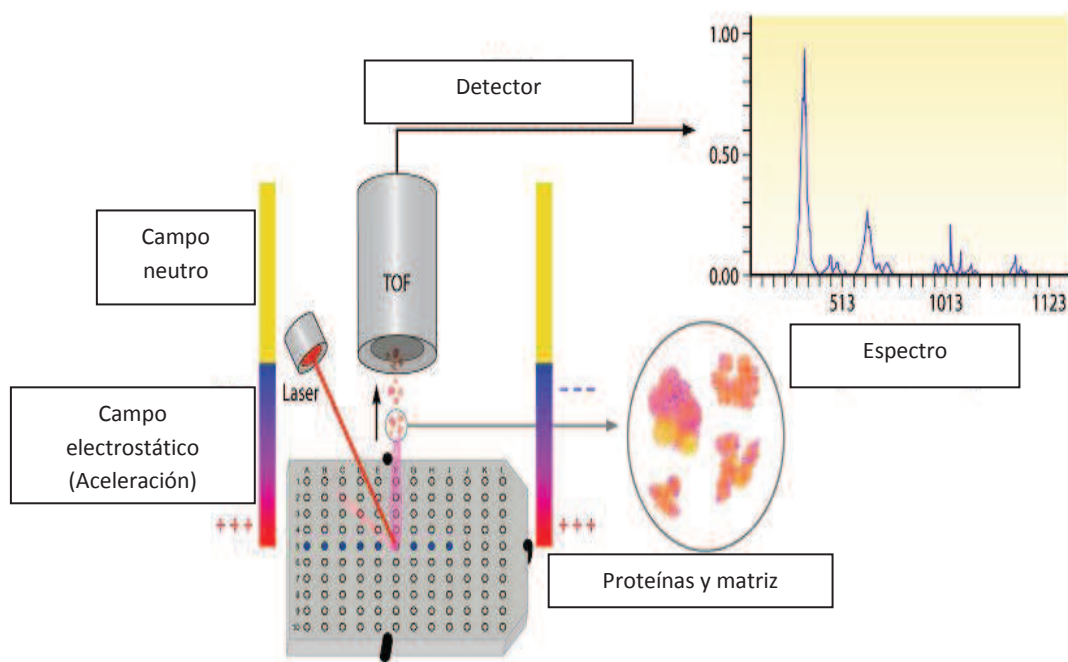


Figura 4. Adaptada de Clark *et al.*, 2013. Esquema básico MALDI-TOF.

- 3. Análisis de los espectros.** Para la identificación de los microorganismos, el espectro obtenido de los microorganismos problema se procesa con el programa MALDI Biotyper 3.0. La lista de picos generada se compara con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 3.0, usando un algoritmo de comparación integrado en el *software*.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tras importar el espectro al programa, todo el proceso, desde su análisis hasta su identificación, se lleva a cabo de forma automática, sin intervención alguna por parte del usuario.

4. **Valoración de resultados.** Las identificaciones obtenidas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se clasifican como fiable a nivel de especie (puntuación en la comparación entre el perfil del microorganismo problema y la base de datos ≥ 2), fiable a nivel de género (puntuación $\geq 1,7$ y < 2) y no fiable (puntuación $< 1,7$).

3. Aplicaciones en los laboratorios de microbiología clínica

La metodología de trabajo en espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación de microorganismos, es sencilla, por lo que es fácil de implantar en un laboratorio de Microbiología. Estudios recientes muestran cómo esta nueva tecnología ofrece una extraordinaria fiabilidad en la identificación, como ya se ha comentado, de diferentes tipos de microorganismos, entre los que se encuentran los patógenos humanos más frecuentes (Seng *et al.*, 2009), pero también microorganismos de aislamiento infrecuente cuya identificación puede ser complicada mediante la metodología convencional (Porrás *et al.*, 2010).

Uno de los primeros estudios publicado por nuestro grupo hace unos años ya mostró altos niveles de correlación de esta herramienta, en comparación con los métodos clásicos de identificación. A partir de colonia, en el caso de los Gram negativos, la correlación a nivel de género fue del 100%, y del 87,8% a nivel de especie. Para Gram positivos se obtuvieron cifras de correlación del 98,8% a nivel de género (Ferreira *et al.*, 2010).

Son muchos los estudios como éste, que con sus resultados han conseguido que, en un corto período de tiempo, la espectrometría de masas MALDI-TOF haya pasado de ser una técnica desconocida y no disponible en los laboratorios de microbiología clínica, a ser un procedimiento completamente integrado en la actividad clínica diaria.

Sin embargo, pese a su extraordinaria fiabilidad para la identificación, no está exento de limitaciones. Algunos grupos de microorganismos como los hongos, levaduras o alguna

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

bacteria, muestran algunas dificultades a la hora de obtener espectros fiables (Galan *et al.*, 2015). Estas deficiencias se cree que están más relacionadas con los métodos de extracción de proteínas, que pueden no ser totalmente adecuados para esos microorganismos, o bien con las bases de datos, que pueden no ser tan completas como sería deseable, que con una insuficiente especificidad de los espectros obtenidos (Muñoz-Bellido *et al.*, 2015).

Esto ha hecho que diferentes centros y grupos hayan ido desarrollando sus propias bases de datos en aquellos ámbitos en los que puedan estar especialmente interesados (micobacterias, hongos filamentosos...). Los sistemas comerciales, de forma más sencilla o más laboriosa, permiten agregar espectros y personalizar las versiones comercializadas, lo que ayuda tanto en investigación como en estudios epidemiológicos. Dentro de los *software* más utilizados está MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania), que se ofrece integrado con el espectrómetro de masas del mismo fabricante, y la base de datos para la interpretación de los resultados (Biotyper 2.0 y Biotyper 3.0). Otra plataforma ampliamente difundida es Axima@SARAMIS (AnagnosTec GmbH, Potsdam, Alemania) que proporciona la base de datos, mientras que el espectrómetro de masas y el software de interpretación son fabricados por la compañía Shimadzu (Kioto, Japón) (Emonet *et al.*, 2010), y que actualmente son comercializados en España por bioMérieux.

Ambas plataformas son similares. En el caso de la base de datos Biotyper 3.0, que es la que nuestro grupo utiliza habitualmente, se encuentran representados 4.111 microorganismos. Ambas bases de datos son actualizadas periódicamente por el fabricante, y permiten además la incorporación de nuevos espectros por el usuario a bases de datos de uso privado. La incorporación de perfiles generados por los usuarios a las bases de datos “oficiales” de la plataforma es un proceso mucho más complejo.

Cuando se obtiene el espectro de masas, el *software* genera un listado de perfiles de la base de datos con los que ese espectro muestra una cierta similitud, junto con una valoración que el *software* da a ese grado de similitud en cuanto a su fiabilidad para establecer una identificación a nivel de género o especie. Para Biotyper 3.0, esta escala está entre 0 y 3, y a la vez se divide en tres intervalos: un valor ≥ 2 indica una identificación fiable a nivel de especie, un valor entre 1,7 y 2 indica una alta fiabilidad a nivel de género, pero no tanto a nivel de especie, y un valor $< 1,7$ implica que se trata de una identificación poco fiable (Bou *et al.*, 2011).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

En el caso de SARAMIS, el valor adjudicado indicativo de la fiabilidad de la detección tiene un solo punto de corte: un valor superior o igual al 70% indica una identificación con elevada fiabilidad a nivel de especie, mientras que en el caso de obtener valores inferiores se debería repetir la identificación (Cherkaoui *et al.*, 2010).

Significado del valor del score

Range	Description	Symbols	Color
2.300-3.000	Identificación de especies altamente probable	(+++)	green
2.000-2.299	Identificación segura del género, identificación probable de especies	(++)	Green
1.700-1.999	Identificación probable del género	(+)	yellow
0.000-1.699	No es una identificación fiable	(-)	red

Significado de las categorías A-C

Category	Description
A	El mejor resultado se clasificó como "verde" (ver arriba). Otros resultados "verdes" son de la misma especie que el primero. Otras coincidencias "amarillas" son al menos del mismo género que la primera.
B	La mejor coincidencia se clasificó como "verde" o "amarillo" (ver arriba). Además, "verde" o "amarillo" tienen al menos el mismo género que el primero. Las condiciones de consistencia de las especies no se cumplen
C	Ni consistencia de especie ni género (verifique los sinónimos de los nombres o la mezcla microbiana) Sin consistencia: Ni consistencia de especie ni género (verifique los sinónimos de los nombres o la mezcla microbiana)

Figura 5. Resultado según base de datos de Biotyper 3.0.

Centrándonos en las aplicaciones clínicas, los primeros estudios que evalúan el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF como herramienta de identificación se realizaron partiendo de aislamientos obtenidos en placas de agar. Se cultivaba el microorganismo y de la colonia problema, se tomaba y se depositaba en la tarjeta de espectrometría de masas MALDI-TOF, sin necesidad de extracción, simplemente aplicando sobre ésta la matriz (Holland *et al.*, 1996; Lartigue *et al.*, 2013).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Este método, conocido como método directo, proporcionaba un método nuevo y sencillo para la identificación rápida de componentes bacterianos, basada en la generación de huellas espectrales específicas que facilitaban la identificación microbiana (Fenselau *et al.*, 2001). Con el tiempo, se convierte en una alternativa muy atractiva a los métodos fenotípicos y genotípicos que había hasta el momento, y se propone incluso como alternativa a la secuenciación del RNA ribosómico 16S (Bizzini *et al.*, 2011).

Son muchos los estudios que se realizaron en la primera mitad de esta década evaluando esta nueva tecnología para la identificación de diferentes tipos de microorganismos, con resultados en general muy prometedores (Carbonelle *et al.*, 2011; Dingle *et al.*, 2013). Se observaron no obstante algunas limitaciones; entre ellas, se hizo evidente que el método directo, muy atractivo por su rapidez y simplicidad, no siempre era apropiado para todos los tipos de muestra ni microorganismos (Hettick *et al.*, 2006), por lo que se empezaron a publicar variantes de la metodología de extracción para los microorganismos más problemáticos, como hongos y micobacterias.

Se observó que la extracción previa de proteínas mejora la identificación, sobre todo cuando se trata de bacterias Gram positivas y levaduras (Bizzini *et al.*, 2010). Se describieron dos procedimientos:

Extracción mediante etanol-ácido fórmico. El etanol inactiva la bacteria mientras el ácido fórmico produce una ruptura de la pared bacteriana. El protocolo consiste en resuspender una colonia en 300µl de agua bidestilada más 900µl de etanol; se centrifuga durante 2 minutos, se retira el sobrenadante y se deja que el sedimento se seque para eliminar el etanol completamente. Se resuspende el pellet en 50 µl de ácido fórmico al 70% y 50 µl de acetonitrilo. Se centrifuga de nuevo durante 2 minutos. Del sobrenadante se lleva un 1 µl a la placa donde se deposita en un pocillo y se le añade la matriz (Tan *et al.*, 2012).

Extracción mediante ácido trifluoroacético (TFA). Con un solo reactivo se consigue inactivar el microorganismo y romper la pared. Para ello se resuspende la colonia en TFA al 80% y se deja a temperatura ambiente. Se añade agua bidestilada y

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

acetonitrilo a partes iguales y se centrifuga. Se lleva un 1 μ l del sobrenadante a la tarjeta, donde se deposita en un pocillo y se le añade la matriz.

Ambos métodos mejoran notablemente la calidad de los espectros resultantes, obteniendo *scores* más altos que se traducen en una fiabilidad superior a la hora de identificar un microorganismo.

3.1. Identificación desde cultivo

Anhalt propuso, ya en el año 1975, la utilización de la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos. Más de dos décadas después se publicó el primer estudio que demostró la eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de microorganismos a partir de células completas (Holland *et al.*, 1996).

Uno de los artículos con más peso presenta en 2009 un estudio (Seng *et al.*, 2009) que contempla más de 1600 aislamientos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, aerobias y anaerobias, obteniendo un 95,4% de identificaciones correctas, si bien es cierto que se hace hincapié en la necesidad de incorporar más perfiles de los diferentes microorganismos a las bases de datos.

Desde este momento, se produce una rápida expansión del uso de esta tecnología en Microbiología Clínica. La primera publicación en España tiene lugar en 2010, y fue el comienzo de un amplio número de estudios relativos a diferentes aspectos de la utilización clínica de la espectrometría de masas MALDI-TOF, pero sobre todo a la identificación de microorganismos (Marklein *et al.*, 2009; Bizzini *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2013; Lévesque *et al.*, 2015).

3.1.1. Bacterias Gram positivas. Debido a los componentes de la pared de este tipo de microorganismos, con mayor cantidad de peptidoglicano, los resultados obtenidos con la espectrometría de masas no son equiparables a los excelentes resultados obtenidos con las bacterias Gram negativas (Tekkipe *et al.*, 2013). Es posible que con determinadas especies sea necesario el uso de procedimientos adicionales como el uso

de lisostafina, lisozima u otras moléculas, que ayuden a la rotura de la pared (Pascual-Hernandez *et al.*, 2016).

En el caso del género *Staphylococcus*, estudios comparativos entre la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF y los estudios fenotípicos y moleculares para la identificación del género *Staphylococcus* a nivel de especie, determinaron la utilidad de la espectrometría de masas para la identificación de 20 especies de estafilococos no productores de coagulasa, con un porcentaje de identificaciones coincidentes del 93,2% (Dupont *et al.*, 2010). Recientemente se consigue identificar a nivel de especie el 97,7% -100%, dependiendo de las series, frente a un 77,5 % - 76 % de otros sistemas automatizados (Zhou *et al.*, 2014; Kassim *et al.*, 2017). Estudios posteriores amplían las aplicaciones de la técnica para tipado y detección de resistencias a la meticilina, (Ostergaard *et al.*, 2015), así como para la detección de la producción de leucocidina de Pantón- Valentine (Bittar *et al.*, 2009).

El género *Streptococcus* resulta más problemático que el género anterior. Dentro de todas las especies que componen este género podríamos considerar fiables los resultados obtenidos para especies como *S. pyogenes*, *S. canis*, *S. agalactiae* (Rychert *et al.*, 2013). De este último ya se han descrito procesamientos directos, a partir de un caldo selectivo de enriquecimiento, para su identificación en muestras de gestantes (Abrok *et al.*, 2015).

A pesar de todos estos avances, en el caso del género *Streptococcus* son necesarios nuevos estudios, ya que los resultados obtenidos son mejorables, sobre todo en especies como *S. pneumoniae*, ya que la espectrometría de masas MALDI-TOF identifica erróneamente, con cierta frecuencia, a otros estreptococos del grupo *viridans* como *S. pneumoniae* (Chen *et al.*, 2015). La última biblioteca de referencia de Bruker Daltonics (MBT 6903 MSP Library) sigue recomendando la utilización de otros test (optoquina, solubilidad en bilis) para corroborar las identificaciones de *S. pneumoniae*.

No ocurre lo mismo con el género *Enterococcus*. Los datos publicados son muy favorables en este caso, considerándose muy fiable la diferenciación entre la mayoría de las especies, en especial entre *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, en parte gracias a las grandes diferencias que existen en sus perfiles de sensibilidad (Kassim *et al.*, 2017). Fanget *et al.*, en 2012, concluyeron en su estudio que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica de identificación rápida, fiable y rentable para enterococos, con mejores resultados incluso que los sistemas automatizados actuales.

Otro de los géneros en el cual la espectrometría ha sido relevante, ha sido el género *Corynebacterium*. Ha de tenerse en cuenta que, en el caso de este género, una identificación correcta requería la utilización de técnicas fenotípicas complejas y costosas (perfiles amplios de utilización de carbohidratos, estudios de composición de la pared por cromatografía en capa fina), o de técnicas moleculares. En determinados laboratorios, esta metodología se ha implantado también para la identificación de cepas toxigénicas (Konrad *et al.*, 2010).

El género *Listeria* también se ve beneficiado, ya que MALDI-TOF ha demostrado ser útil diferenciando todas sus especies (Ojima-Kato *et al.*, 2016). En el caso de *Nocardia* ocurre lo mismo, pero es cierto que debemos recalcar que este tipo de microorganismos necesita procedimientos de extracción específicos que, a pesar de hacer la técnica algo más laboriosa de lo habitual, dan mejores resultados frente a los métodos utilizados hasta la actualidad (Girard *et al.*, 2016).

No se debe olvidar que hay microorganismos que, debido a su lento crecimiento o su dificultad para crecer en los medios utilizados convencionalmente, se encuentran infradiagnosticados en determinadas infecciones. Desde la introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF en los laboratorios de Microbiología Clínica, se ha observado un incremento en el número de aislamientos de los mismos por su facilidad para identificarlos con este método, como es el caso de *Actinotignum* (Siller *et al.*, 2016).

Sin embargo, no todo son buenos resultados. Otros microorganismos Gram positivos con importancia en clínica que han sido objeto de estudio no han tenido el mismo éxito, como es el caso del género *Bacillus* (Celandroni *et al.*, 2016) en el que se han encontrado dificultades para diferenciar entre las distintas especies.

3.1.2 Bacterias Gram negativas. Los estudios demuestran que la eficacia en la identificación de enterobacterias y otros Gram negativos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF es excelente, incluyendo tanto los Gram negativos más habituales en clínica como otros menos frecuentes o más complicados de identificar con la metodología clásica.

El grupo más amplio estudiado han sido las enterobacterias, grupo en el cual encontramos una de las limitaciones más conocidas del uso de espectrometría de masas MALDI-TOF, como es la incapacidad para diferenciar de manera correcta entre *Escherichia coli* y *Shigella* spp. En 2010 se realizó un estudio en el que se pretendía evaluar la eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de enterobacterias a partir de colonias obtenidas de muestras fecales. En dicho estudio se observó que, de las 304 colonias a identificar, falló en 36 aislados de *Shigella* spp. y en 3 *Escherichia coli* enterohemorrágicos (He *et al.*, 2010). Estudios más recientes sugieren que es posible salvar estas limitaciones. Utilizando programas informáticos como FlexAnalysis y ClinProTools (Bruker Daltonics GmbH, Alemania), se han identificado picos específicos que permiten diferenciar *E. coli* y *Shigella* en el 90% de los casos (Khot *et al.*, 2013).

Otros autores han demostrado que esta diferenciación es posible incluso sin utilizar *software* adicional alguno, simplemente incrementando el número y variedad de perfiles de *E. coli* y de *Shigella* presentes en la base de datos de referencia (Paauw *et al.*, 2015). Con este método, los autores identificaron correctamente 60/64 aislamientos de *E. coli* y 110/116 aislamientos de *Shigella*.

En aquellos laboratorios en los que se ha utilizado la espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación es notorio que, con la metodología habitual, a pesar de que la

identificación de *Salmonella* a nivel de género es fiable, no ocurre lo mismo a nivel de especie. Sin embargo, existen ya desde 2004 publicaciones que sugieren la existencia de picos específicos que podrían permitir identificar serovares con mayor fiabilidad (Leuschner *et al.*, 2004). Un estudio reciente sugiere la existencia de picos que permiten identificar con fiabilidad el serovar Typhi (Kuhns *et al.*, 2012). Puesto que parecen existir elementos diferenciales, una ampliación de la base de datos de referencia con un mayor número de espectros de, al menos, los serovares más frecuentes, nos ayudaría a solventar esta limitación, llegando a mejorar los resultados a nivel de especie.

En relación con las enterobacterias más comunes se aprecian otras áreas en las que el comportamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF es mejorable, como son los casos de los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*, en los cuales puede resultar complicado llegar a una buena identificación a nivel de especie. En el caso de *Enterobacter spp.*, los primeros estudios únicamente alcanzaron un 80% de sensibilidad, (Pavlovic *et al.*, 2012), cifras que posteriormente han sido mejoradas claramente. En cuanto a *Citrobacter spp.*, los resultados han mejorado sustancialmente, con datos en torno al 90-95% de concordancia con los métodos convencionales de identificación. Sin embargo, sigue habiendo aislados que, por su estrecha relación, no pueden diferenciarse, obligando a utilizar la denominación de *complejo* (Febrarro *et al.*, 2016).

La correlación con los sistemas bioquímicos de identificación en el caso de *Klebsiella pneumoniae* es prácticamente del 100%. Sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso de *Klebsiella oxytoca*. Esto se debe fundamentalmente a las dificultades de los sistemas clásicos de identificación para diferenciar entre *K. oxytoca* y *Raoultella spp.*, de modo que, en la mayor parte de los casos, *Raoultella* era identificada erróneamente como *K. oxytoca*. Esto ha originado una notable infravaloración del papel de *Raoultella* como patógeno, papel que ha empezado a ser puesto en valor sólo cuando el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF ha empezado a llamar a atención sobre su repercusión real (Siller *et al.*, 2013; Ponce-Alonso *et al.*, 2016).

En el caso de enterobacterias menos frecuentes se obtienen también buenos resultados desde colonia. Así, se ha demostrado que se consigue una excelente identificación a nivel de especie, en especies del género *Yersinia* como *Y. pestis* y *Y. enterocolitica* (Ayyadurai *et al.*, 2010).

Un grupo importante dentro de los Gram negativos, por las dificultades que con frecuencia comporta su identificación fiable por métodos tradicionales, es el de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF). Dentro de las BGNNF podemos destacar la utilidad de espectrometría de masas MALDI-TOF en fibrosis quística al menos en lo que se refiere a los patógenos más habituales. Géneros como *Ralstonia*, *Elizabethkingia* o *Chryseobacterium* se ven más limitados debido, sobre todo, al bajo número de espectros contenidos en las bases de datos (Fernández Olmos *et al.*, 2012).

En el caso de *Pseudomonas spp.* y de *Acinetobacter*, se consigue una alta fiabilidad de identificación a nivel de género, cercana al 100%, lo que supone una ayuda evidente en clínica, al permitir una selección más rápida y ajustada de la terapia empírica, sobre todo ante un brote o posibles microorganismos multirresistentes. Esta excelente correlación se resiente no obstante, en cierta medida, a nivel de especie, donde se ve disminuida a cifras del 85-90% (Mulet *et al.*, 2012; Hsueh *et al.*, 2014).

Stenotrophomonas maltophilia (Homem de Mello de Souza *et al.*, 2014) y *Burkholderia cepacia* (Lambiase *et al.*, 2012) muestran una correlación entre la espectrometría de masas MALDI-TOF y los métodos moleculares de identificación mucho mayor de la que se observaba con los métodos clásicos de identificación.

Finalmente dentro del grupo de Gram negativos podemos encontrar microorganismos que se caracterizan por su lento crecimiento y necesidades nutricionales exigentes, como son los pertenecientes al grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*). No hay muchos estudios sobre ellos, ya que de por sí es complicado llegar a una correcta y rápida identificación de estos microorganismos mediante técnicas convencionales. No obstante, con uno de los primeros análisis que se realizaron se consiguieron resultados favorables, ya que de

140 muestras analizadas solo hubo identificaciones erróneas en 13 de ellas (Powell *et al.*, 2013).

En el caso particular de *Haemophilus* spp., hay estudios con resultados dispares a la hora de diferenciar entre las distintas especies, pero los más recientes avalan a la espectrometría de masas MALDI-TOF como una herramienta útil para la identificación de microorganismos de este género a nivel de especie aunque, como en otros casos, ello requerirá muy probablemente un crecimiento cuantitativo y cualitativo de las bases de datos (Frickmann *et al.*, 2013).

En cuanto a *Brucella* spp., nuestro grupo llevó a cabo un estudio en el que se concluyó que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una buena herramienta para identificar a nivel de género este microorganismos. Sin embargo, los resultados no fueron tan prometedores a nivel de especie dada la gran similitud entre espectros de diferentes especies (Ferreira *et al.*, 2010). Es necesario asimismo disponer de más datos relativos a otros microorganismos patógenos humanos como *Bartonella* spp., y *Francisella* spp.

3.1.3 Bacterias anaerobias. Las cualidades de identificación de esta técnica son aún más favorables en microorganismos como las bacterias anaerobias, para las cuales se ha convertido en el método de elección para la identificación rutinaria de las mismas en los laboratorios de Microbiología Clínica. Los estudios publicados obtienen excelentes resultados tanto en anaerobios Gram positivos como Gram negativos, identificando correctamente las especies más habituales (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Actinomyces*...) De hecho, las discrepancias observadas con los métodos clásicos se deben a la baja fiabilidad de éstos, de modo que cuando se producen discrepancias, los métodos moleculares casi siempre corroboran los resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF (Vega Castaño *et al.*, 2012). La extracción o no de la muestra no parece modificar sensiblemente los resultados, como tampoco lo hace el medio de cultivo de origen.

Este estudio de Vega Castaño *et al.* fue uno de los primeros que se realizó en España sobre la identificación de bacterias anaerobias mediante espectrometría de masas

MALDI-TOF, y en él se concluía que era necesario ampliar los perfiles de referencia, ya que la identificación era extremadamente fiable, siempre que la especie correspondiente estuviese incluida en la base de datos, y que la práctica totalidad de los errores de la espectrometría de masas MALDI-TOF, con respecto a la secuenciación del rRNA 16S, derivaba de que la especie correspondiente no estaba incluida en la base de datos. Los estudios más antiguos ofrecen una eficacia en la identificación en torno al 75-80%, mientras estudios más recientes, con bases de datos más completas o con bases de datos específicas, ofrecen cifras superiores al 90% (Jamal *et al.*, 2013).

3.1.4. Micología. La espectrometría de masas MALDI-TOF se ha utilizado para la identificación de levaduras y hongos filamentosos, incluyendo dermatofitos. Las levaduras son los componentes de este grupo más estudiadas, no sólo a la hora de ser identificadas, sino incluso en el hecho de buscar antígenos proteicos que pudieran ser útiles como biomarcadores en candidiasis sistémica. En este caso sí que se ha visto que influye el método de extracción proteica utilizado, así como las condiciones de crecimiento, el tiempo de incubación y los medios de cultivo utilizados (Quiles Melero *et al.*, 2016), aunque no todos los autores están de acuerdo con esto (Pence *et al.*, 2013).

Ferreira *et al.* realizaron estudios comparativos en este tipo de microorganismos utilizando medios de cultivo (agar sangre, agar Sabouraud) y métodos de identificación convencionales, frente a la espectrometría de masas MALDI-TOF. En los discrepantes, se realizó secuenciación de la región ITS (Ferreira *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos tuvieron muy buena correlación en cuanto a las levaduras, prácticamente del 100%, pero se observó que en el caso de los hongos filamentosos no ocurría lo mismo, alcanzando desde un 14% hasta un 60% según el género. Los resultados fueron considerados satisfactorios sólo a nivel de género, ya que los valores de los *scores* oscilaban entre 1.68 y 1.86.

Estos resultados pueden explicarse por diversos factores que tienen una influencia significativa en el perfil fúngico como, por ejemplo, el hecho de que la lisis de las

células fúngicas pueda no producirse adecuadamente debido al grosor de la pared celular, las diferentes etapas de maduración de las colonias seleccionadas, la presencia/ausencia simultánea de hifas y conidias, la presencia de melanina, etc. (De Carolis *et al.*, 2012).

El factor más estudiado con respecto a los problemas que plantea la identificación de los hongos filamentosos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, son las significativas diferencias que aparecen en los perfiles proteicos obtenidos en función de la antigüedad de los cultivos, e incluso entre diferentes subcultivos de la misma cepa. Sin embargo se han desarrollado métodos de extracción más adecuados que el estándar utilizado para bacteriología con el fin de mejorar los resultados en hongos filamentosos y dermatofitos, al igual que ha ocurrido en relación con las micobacterias.

Actualmente Bruker Daltonics, cuya base de datos de hongos filamentosos, en su versión MBT 6903 MSP Library, incluye 25 géneros y 42 especies, recomienda el cultivo en medio líquido durante una noche, seguida de centrifugación, lavado y extracción con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. MS-VITEK, en su versión 3.0, incluye 32 géneros y 81 especies, y SARAMIS en su versión RUO 4.13, incluye una base de datos más amplia, con 45 géneros y 168 especies. BioMérieux no recomienda el cultivo en medio líquido, sino una extracción convencional con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. A pesar de todo recientemente, usando la metodología recomendada por Bruker Daltonics, se ha conseguido identificar correctamente a nivel de especie el 72% de los aislados (Schulthess *et al.*, 2014), frente al 66,8% de 318 aislados usando VITEK 3.0, debido sobre todo a carencias de la base de datos (McMullen *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta todo lo publicado al respecto para este tipo de microorganismos, se puede concluir que no existen motivos fundados para pensar que en la identificación de hongos filamentosos no se pueda llegar a alcanzar la misma fiabilidad que en la identificación de levaduras. Es necesario realizar una extracción adecuada, y fundamentalmente es necesario disponer de bases de datos más completas tanto desde el punto de vista cuantitativo (número de especies incluidas) como cualitativo

(inclusión de perfiles de la misma especie obtenidos de cultivos con diferente antigüedad, procedentes de diferentes medios de cultivo, etc.)

3.1.5. *Micobacterias.* El mayor problema que han presentado siempre las técnicas convencionales para la identificación de micobacterias han sido la baja sensibilidad y especificidad de las tinciones, y la tardanza en la obtención de resultados en las pruebas de identificación de fundamento bioquímico, debido a los tiempos de crecimiento de estos microorganismos. Por ello, los métodos de referencia en la actualidad son las técnicas moleculares. Sin embargo, la biología molecular presenta un inconveniente claro, que es su elevado coste. Pese a ello, no existen en este momento técnicas equiparables a las técnicas moleculares en cuanto a sensibilidad y rapidez, sobre todo cuando se trata de trabajar a partir de muestra directa. Sin embargo, la espectrometría de masas MALDI-TOF es una alternativa muy interesante cuando se trata de trabajar a partir de colonia, ya que podría llegar a ofrecer resultados similares en cuanto a fiabilidad y rapidez a los de las técnicas moleculares, con un coste muy inferior.

Se trata de un grupo de microorganismos complejo desde el punto de vista de su composición proteica. Dentro de los factores que pueden afectar a su identificación se ha contemplado el hecho de que puedan presentar perfiles proteicos muy diferentes en función de la antigüedad de los cultivos, al igual que ocurre con los hongos. Se ha hablado también de la posible formación de polímeros que enmascararían el tamaño real de las proteínas características utilizadas para la identificación. Por todo ello, resulta imprescindible disponer de bases de datos más amplias y complejas, que reflejen toda la diversidad que se puede dar en estos microorganismos en cuanto a su composición proteica, para alcanzar porcentajes de éxito en la identificación similares a los que se obtienen en otras bacterias.

Los resultados de identificación que se obtienen para las micobacterias no siguen un patrón común, es decir, los diferentes grupos de investigación presentan resultados muy dispares, probablemente influenciados por estos factores que dificultan el

proceso, de manera que existe una gran cantidad de protocolos, si bien es cierto que las diferencias entre uno y otros son menores en la mayor parte de los casos.

El método recomendado actualmente por Bruker Daltonics incluye varios pasos de calentamiento y lavado, seguidos de un tratamiento con bolas de vidrio y acetonitrilo. Posteriormente son tratadas con ácido fórmico, aplicadas en la placa y cubiertas con la matriz.

Por el contrario, el método propugnado por bioMérieux parte de un tratamiento inicial con etanol al 70% y bolas de vidrio, tras el cual la muestra es extraída con ácido fórmico y acetonitrilo, aplicada en la placa y cubierta con la matriz.

Un estudio presentado por Wilen *et al.* en 2015, concluye que las muestras obtenidas con el método de extracción de Bruker dan mejores resultados en su espectrómetro, y las procesadas con el método de Vitek lo hacen tanto con SARAMIS como en el propio Vitek MS, aunque la diferencia en este caso es menor. En conjunto, parece ser que Vitek MS se ve menos afectado por el método de extracción.

En cuanto a la eficacia en la identificación, en ese mismo estudio, Biotyper (BD) identificó con un *score* $\geq 1,8$ un 81,5% de los aislados, mientras SARAMIS y Vitek MS 3.0 identificaron con una fiabilidad $\geq 90\%$ un 85,4% y un 89,2% respectivamente. Utilizando estos mismos criterios, un 22,6% de los aislados que fueron identificados por Biotyper (BD) necesitaron ser extraídos en más de una ocasión para lograr la identificación, lo que ocurrió en un 21,5% con SARAMIS y en un 14,2% con Vitek MS 3.0.

En cuanto a otros aspectos no relacionados estrictamente con la identificación, pero que van a influir en ella, no sólo son las condiciones de crecimiento que se han comentado al principio. Es muy importante que el protocolo de extracción de proteínas sea examinado al detalle, y que se realice una buena inactivación de la micobacteria (BaLazova *et al.*, 2014). Se ha visto también que la espectrometría de masas MALDI-TOF genera menos residuos que otras técnicas moleculares o pruebas

bioquímicas que tienen mayor cantidad de material desechable (Balada *et al.*, 2013), lo que supone otra ventaja añadida para esta herramienta.

3.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF a partir de muestra directa

La posibilidad de trabajar a partir de muestra directa, sin necesidad de esperar al crecimiento en medios de cultivo, se convierte en uno de los grandes atractivos de esta metodología, por lo que supone en cuanto a aumento de la rapidez de respuesta manteniendo una alta fiabilidad de los resultados (Clark *et al.*, 2013). Con esta aplicación, La espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en una herramienta clave en infecciones graves con alta tasa de morbilidad y mortalidad como bacteriemias o fungemias (Rodríguez *et al.*, 2016).

Es cierto que, a la hora de trabajar a partir de muestra directa, se presentan inconvenientes que pueden limitar la utilidad de la técnica. En lo que se refiere al microorganismo, se ha comprobado que en muestras con baja densidad microbiana no es posible realizar una correcta identificación, ya que la cantidad de proteínas bacterianas presentes es insuficiente. En el caso de muestras polimicrobianas se encuentran dificultades, ya que es difícil poder llevar a cabo la identificación de forma satisfactoria, pues se genera un perfil proteico aberrante como resultado de la mezcla de varios perfiles únicos, si bien Bruker Daltonics ha desarrollado un *software* que permitiría la individualización de estos perfiles, al menos en algunos casos. Otra posibilidad es que, en infecciones mixtas, el microorganismo que esté en menor proporción no se detecte, por lo que uno de los factores que influye en el resultado es la proporción que esté presente de cada población. Por último, en el caso de microorganismos mayoritariamente intracelulares, podría ser necesario un paso adicional de lisis celular para obtener cantidad suficiente de microorganismos.

Por otro lado, no todas las muestras son válidas para este tipo de estudio. El volumen es uno de los factores limitantes más importante para poder procesar una muestra, sobre todo en aquellas muestras en las que la concentración bacteriana sea baja. Se debe tener cuidado con las muestras poco diluidas o purulentas porque es posible que la identificación no pueda llevarse a cabo con los protocolos más sencillos y, por último, existen sustancias que podrían

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

interferir en el resultado de la identificación (restos celulares, proteínas, etc.) (Vila *et al.*, 2016).

La muestra ideal para realizar una identificación directa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF es aquella que proceda de un área habitualmente estéril, que contenga altas concentraciones de microorganismo y en la que el volumen no sea un factor limitante. La orina y los hemocultivos son muestras que se ajustan bien a este perfil, y por ello han sido las más estudiadas. Las muestras procedentes de áreas habitualmente colonizadas (piel, aparato respiratorio alto, muestras fecales...) van a generar con toda probabilidad perfiles imposibles de interpretar.

Estos inconvenientes son mínimos frente a las numerosas ventajas en cuanto a rapidez y fiabilidad que ofrece la técnica, en aquellos ámbitos en que es razonable aplicarla, con una repercusión clínica evidente sobre todo en el caso de los hemocultivos, que ha hecho que se haya convertido en un uso habitual en numerosos Servicios de Microbiología. De hecho, en la actualidad, la utilidad de esta aplicación está fuera de toda discusión, y su aplicación se ve dificultada en muchos casos por problemas ajenos a los estrictamente científicos (disponibilidad de personal técnico, periodos de actividad/inactividad del Servicio de Microbiología, etc.).

3.2.1. Identificación directa a partir de muestra de orina

El cultivo de orina es el método de referencia para el diagnóstico de las infecciones urinarias, ya que permite cuantificar e identificar los diferentes uropatógenos (Ferreira *et al.*, 2010). Sin embargo, su rentabilidad no es muy alta, ya que el 60-70% de la orinas procesadas resultan cultivos negativos y el intervalo entre la recepción de la muestra y la emisión de resultados (24–48 horas), sin ser crítico, como en el caso de los hemocultivos, en la mayoría de los casos, sí es claramente mejorable. Con la introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el diagnóstico microbiológico, una de los primeros tipos de muestra con los que se comienza a trabajar para la identificación directa de microorganismos es la orina, ya que cumple los requisitos para ser una muestra adecuada: el volumen de muestra no suele ser un

problema, la infección es muy mayoritariamente monobacteriana y la concentración de microorganismos suele ser alta.

Algunos trabajos publicados hasta el momento han obtenido resultados excelentes, con concordancias en cuanto a la identificación que llegan a ser del 90-95% (Sánchez-Juanes *et al.*, 2014), en comparación con los sistemas automatizados y siendo los resultados favorables para la espectrometría de masas MALDI-TOF en la mayoría de los casos discrepantes tras recurrir a la secuenciación RNA 16S.

A la hora de procesar las muestras se han descrito diferentes protocolos, coincidiendo todos ellos en la necesidad de realizar un cribado previo para poder discriminar entre las muestras positivas y negativas, y así rentabilizar la técnica, utilizando la espectrometría de masas exclusivamente para las muestras positivas. Se han empleado para ello distintas técnicas, entre ellas la citometría de flujo y la tinción de Gram (Burillo *et al.*, 2014).

En cuanto a la preparación de la muestra, en la mayoría de los casos se utilizan técnicas de centrifugación. Según los diferentes grupos de trabajo existen pequeñas variaciones en los protocolos, pero todos siguen la norma de someter a las muestras a una serie de centrifugaciones y lavados con agua desionizada, llevando a cabo posteriormente el procedimiento convencional de la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se ha propuesto incorporar diferentes sustancias a la alícuota de la muestra, como dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% (Sánchez-Juanes *et al.*, 2014) o Tween-80 (Burillo *et al.*, 2014), para mejorar los resultados. Estas sustancias actuarían como detergentes, dispersando las membranas celulares y liberando microorganismos intracelulares, con lo que la concentración de microorganismos, y los resultados de la espectrometría, mejorarían, en especial en aquellos casos en que los resultados son mediocres por baja cantidad de proteínas bacterianas. Otros grupos de trabajo incluyen pasos intermedios como la diafiltración, con la que consiguen valores predictivos positivos del 100% (DeMarco *et al.*, 2014).

En la mayoría de los trabajos los resultados obtenidos tienden a ser mejores para microorganismos Gram negativos que para Gram positivos y hongos, obteniendo identificaciones fiables en aquellas muestras en las que los recuentos son elevados, con recuentos superiores a 10^5 UFC/ml.

Una de las mayores limitaciones que se han planteado, de manera general, en relación con el uso de la espectrometría de masas, es la falta de correlación temporal entre la identificación y los estudios de sensibilidad. La espectrometría de masas permite obtener identificaciones muy rápidas y fiables. En muchos casos esto permite orientar y definir más la terapia empírica, pero en todo caso sigue siendo terapia empírica, con todos sus inconvenientes (posibilidad de fracaso terapéutico, presión selectiva sobre los microorganismos resistentes, alto coste, etc.). Sin embargo, no se ha conseguido desarrollar métodos, basados en espectrometría de masas, que den una información sobre sensibilidad a antimicrobianos equiparable a la que ofrece el antibiograma convencional, con la rapidez y fiabilidad de la identificación basada en esta tecnología. Algunos autores han propuesto un método intermedio, mediante el cual se utiliza para hacer un antibiograma convencional por difusión en agar el mismo sedimento que se utiliza para la identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y que permite una lectura precoz del mismo a las 6-8 horas con una fiabilidad bastante alta (Zboromyrska *et al.*, 2016).

A pesar de todos estos avances, el hecho de que se trate, en la mayor parte de los casos, de infecciones moderadas o leves, y en la mayoría de los casos extrahospitalarias, se traduce en una escasa difusión de estos estudios a la práctica clínica diaria.

3.2.2. Identificación directa a partir de hemocultivos

La bacteriemia o fungemia, el shock séptico y la endocarditis representan enfermedades graves con mortalidad y morbilidad importantes, con una tasa de incidencia estimada de hasta 18 millones de personas en todo el mundo cada año.

El cultivo de sangre ha sido durante muchos años la mejor manera de conocer la etiología de estas infecciones, así como la herramienta para poder determinar la sensibilidad a los antimicrobianos. Con este método, los tiempos de respuesta se sitúan en no menos de 24 horas para conocer el agente causal, y no menos de 48 horas para poder dirigir el tratamiento de manera adecuada. Sin embargo, los índices de mortalidad en bacteriemias están directamente vinculados a la rapidez con que se realiza el diagnóstico etiológico y se dispone de un antibiograma fiable (Croxato *et al.*, 2011).

Aunque inicialmente la posibilidad de tener datos de sensibilidad a antimicrobianos basados en la tecnología de espectrometría de masas era baja, la simple posibilidad de utilizar la espectrometría de masas MALDI-TOF para tener una identificación fiable a los pocos minutos de positivizarse un hemocultivo era enormemente atractiva, ya que abría un amplio campo de posibilidades a la hora de establecer tratamiento empíricos basados no sólo en la tinción de Gram, sino en una identificación fiable, como mínimo, a nivel de género.

A priori se trataba, como en el caso de la orina, de una muestra muy adecuada, ya que se dispone de un alto volumen, se trata de una infección muy mayoritariamente monobacteriana y, una vez positivizados, con una carga bacteriana alta, en torno a 10^5 UFC/mL (Morgenthaler *et al.*, 2015). A nivel teórico, también se planteaban algunos inconvenientes, como las posibles interferencias en los perfiles que podían condicionar la presencia de proteínas humanas, células sanguíneas y el carbón del propio frasco de hemocultivo (Rodríguez *et al.*, 2016).

Al igual que se planteó con las muestras de orina, e incluso en mayor medida, se planteó que, al tratarse en algunos casos de infecciones mayoritariamente intracelulares, la optimización del diagnóstico de bacteriemia requería métodos de lisis celular para recuperar la mayor cantidad posible de microorganismos. Así se han publicado varios protocolos para conseguir la lisis de las células presentes en los hemocultivos. Uno de ellos se basa en la inducción de la lisis celular mediante el tratamiento de la muestra con un detergente, como puede ser el dodecilsulfato sódico (SDS) (Hoyos–Mayecot *et al.*, 2013), saponina (Martyni *et al.*, 2012) o Tween 80 (Juiz *et al.*, 2011). Como alternativa al uso de detergentes, Moussaoui describió un método

que consiste en usar un tubo con gel separador de suero y con activador de la coagulación, y que también permite una mayor recuperación bacteriana (Moussaoui *et al.*, 2010).

Nuestro grupo describió en 2011 un protocolo basado en centrifugación diferencial; en este método se realiza una centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células y otros cuerpos más densos que los microorganismos, y así obtener un sobrenadante más limpio que seguidamente se centrifuga a alta velocidad con el fin de forzar la sedimentación de los microorganismos que se pretenden identificar (Ferreira *et al.*, 2011).

Se ha desarrollado también un equipo comercial (MALDI Sepsityper, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), basado en principios similares (lisis celular y centrifugación), que permite la identificación de bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas y levaduras desde hemocultivos positivos en 30 minutos. Es un protocolo sencillo, desarrollado para su uso clínico rutinario en hemocultivos positivos. Brevemente, se añaden 200 µl de tampón de lisis a 1 ml de hemocultivo extraído a un tubo de reacción. El tubo se agita en un vórtex durante 10 segundos, y posteriormente se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante es desechado, se resuspende el sedimento en 1 ml de tampón de lavado, y se centrifuga de nuevo a 13.000 rpm durante otro minuto. El sobrenadante es descartado una vez más, y el pellet se resuspende en 300 µl de agua desionizada y 900 µl de etanol y se introduce en el MALDI-TOF para su identificación (Schieffer *et al.*, 2014; Morgenthaler *et al.*, 2015; Riederer *et al.*, 2015).

No hay unanimidad entre los diferentes autores a la hora de interpretar los proteogramas obtenidos de manera directa de hemocultivos positivos. Algunos autores utilizan valores de *score* >1.7 para considerar la identificación como adecuada, mientras otros disminuyen el límite de valor de *score* hasta 1.5, pero a cambio incluyen otros requisitos, como que la especie que obtenemos aparezca en las dos o tres primeras posiciones de lista de posibles microorganismos coincidiendo en todas las posiciones el mismo microorganismo (Idelevich *et al.*, 2014), o bien que entre la primera opción que propone la espectrometría de masas MALDI-TOF y la siguiente, exista una diferencia en el *score* de, al menos, 0.3 puntos (Martiny *et al.*, 2012).

En general, los estudios publicados muestran resultados similares (March-Rosselló *et al.*, 2009; Idelevich *et al.*, 2014). La mayoría de ellos obtienen resultados satisfactorios en el procesamiento directo de hemocultivos, si bien estos resultados suelen ser mejores en el caso de los Gram negativos que en el de los Gram positivos, algo que ya ocurría con la identificación directa a partir de muestras de orina, o incluso en los comienzos de la espectrometría de masas MALDI-TOF a partir de cultivo. En particular, dentro de los estudios realizados, existen muchas discrepancias en cuanto a Gram positivos se refiere, tanto en sensibilidad como en especificidad, sobre todo si hablamos de estreptococos del grupo *viridans* o de las diferentes especies de estafilococos no productores de coagulasa (Martiny *et al.*, 2012; Foster *et al.*, 2013; Morgenthaler *et al.*, 2015).

Las revisiones que recopilan resultados de estudios de identificación directa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en hemocultivos positivos recogen que, con pequeñas modificaciones de los protocolos, la identificación correcta de Gram negativos estaría entorno al 90-95%, mientras la de Gram positivos muestra un intervalo mucho más amplio, entre el 50% y el 90 % aproximadamente, tal y como aparece en la tabla 1 (Rodríguez *et al.*, 2016).

Pese a que la identificación de levaduras a partir de cultivo ofreció excelentes resultados desde los primeros estudios, la espectrometría de masas directa sobre hemocultivos, en pacientes con fungemia, incluyendo fungemias por *Candida spp.* y otras levaduras, ofreció unos resultados decepcionantes (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2014). Se observó que el método sencillo de extracción convencional con etanol y ácido fórmico no era útil. Fue necesario incluir un paso adicional de extracción previo para conseguir cifras de identificación superiores al 90% (Ghosh *et al.*, 2015). En las últimas revisiones las tasas de éxito oscilan entre un 91.3 y el 100% (Quiles-Melero *et al.*, 2016).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

REFERENCIA	MÉTODO	SENSIBILIDAD
Rodríguez-Sánchez <i>et al.</i>	Lavados y etanol/fórmico	Global (81,4)
Paolucci <i>et al.</i>	13 Lavados, SDS ácido fórmico	Levaduras (40,9)
Hoyos-Mallecot <i>et al.</i>	34 Lavados, SDS, ácido fórmico	CGP (73,3), BGN (96,0)
Bidart <i>et al.</i>	37 Lavados, SDS, ácido fórmico/acetonitrilo	Levaduras (88,8)
March-Rosselló <i>et al.</i>	35 Lavados y etanol/fórmico	CGP (98,4)
Egli <i>et al.</i>		Levaduras (62,5)
Morgenthaler y Kostrzewa (metaanálisis)		39 CGP (86,3), BGN (89,8), levaduras (70,6)
Bidart <i>et al.</i>		42 CGP (58,5), BGN (82,5)
Martiny <i>et al.</i>		<i>Staphylococcus</i> spp. (66), <i>Enterococcus</i> spp. (100), <i>Streptococcus</i> spp. (86,7), enterobacterias (92), <i>Pseudomonas</i> spp. (80), levaduras (12,5)
Idelevich <i>et al.</i>		CGP (98), BGN (94)
Saffert <i>et al.</i>	Saponinas	CGP (58,2), BGN (90,0)
Saffert <i>et al.</i>	Lisis y filtración	CGP (77,5), BGN (82,4), levaduras (83,3)
Foster <i>et al.</i>	Centrifugación y detergente	<i>Staphylococcus</i> spp. (99,2), <i>Streptococcus</i> spp. (38,5), <i>Enterococcus</i> spp. (100), enterobacterias (92,5), BGN-NF (52,4)

Tabla 1. Adaptada de Rodríguez *et al.*, 2016. Tabla resumen de sensibilidad y especificidad de los diferentes protocolos. BGN: bacilos Gram negativos; BGN-NF: bacilos Gram negativos no fermentadores; CGP: cocos Gram positivos; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; SDS: docecilsulfato sódico.

En cuanto a la comparación entre los kit comerciales, como Sepsityper, frente a los métodos de procesamiento alternativos desarrollados en los laboratorios, los resultados son similares, de manera que es cada laboratorio el que deberá priorizar entre la mayor normalización y el ahorro en tiempo de procesamiento de los métodos comerciales, o el ahorro económico que supone la utilización de un método alternativo (Chen *et al.*, 2013).

Aunque no está exento de limitaciones, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha mostrado como un método rápido y fiable para la identificación de microorganismos directamente desde frascos de hemocultivo. El tiempo para obtener resultados se ve reducido a unos 30 minutos frente a las 24-48 horas de los métodos convencionales. No se requiere un personal demasiado especializado para la ejecución de los protocolos, lo que sumado a que la técnica no tiene un coste elevado facilita la implantación en el laboratorio.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

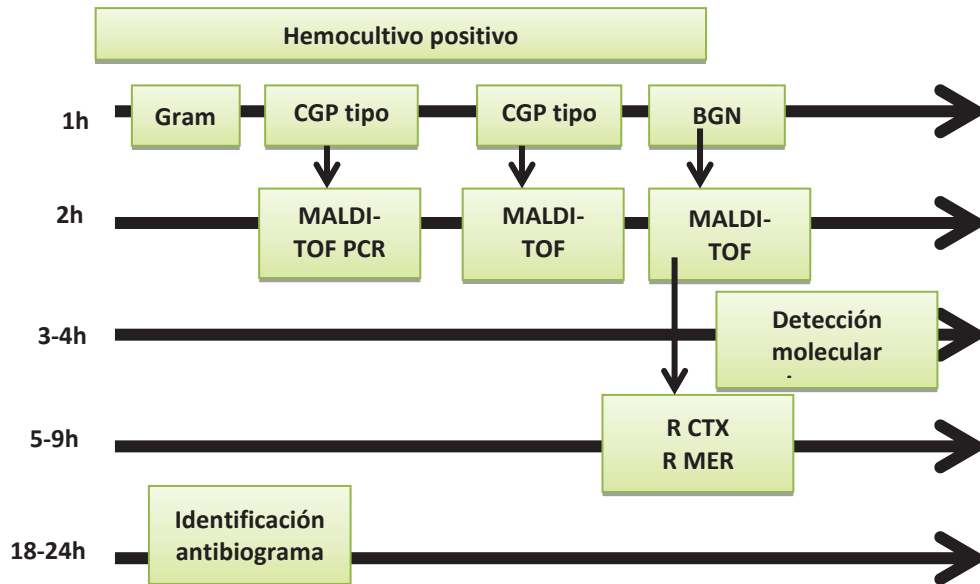


Figura 6. Adaptada de Rodríguez *et al.*, 2016. Tiempos de respuesta para conocimiento de agente etiológico en sepsis. BGN: bacilos Gram negativos; CGP: cocos Gram positivos; MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MR: multirresistente; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; R: resistencia; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

La posibilidad de disponer de la identificación del agente etiológico de una bacteriemia en un plazo de menos de 1 hora desde la positivización del hemocultivo supone un avance evidente, que puede ayudar de forma decisiva a dirigir el tratamiento antimicrobiano, minimizar costes y conseguir una reducción en la estancia hospitalaria y un aumento en la supervivencia.

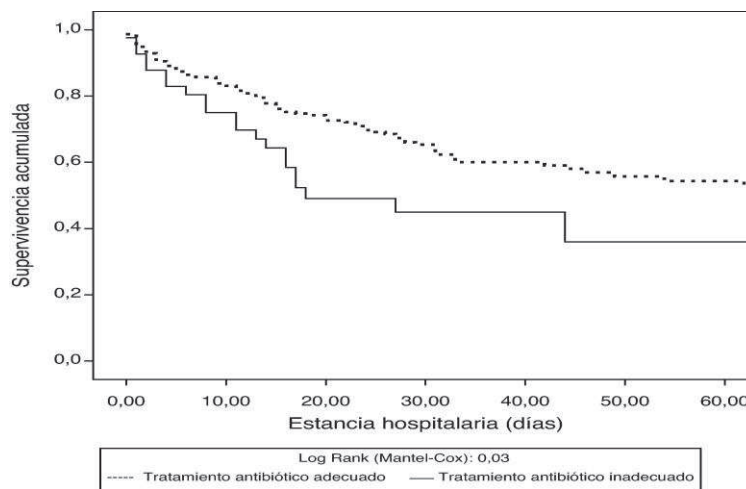


Figura 7. Tomada de Suberviola *et al.*, 2015. Relación estancia hospitalaria con supervivencia acumulada.

Al mismo tiempo, la difusión de estos procedimientos podría reducir enormemente el uso de tratamientos empíricos en sentido estricto, en las bacteriemias, ya que sería posible recurrir a tratamientos que, sin dejar de ser empíricos, estarían dirigidos por la identificación exacta del agente etiológico. Ello, aparte de influir en la supervivencia de los pacientes y en el coste terapéutico, permitiría reducir de manera notable la presión ecológica ejercida por las terapias empíricas de amplio espectro, lo que a su vez repercutiría muy probablemente en la prevalencia de las resistencias a antimicrobianos.

Obviamente, lo ideal sería disponer de sistemas equiparables en rapidez y eficacia también para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, pero eso hasta el momento sólo se había conseguido parcialmente, a través de métodos moleculares o a través de métodos basados en espectrometría de masas MALDI-TOF que permiten conocer la existencia de mecanismos de resistencia concretos que afectan a grupos de antimicrobianos específicos.

Se han publicado varios estudios importantes, que estudian la repercusión directa que el uso de estas técnicas tuvo en el tratamiento de los pacientes. En el estudio publicado por Clerc *et al.* se seleccionaron bacteriemias por bacilos Gram negativos, y se determinó el impacto de la tinción de Gram, así como del uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF. Se observó que la tinción de Gram ayudo a ajustar el tratamiento en el 20,8% de los casos, mientras la identificación del microorganismo por espectrometría de masas MALDI-TOF directamente a partir del hemocultivo positivo propició un cambio en el tratamiento en el 35,1% de las bacteriemias (Clerc *et al.*, 2013).

En el caso de microorganismos Gram positivos, algunos autores han demostrado la utilidad de esta herramienta para discriminar de manera inmediata entre *Staphylococcus aureus* y estafilococos no productores de coagulasa, lo que se tradujo en una reducción del uso innecesario de vancomicina (Nagel *et al.*, 2014).

En general, los estudios que analizan la repercusión clínica de la disponibilidad de esta metodología demuestran una reducción de la estancia en unidades de cuidados

intensivos, reducción en la estancia hospitalaria global, reducción de los costes hospitalarios totales y de la mortalidad a los 30 días.

3.2.3. Identificación directa a partir de otras muestras

Sobre el resto de muestras biológicas, aparte de muestras de orina y hemocultivos, el número de estudios es muy escaso. Un tipo de muestra para la que es muy importante disponer de una tecnología con el nivel de fiabilidad y rapidez que ha demostrado la espectrometría de masas es el líquido cefalorraquídeo. Existen técnicas moleculares, sobre todo a partir del lanzamiento de las técnicas multiplex con perfiles sindrómicos, que cumplen estos parámetros de rapidez y fiabilidad, pero su coste supone en este momento una limitación determinante para su uso. La espectrometría de masas obviaría este inconveniente, pero la mayoría de los estudios muestran que el volumen limitado de la muestra, la dificultad de obtener muestras sucesivas y la baja densidad bacteriana suponen un inconveniente decisivo, que condiciona una sensibilidad extremadamente baja (Bjørnholt *et al.*, 2011). Así, en el estudio de Bjørnholt, 14 de 183 muestras de LCR, fueron positivas por el método convencional, y ninguna de ellas fue positiva por espectrometría de masas MALDI-TOF directa sobre muestra.

Se han descrito casos aislados en los que se logró la identificación correcta del microorganismo implicado, como una meningitis neumocócica (Nyvang *et al.*, 2010) y un caso de meningitis por *Klebsiella pneumoniae* (Segawa *et al.*, 2014) pero, por regla general, los resultados son poco prometedores, y las limitaciones de la muestra no hacen prever que esto vaya a variar en un futuro próximo.

Existen pocos datos sobre otro tipo de muestras. Las muestras con baja carga bacteriana, sobre todo si no están disponibles en cantidad suficiente, no es previsible que ofrezcan buenos resultados. Otras muestras como exudados, etc., con cargas bacterianas altas, podrían ofrecer resultados mejores, aunque habría que estudiar la interferencia que puede suponer la presencia de cantidades importantes de proteínas de otros orígenes (células, exudado...) en la identificación. Por otra parte, la baja sensibilidad de la técnicas obligaría a estudiar mediante metodología convencional todas las muestras negativas por espectrometría de masas

3.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF Y resistencia a antimicrobianos

La espectrometría de masas MALDI-TOF es, indudablemente, una excelente técnica para identificación de microorganismos. Ofrece unos resultados comparables en fiabilidad a los de la secuenciación del RNA 16S, con un tiempo e respuesta en torno a los 30 minutos desde la positivización del hemocultivo o la recepción de la muestra de orina. Sin embargo, estas ventajas evidentes quedan en parte ensombrecidas por la no disponibilidad de estudios de sensibilidad con una fiabilidad y rapidez de respuesta parecidas que permitan un informe etiológico completo.

Conseguir, mediante técnicas proteómicas, perfiles de sensibilidad similares a los perfiles fenotípicos convencionales, con una rapidez y fiabilidad próximas a las logradas en la identificación es un desafío importante, dada la variedad de mecanismos de resistencia y la diversidad de proteínas implicadas en cuanto a tamaño, nivel de producción, localización, etc.

Este reto cobra aún más importancia en aquellos mecanismos de resistencia que tengan una prevalencia elevada y afectan a antimicrobianos de amplio uso en terapias empíricas, como cefalosporinas de 3ª generación o carbapenemas (Lartigue *et al.*, 2013).

Hace ya algunos años, a medida que se fueron conociendo en detalle los principales mecanismos de resistencia a los diferentes antimicrobianos, se fue desarrollando el antibiograma interpretativo, que intentaba extrapolar, sobre la base del fenotipo de resistencia de un microorganismo y de las características de ésta (constitutiva, inducible...), los mecanismos de resistencia existentes, deduciendo a partir de ello el perfil de resistencia real, incluyendo aquellas resistencias no detectables por un antibiograma convencional. Obviamente este antibiograma constitutivo, aunque ha supuesto un avance importante para el manejo adecuado de los antimicrobianos, no siempre puede ser utilizado. Una utilización adecuada del antibiograma interpretativo requiere conocimientos profundos sobre antimicrobianos, y no es aplicable a todos los antimicrobianos ni a todos los perfiles de sensibilidad. En especial cuando se combinan varios mecanismos de resistencia, deducir su implicación puede ser extremadamente complejo. La progresiva implantación de métodos moleculares para la detección de mecanismos de resistencia ha constituido una aportación importante. Se trata de técnicas rápidas y precisas, aunque todavía con un coste elevado. Por

otra parte, la búsqueda de mecanismos de resistencia por métodos moleculares sólo es aplicable, en este momento, a mecanismos específicos que sean de especial interés en un momento determinado. No es posible, en este momento, obtener antibiogramas completos mediante esta metodología por complejidad técnica, coste, y porque la resistencia a los antimicrobianos no siempre se asocian a la presencia de genes específicos. En ocasiones se asocia a diferentes niveles de expresión de genes constitutivos, lo que hace si cabe más complejo el problema.

La posibilidad de utilizar la espectrometría de masas MALDI-TOF para desarrollar estudios de sensibilidad, aunque muestra dificultades evidentes, tiene la ventaja de poder trabajar con la misma infraestructura utilizada para la identificación, por lo que su coste sería mucho más reducido no sólo que el de los métodos moleculares, sino incluso que el de los métodos fenotípicos y bioquímicos (Oviaño *et al.*, 2016).

En este área de investigación sobre estudios de sensibilidad y métodos de detección de resistencia basados en espectrometría de masas MALDI-TOF, se ha trabajado en varias direcciones. La primera de ellas es la de la detección de la presencia de enzimas capaces de hidrolizar a determinados antimicrobianos, a partir del diferente cociente m/z generado por el antimicrobiano intacto y el hidrolizado. Otros enfoques han sido analizar los componentes de las células bacterianas, estudios de metilación del DNA, la detección de mutaciones con minisequenciación (Habrak *et al.*, 2013) o la presencia de algunos mecanismos de resistencia, como VanB, a partir de la presencia de picos específicos.

3.3.1. Detección de enzimas hidrolizantes

3.3.1.1. Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Se han descrito más de 300 tipos de BLEE que se clasifican en diferentes grupos. La mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de Ambler donde se encuentran todas las enzimas de los grupos TEM, SHV y CTX-M (Habrak *et al.*, 2013). A ellas se suman otras enzimas mucho menos prevalentes, pertenecientes a otros grupos funcionales, como las PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, pertenecientes al grupo *2be*, o las β -lactamasas CMT (*complex mutant TEM*), incluidas en el *2ber*. Se engloban

también dentro de este tipo de enzimas algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional *2de*).

El hecho de que haya tantas enzimas diferentes capaces de producir fenotipos de resistencia muy similares, dificulta lo que podría parecer la evolución natural de los estudios de sensibilidad hacia la tecnología molecular, ya que la detección de los enzimas implicados podría implicar la necesidad de realizar cientos de PCRs a cada aislado.

El mecanismo más común de resistencia a los β -lactámicos es mediante hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico. El producto de degradación de la hidrólisis muestra una masa molecular diferente de la molécula original, a lo que se le suman posibles descarboxilaciones y captaciones de iones de la matriz que modifican dicha masa. Esto es el punto clave que nos ayudará a diferenciar los microorganismos resistentes de los sensibles.

Los trabajos llevados a cabo se basan en la realización de cultivos del microorganismo, incubándolo en presencia de los antibióticos problema. Mediante una serie de centrifugaciones y lavados, el sobrenadante es usado para llevarlo al espectrómetro de masas MALDI-TOF y se procede a la extracción mediante etanol y ácido fórmico. A continuación se obtienen diferentes perfiles de picos de masas con y sin antibiótico. Analizando y comparando estos perfiles, se puede identificar la presencia de una beta-lactamasa (Schaumman *et al.*, 2012). Sparbier *et al.* fue el primero en realizar este tipo de estudio, y estableció la posibilidad de llevarlo a cabo en un tiempo de 3 horas. En este estudio se tuvieron en cuenta ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, imipenem y meropenem, y como se observa en las figuras 7, 8 y 9, es posible discriminar entre cepas sensibles y resistentes (Sparbier *et al.*, 2012). No obstante, lo que se obtiene es un perfil fenotípico (hidrólisis/no hidrólisis), no siendo posible determinar los enzimas concretos implicados en la hidrólisis, si existe.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

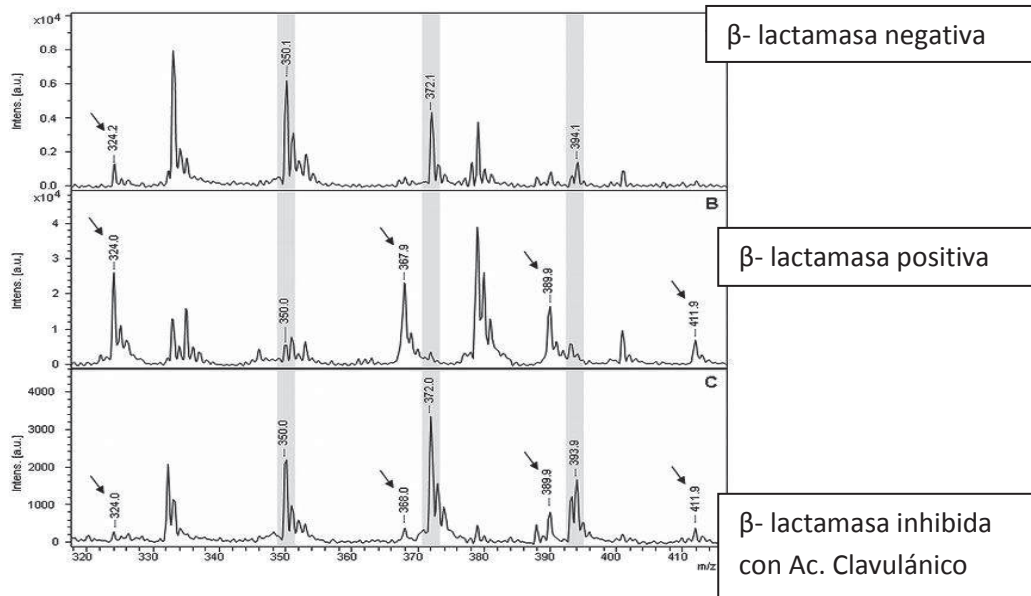


Figura 8. Tomada de Sparbier *et al.*, 2012. Presencia de picos debidos a la hidrólisis. Estudio de ampicilina.

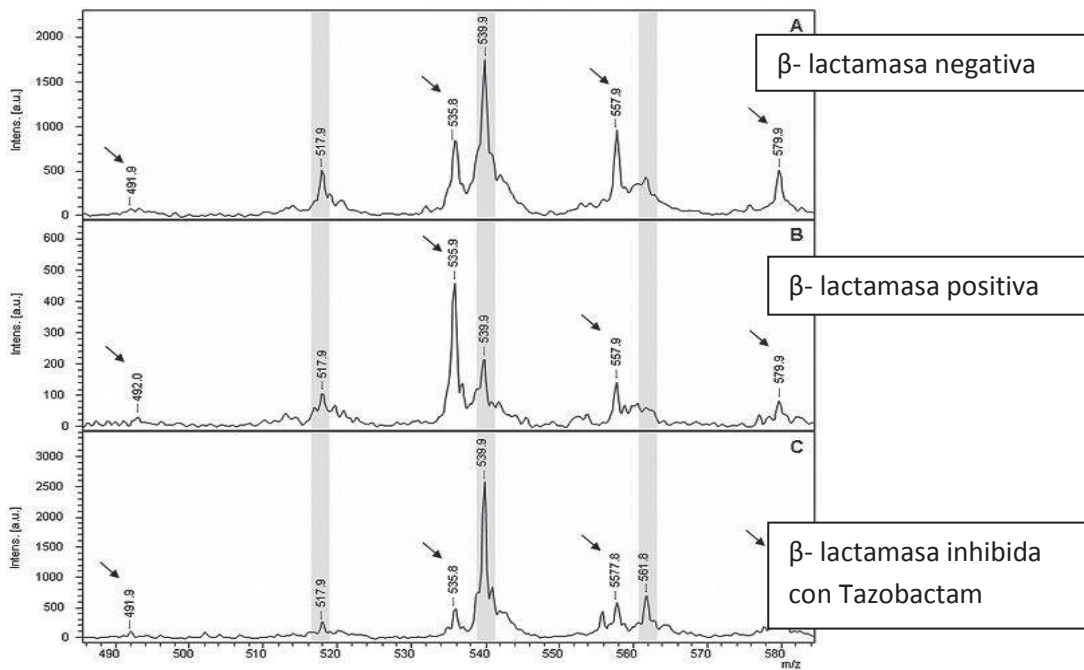


Figura 9. Tomada de Sparbier *et al.*, 2012. Presencia de picos debidos a la hidrólisis. Estudio con piperacilina.

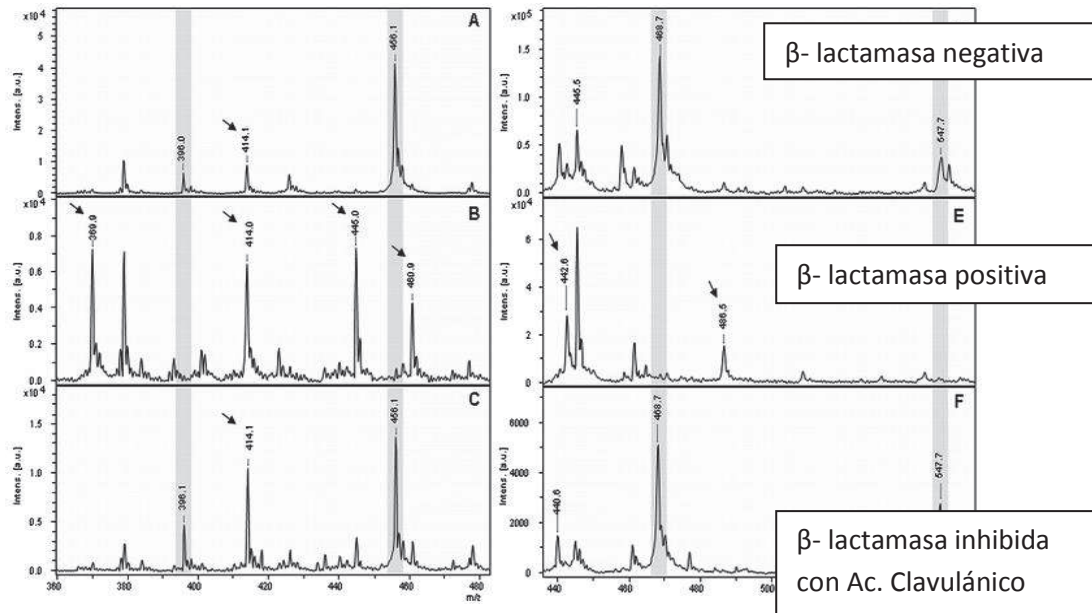


Figura 10. Tomada de Sparbier *et al.*, 2012. Presencia de picos debidos a la hidrólisis, estudio con cefotaxima y ceftazidima.

Otros estudios corroboraron esta técnica (Jung *et al.*, 2014) para Gram negativos y cefalosporinas de tercera generación, utilizando muestras clínicas. Los resultados fueron buenos aunque la variedad de beta-lactamasas estudiada no fue muy amplia, y se llegó a la conclusión de que eran necesarios más estudios que además incluyeran diferentes perfiles, como por ejemplo cepas portadoras de *AmpC*. A pesar de estas pequeñas limitaciones se redujo el tiempo a un intervalo de 2 -2,5 horas desde que el hemocultivo se positiviza, anticipándose 24-48 horas a los métodos tradicionales.

Posteriormente se mejoraron estos resultados, llegándose a alcanzar sensibilidades del 99%, con tiempos de respuesta similares. Sin embargo, se dio un paso más al observarse una relación cualitativa entre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y el grado de hidrólisis del antibiótico, lo que llevó a concluir que el tiempo necesario para la hidrólisis sería menor cuanto mayor fuera la CIM. (Oviaño *et al.*, 2014)

3.3.1.2. Enzimas carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, incluido el de las carbapenemas. Cuando apareció este tipo de enzima no había un método directo estandarizado para la detección de las mismas en laboratorios microbiológicos de rutina. El método de referencia se basaba en el análisis espectrofotométrico de imipenem, que requiere la preparación de un extracto bacteriano por sonicación, y en la prueba de Hodge, difícil de estandarizar (Grundmann *et al.*, 2010). Se han utilizado métodos indirectos, basados en la capacidad de algunos compuestos para inhibir las carbapenemasas. Así, se han usado agentes quelantes iónicos (EDTA, ácido dipicolínico) que inhiben metalo β -lactamasas (MBL) y ácido fenilborónico, que inhibe las carbapenemasas con núcleo activo de serina, como la carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) (Giske *et al.*, 2011). Sin embargo, la especificidad de este método es limitada. Con los años se han desarrollado métodos moleculares que permiten la detección de este tipo de mecanismo de resistencia (Normand *et al.*, 2011).

Con la introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF, se describe un nuevo método para la detección directa de la actividad carbapenemasa, basado en una simple preparación de la muestra en presencia y ausencia de antibiótico, seguida de extracción mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y estudio de los perfiles de picos. Fue en el año 2011 cuando comenzaron a publicarse este tipo de trabajos. Se estudiaron cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* y como antimicrobiano se utilizó meropenem (Habrak *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos fueron muy prometedores, con una sensibilidad del 96.67% y una especificidad del 97.87%. Este trabajo fue posteriormente modificado y mejorado por el mismo grupo en un primer estudio, en el que se incluyó el uso de SDS al 0,01% en un paso previo, que permite disminuir la concentración de células bacterianas (Habrak *et al.*, 2012), y en un segundo trabajo, en el que para poder eliminar los productos de degradación de aquellas cepas portadoras de OXA-48 se utiliza carbonato amónico (Pagiannitsis *et al.*, 2015).

En estudios realizados por otros grupos de investigación (Wang *et al.*, 2013), se construyó un modelo de algoritmo con el software *ClinProTools*, utilizando los espectros de 43 aislados productores y 40 no productores de carbapenemasa, después de 2h de incubación. Este modelo fue validado externamente utilizando 60 aislamientos de prueba. Todos los espectros de los sobrenadantes de los aislados no productores de carbapenemasa, mostraron perfiles de picos comparables a los de meropenem. Sin embargo, en las cepas productoras de carbapenemasa, el pico específico de meropenem desapareció durante el tiempo de incubación, y se identificaron otros correspondientes a los productos de degradación del antimicrobiano (el producto descarboxilado y sal sódica del producto descarboxilado, así como variantes de la sal sódica). Los autores concluyen que la espectrometría de masas MALDI-TOF, junto con *ClinProTools*, es capaz de identificar de forma rápida, precisa y automática a los aislados productores de carbapenemasa.

Lo más interesante de esta nueva metodología era la posibilidad de aplicarla en clínica, acortando de forma muy notable la detección de microorganismos productores de carbapenemasas, dada la frecuencia con que se incluyen en las terapias empíricas fármacos que se pueden ver afectados por estas enzimas. Se comenzaron a realizar estudios directamente sobre hemocultivos positivos, en los cuales, una vez que el hemocultivo se positiviza, se extrae una alícuota (Carvalhaes *et al.*, 2014) y, con ayuda de tubos con gel separador y activador de coágulos se consigue mediante centrifugación concentrar las bacterias. Este sedimento bacteriano que se obtiene se incuba con una solución de ertapenem para su posterior procesamiento mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La aplicación de esta metodología permitió obtener una serie de perfiles de picos que permitían discriminar cepas productoras y no productoras de carbapenemasa (Figura 11).

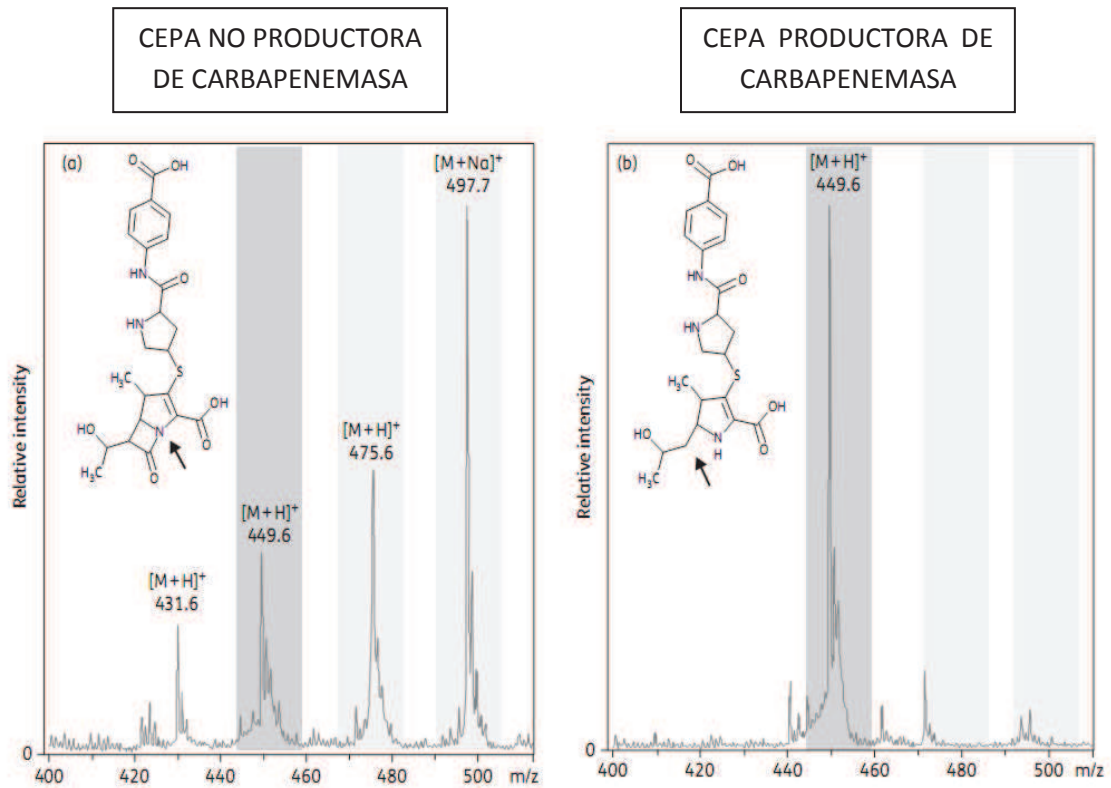


Figura 11. Tomada de Carvalhaes *et al.*, 2014. Degradación del ertapenem debido a la presencia o no de carbapenemasa.

Los resultados son prometedores, aunque es cierto que no son extrapolables a todas las carbapenemasas ni a todos los microorganismos. El trabajo muestra que, tal y como ocurría en estudios anteriores, se consiguen una alta sensibilidad (100%) y especificidad (100%) de la espectrometría de masas MALDI-TOF para detectar las carbapenemasas de tipo KPC-2, KPC-3 o SPM-1. Por el contrario, se observó que existen dificultades para la detección de OXA-23, considerándose como posible causa su baja capacidad hidrolítica. Otros tipos de OXA, como la OXA 48 también resultan difíciles de detectar (Johansson *et al.*, 2014). Sin embargo, si la cepa se incubaba 24 horas y se procesa a partir de cultivo, sí se consigue identificar el tipo de carbapenemasa en todas las cepas incluyendo estas últimas, con el inconveniente de retrasar los resultados las 24 horas necesarias para el crecimiento del microorganismo.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Trabajos más recientes tratan de corregir estas limitaciones, utilizando enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores (Grehewedin *et al.*, 2016). En este caso, el antimicrobiano elegido fue imipenem. El trabajo se desarrolló sobre 63 aislados caracterizados previamente como productores de diferentes tipos de carbapenemasas (KPC, GIM, IMP, NDM, OXA, VIM). El estudio se realiza con hemocultivos reales y con SDS para intentar eliminar restos celulares. Al analizar los resultados se observaron grandes diferencias según el tipo de microorganismo ya que, en el caso de *Acinetobacter spp.*, solo el 63,2% aislamientos pudo correlacionarse con la presencia de una carbapenemasa. En 14 aislamientos no fue posible determinar la actividad de carbapenemasa, estando incluidas diversos tipo como OXA (OXA-23, -40, y -164), NDM-1 y VIM-2. La mayoría de ellos fueron portadores de OXA (8 de 14 aislados).

Otros estudios publicados en relación con imipenem y *Acinetobacter baumannii* han mostrado buenos resultados. En el llevado a cabo por Kempf *et al.* refieren una sensibilidad y especificidad del 100%, conseguidas mediante el cálculo de la ratio de hidrólisis de imipenem, después de un tiempo de incubación de 4 h, mediante el cálculo de la relación entre los picos de imipenem y los de sus metabolitos, marcando el valor de referencia en 0.5, como se puede apreciar en las figuras 12 y 13 (Kempf *et al.*, 2012).

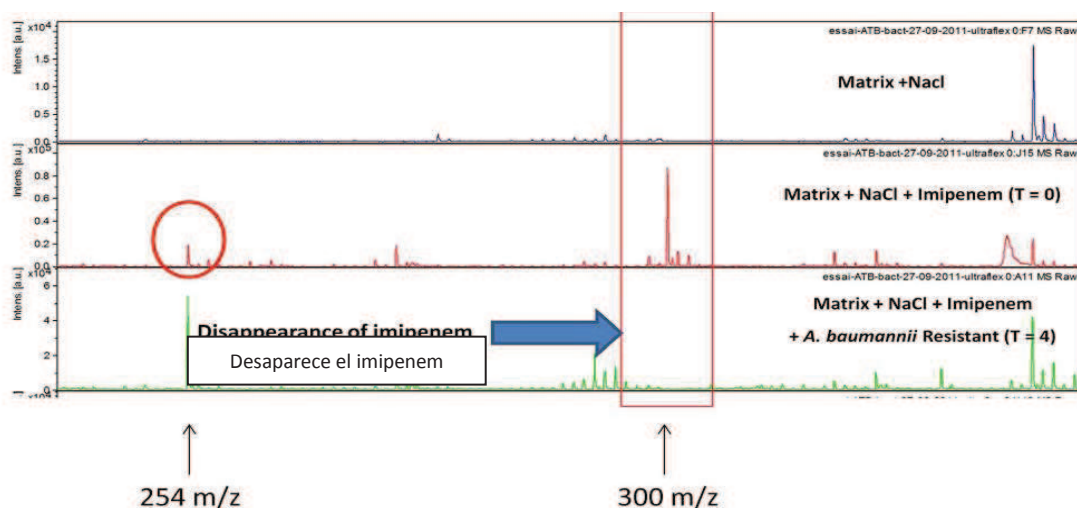


Figura 12. Tomada de Kempf *et al.*, 2012. Hidrólisis del imipenem debida a la presencia de una cepa de *Acinetobacter spp.* productora de carbapenemasa.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

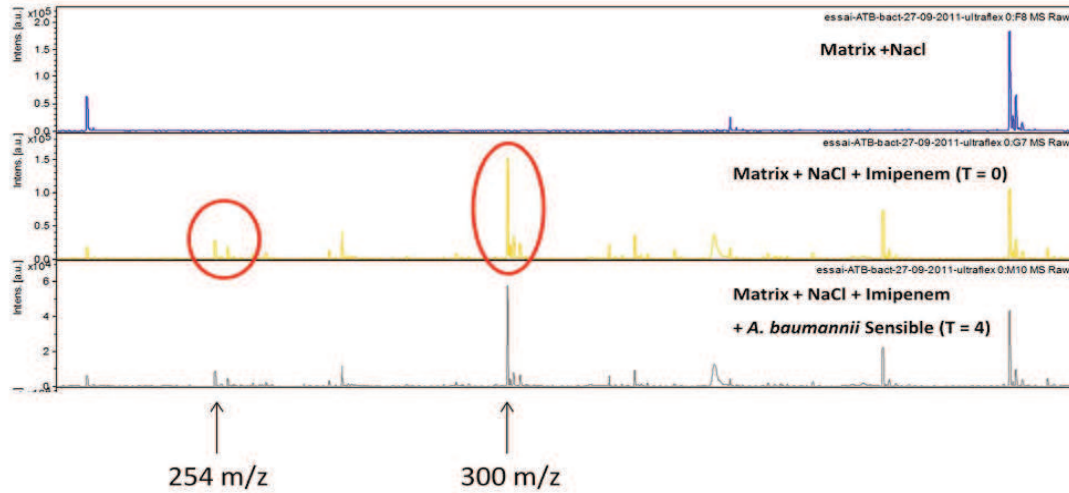


Figura 13. Tomada de Kempf *et al.*, 2012. Ausencia de hidrólisis del imipenem en presencia de una cepa de *Acinetobacter spp.* no productora de carbapenemasa.

Otro estudio destacado por su menor tiempo de respuesta es el Lasserre *et al.*, ya que obtienen resultados para imipenem en *Enterobacteriaceae* en 30 minutos, con un 99% de sensibilidad y un 100% de especificidad. En este caso se utilizó una ratio $\geq 0,82$ para clasificar los aislados entre sensibles y resistentes (Lasserre *et al.*, 2015).

El último estudio publicado (Oviaño *et al.*, 2016), utiliza imipenem-avibactam demostrando una sensibilidad y una especificidad del 98% y 100% respectivamente. La utilización de esta combinación permitió la detección de aislados productores de KPC y de OXA-48, que en estudios previos había sido problemática, de manera que representa una nueva estrategia para identificar y confirmar la presencia de estas carbapenemasas. Como en otros estudios revisados, los aislados de *A. baumannii* son los que más problemas plantean a la hora de detectar la producción de carbapenemasas con fiabilidad.

Exceptuando la posibilidad de introducir pasos previos de lisis o la utilización de diferentes *buffers* de reacción como agua, citrato sódico, Tris-ácido clorhídrico y bicarbonato de amonio para mejorar el rendimiento de la técnica (Oviaño *et al.*, 2016) no existen muchas más diferencias entre unos protocolos y otros, y todos ofrecen una

alta fiabilidad a la hora de detectar la producción de carbapenemasas en enterobacterias.

3.3.1.3. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos se produce a través de varios mecanismos que pueden coexistir. Dentro de estos mecanismos se incluyen la modificación de la diana por mutación del ARNr 16S o de las proteínas ribosómicas, la metilación de ARNr 16S, que es uno de los más prevalentes, y la acumulación insuficiente del fármaco en el citoplasma bacteriano, bien por reducción de la permeabilidad de la membrana externa, o bien por la expulsión del fármaco mediante bombas de expulsión. La inactivación enzimática de la molécula antibiótica que es considerada el mecanismo más prevalente en el contexto clínico (Ramírez *et al.*, 2010).

Falta experiencia en este campo, ya que no hay muchos trabajos sobre aminoglucósidos y espectrometría de masas MALDI TOF. En el ECCMID de 2013 se presentó un trabajo en el que los autores trabajaban con bacilos Gram negativos productores y no productores de la enzima aac-6, confirmada mediante PCR. Con una metodología similar a los anteriores apartados, se incubaron los aislamientos durante 3 horas con amicacina y tobramicina, y el sobrenadante se procesó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se corroboró que la transferencia de un grupo éter por acción de la N-acetiltransferasa, que es lo que condiciona la pérdida de actividad del aminoglucósido, era detectable mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, debido a la variación en el peso molecular de los diferentes aminoglucósidos, por lo que potencialmente era un método también aplicable a la inactivación de aminoglucósidos por mecanismos enzimáticos (Zimmerman *et al.*, 2013).

3.3.2. Perfil proteico bacteriano

3.3.2.1. Staphylococcus aureus resistentes a meticilina

Existen varias causas de resistencia a meticilina, pero la más estudiada, y desde luego la que tiene mayor repercusión clínica, es la adquisición del gen *mecA*, que codifica una

PBP2 adicional, la PBP2a. La PBP2a tiene escasa afinidad por el betalactámico y sustituye a la PBP2 original en la función de transpeptidación para la síntesis de peptidoglucano. El gen *mecA* forma parte de un elemento genético móvil, transferible horizontalmente, conocido como cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*). Se han descrito varios tipos de *SCCmec* (I-XI). Los tipos I, IV y V sólo contienen genes de resistencia a meticilina, mientras que los tipos II y III además contienen plásmidos y trasposones que codifican resistencia a otros antibióticos (Mensa *et al.*, 2008).

Se han observado otros dos tipos de resistencia a meticilina. Existen cepas de *S. aureus* tolerantes a la meticilina por déficit de enzimas autolíticos en la pared bacteriana. Por otro lado, tanto la hiperproducción de β -lactamasas como la presencia de cambios en las PBP 1, 2 y 4 (hiperproducción o mutaciones en el dominio transpeptidasa) pueden condicionar también este fenotipo (Sierra-Madero *et al.*, 1988).

El primer artículo publicado al respecto es del año 2000, en el cual Edward-Jones *et al.* demuestran que existen diferencias entre los *S. aureus* resistentes (SARM) y sensibles a meticilina (SASM), presentando estos últimos un número de picos específicos menor que los primeros. Además, el número global de picos producido por SARM era mayor en todos los aislamientos, hecho que ayuda a discriminar como se muestra en la figura 14 (Edward-Jones *et al.*, 2000).

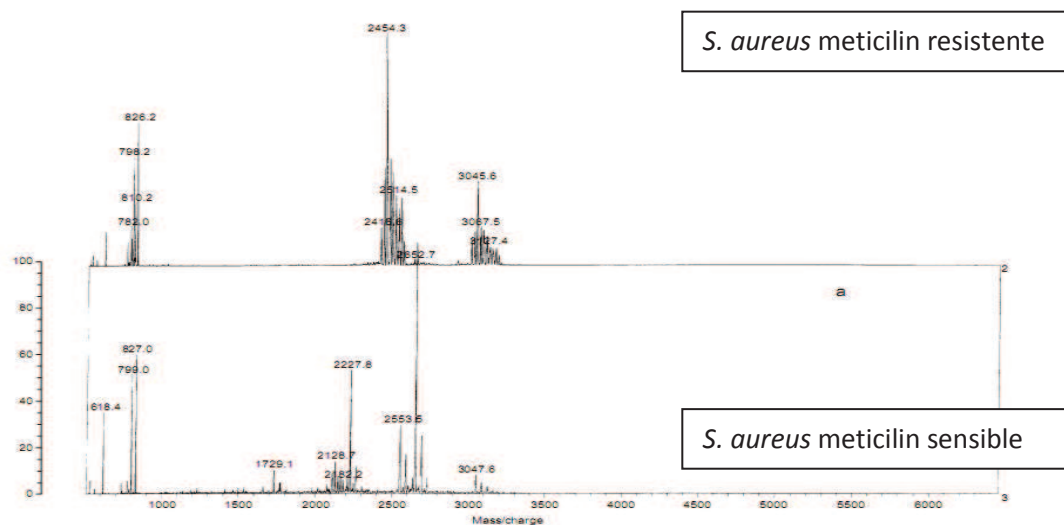


Figura 14. Tomada de Edwards-Jones *et al.*, 2000. Diferencia de perfiles de picos de cepas de *S. aureus* metilicin resistente y metilicin sensible.

Cuando analizaron los perfiles más profundamente observaron que existen diferencias significativas entre todos los SARM. Esto es importante porque, aunque es cierto que la idea original era prometedora, y que los resultados aparentemente mostraban que se trataba de una metodología que podría permitir diferenciar de manera rápida y sencilla entre SARM y SASM, los diferentes trabajos presentados posteriormente mostraron resultados dispares.

Existen, por una parte, trabajos con resultados negativos, en los que se llega a la conclusión de que los perfiles de picos bacterianos de las cepas estudiadas no mantenían un perfil uniforme para SARM. Sin embargo, sí que eran específicos para una cepa determinada (Bernardo *et al.*, 2002) lo que llevaba a considerar la posibilidad de utilizar la espectrometría de masas MALDI-TOF como herramienta para la rápida identificación clonal de cepas de *S. aureus* en estudios epidemiológicos.

Lu *et al.* consiguieron determinar marcadores que pudieran distinguir entre cepas comunitarias y cepas hospitalarias pero no obtuvieron picos específicos que discriminaran entre sensibles y resistentes (Lu *et al.*, 2012). Szabados *et al.* tampoco consiguieron encontrar diferencias mediante espectrometría de masas entre una cepa portadora de SCCmec y otra no portadora (Szabados *et al.*, 2012).

En 2013 se puso en marcha un estudio en el que se observó la presencia de dos picos de mayor intensidad, con una masa de 3784 Da y 5700 Da, que estaban presentes en MRSA, mientras que estaban ausentes en MSSA (Wang *et al.*, 2013).

Josten *et al.* alcanzaron una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% en la diferenciación entre SARM y SASM, mediante la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de la presencia de un péptido PSM-mec, codificado en los cassettes SCCmec de tipo II, III y VIII presentes en los genomas de cepas de SARM nosocomiales (Josten *et al.*, 2014).

En la actualidad se ha retomado el uso del péptido PSM-mec, tras determinarse que se detecta en torno a 2415 *m/z*. Cuando se analizó la correlación con la posible resistencia a meticilina, se concluyó que el estudio de este pico aporta una sensibilidad del 37%, pero una especificidad del 98% (Rhoads *et al.*, 2016). De este modo, a pesar de la baja sensibilidad, la identificación de este pico puede tener utilidad en las

pruebas de rutina de espectrometría de masas MALDI-TOF, ya que su detección es inmediata y no añade coste alguno al estudio.

En definitiva, aunque existen indicios de que pueden existir diferencias entre SARM y SASM que pueden ser explotadas para su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, hasta el momento no se han encontrado factores diferenciales que combinen sensibilidad y especificidad suficientes como para poder ser incluidos en clínica de forma sistemática.

3.3.2.2. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

Vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose con alta afinidad a los terminales *D*-alanil-*D*-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. La resistencia a vancomicina se debe a la presencia de operones que codifican enzimas que sintetizan precursores de baja afinidad, en los que el extremo C-terminal d-Ala se sustituye por d-lactato (d-Lac) o D-serina (d-Ser), modificando así el sitio de unión de vancomicina. Existen 6 tipos diferentes. Cinco de estos tipos (VanA, B, D, E, y G) corresponden a resistencia adquirida, mientras VanC es un mecanismo de resistencia intrínseco a especies concretas. Se han estudiado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF los dos mecanismos con mayor trascendencia clínica (*vanA* y *vanB*). Los de tipo *vanA* presentan altos niveles de resistencia inducible tanto a vancomicina como a teicoplanina, mientras que las cepas de tipo *vanB* lo hacen frente a vancomicina solamente (Courvalin *et al.*, 2006).

El primer trabajo realizado fue sobre cepas de *Enterococcus faecium* portadoras del gen *vanB*, siguiendo una metodología similar a las que se han descrito para SARM, basada en el estudio de perfiles de picos. En el estudio se genera un modelo estadístico que muestra una sensibilidad del 96,7% y una especificidad del 98,1% para la discriminación entre cepas *vanB* positivas y negativas (Griffin *et al.*, 2012).

Un segundo estudio, en esta ocasión sobre *vanA*, utilizó la herramienta *ClinProTools* v.2.2, que mediante el análisis de 3 algoritmos diferentes analizó los espectros, consiguiendo una sensibilidad y una especificidad superiores al 90%. Hay que tener en cuenta no obstante que en los estudios sobre *Enterococcus faecium* las cepas estaban

relacionadas clonalmente, lo que puede sesgar a favor de la técnica los resultados obtenidos (Nakano *et al.*, 2014).

3.3.2.3. *Bacteroides fragilis* portador gen *cfiA*

La resistencia a carbapenemas en *B. fragilis* se puede asociar a varios mecanismos. Uno de los más estudiados es la presencia del gen *cfiA*, que codifica una metalo β -lactamasa, perteneciente por tanto a la clase B de la clasificación de Ambler, que se activa mediante una secuencia de inserción (IS). El gen *cfiA* confiere resistencia a todos los betalactámicos incluidas las carbapenemas. Se han descrito, no obstante, CIMs elevadas en cepas que no tenían estos elementos IS activadores (Soki *et al.*, 2006). Se han descrito además otros mecanismos, como la producción de CepA que conduce a resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, como las cefamicinas, los carbapenems y los inhibidores de β -lactamasa (Rasmussen *et al.*, 1990).

La mayoría de los estudios realizados con espectrometría de masas MALDI-TOF han estado orientados a la diferenciación entre aislados portadores y no portadores de *cfiA*. No se han llevado muchos estudios a la práctica, pero en los realizados se han obtenido buenos resultados, con sensibilidades hasta del 100% (Nagy *et al.*, 2011). Analizando los perfiles obtenidos de la cepa problema, se observaron variaciones en los espectros según si la cepa era portadora o no de *cfiA* como muestra la figura 15.

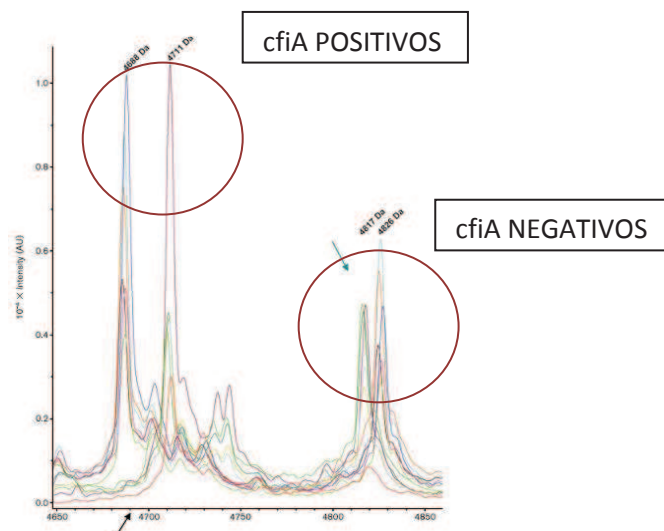


Figura 15. Tomada de Nagy *et al.*, 2011. Diferencia de perfiles de picos de cepas con *cfiA* codificante y no codificante.

En 2014 se presenta otro trabajo pero enfocado a muestras clínicas. Se trabajó con hemocultivos, con la misma metodología que se utiliza para identificar microorganismos directamente de la botella, combinada con lo explicado en el anterior trabajo, y se consiguió determinar, en 3 horas, si las cepas eran o no *cfiA* positivas, (Johansson *et al.*, 2014).

3.3.2.4. Otros mecanismos de resistencia

El resto de estudios que hay sobre detección de posibles resistencias desde el perfil proteico bacteriano necesitan más estudios que validen las técnicas, bien porque se trate de estudios aislados, como ocurre con *K. pneumoniae* con pérdida de porina Omp36 (Cai *et al.*, 2012) o con la búsqueda de un pico específico que determine si las enterobacterias son productoras de cefalosporinasa tipo CMY-2 (Papagiannitsis *et al.*, 2014), o bien porque en los pocos estudios publicados, los resultados son dispares.

Esto ocurre en el caso de los estudios sobre producción global de beta-lactamasas. En el primer artículo publicado al respecto, los resultados eran muy prometedores. Se encontró un pico dentro del perfil que estaba presente en todos los *E. coli* resistentes a ampicilina, lo que *a priori* lo convertía en una herramienta útil para discriminar entre microorganismos productores y no productores (Camara *et al.*, 2007). En estudios posteriores, que pretendían validar el método no solo para *E. coli*, sino que utilizan enterobacterias y *P. aeruginosa* productores y no productores de betalactamasas, se llegó a la conclusión de que ni el análisis visual ni el de similitud matemática permitían la discriminación entre espectros de las cepas productoras de β -lactamasa y las cepas no productoras (Schaumann *et al.*, 2012), de manera que es necesario seguir investigando sobre ello.

Todas las metodologías referidas hasta el momento aportan información con utilidad clínica inmediata, que se obtiene de forma rápida y barata. La principal limitación es que se trata de una información parcial, que se refiere sólo a mecanismos de resistencia específicos, fundamentalmente hidrolíticos, y a familias de antimicrobianos concretas, de modo que no puede sustituir al antibiograma fenotípico convencional.

Esta parcialidad de los datos hace que, de manera global, estos métodos, en este momento, puedan ofrecer datos fiables sobre resistencia, pero no sobre sensibilidad.

Además, ha de tenerse en cuenta que, en la actualidad, a la hora de pautar un antimicrobiano para una cepa portadora de BLEE, se comienza a considerar los valores de la CIM, de manera que si una de las cefalosporinas no alcanza los niveles necesarios para ser resistente podría ser administrada y no solo habría que tener en cuenta la presencia del mecanismo de resistencia como hasta hace unos años. Si trabajamos con sistemas no cuantificables y extrapolables a CIM, no serían suficientes para emitir un informe de resistencia (Muñoz Bellido *et al.*, 2015).

Por ello, sigue constituyendo un reto el desarrollo de métodos que ofrezcan una información tan amplia y global como el antibiograma fenotípico convencional, pero con la rapidez que se ha demostrado que está al alcance de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación directa, incluso a partir de determinadas muestras.

Por un lado se comienza a trabajar con la idea de conseguir estos objetivos a partir del uso de isótopos naturales estables. Se llevan a cabo varios ensayos dentro de este planteamiento:

- MS-RESIST es un sistema probado con *S. aureus*, que plantea la incorporación al medio de cultivo de aminoácidos marcados junto con el antimicrobiano a probar. Si la cepa es sensible, apenas incorporará aminoácidos, o lo hará en baja cantidad, ya que el microorganismo se multiplicará de forma lenta o nula. Por el contrario los resistentes se multiplicarán e incorporarán estos aminoácidos, que generan perfiles diferentes a los sensibles, ya que varía su tamaño final. El estudio se centra en la detección de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Sparbier *et al.*, 2013).

La lectura se basa directamente en el perfil clásico de espectros que se adquieren del mismo modo que los espectros de identificación de especies. Esto hace que no se necesite personal específico para realizarlo. Es un método que podría utilizarse para diferentes microorganismos y antimicrobianos, conociendo las condiciones óptimas para la incubación, la adaptación del medio de cultivo y la concentración de los antimicrobianos.

Otro trabajo similar utilizó un medio de cultivo que contenía ^{13}C como marcador y como microorganismos *Bacillus* sp. y *E. coli* (Demirev *et al.*, 2013). Para poder diferenciar unas cepas de otras se utilizaron unos algoritmos basados en los perfiles proteicos que detectaban la incorporación del ^{13}C , debido a la capacidad de la cepa de crecer en ese medio al ser resistente.

- SILAC es otra técnica de proteómica cuantitativa basada en marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular. Para este trabajo, se eligió la lisina como el único aminoácido isotópico, como microorganismo a *Pseudomonas aeruginosa* y como antimicrobianos meropenem, tobramicina y ciprofloxacino. Las cepas se incubaron en medio normal, medio suplementado con lisina marcada con $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ y medio suplementado con lisina marcada y antibiótico. Los cambios de picos producidos en el espectro debido a la incorporación de los aminoácidos marcados fueron detectados por espectrometría de masas MALDI-TOF (Jung *et al.*, 2014).

Los propios autores determinan que a pesar de poder distinguir entre cepas sensibles y resistentes, el estudio tiene una gran limitación, ya que no es posible extrapolar los resultados a la CMI. No existe linealidad entre la intensidad relativa y la concentración del analito utilizado. Son necesarios más ensayos que mejoren las condiciones experimentales así como el análisis de los datos. Plantean también la posibilidad de realizar mediciones a diferentes concentraciones de antimicrobiano y alargar los tiempos de incubación.

3.4. Espectrometría de masas MALDI TOF cuantitativa para obtener perfiles de resistencia

Existen escasos trabajos sobre espectrometría de masas cuantitativa, en ellos se intentan solventar las limitaciones de los métodos que se han expuesto hasta ahora. La idea se presenta como una prueba rápida de sensibilidad a antimicrobianos usando MALDI Biotyper (MBT-ASTRA, Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania). Al igual que con el ensayo MBT-RESIST, las bacterias se incuban en medio de cultivo en presencia o ausencia de antibióticos. En comparación con MBT-RESIST, el medio utilizado es un medio más adecuado para el crecimiento de los aislamientos, Brain-Heart Infusion (BHI)(Heipha, Germany), seguido de un proceso de lisis celular para facilitar el trabajo con espectrometría de masas MALDI TOF (Langue *et al.*, 2014).

El primer trabajo publicado al respecto, utiliza aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, cultivadas 24 horas a 37°C en agar Columbia (BD, Alemania). El antimicrobiano a estudio fue meropenem, determinando su CIM mediante e-test siguiendo los criterios EUCAST.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo de la resistencia mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, las muestras fueron incubadas en caldo brain-heart (BHI)(Heipha, Alemania) con una densidad de 0,5 estándar de McFarland. Para cada cepa, se incubaban dos tubos eppendorf, uno con 200 µl con meropenem a 64 µg / ml (Sigma - Aldrich, Alemania) y otro sin antibiótico. Las preparaciones se incubaron a 37°C durante 1, 2 y 3 h. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con 150 µl de agua pura y una vez con 100 µl de etanol al 70%. A continuación las bacterias se lisaron de acuerdo con el protocolo estándar de MALDI Biotyper.

Se analizaron también desde muestra directa de hemocultivo para el análisis de muestras derivadas de hemocultivo. Una vez que éste se positivizaba se tomaba una muestra de 0,5 ml de hemocultivo, las células se aislaban por centrifugación (12.000 g durante 2 min), y el pellet se resuspendió directamente en 400 µl de medio BHI. A continuación, se incubaron 200 µl de esta suspensión sin meropenem, y 200 µl se incubaron en presencia de 8 µg/ml de meropenem. Para extraer las células se ayudaron del kit MALDI Sepsityper (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Se calculó el rango de intensidad relativa entre 0 y 1, el área bajo la curva (AUC), el crecimiento relativo, todo ello obtenido de las muestras incubadas con y sin el antibiótico.

Las intensidades de los picos se correlacionan con la cantidad de proteína y a su vez con el crecimiento bacteriano. Analizando los espectros se observa una gran diferencia entre sensibles y resistentes. Los sensibles presentan menos picos que las cepas resistentes que presentan muchos picos derivados de proteínas ribosómicas. Sin embargo es necesario un algoritmo para poder automatizar el proceso, pues no basta con analizar visualmente el espectro. Los aislamientos resistentes muestran el mismo espectro antes y después de la incubación con el antibiótico, presentando un crecimiento relativo de 1. Los aislamientos sensibles muestran un descenso en las intensidades del patrón de picos de masas, siendo el crecimiento relativo sobre 0,4 (Figura 16).

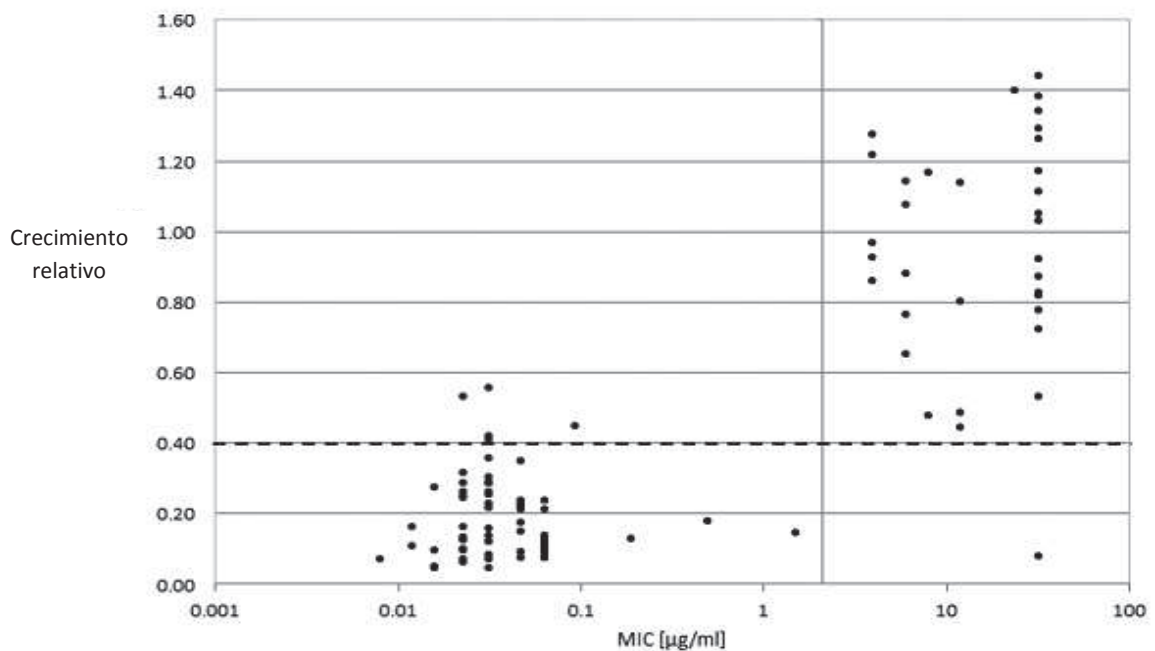


Figura 16. Tomada de Languet *et al.*, 2016. Crecimiento relativo de cada cepa respecto a la CMI.

Los resultados se obtienen en 2-3 horas, lo que agiliza la rutina del laboratorio. El método alcanzó una especificidad del 93,5% y una sensibilidad del 97,3%. Presenta, no obstante, varias limitaciones. Una de ellas fue la betalactamasa OXA 48, ya que en las cepas incluidas hubo discordancia con el e-test, si bien es cierto que el número de cepas era pequeño y, por

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

otro lado, estaría la posibilidad de tener una infección polimicrobiana, ya que es capaz de identificar la infección mixta pero no es capaz de diferenciar las resistencias de manera que a pesar de que uno de los microorganismos fuera sensible sería informado como resistente.

Existe otro trabajo llevado a cabo por Jung *et al.* en el que se analizaron 30 hemocultivos simulados con diferentes enterobacterias frente a gentamicina y ciprofloxacino. Por otro lado se estudiaron 99 hemocultivos de pacientes frente a cefotaxima, piperacilina-tazobactam y ciprofloxacino. Se llevó a cabo utilizando el método MBT-ASTRA con variaciones ya que no se utilizó BHI, sino Mueller Hinton, se usaron tubos separadores en vez del kit Sepsityper (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) y se prolongó el tiempo hasta 3 horas. Los resultados fueron excelentes con cefotaxima y gentamicina (100% de correlación con el método fenotípico). Respecto al resto de antibióticos hubo una sola discordancia con ciprofloxacino, y 5 con piperacilina- tazobactam.

En resumen son trabajos con muy buenas perspectivas. Es un hecho probado que, en cuanto a identificación se refiere, la espectrometría de masas MALDI-TOF ha asentado unas bases muy sólidas de fiabilidad. Sin embargo, sus posibilidades van más allá. Sería interesante que se presentaran estudios de coste /efectividad que justifiquen el uso de este sistema para poderlo después implantar en la práctica clínica diaria con unos protocolos sistematizados.

4. Coste-efectividad de la aplicación de espectrometría de masas MALDI-TOF e impacto clínico

Como ya se ha mencionado, la introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF ha significado una gran revolución en los laboratorios de Microbiología. Ha generado un gran impacto en los flujos de trabajo de los mismos, aportando un beneficio clínico evidente debido a la fiabilidad de la información que se genera y a la notable reducción del tiempo de respuesta (De la Pedrosa *et al.*, 2016).

Se han publicado varios trabajos en los que se recogen datos para conocer el impacto clínico y la adecuación del tratamiento antimicrobiano en programas de optimización del uso de

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

antimicrobianos (PROA) o *stewardship*, tras la implantación de esta herramienta. En el estudio llevado a cabo por Vlek *et al.* presentaron los datos de un estudio sobre 253 episodios de bacteriemia. 89 de las muestras pertenecían a los hemocultivos del momento del diagnóstico y 164 fueron hemocultivos posteriores en los controles. El tiempo hasta la identificación de la especie se obtuvo en 28,8 h y se correlacionó con un aumento del 11,3% de pacientes que recibieron tratamiento antibiótico apropiado 24 horas después de la positividad del cultivo de sangre (Vlek *et al.*, 2012).

Huang *et al.* observaron una reducción significativa de la estancia (14,2 frente a 11,4 días), del tiempo transcurrido hasta el inicio de un antibiótico activo (30,1 frente a 20,4 h) y su optimización (90,3 frente a 47,3 h). Todos estos datos se traducirían en un descenso de la mortalidad del 6%, una estancia media en la unidad de cuidados intensivos (UCI) en 6,6 días, y la disminución de bacteriemias recurrentes (el 5,9 frente al 2,0%) (Huang *et al.*, 2013).

Estudios realizados en pediatría demuestran que la combinación de programas de optimización de antimicrobianos junto con espectrometría de masas MALDI-TOF reduce significativamente el tiempo hasta una terapia adecuada (77,0 frente a 54,2 horas). En el caso de bacteriemia por Gram-negativos, el tiempo para el tratamiento eficaz y óptimo se redujo significativamente (2 vs. 0,7 horas y 146,8 vs. 48 horas, respectivamente) (Malcolmson *et al.*, 2016).

En relación con los costes, Perez *et al.* estudiaron los costes en un hospital de Houston. Determinaron que el coste promedio disminuyó en 19.547 dólares, englobando toda la estancia hospitalaria, ya que los pacientes con septicemia suelen requerir hospitalizaciones prolongadas con costes superiores a los 40.000 dólares por episodio. De forma global, tras el estudio, calcularon un ahorro de 18 millones \$ anuales con la implantación de espectrometría de masas MALDI-TOF en el manejo de bacteriemias por Gram negativos (Perez *et al.*, 2014). Serían necesarios estudios españoles para poder hacernos una idea de cuánto supondría en nuestro sistema de sanidad, pero todo sugiere que los gastos se reducirían de forma significativa.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

De manera general, en las últimas revisiones, se considera que estos avances hacen que el ahorro en costes tras la introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF, simplemente con su aplicación para identificación de bacterias, sin hablar de detección de resistencias u otras posibilidades, se encontrar en torno a un 60-80% para bacterias, en comparación con los sistemas convencionales, aunque dependería del medio de adquisición del aparato. Si hablamos de levaduras este ahorro sería en torno al 80-90% (El Bouri *et al.*, 2012; De la Pedrosa *et al.*, 2016).

Se ha valorado no sólo el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF como herramienta individual, sino también su repercusión en combinación con métodos moleculares, con la limitación de que en estos casos no se abarataría el coste. Se utilizaría MALDI-TOF como sistema de identificación y la biología molecular para determinar resistencias como podría ser una técnica de PCR en tiempo real (GeneXpert MRSA). Según algún estudio, la combinación de las dos técnicas permitiría reducir el tratamiento empírico frente a SARM el 17,1 frente al 29,2% (Clerc *et al.*, 2014). No obstante, desde el punto de vista del coste, las técnicas basadas en espectrometría de masas MALDI-TOF tienen la gran ventaja de que permitirían obtener datos de sensibilidad con un sobrecoste mínimo respecto a la identificación.

La mayoría de los estudios coste-efectividad están centrados en espectrometría de masas MALDI-TOF como herramienta para la identificación. Sin embargo, son muchas las posibilidades que ofrece esta metodología, por lo que en un futuro serían interesantes estudios que incluyeran todas estas aplicaciones de espectrometría de masas MALDI-TOF, e incluso una posible optimización de los recursos humanos. Los resultados obtenidos serían una perfecta carta de presentación para avalar esta herramienta.

OBJETIVOS

II. Objetivos

La espectrometría de masas MALDI-TOF se ha consolidado en los últimos años como una herramienta de extraordinaria utilidad para la identificación rápida y fiable de microorganismos en Microbiología Clínica. Sin embargo, la utilidad clínica de este recurso se ha visto, en cierta medida, ensombrecida por la falta de métodos basados en esta tecnología que ofrezcan una información sobre sensibilidad antimicrobiana semejante a la que ofrece el antibiograma convencional, con una rapidez y fiabilidad similares a las que alcanza la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos.

Recientemente han empezado a aparecer nuevas propuestas basadas en la espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa. Esta metodología se basa en la incubación del microorganismo en presencia y ausencia de los antimicrobianos, y la cuantificación del tamaño de los picos generados en ambas circunstancias. Se trata de un método que se ha mostrado sensible y específico frente a microorganismos concretos con características específicas, como *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasas.

Se trata de una estrategia que, al estar basada en los mismos principios que el antibiograma convencional podría permitir, al menos en teoría, estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos sobre una base estrictamente fenotípica, con independencia de los mecanismos de resistencia implicados, salvando así una de las principales limitaciones de los métodos basados en hidrólisis de antimicrobianos.

El objetivo principal que se plantea es sistematizar un método de espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa, que permita el estudio fenotípico global de la sensibilidad a los antimicrobianos en patógenos bacterianos, no solo a partir de colonia, sino también a partir de muestras, fundamentalmente de hemocultivos.

Como objetivos secundarios se plantean los siguientes:

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

- realizar este estudio en un grupo amplio de microorganismos, ya que la mayor parte de los estudios están realizados con pocos microorganismos pertenecientes a una sola o muy pocas especies.
- Determinar su comportamiento con diferentes antimicrobianos con distintos mecanismos de acción.
- Reducir en lo posible el tiempo de respuesta, con el objetivo de aproximarlos tanto como sea posible a la identificación. En relación con este objetivo, consideraríamos adecuado obtener la sensibilidad a antimicrobianos en un periodo de 2-3 horas tras la positivización del hemocultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. Material y métodos

El estudio se llevó a cabo utilizando tanto hemocultivos simulados como hemocultivos reales. La utilización de hemocultivos simulados, en los que se inocula un microorganismo en un frasco de hemocultivo (BD BACTEC™ (Becton-Dickinson, USA), continuando luego ese hemocultivo con el procesamiento convencional, tiene la ventaja de que permite poner a punto la técnica de forma más controlada y, sobre todo, tener referencia del funcionamiento del método con un grupo mucho más amplio de géneros y especies, incluyendo aquellos más infrecuentes en hemocultivos reales.

1. Selección de cepas

1.1. Estudios de sensibilidad a ciprofloxacino

En total se procesaron 137 hemocultivos, de los que 35 fueron hemocultivos reales y 102 fueron hemocultivos simulados.

1. Hemocultivos reales. Se incorporaron al estudio 35 hemocultivos reales procedentes de pacientes con sospecha de bacteriemia y en los que, en el momento de su positivización, se identificó la presencia de una enterobacteria. Los microorganismos identificados en estos hemocultivos fueron los siguientes:

- 25 *Escherichia coli*
- 1 *Serratia marcescens*
- 4 *Proteus mirabilis*
- 1 *Citrobacter freundii*
- 1 *Enterobacter cloacae*
- 3 *Klebsiella pneumoniae*

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

2. Hemocultivos simulados:

Se realizaron 102 hemocultivos simulados, que se llevaron a cabo inoculando en el frasco de hemocultivo. El microorganismo se obtuvo a partir de un cultivo de 24 horas en agar Mac Conkey de los siguientes microorganismos:

- 59 *Escherichia coli*
- 6 *Serratia marcescens*
- 11 *Proteus mirabilis*
- 8 *Citrobacter* spp. (4 *C. freundii* y 3 *C. koseri*)
- 8 *Enterobacter* spp. (3*E. aerogenes*, 2 *E. cloacae*, 2 *E. kobei* y 1 *E. asburiae*)
- 10 *Morganella morganii*

La selección de los microorganismos inoculados se realizó teniendo en cuenta tanto su identificación como su perfil de sensibilidad a fluoroquinolonas, con el fin de conseguir información sobre un número amplio de géneros de enterobacterias y conocer el comportamiento tanto de microorganismos sensibles como de microorganismos resistentes. El estudio previo de sensibilidad a fluoroquinolonas se llevó a cabo mediante diferentes sistemas de microdilución: Vitek 2 (bioMérieux, Francia) para cepas aisladas a partir de muestras de orina y WIDER (Francisco SORIA MELGUIZO S.A, Madrid, España) para cepas aisladas a partir de hemocultivo. En los casos necesarios, se estudió también la sensibilidad mediante E-test (bioMérieux, Francia).

1.2. Estudio de sensibilidad a cefotaxima

Se realizaron un total de 105 hemocultivos, de los que 17 correspondieron a hemocultivos reales y 88 a hemocultivos simulados, con los mismos criterios y procedimientos referidos anteriormente en relación con ciprofloxacino. Los 17 hemocultivos reales correspondían a los siguientes microorganismos:

- 7 *Escherichia coli*
- 1 *Serratia marcescens*

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

- 4 *Proteus mirabilis*
- 1 *Citrobacter freundii*
- 1 *Enterobacter cloacae*
- 3 *Klebsiella pneumoniae*

Los 88 hemocultivos simulados se realizaron usando aislados clínicos de las siguientes enterobacterias:

- 45 *Escherichia coli*
- 6 *Serratia marcescens*
- 11 *Proteus mirabilis*
- 8 *Citrobacter* spp. (5 *C. freundii* y 3 *C. koseri*)
- 8 *Enterobacter* spp. (3 *E. aerogenes*, 2 *E. cloacae*, 2 *E. kobei* y 1 *E. asburiae*)
- 10 *Morganella morganii*

Como en el caso anterior, y por los mismos motivos, la selección de los microorganismos se realizó teniendo en cuenta su identificación y su perfil de sensibilidad. El estudio previo de sensibilidad a cefotaxima se llevó a cabo mediante Vitek 2 (bioMérieux, Francia) para aislados obtenidos a partir de muestras de orina, y WIDER (Francisco SORIA MELGUIZO S.A, Madrid, España) para los obtenidos a partir de hemocultivo. En los casos necesarios, se estudió también la sensibilidad mediante E-test (bioMérieux, Francia).

1.3. Estudio de sensibilidad a imipenem

Se estudiaron un total de 97 hemocultivos, de los que 20 correspondían a hemocultivos reales, seleccionados con los mismos criterios que los casos anteriores, y 76 correspondían a hemocultivos simulados. De los hemocultivos reales se aislaron los siguientes microorganismos:

- 10 *Escherichia coli*
- 1 *Serratia marcescens*
- 4 *Proteus mirabilis*
- 1 *Citrobacter freundii*

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

- 1 *Enterobacter cloacae*
- 3 *Klebsiella pneumoniae*

Los 76 hemocultivos simulados, se inocularon con los siguientes microorganismos:

- 5 *Escherichia coli*
- 11 *Serratia marcescens*
- 11 *Proteus mirabilis*
- 8 *Citrobacter* spp. (5 *C. freundii* y 3 *C. koseri*)
- 8 *Enterobacter* spp. (3 *E. aerogenes*, 2 *E. cloacae*, 2 *E. kobei* y 1 *E. asburiae*)
- 10 *Morganella morganii*
- 23 *Klebsiella* spp. (17 *K. pneumoniae* y 6 *K. oxytoca*)

La selección de los microorganismos y los estudios previos de sensibilidad se llevaron a cabo con arreglo a los mismos criterios y métodos referidos anteriormente para cefotaxima y ciprofloxacino.

1.4. Estudios de sensibilidad a ceftazidima, piperacilina-tazobactam y gentamicina.

Se amplía el estudio a nuevos antibióticos, entre los que se seleccionan ceftazidima, piperacilina-tazobactam y gentamicina, para los cuáles se trabajó con las mismas cepas, entre las cuáles se encontraban 17 hemocultivos reales y 46 hemocultivos simulados.. De los 17 hemocultivos reales se aislaron los siguientes microorganismos:

- 7 *Escherichia coli*
- 1 *Serratia marcescens*
- 4 *Proteus mirabilis*
- 1 *Citrobacter freundii*
- 1 *Enterobacter cloacae*
- 3 *Klebsiella pneumoniae*

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Los 46 hemocultivos simulados se inocularon como sigue:

- 3 *Escherichia coli*
- 6 *Serratia marcescens*
- 11 *Proteus mirabilis*
- 8 *Citrobacter* spp. (5 *C. freundii* y 3 *C. koseri*)
- 8 *Enterobacter* spp. (3 *E. aerogenes*, 2 *E. cloacae*, 2 *E. kobei* y 1 *E. asburiae*)
- 10 *Morganella morganii*

Los aislados incluidos procedían de muestras de orina, esputo y de diferentes tipos de exudados. La selección se llevó a cabo con arreglo a los criterios indicados anteriormente. El estudio de sensibilidad fue llevado a cabo mediante el sistema Vitek 2 (bioMérieux, Francia) para aislados obtenidos a partir de muestras de orina, y mediante el sistema MicroScan Walkaway (Dade Behring, USA)) para los aislados obtenidos a partir de muestra de esputo y exudados. Cuando fue necesario, las CIMs se confirmaron mediante E-test (bioMérieux, Francia).

1.5. Estudios de sensibilidad a ceftriaxona

Se realizaron con 27 hemocultivo reales:

- 21 *Escherichia coli*,
- 3 *Klebsiella pneumoniae*
- 1 *Klebsiella oxytoca*
- 2 *Enterobacter cloacae*

La selección de aislados y los estudios de sensibilidad se realizaron como en los casos anteriores.

1.6. Estudios de sensibilidad a ceftriaxona, piperacilina-tazobactam y cefotaxima con 3 horas de incubación

Una vez analizados los resultados obtenidos a 2 horas, nos planteamos la posibilidad que en determinados antibióticos como era el caso de la familia de los β -lactámicos fuera

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

necesario ampliar el tiempo de incubación y se decidió realizar un experimento ampliando este tiempo a 3 horas. Se utilizaron 10 hemocultivos reales:

- 9 *Escherichia coli*
- 1 *Klebsiella pneumoniae*

El estudio de sensibilidad convencional se realizó con los mismos métodos que en los casos anteriores.

2. Inoculación de hemocultivos simulados

Para preparar los hemocultivos simulados se parte de aislados incubadas a 37°C durante 24 horas en placas de agar Mac Conkey. A partir de este cultivo se prepara una suspensión en agua estéril del 0,5-1,0 de McFarland.

Se inoculan 100µl de la suspensión anterior en tubos Eppendorf con 900µl de agua estéril. Con ayuda de una jeringa, se toma todo el contenido del tubo Eppendorf y se inocula en una botella de hemocultivo (BD BACTEC™).

Una vez inoculados, los frascos de hemocultivos simulados se incuban, en las mismas condiciones que los reales, en el sistema BACTEC 9240 (Becton-Dickinson, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez positivizados, se procesaron inmediatamente o, cuando no fue posible, se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento.

3. Inoculación de hemocultivos reales

Para la realización de los hemocultivos reales se procedió siguiendo la técnica habitual. Cuando las circunstancias clínicas del paciente lo requerían, se obtuvieron 8-10 ml de sangre venosa periférica mediante venopunción en condiciones estériles, y se inocularon en frascos de hemocultivos BD BACTEC™ (Becton-Dickinson, USA). Se mantuvieron en incubación en un sistema BACTEC 9240 (Becton-Dickinson, USA), hasta que fueron informados como positivos, momento en el que fueron procesados.

4. Tiempo de incubación mediante EM MALDI TOF

Para calcular los tiempos de incubación se llevó a cabo un estudio previo de crecimiento, que se realizó incubando a partir de colonias de 24 horas de cada cepa, en tubos con 300 µL de caldo Brain – Heart, se inocula 100 µL de una concentración de 2,0 McFarland de cada una de ellas. Los tubos se incuban a 37º C, en agitación durante 1, 2 y 3 horas respectivamente. Posteriormente son procesadas mediante EM MALDI TOF para conocer el tiempo mínimo al que es detectable el microorganismo para optimizar el método al menor tiempo posible. Seleccionando 2 horas como dicho tiempo.

Se realizó una siembra cuantitativa de hemocultivos reales positivos, para enterobacterias, mediante diluciones seriadas que nos permitían realizar un recuento en la placa sembrada de agar sangre, observándose que la concentración bacteriana, en el momento de positivización del hemocultivo, se encontraba habitualmente en torno a 10^8 UFC/mL. Esto nos llevó a conocer la concentración de microorganismo de la que partíamos para luego realizar el estudio de sensibilidad. Todos los hemocultivos estaban próximos a esa concentración, de manera que la cantidad de microorganismos no nos supuso un condicionante a la hora de llevar a cabo el estudio.

5. Selección de antimicrobianos y cálculo de las concentraciones de antimicrobianos

A partir de aquí se empezaron a plantear la selección de antimicrobianos a utilizar y las concentraciones a probar. Se seleccionaron antimicrobianos de referencia de los grupos más habitualmente usados en bacteriemias por Gram negativos (Tabla 2).

Siguiendo los puntos de corte establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para determinar sensibilidad y resistencia, se utilizaron para el estudio la CIM más baja que se interprete como “resistente”, y la CIM inmediatamente inferior, que según el antimicrobiano puede tener la consideración de “intermedia” o de “sensible”.

MICROORGANISMO/ ANTIMICROBIANO	Cefotaxima Ceftriaxona	Ceftazidima	Ciprofloxacino	Gentamicina	Imipenem	Piperacilina/ tazobactam
<i>Escherichia coli</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Serratia sp.</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Citrobacter sp.</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Enterobacter sp.</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Proteus sp.</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4
<i>Morganella sp.</i>	≥4	≥16	≥4	≥16	≥4	≥128/4

Tabla 2. Puntos de corte establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para que la adición del caldo de disolución del antimicrobiano modificara lo menos posible la concentración inicial de microorganismos, y teniendo en cuenta las características de solubilidad de los antimicrobianos, éstos se disolvieron en caldo Brain Heart a concentraciones 28 y 14 veces mayores que las requeridas para el estudio, añadiéndose posteriormente 15 µl de caldo con antimicrobiano a 400 µl de solución de cultivo (390 µl de caldo y 10 µl de agua conteniendo microorganismos a 1 McFarland) . Para la obtención de estas concentraciones se

partió de sustancia pura valorada o, cuando no fue posible, de viales clínicos del antimicrobiano correspondiente.

6. Estudio de sensibilidad mediante EM MALDI TOF

Se utiliza una adaptación del método de Langue et al. (Langue et al., 2014). Se prepararon 4 tubos con 390 µL de caldo Brain Heart por cada antimicrobiano a analizar:

- **Primer tubo:** 390 de caldo + 10 µl de una alícuota extraída de la botella de hemocultivo una vez positivizado, que se introduce directamente a 4 °C para mantener los recuentos estables. Este primer tubo nos sirve como control negativo obteniendo un perfil proteico basal.
- **Segundo tubo:** 390 de caldo + 10 µl de una alícuota extraída de la botella de hemocultivo una vez positivizado, que se incubó durante 2 horas a 37 °C (control positivo).
- **Tercer tubo:** 390 de caldo + 10 µl de una alícuota extraída de la botella de hemocultivo una vez positivizado + 15µl de la concentración de antimicrobiano más baja de las dos utilizadas. La concentración final corresponderá a la concentración más alta considerada por el CLSI como intermedia o, en su defecto, sensible. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- **Cuarto tubo:** 390 de caldo BHI + 10 µl de una alícuota extraída de la botella de hemocultivo una vez positivizado + 15µl de la concentración de antimicrobiano más alta de las dos utilizadas. La concentración final corresponderá a la concentración más baja considerada por el CLSI como resistente. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.

Transcurridas las 2 horas de incubación (3 en el caso del último experimento para ceftriaxona, piperacilina-tazobactam y cefotaxima), los 4 tubos se centrifugaron durante 5' a 16.000 g y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 150 µl de agua (Chromasolv Plus HPLC, Sigma Aldrich), se agitó en vórtex y se centrifugó de nuevo durante 5' a 16.000 g. Se retiró de nuevo el sobrenadante, y esta segunda vez se añaden 200µl de etanol (Emsure, Merck) en agua (v/v), se agita en vórtex y se deja evaporar durante 5 minutos

Las células fueron lisadas siguiendo el protocolo de extracción habitual para la espectrometría de masas MALDI-TOF, se añadieron 10 µL de ácido fórmico al 70%, se agitó con vortex hasta alcanzar una completa resuspensión del sedimento y después se añadieron 10 µL de acetonitrilo al 100% y se volvieron a agitar con vortex los tubos. Una vez hecho esto, se centrifugaron los tubos durante 5' a 16.000g. El sobrenadante contiene las proteínas extraídas del microorganismo.

Se depositó 1 µL de sobrenadante por duplicado en la placa del espectrómetro de masas MALDI-TOF (MTP 384 ground steel, Bruker Daltonics). Se dejó evaporar en su totalidad y después se añadió 1 µL de solución matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma Aldrich) en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%).

La espectrometría de masas se realiza en un espectrometro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (BrukerDaltonicsGmbH, Leipzig, Alemania). Se obtiene el espectro entre 2 y 20 kDa de forma automática, trabajando en el modo lineal positivo a una frecuencia de 200 hertzios, se realizará en distintos rangos de detección de masas que se ajustan en función de la masa a estudio bien si excede o bien si es inferior a los márgenes del rango habitual. Los parámetros para el espectrómetro en el rango automático de detección son : IS1 a 20 kV, IS2 a 17.5 kV, lente a 6kV, detector gain 7.4 V. Los espectros se calibran externamente utilizando una mezcla de calibrador estándar (extracto de *Escherichia coli* DH5- alfa más dos proteínas adicionales: RNAasa A y mioglobina para cubrir un intervalo de 4 a 17 kDa). De nuevo tanto los parámetros del espectrómetro como los calibradores se ajustarán de manera adecuada al rango de masas estudiado.

7. Análisis de los datos mediante EM MALDI TOF

Para el análisis automatizado de datos, los espectros se procesaron usando el software MALDI Biotyper 3.0 RTC (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) en los ajustes predeterminados. El software realiza la normalización, la suavización, la sustracción de la línea base y la selección de picos, creando una lista de los picos más significativos del espectro (valores m/z con una intensidad dada, con el umbral establecido en un mínimo del 1% del pico más alto y un máximo de 100 picos). Para identificar bacterias desconocidas, cada lista de picos generada se

comparó directamente con las bibliotecas de referencia (4111 especies) usando el algoritmo de concordancia de patrones integrado del software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, GmbH, Alemania).

Los espectros desconocidos se compararon con una biblioteca de espectros de referencia basada en un algoritmo de reconocimiento de patrones usando la posición de pico, las distribuciones de intensidad de pico y las frecuencias de pico. Una vez que un espectro ha sido generado y capturado por el software, todo el proceso de identificación se realiza automáticamente, sin intervención del usuario.

Las identificaciones MALDI-TOF MS se clasificaron utilizando valores de puntuación modificados propuestos por el fabricante: una puntuación de ≥ 2 indica la identificación de las especies; una puntuación entre 1,7 y 1,9 indica la identificación del género, y una puntuación de $< 1,7$ indica que no hay identificación.

8. Sensibilidad antibiótica.

Para los análisis de sensibilidad a los antibióticos, los espectros se procesaron por primera vez en el software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Se utilizó un método de procesamiento diferente para detectar tantos picos como sea posible aunque no fueran relevantes para el proceso de identificación. Así que los espectros fueron la primera línea de base suprimida (TopHat algoritmo), normalizado y suavizado (Savitzky Golay algoritmo). El umbral de señal a ruido fue de 0,001 y el pico del algoritmo de ecualización elegido fue centróide con un máximo de 150 picos. Una vez obtenidos los perfiles completos de proteínas de cada muestra de MALDI Biotyper, los archivos que contenían toda esta información se procesaron con un software desarrollado específicamente.

9. Desarrollo de software

El sistema se ha desarrollado con el framework .NET utilizando el lenguaje C#. Consiste en una herramienta que facilita la gestión integrada y visualización de todos los datos sobre las

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

intensidades de los picos m/z recogidos para cada cepa. En su primera versión, el sistema consta de cuatro módulos principales:

- Importación e integración de datos de picos: basado en expresiones regulares, identifica los archivos XML que contienen los datos obtenidos para un aislamiento particular, e incorpora de forma integrada en una nueva estructura, que se pueden almacenar en un nuevo archivo XML.
- Homogeneización de datos: se analizan los valores obtenidos para cada pico m/z en los diferentes perfiles del mismo aislado, estableciendo los conglomerados que se considerarán representativos de cada proteína. Esta estrategia permite comparaciones adicionales y alineaciones visuales entre diferentes perfiles. La estrategia de agrupamiento fue aglomerativa, basada en la distancia euclidiana.
- Visualización: este módulo permite una representación gráfica de los datos, facilitando su análisis visual. El software incluye algunas herramientas que permiten configurar los elementos que están siendo incluidos en el gráfico.
- Extracción de datos relevantes: a partir de los datos de un conjunto de cepas se generan nuevas estructuras de datos con la información que se ha considerado de interés para el estudio.

Este software obtiene el perfil completo de los picos de los espectros procesados de FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) y compara la suma de las intensidades del grupo completo de picos de cada perfil y el tamaño de los picos específicos en cada perfil, teniendo principalmente en cuenta:

- La proporción entre la suma de todos los picos en los tubos con antibióticos y el tubo sin antibiótico después de una incubación de 2 horas (3h en el caso de ceftazidima, cefotaxina y piperacilina- tazobactam)
- La proporción entre el pico de la proteína ribosomal L34 50S, cuya masa varía según el microorganismo como detallamos en la tabla 3, es el más profundamente afectado por la acción del antibiótico, en los tubos con antibióticos y el tubo sin antibiótico después de una incubación de 2 horas (3h en el caso de ceftazidima, cefotaxina y piperacilina- tazobactam).

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

CEPA	PESO
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	5,380
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	5,380
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	5,380
<i>Klebsiella oxytoca</i> (strain ATCC 8724 / DSM 4798 / JCM 20051 / NBRC 3318 / NRRL B-199 / KCTC 1686)	5,410
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5,380
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> Db11	5,380
<i>Serratia marcescens</i> FGI94	5,366
<i>Proteus mirabilis</i>	5,494
<i>Proteus mirabilis</i>	5,494
<i>Citrobacter freundii</i> CFNIH1	5,409
<i>Citrobacter freundii</i>	5,409
<i>Enterobacter aerogenes</i> (strain ATCC 13048 / DSM 30053 / JCM 1235 / KCTC 2190 / NBRC 13534 / NCIMB 10102 / NCTC 10006)	5,393
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (strain ATCC 13047 / DSM 30054 / NBRC 13535 / NCDC 279-56)	5,380
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,380
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,409
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> KT	5,380

Tabla 3. Masa proteína L34 del ribosoma 50 S.

Esta comparación también se hizo de forma manual. Cuando no se encontró crecimiento en ningún tubo, incluido el control cultivado sin antibiótico, la prueba se consideró no válida

RESULTADOS

IV. Resultados

1. Ciprofloxacino.

Se realizaron un total de 102 hemocultivos simulados, que fueron inoculados con microorganismos pertenecientes a 6 géneros de enterobacterias. De los microorganismos inoculados, 79 eran sensibles y 23 resistentes a CIP. Por otra parte, se seleccionaron aleatoriamente 35 hemocultivos reales de la clínica diaria, con la única condición de que se hubiera aislado en ellos una enterobacteria. De los 35 aislados, 23 eran sensibles y 12 resistentes a CIP (Tabla 4).

Tabla 4. Microorganismos utilizados para realizar los hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de ciprofloxacino.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	59	25
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Klebsiella spp.</i>	0	3
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	102	35

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Hemocultivos simulados. Utilizando como criterio principal una disminución de 3 veces en la suma de los picos obtenidos, y/o una disminución de 3 veces en el valor del pico de la proteína ribosómica L34 en el tubo con antibiótico, con respecto al tubo cultivado durante 2 horas sin antibiótico, los resultados obtenidos con concentraciones de CIP de 2 mg/L se correlacionaron con los resultados del sistema de microdilución en caldo en el 96,1% de los casos (98/102). De los 23 aislados resistentes, tan sólo 1 fue clasificado como sensible. 76 de los 79 aislados sensibles fueron correctamente clasificados mediante EM MALDI-TOF (96,2%).

Tabla 5. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para ciprofloxacino

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/CIPROFLOXACINO 2 mg/L		MALDI-TOF/CIPROFLOXACINO 4 mg/L	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
Sensible	76	3	78	1
Resistente	1	22	1	22

De este modo, el valor predictivo positivo, entendiendo como tal la probabilidad de que aquel aislado informado como resistente lo sea realmente, y al que en adelante nos referiremos como Valor Predictivo de la Resistencia (VPR) fue del 88%, y el valor predictivo negativo, entendiendo como tal la probabilidad de que aquel aislado informado como sensible lo sea realmente, y al que en adelante nos referiremos como Valor Predictivo de la Sensibilidad (VPR) fue del 95,7%. Los 3 aislamientos sensibles clasificados erróneamente como resistentes tuvieron CIMs de CIP, mediante E-test, de 0.25, 0.25 y 1 mg/L.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Los resultados obtenidos con los mismos parámetros, cuando se utilizan concentraciones de CIP de 4 mg/l, se correlacionaron con los resultados obtenidos mediante microdilución en el 98,04% de los casos (100/102). El VPS se mantuvo en el 95,7%, mientras el VPR se incrementó hasta el 98,7%.

El único aislado sensible clasificado por EM MALDI-TOF como resistente tenía una CIM de CIP por E-test de 1 mg/L. El único aislado resistente a CIP que se clasificó erróneamente como sensible mediante EM-MALDI-TOF, tenía un valor de 0.31, en el valor de caída del pico de la proteína L34, próximo al punto de corte establecido. En la tabla 6 podemos observar de manera más específica desglosando según microorganismo.

Tabla 6. Microorganismos utilizados para hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para ciprofloxacino

MICROORGANISMOS	CIPROFLOXACINO CORRECTOS	CIPROFLOXACINO DISCREPANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	58	1	59
<i>Citrobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Enterobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Morganella morganii</i>	10	0	10
<i>Proteus spp.</i>	10	1	11
<i>Serratia spp.</i>	6	0	6
TOTAL	100	2	102

Hemocultivos reales. Ante los resultados obtenidos con los hemocultivos simulados, en los hemocultivos reales se utilizó sólo la concentración más alta, 4mg/L. Todos los hemocultivos que fueron informados como sensibles por el método basado en EM MALDI-TOF mostraron correlación con los resultados obtenidos con el método de referencia (23/23), mientras esto ocurrió en 11 de los 12 que fueron informados como resistentes.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 7. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para ciprofloxacino

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/CIPROFLOXACINO 4 mg/L	
	Sensible	Resistente
Sensible	23	0
Resistente	1	11

De este modo, el VPR fue del 91,7%, y el VPS fue del 100%. En conjunto, la correlación fue del 97,14% (34/35). La tabla 8 nos muestra los microorganismos utilizados y su correcta o incorrecta clasificación.

Tabla 8. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para ciprofloxacino

MICROORGANISMOS	CIPROFLOXACINO CORRECTOS	CIPROFLOXACINO DISCREPANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	25	0	25
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Klebsiella spp.</i>	3	0	3
<i>Proteus spp.</i>	3	1	4
<i>Serratia spp.</i>	1	0	1
TOTAL	34	1	35

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Los resultados discordantes entre ambos métodos aparecen en las tablas 9 y 10

Tabla 9. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para ciprofloxacino.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio concentración x/control	Relación L34 concentración x/control
<i>E.coli</i>	S	0,69	0,38
<i>Proteus spp.</i>	R	0,69	0,30

Tabla 10. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos reales con resultados discordantes para ciprofloxacino.

HEMOCULTIVOS REALES	CIM	Relación sumatorio concentración x/control	Relación L34 concentración x/control
<i>Proteus spp.</i>	R	0,24	0,04

2. Cefotaxima.

Se realizaron 88 hemocultivos simulados, para lo cual se utilizaron los aislados de enterobacterias que aparecen en la Tabla 11. De estos 88 aislados, 49 eran sensibles a CTX y 39 eran resistentes. Se probó asimismo el método con CTX en 17 hemocultivos, de los que se habían aislado las enterobacterias que aparecen en la Tabla 11. De ellos, 15 eran sensibles y 2 eran resistentes a CTX.

Tabla 11. Microorganismos utilizados para realizar los hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de cefotaxima.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	45	7
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Klebsiella spp.</i>	0	3
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	88	17

Hemocultivos simulados. Aplicando los mismos criterios especificados previamente con respecto a CIP, y utilizando la concentración más alta de CTX de 4 mg/L, los resultados obtenidos se correlacionaron con los obtenidos por microdilución, en conjunto, en el 87,5% de los casos (77/88). Como en los casos anteriores, se obtuvieron excelentes valores de VPS, mientras los de VPR fueron discretamente inferiores. En este caso, el VPS fue del 100%, mientras el VPR fue del 78%.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 12. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para cefotaxima

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/CEFOTAXIMA 4 mg/L	
	Sensible	Resistente
Sensible	38	11
Resistente	0	39

Tabla 13. Microorganismos utilizados para hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para cefotaxima

MICROORGANISMOS	CEFOTAXIMA CORRECTOS	CEFOTAXIMA DISCREPANTES	TOTAL
<i>Escherichia spp.</i>	43	2	45
<i>Citrobacter spp.</i>	6	2	8
<i>Enterobacter spp.</i>	7	1	8
<i>Morganella spp.</i>	6	4	10
<i>Proteus spp.</i>	11	0	11
<i>Serratia spp.</i>	4	2	6
TOTAL	77	11	88

Hemocultivos reales. Siguiendo las mismas pautas y concentraciones de CTX que en hemocultivos simulados, se observó correlación entre la EM MALDI-TOF y la microdilución en el 47,1% de los casos (8/17). El método basado en EM MALDI-TOF informó como sensibles a CTX 6 aislados, con una correlación con el método de referencia del 100%. Sin embargo, de los 11 aislados que dicho método informó como resistentes, solamente 2 lo eran realmente. De este modo, el VPR fue solamente del 18,2%, pero el VPS continuó siendo del 100%.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 14. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para cefotaxima

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/CEFOTAXIMA 4 mg/L	
	Sensible	Resistente
Sensible	6	9
Resistente	0	2

El estudio de estos resultados sugiere que la metodología utilizada, con excelentes resultados, en relación con CIP, debía ser modificada en el caso de las cefalosporinas ya que, aunque se mantenía un VPS excelente, el VPR era muy bajo. Observadas las gráficas, se pudo comprobar que, en las que corresponden a los aislados informados como falsamente resistentes, aunque se registra en numerosos casos una cierta caída en las cifras tanto globales como de la proteína L34, ésta no llega a los puntos de corte establecidos en el caso de CIP. Ante esta baja especificidad en los aislados informados como resistentes, se planteó la posibilidad de cambiar los parámetros prefijados para este antimicrobiano. Estos parámetros se podían modificar en dos sentidos: modificando el punto de corte establecido, o prolongando el tiempo de incubación.

En el primer caso se analizaron todos los valores, y se observó que el punto de corte que mostraba mejor correlación con los resultados de sensibilidad por métodos convencionales era una caída del pico de la proteína L34 al 46% del control. Con este punto de corte no se modificaba el VPS, que se mantenía en el 100%, tanto en hemocultivos simulados como reales. Por el contrario, mejoraba el VPR, que pasaba del 78% al 79,6% en hemocultivos simulados, y del 18,2% hasta el 33,3% en hemocultivos reales. Se trata de un VPR discretamente superior al previo, pero todavía claramente mejorable. En la tabla 17 se pueden ver los géneros a los que pertenecían las cepas discordantes.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 15. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para cefotaxima, usando como punto valor de caída del pico de la proteína L34 de 0.46.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ CEFOTAXIMA 4 mg/L	
	Sensible	Resistente
Sensible	39	10
Resistente	0	39

Tabla 16. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para cefotaxima, usando como punto valor de caída del pico de la proteína L34 de 0.46.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ CEFOTAXIMA 4 mg/L	
	Sensible	Resistente
Sensible	11	4
Resistente	0	2

Tabla 17. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para cefotaxima, usando como punto valor de caída del pico de la proteína L34 de 0.46.

MICROORGANISMOS	CEFOTAXIMA CORRECTOS	CEFOTAXIMA DISCREPANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	4	3	7
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Klebsiella spp.</i>	3	0	3
<i>Proteus spp.</i>	4	0	4
<i>Serratia spp.</i>	0	1	1
TOTAL	13	4	17

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 18. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para cefotaxima.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>E.coli</i>	S	1,07	0,95
<i>Citrobacter spp.</i>	S	0,63	0,94
<i>Citrobacter spp.</i>	S	1,13	0,60
<i>Enterobacter spp.</i>	S	1,22	0,91
<i>Morganella spp.</i>	S	1,15	1,23
<i>Morganella spp.</i>	S	1,53	2,20
<i>Morganella spp.</i>	S	1,52	0,80
<i>Morganella spp.</i>	S	1,07	1,28
<i>Serratia spp.</i>	S	0,89	0,62
<i>Serratia spp.</i>	S	1,07	0,81

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 19. Microorganismos que se mantienen discrepantes con el punto de corte de 0,46 en hemocultivos reales

HEMOCULTIVOS REALES	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>E.coli</i>	S	0,83	0,58
<i>E.coli</i>	S	1,60	0,95
<i>E.coli</i>	S	0,93	0,64
<i>Serratia</i> spp.	S	0,84	0,65

3. Ceftazidima

Para llevar a cabo el estudio de hemocultivos simulados con ceftazidima (CAZ) se seleccionaron 46 aislados de diversas enterobacterias, de las cuales 32 eran sensibles y 14 resistentes a este antimicrobiano. Para los hemocultivos reales se seleccionaron 17 hemocultivos, de los que 15 eran sensibles y 2 resistentes a CTZ.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 20. Microorganismos utilizados para realizar los hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de ceftazidima.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	3	7
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	3
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	46	17

Hemocultivos simulados. Con arreglo a los criterios definidos inicialmente (reducción a la 3ª parte del sumatorio total de picos o del pico correspondiente a la proteína L34 con respecto al control positivo), se observó correlación con los resultados del antibiograma convencional en el 80,4% de los casos (37/46). En este caso, el VPS fue del 96%. El único aislamiento resistente erróneamente clasificado como sensible mostró un valor de crecimiento relativo de 0.32 en L34, muy próximo al punto de corte. Ocho aislados sensibles fueron erróneamente clasificados como resistentes, lo que supone un VPR de un 61,9%.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 21. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para ceftazidima, usando como punto de corte el valor convencional de 0,33.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	24	8
Resistente	1	13

Tabla 22. Microorganismos aislados en hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para ceftazidima.

MICROORGANISMOS	CEFTAZIDIMA CORRECTOS	CEFTAZIDIMA DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	3	0	3
<i>Citrobacter spp.</i>	7	1	8
<i>Enterobacter spp.</i>	7	0	8
<i>Morganella morganii</i>	6	4	10
<i>Proteus spp.</i>	9	2	11
<i>Serratia spp.</i>	4	2	6
TOTAL	37	9	46

La reevaluación de los puntos de corte permitió observar que un punto de corte de 0,37 para el pico de la proteína L34, permitió mejoras muy discretas del VPS, que se incrementa del 96% al 96,2%, y del VPR, que se incrementa del 61,9% al 65%.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 23. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para ceftazidima, usando como punto de corte el valor corregido de 0,37.

MICRODILUCIÓN	HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	25	7
Resistente	1	13

Hemocultivos reales. En el caso de los hemocultivos reales los resultados obtenidos se correlacionaron en el 82,35 % de los casos (14/17). El VPS fue del 96,2%, mientras el VPR fue del 65%. No se observó ningún punto de corte alternativo que mejorase el VPR sin deteriorar el VPS.

Tabla 24. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para ceftazidima, usando como punto de corte tanto el valor inicial (0,33) como el valor corregido (0,37).

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	13	2
Resistente	1	1

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

La tabla 25 muestra los microorganismos en que se observaron discrepancias en este caso.

Tabla 25. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para ceftazidima.

MICROORGANISMOS	CEFTAZIDIMA CORRECTOS	CEFTAZIDIMA DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	7	0	7
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	0	1	1
<i>Klebsiella spp.</i>	2	1	3
<i>Proteus spp.</i>	4	0	4
<i>Serratia spp.</i>	0	1	1
TOTAL	14	3	17

Las tablas 26 y 27 muestran los ratio entre los sumatorios de picos y las cifras de L34 obtenidos en presencia y ausencia de antimicrobiano.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 26. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para ceftazidima.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>Citrobacter spp.</i>	R	0,55	0,32
<i>Morganella spp.</i>	S	0,93	0,36
<i>Morganella spp.</i>	S	1,08	0,55
<i>Morganella spp.</i>	S	1,55	0,82
<i>Morganella spp.</i>	S	0,81	0,72
<i>Proteus spp.</i>	S	1,48	0,70
<i>Proteus spp.</i>	S	0,81	0,41
<i>Serratia spp.</i>	S	1,04	0,82
<i>Serratia spp.</i>	S	0,94	1,36

Tabla 27. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos reales con resultados discordantes para ceftazidima.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>Enterobacter spp.</i>	S	0,95	0,79
<i>Serratia spp.</i>	S	0,91	0,74
<i>Klebsiella spp.</i>	R	0,73	0,18

4. Ceftriaxona

Teniendo en cuenta la posibilidad de que los problemas observados con CTX no fuesen un problema global de las cefalosporinas de 3ª generación, sino un problema específico de CTX como cefalosporina de 3ª generación de referencia, se probó también el comportamiento de ceftriaxona (CRO). La actividad de CRO se comprobó en hemocultivos reales, ya que eran los que mostraban peor comportamiento con CTX, sobre todo en el caso del VPR.

Hemocultivos reales. Se seleccionaron aleatoriamente 27 hemocultivos positivos para enterobacterias, de las que 20 se mostraron sensibles a CRO y 7 resistentes mediante métodos convencionales.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 28. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para ceftriaxona, usando como punto de corte tanto el valor inicial (0,33) como el valor corregido (0,37).

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	14	6
Resistente	0	7

El porcentaje global de correlación entre ambos métodos fue del 79,8 %. Como en el caso de CTX, el VPS fue del 100%. El VPR fue del 53,8%, discretamente mejor que los obtenidos en el caso de CTX, pero todavía sensiblemente inferior a los obtenidos en el caso CIP (Tabla 28)

Las concordancias y discrepancias en los diferentes géneros y especies aparecen en la Tabla 29.

Tabla 28. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para ceftriaxona.

MICROORGANISMOS	CEFTRIAXONA CORRECTOS	CEFTRIAXONA DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	16	5	21
<i>Klebsiella spp.</i>	4	0	4
<i>Enterobacter spp.</i>	1	1	2
TOTAL	21	6	27

Los ratios observados en los aislados discrepantes aparecen en la Tabla 30.

Tabla 30. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos reales con resultados discordantes para ceftriaxona.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>E.coli</i>	S	0,86	0,66
<i>E.coli</i>	S	0,85	0,89
<i>E.coli</i>	S	1,38	1,05
<i>E.coli</i>	S	1,29	0,79
<i>E.coli</i>	S	1,38	0,54
<i>Klebsiella spp.</i>	S	1,61	0,73

5. Piperacilina- Tazobactam

Para el estudio de hemocultivos simulados con piperacilina-tazobactam (P/T) se seleccionaron 46 cepas de enterobacterias, de las cuales 37 eran sensibles y 9 resistentes a este antimicrobiano. Para los hemocultivos reales se seleccionaron 17 hemocultivos. Todas las enterobacterias aisladas de estos hemocultivos fueron sensibles a P/T. (Tabla 31)

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 31. Microorganismos utilizados para realizar los hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de piperacilina/tazobactam.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	3	7
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	3
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	46	17

Hemocultivos simulados. Con los criterios iniciales fijados en 0.33 como valor del tubo incubado en presencia del antimicrobiano con respecto al control positivo, los resultados observados fueron similares a los observados con las cefalosporinas. Al igual que en otros casos, se observó un excelente VPS (100%), mientras el VPR fue solamente del 40,1% (Tabla 32).

Tabla 32. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para piperacilina/tazobactam, (punto de corte: 0,33)

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	24	13
Resistente	0	9

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Analizando los datos se observa que las cepas resistentes muestran valores muy próximos a los del control positivo, mientras que las sensibles muestran descensos marcados, pero que en bastantes casos se quedan en proporciones de 0,5-0,6 con respecto al control positivo. Reevaluando, como en casos anteriores, el valor de caída de la proteína L34, se observó que elevando el punto de corte hasta 0.64 los resultados mejoran sustancialmente, hasta un 91,9 % (34/37) de correlación en cepas sensibles simuladas, aunque ello supone que dos cepas consideradas resistentes por ambos métodos con los criterios iniciales, en este caso serían consideradas como sensibles con valores de caída del pico de 0.35 y 0.36.

Tabla 33. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para piperacilina/tazobactam, (punto de corte: 0,64)

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	34	3
Resistente	2	7

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Como se observa en la tabla 34 prácticamente todos los géneros se vieron afectados en los resultados presentando resultados discordantes.

Tabla 34. Microorganismos aislados en hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para piperacilina/tazobactam con punto de corte de 0,64.

MICROORGANISMOS	PT CORRECTOS	PT DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	1	2	3
<i>Citrobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Enterobacter spp.</i>	7	1	8
<i>Morganella morganii</i>	9	1	10
<i>Proteus spp.</i>	10	1	11
<i>Serratia spp.</i>	6	0	6
TOTAL	41	5	46

Hemocultivos reales. En este caso los valores predictivos no son fiables, al no ser resistente ningún microorganismo de los aislados de hemocultivos positivos. Aun así, se mantiene el mismo problema que en casos anteriores, ya que de todos los aislados sensibles por la metodología convencional, sólo son etiquetados como sensibles el 35,3% de ellos, siendo el resto falsas resistencias.

Tabla 35. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para piperacilina/tazobactam, (punto de corte: 0,33)

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	12	5
Resistente	0	0

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Se encuentran recogidos en la tabla 36 los géneros y las cepas discordantes en cada uno de ellos.

Tabla 36. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para piperacilina/tazobactam con punto de corte de 0,64.

MICROORGANISMOS	PT CORRECTOS	PT DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	4	3	7
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Klebsiella spp.</i>	3	0	3
<i>Proteus spp.</i>	3	1	4
<i>Serratia spp.</i>	0	1	1
TOTAL	8	10	17

Los ratios de los resultados discordantes aparecen en las tablas 37 y 38.

Tabla 37. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para piperacilina/tazobactam.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>E. coli</i>	R	1,31	0,36
<i>E. coli</i>	R	0,64	0,35
<i>Enterobacter spp.</i>	S	0,84	0,81
<i>Morganella spp.</i>	S	0,77	1,07
<i>Proteus spp.</i>	S	2,47	1,00

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 38. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos reales con resultados discordantes para piperacilina/tazobactam.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>E. coli</i>	S	1,52	1,19
<i>E. coli</i>	S	1,60	0,77
<i>E. coli</i>	S	1,68	1,28
<i>Proteus spp</i>	S	0,87	1.00
<i>Serratia spp.</i>		0,93	0,96

6. Hemocultivos a 3 horas

Las modificaciones de los puntos de corte planteaban varios problemas. Por una parte, implicaba una falta de homogeneidad en el método, y suponía tener que estudiar un grupo de hemocultivos mucho más amplio para poder acercarse, en su caso, a un punto de corte óptimo fiable. Por otra parte, la mejora que se consigue buscando el corte óptimo para el VPR, que no afecte al VPS, es sólo moderada. Por ello, se planteó variar el método manteniendo un punto de corte homogéneo, y prolongando el tiempo de incubación.

El hecho de que casi todas las discrepancias estuvieran asociadas a una insuficiente diferenciación entre la intensidad del perfil de picos de los controles positivos y del perfil en presencia de antimicrobiano, cuando se trataba de microorganismos sensibles de acuerdo con la metodología convencional, y que afectara fundamentalmente a beta-lactámicos, sugería

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

que esta circunstancia estuviera asociada al carácter de bactericidas lentos de esta familia de antimicrobianos, por lo que se decidió mantener unos puntos de corte homogéneos y prolongar los tiempos de incubación.

Se seleccionaron dos cefalosporinas de 3ª generación, CTX y CRO, y una combinación penicilina/inhibidor de beta-lactamasas, P/T. El estudio se realizó sobre hemocultivos reales, siguiendo la misma metodología que en los estudios anteriores, pero ampliando el tiempo de incubación a 3 horas.

Hemocultivos reales. Se seleccionaron 10 hemocultivos reales positivos para enterobacterias, de los que 9 eran sensibles a los 3 antimicrobianos y uno era resistente a todos ellos. Se probaron los 10 hemocultivos frente a CRO, y 4 de los sensibles y el resistente frente a CTX y P/T. El estudio comparativo de todos los perfiles obtenidos permitió observar que el punto de corte que guardaba una mayor correlación con los resultados de sensibilidad obtenidos mediante metodología convencional fue una caída de los valores de la proteína L34 a, como mínimo, un 40% del valor obtenido en el control positivo. Con este punto de corte, el VPS se mantuvo en el 100% en los tres casos, mientras el VPR fue del 100% también para CTX y P/T, y fue del 50% para CRO. El único aislamiento sensible a CRO que fue informado por la metodología EM MALDI-TOF como resistente, mostró un valor de la proteína L34 del 77% respecto al control positivo.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Tabla 39. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para cefotaxima, ceftriaxona y piperacilina/tazobactam, con un tiempo de incubación de 3 horas (punto de corte: 0,4)

E-test	Sensibilidad MALDI-TOF MS					
	Ceftriaxona		Cefotaxima		Piperacilina-tazobactam	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
Sensible	8	1	4	0	4	0
Resistente	0	1	0	1	0	1

7. Imipenem Para llevar a cabo el estudio en hemocultivos simulados con Imipenem (IMP) se seleccionaron 76 aislados de enterobacterias, de las cuales 70 eran sensibles y 6 eran resistentes al fármaco. Se utilizaron asimismo 20 hemocultivos reales (Tabla 40). El 100% de los aislados de enterobacterias obtenidos de dichos hemocultivos fueron sensibles a IMP.

Tabla 40. Microorganismos utilizados para la realización de hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de imipenem.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	4	7
<i>Klebsiella spp.</i>	23	6
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	76	20

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Hemocultivos simulados. A diferencia de lo que ocurre con otros beta-lactámicos, en el caso de IMP, aplicando los mismos parámetros usados en el caso de CIP, se obtiene una excelente correlación.

En los que se refiere a los hemocultivos simulados, El VPS obtenido fue del 100%, mientras el VPR fue del 75%. No obstante, las dos muestras que fueron consideradas como resistentes por EM MALDI-TOF y sensibles mediante la metodología convencional, tenían valores en la caída de la proteína L 34 de 0.35 y 0.34, muy cercanos al punto de corte.

Tabla 41. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para imipenem.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	68	2
Resistente	0	6

Todos los falsos resistentes pertenecían al género *Proteus* (tabla 42).

Tabla 42. Microorganismos aislados en hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para imipenem.

MICROORGANISMOS	IMIPENEM CORRECTOS	IMIPENEM DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	4	0	4
<i>Klebsiella spp.</i>	23	0	23
<i>Citrobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Enterobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Morganella morganii</i>	10	0	10
<i>Proteus spp.</i>	9	2	11
<i>Serratia spp.</i>	6	0	6
TOTAL	74	2	76

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Estos datos indican que probablemente sea necesario incorporar más de una lectura para cada muestra y promediarlas, o bien introducir una zona gris en la que los resultados no sean considerados concluyentes.

Hemocultivos reales. En el caso de los hemocultivos reales, el VPS fue también del 100%. El VPR no se puede calcular, al ser sensibles todos los microorganismos aislados (Tabla 43).

Tabla 43. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos reales para imipenem.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	19	1
Resistente	0	0

Tabla 44. Microorganismos aislados en hemocultivos reales, y discrepancias observadas para imipenem.

MICROORGANISMOS	IMIPENEM CORRECTOS	IMIPENEM DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	7	0	7
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Klebsiella spp.</i>	6	0	6
<i>Proteus spp.</i>	3	1	4
<i>Serratia spp.</i>	1	0	1
TOTAL	20	0	20

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

No obstante, uno de los 20 hemocultivos fue considerado resistente mediante EM MALDI-TOF. Se trataba de un aislado de *Proteus mirabilis*, que mostró unos valores del sumatorio de 0,87 y de la proteína L34 de 0,92 (tabla 45).

Los ratios observados en los aislados discordantes aparecen en las Tablas 45 y 46.

Tabla 45. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para imipenem.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>Proteus spp.</i>	S	0,72	0,36
<i>Proteus spp.</i>	S	1,12	0,35

Tabla 46. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos reales con resultados discordantes para imipenem.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>Proteus spp.</i>	S	0,87	0,92

8. Gentamicina

El estudio relativo a gentamicina se llevó a cabo, en el caso de los hemocultivos simulados, con 46 aislados de diversas enterobacterias, de los que 43 eran sensibles a gentamicina y 3 resistentes mediante la metodología fenotípica convencional. El estudio con hemocultivos reales se llevó a cabo con 17 hemocultivos positivos para alguna enterobacteria (Tabla 47).

Tabla 47. Microorganismos utilizados para la realización de hemocultivos simulados y reales para probar la actividad de gentamicina.

MICROORGANISMOS	HC simulados	HC reales
<i>E. coli</i>	3	7
<i>Citrobacter spp.</i>	8	1
<i>Enterobacter spp.</i>	8	1
<i>Klebsiella spp.</i>	0	3
<i>Morganella morganii</i>	10	0
<i>Proteus spp.</i>	11	4
<i>Serratia spp.</i>	6	1
TOTAL	46	17

Hemocultivos simulados. El VPS con gentamicina fue del 100%. Por el contrario, el VPR fue sólo del 42,9%, ya que sólo 3 de los 7 hemocultivos informados como resistentes por EM MALDI-TOF, lo fueron realmente de acuerdo a la metodología aceptada.

Tabla 48. Correlación entre E-test y EM MALDI-TOF en hemocultivos simulados para gentamicina.

MICRODILUCIÓN	MALDI-TOF/ HC SIMULADOS	
	Sensible	Resistente
Sensible	39	4
Resistente	0	3

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

En este caso no se pudo determinar un valor de caída de la proteína L 34, ya que la diferencia de valores entre los aislados identificados como resistentes y como sensibles mediante EM MALDI-TOF era muy elevada y, por motivos que habrán de ser estudiados con mayor detenimiento, los cuatro aislados identificados erróneamente como resistentes por EM MALDI-TOF tenían valores muy similares a los resistentes reales y pertenecían al género *Proteus* (tabla 49).

Tabla 49. Microorganismos aislados en hemocultivos simulados, y discrepancias observadas para gentamicina.

MICROORGANISMOS	GENTAMICINA CORRECTOS	GENTAMICINA DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	3	0	3
<i>Citrobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Enterobacter spp.</i>	8	0	8
<i>Morganella morganii</i>	10	0	10
<i>Proteus spp.</i>	7	4	11
<i>Serratia spp.</i>	6	0	6
TOTAL	42	4	46

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

Los ratios observados en aislados discordantes en hemocultivos simulados aparecen en la Tabla 50.

Tabla 50. Relación ϵ picos con antibiótico/ ϵ picos control positivo y L34 con antibiótico/ L34 control positivo en los hemocultivos simulados con resultados discordantes para gentamicina.

HEMOCULTIVOS SIMULADOS	CIM	Relación sumatorio antibiótico/control	Relación L34 antibiótico/control
<i>Proteus spp.</i>	S	0,79	0,42
<i>Proteus spp.</i>	S	1,32	0,64
<i>Proteus spp.</i>	S	1,58	0,79
<i>Proteus spp.</i>	S	1,52	0,59

Hemocultivos reales. Los resultados obtenidos en hemocultivos reales fueron excelentes, con VPS y VPR del 100%. Los microorganismos utilizados aparecen recogidos en la tabla 51.

Tabla 51. Microorganismos aislados en hemocultivos reales para gentamicina.

MICROORGANISMOS	GENTAMICINA CORRECTOS	GENTAMICINA DISCORDANTES	TOTAL
<i>E. coli</i>	7	0	7
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1
<i>Klebsiella spp.</i>	3	0	3
<i>Proteus spp.</i>	4	0	4
<i>Serratia spp.</i>	1	0	1
TOTAL	17	0	17

DISCUSIÓN

V. Discusión

La espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en un recurso muy útil para la identificación bacteriana, por su fiabilidad y rapidez en la obtención de resultados (Fenselau *et al.*, 2001; Seng *et al.*, 2009, Muñoz-Bellido *et al.*, 2015). Esta tecnología ofrece unos resultados extraordinarios en cuanto a identificación de diferentes tipos de microorganismos similar a la obtenida con la secuenciación de ARNr 16S, (Fenselau *et al.*, 2001: Muñoz-Bellido *et al.*, 2015), y permite la identificación de microorganismos, a partir de colonias cultivadas en placas de cultivo, en tan solo unos minutos (Ferreira *et al.*, 2010).

Además, se ha comprobado, que se pueden obtener también resultados altamente fiables cuando se aplica esta metodología directamente sobre algunas muestras, como es el caso de las orinas y hemocultivos. En estos casos, debido a la alta densidad bacteriana y al volumen de muestra habitualmente disponible, se suele disponer de una cantidad de proteína bacteriana suficiente para conseguir una identificación fiable. Ello acorta sustancialmente el tiempo requerido para la identificación del patógeno, y permite un tratamiento más rápido y orientado.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud de primer orden, que ha dado lugar en los últimos tiempos a directivas e iniciativas de numerosos organismos oficiales, nacionales e internacionales, dirigidas tanto a atajar este problema como al desarrollo de nuevos antimicrobianos activos frente a microorganismos multirresistentes. Una de las consecuencias clínicas más inmediatas del incremento de la resistencia y la multirresistencia, es la dificultad creciente que existe para establecer pautas de tratamiento empírico con una fiabilidad suficiente. Por otra parte, estas pautas de tratamiento empírico llevan a un aumento del uso de antimicrobianos de alta actividad intrínseca y amplio espectro, lo que, a la larga, no hace sino agravar el problema. La solución más rentable, a largo plazo, para este problema, es el desarrollo de métodos de estudio de la sensibilidad antimicrobiana suficientemente rápidos, que permitan prescindir de la terapia empírica en la mayor parte de los casos, estableciendo

un tratamiento orientado precoz. Desafortunadamente, la gran revolución que ha supuesto la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF a la identificación bacteriana, desde el punto de vista de la rapidez y la fiabilidad de la misma, no ha podido hacerse extensiva, hasta el momento, al estudio de sensibilidad. La posibilidad de obtener, a través de técnicas proteómicas, perfiles de sensibilidad similares a los perfiles fenotípicos proporcionados por técnicas bacteriológicas convencionales, con una velocidad y fiabilidad similares a las logradas en la identificación, se planteaba inicialmente como un desafío complejo, debido a la gran variedad de mecanismos de resistencia existentes, y la gran diversidad de las proteínas asociadas a ellos.

Se han desarrollado métodos que permiten conocer la presencia de algunas enzimas hidrolizantes de antibióticos, como diferentes tipos de betalactamasas (BLEE, carbapenemasas ...) en función de los diferentes picos m/z generados por la molécula antimicrobiana intacta y la molécula hidrolizada (Oviaño *et al.*, 2017; Oviaño *et al.*, 2017) . Algunos otros mecanismos de resistencia, como *vanB*, también pueden deducirse de la presencia de picos específicos (Griffin *et al.*, 2012). Se ha conseguido demostrar también, en el caso de *Bacteroides* spp., la presencia de la proteína codificada por el gen *cfiA*, que determina resistencia a carbapenemas (Johansson *et al.*, 2014).

Más recientemente, se ha publicado un artículo en el que los autores utilizan una estrategia similar para detectar la resistencia a las fluoroquinolonas mediada por un mecanismo específico (Oviaño *et al.*, 2017). En este trabajo, los autores detectaron la presencia de una enzima que inactiva la fluoroquinolona sobre la base del diferente valor de m/z del antibiótico y el antibiótico acetilado por la enzima AAC-(6')-Ib-cr.

Estas estrategias pueden proporcionar información útil y rápida sobre un mecanismo particular de resistencia o un grupo particular de agentes antimicrobianos de forma específica, pero no es previsible que se puedan obtener, a través de estas estrategias, perfiles globales de sensibilidad, comparables a los que se obtienen con los antibiogramas convencionales. La resistencia a los antimicrobianos se asocia frecuentemente, en todo o en parte, a mecanismos no hidrolíticos (impermeabilidad, bombas de expulsión, mutaciones de las dianas...), lo que invalida la metodología utilizada para la detección de beta-lactamasas. Incluso cuando la resistencia se asocia a la presencia de una proteína determinada, puede tratarse de una proteína presente en cantidades muy escasas, asociada a estructuras celulares que dificulten

notablemente su extracción o con una relación m/z que la sitúa fuera de la ventana convencional de detección del espectrómetro. Ésta no sería una limitación insoslayable, ya que la ventana de detección se puede modificar, pero restaría mucha agilidad y por tanto mucha aplicabilidad práctica al método.

De este modo, la metodología en la que más se ha insistido hasta el momento, que es la búsqueda indirecta de mecanismos de hidrólisis a través del producto de la misma, no es aplicable a todos los antimicrobianos, y en todo caso podría permitir predecir la resistencia, pero en ningún caso la sensibilidad. Además, en el caso de algunos mecanismos de resistencia tales como las BLEE, la tendencia actual es no considerar la resistencia si no se alcanzan valores específicos de CIM, incluso si la enzima está presente, por lo que la mera detección de hidrólisis no sería suficiente para emitir un informe de resistencia.

Estas limitaciones han estimulado el desarrollo de nuevas estrategias. Una nueva metodología sugiere la incorporación de aminoácidos marcados isotópicamente en el medio de cultivo, junto con el antibiótico a analizar (Sparbier *et al.*, 2013). La replicación de microorganismos sensibles será más lenta y, por lo tanto, difícilmente incorporará aminoácidos marcados, mientras que los microorganismos resistentes se multiplicarán de una forma mucho más activa e incorporarán cantidades mayores de aminoácidos marcados. Estos aminoácidos marcados tienen tamaños específicos, y generarán perfiles m/z característicos en microorganismos resistentes. Este método ha demostrado ser útil para la identificación de MRSA. Se seleccionaron 28 cepas de *Staphylococcus aureus* y para determinar la resistencia a meticilina se empleó oxacilina y cefoxitina. En el caso de la oxacilina el 96,42% de las cepas fueron correctamente clasificadas, tan sólo una de ellas fue considerada resistente por este nuevo método siendo sensible por el resto de sistemas usados, de manera que hubo un falso resistente. Para cefoxitina, 3 cepas fueron mal clasificadas como resistentes siendo sensibles, de manera que la sensibilidad se vio disminuida a un 89,26%. A pesar de ello, los resultados son muy prometedores.

Otra alternativa propuesta recientemente es la espectrometría de masas MALDI-TOF semicuantitativa (Langue *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2016; Sparbier *et al.*, 2016). Esta metodología también se basa en la incubación del microorganismo en presencia y ausencia de los antimicrobianos a analizar, y la cuantificación del crecimiento bacteriano en ambas circunstancias. Este método se probó inicialmente con *Klebsiella* spp. (Langue *et al.*, 2014)

productora de carbapenemasas, y recientemente se ha probado con otros microorganismos contra varios antibióticos (Jung *et al.*, 2016), e incluso para las micobacterias (Ceysens *et al.*, 2017), con buenos resultados. En el último estudio realizado con bacterias, se extrajeron células bacterianas de los frascos de cultivo de sangre, y se usaron para preparar una suspensión bacteriana equivalente a alrededor de 5×10^6 UFC / ml (Jung *et al.*, 2016).

Evitamos este paso en nuestro método porque previamente hemos observado que, en las enterobacterias, la concentración bacteriana en la positividad del hemocultivo es de alrededor de 10^6 UFC / ml.

Al igual que el trabajo llevado a cabo por Jung *et al.*, nuestro método se basa en las modificaciones de perfil de los picos condicionadas por el crecimiento del microorganismo en contacto con concentraciones específicas de antibióticos. La suma de los valores de los picos que usamos es conceptualmente similar al AUC utilizado por estos autores, y el crecimiento relativo (RG) definido por ellos también es conceptualmente similar a las tasas entre los picos de los valores de suma que usamos. Sin embargo, hemos observado que los mejores resultados se obtienen combinando los resultados del sumatorio de picos y los del pico m/z , correspondiente a la proteína ribosómica L34. El valor de este pico no es exactamente igual para todas las especies (tabla 3, pág. 91). Sin embargo, el valor m/z de esta proteína es bien conocido para la mayoría de los microorganismos, lo que ha permitido automatizar su identificación mediante software. Al proporcionarle al software la identificación del microorganismo, automáticamente busca en una tabla el tamaño de la proteína L34, y utiliza este valor m/z para interpretar, en su caso los cambios en su valor tras incubar el microorganismo con y sin antimicrobiano.

La proteína L34, codificada por el gen *rpmH*, forma parte de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Esta subunidad está integrada por RNA 23S y 5S, y por más de 30 proteínas. Su función no ha sido definitivamente aclarada. Se ha demostrado que su función no es absolutamente esencial para la supervivencia del microorganismo, aunque su ausencia produce graves defectos en la formación del ribosoma 70S y un enlentecimiento del crecimiento bacteriano (Akanuma *et al.*, 2012). Se sabe que la proteína L34 se une a la subunidad 50S del ribosoma en una fase tardía de su formación, y se ha sugerido que participa en la regulación de la vía de biosíntesis de las poliaminas (Herold *et al.*, 1987; Panagiotidis *et al.*, 1995). De todos modos las funciones de la proteína L34 dentro del ribosoma, su

implicación en la síntesis proteica, en el ensamblamiento de la subunidad 50S y en la propia formación del ribosoma no están definitivamente aclarados (Akunama *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la proteína L34 es esencial para una conformación adecuada del ribosoma 70S, y que la supresión del gen *rpmH* redundaría en un crecimiento de los microorganismos significativamente más lento, y que estos efectos pueden ser compensados por mutaciones en otros genes (*yhdP*, *mgtE*) que redundan en mayores concentraciones intracelulares de Mg^{++} . Se ha demostrado asimismo que la proteína L34 es esencial para una eficaz interacción entre las subunidades 30 y 50S, a pesar de que la localización de L34 en el ribosoma está alejada de la zona de interacción entre las dos subunidades (Yusupov *et al.*, 2001).

Se ha demostrado asimismo que, por motivos que no están definitivamente aclarados, la reducción en la síntesis de proteína L34 redundaría además en una reducción de la síntesis de proteína L16. No obstante, hay que tener en cuenta que se trata de datos experimentales obtenidos a partir de la supresión del gen *rpmH*, con lo cual no queda claro si la reducción de la proteína L16 es secundaria a la menor síntesis de la proteína L34, cualquiera que sea la vía por la que se produzca, o está vinculada directamente a la supresión del gen.

Aparentemente, la falta de proteína L34 reduce la afinidad entre la proteína L16 y la subunidad 50S del ribosoma, probablemente por un cambio conformacional en la subunidad 50S. En el ribosoma, la proteína L16 se sitúa cerca de la zona de interacción de las dos subunidades, y se inserta entre dos hélices de rRNA 23S, las hélices 38 y 89 (Yusupov *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2001). Se sabe que la hélice 38 forma un puente entre las dos subunidades, dentro del ribosoma 70S, y se ha publicado que la incorporación de la proteína L16 produce un cambio conformacional importante en las subunidades 50S que es determinante en su asociación con la subunidad 30S. En consecuencia, la falta de proteína L16 puede repercutir en un defecto en la formación del ribosoma 70S. En conjunto, parece por tanto que la falta de proteína L34 redundaría en una reducción de la afinidad de L16 por su punto de unión, y todo ello tendría como consecuencia un cambio conformacional en la subunidad 50S que repercutiría en alteraciones en la formación del ribosoma 70S completo.

La reducción en el sumatorio de valores de todos los picos m/z en los aislados sensibles a cada antimicrobiano es fácilmente explicable por la reducción de crecimiento condicionada por éste, que como es lógico redundaba en una menor masa proteica bacteriana global.

Sin embargo, resulta más difícil de explicar la reducción selectiva de la proteína L34, mucho más marcada, más precoz y más homogéneamente relacionada con la categoría de sensibilidad o resistencia que la de cualquier otra proteína de las detectables dentro de la ventana convencional de detección del espectrómetro.

En este aspecto, hay que tener en cuenta una posible limitación del método utilizado, y es la posibilidad de que existan otras proteínas que queden fuera de la ventana de detección convencional, que como es sabido incluye fundamentalmente proteínas ribosómicas. No obstante, al haber encontrado proteínas ribosómicas que guardan una excelente correlación con el comportamiento de los microorganismos respecto a su sensibilidad a los microorganismos, hemos considerado no extender el estudio a otras proteínas, que implican reajustes en el espectrómetro y por tanto restarían agilidad al procedimiento. No parece que tenga relación con el mecanismo de acción de los antimicrobianos, ya que se comporta de forma similar con betalactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, que tienen mecanismos de acción completamente dispares. Ni siquiera parece tener relación con el hecho de que la diana del antimicrobiano sea o no el ribosoma bacteriano, ya que los aminoglucósidos tienen su diana en el ribosoma 70S, pero fluoroquinolonas y betalactámicos no tienen relación alguna con esta diana.

Se trata del primer estudio que hace referencia a una relación tan específica entre la caída del pico m/z correspondiente a una proteína concreta y la sensibilidad a microorganismos. Tanto la caída del pico específico de la proteína L34 como la caída del sumatorio de picos, se ajustan muy bien a lo que se pretendía con el estudio, que era el desarrollo de un método cualitativamente similar al antibiograma convencional, en cuanto que se comportara igual para todas las familias de antimicrobianos y diera información sobre sensibilidad o resistencia con independencia de los mecanismos implicados.

Un extremo que será interesante estudiar en el futuro es si este comportamiento guarda relación con la acción bactericida del antimicrobiano, o se mantiene también con antimicrobianos bacteriostáticos. En este caso no se han incluido antimicrobianos

bacteriostáticos ya que, siendo el objetivo principal la posibilidad de utilización directa sobre hemocultivos positivos, los antimicrobianos indicados para su tratamiento son bactericidas prácticamente en su totalidad. Sin embargo, será interesante comprobar si este comportamiento se extiende también a antimicrobianos bacteriostáticos, a efectos de poder extender este método de estudio de la sensibilidad a otros grupos importantes de antimicrobianos, como macrólidos o tetraciclinas.

Si bien los diferentes mecanismos de acción no parecen influir en el comportamiento de los picos m/z en las cepas sensibles, lo que sí parece influir es la velocidad de la acción bactericida. Ello explicaría por qué fármacos de acción bactericida rápida, como aminoglucósidos o fluoroquinolonas, muestran un excelente comportamiento con dos horas de incubación, mientras los beta-lactámicos, con una acción bactericida más lenta, aunque muestran un comportamiento aceptable con dos horas de incubación, parecen requerir una hora de incubación más para mostrar un comportamiento óptimo.

Para obtener unos valores más fiables, sobre todo en relación con el sumatorio de todos los picos m/z , ha sido necesario introducir modificaciones en el método convencional de adquisición de datos. El método utilizado por defecto para la identificación tiene en cuenta sólo picos con un tamaño mínimo, lo que puede introducir sesgos importantes, sobre todo cuando se obtienen perfiles pobres. Sin embargo, la utilización de todas las señales m/z obtenidas, con independencia del tamaño, suponía correr el riesgo de interpretar como picos m/z señales que en realidad sólo fueran ruido de fondo, modificando al alza el sumatorio de señales. En consecuencia, se decidió modificar el método de captación de picos de modo que se adquirieran todas las señales generadas, pero posteriormente, mediante el software desarrollado, dar validez solamente a los picos con intensidad a partir de 10, ya que se trata de valores que es muy improbable que correspondan a ruido de fondo.

En estas condiciones, se estudió para cada uno de los picos mayoritarios y estables, y para el sumatorio de todos ellos, la proporción que guardaba una mejor correlación con los resultados. Eso se estudió tanto de manera general como de manera individual para cada microorganismo. El objetivo era, en la medida de lo posible, intentar establecer un umbral común para todos los Gram negativos, probados, salvo que hubiera diferencias significativas que recomendaran establecer umbrales de forma individual para cada género y especie.

El primer estudio llevado a cabo respecto a la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativo utilizó hemocultivos en las que se aislaron diferentes *Klebsiella* spp., y determinó su sensibilidad a meropenem. El tiempo por este método para discriminar entre sensible y resistente se calcula en torno a 4 horas, teniendo en cuenta un tiempo de incubación que inicialmente se proponía en torno a 1 hora, aunque posteriormente se vio que debía ser más largo, y un tiempo de análisis de datos entre 2 y 3 horas. Este estudio utiliza dos concentraciones de carbapenema (4 y 8 mg/L), que requieren dos puntos de corte distintos (0,6 y 0,4 respectivamente) (Langue *et al.*, 2014).

En el estudio de Langue *et al.* se utilizaron 108 cepas de *Klebsiella* spp., de las cuales 36 son resistentes y 72 son sensibles al meropenem a concentración de 8mg/L. Todas ellas se inocularon en hemocultivos simulados, no se utilizaron hemocultivos reales. En estas condiciones se obtuvieron 5 falsos positivos y 1 falso negativo. Lo que se tradujo en una especificidad del 93,5% y una sensibilidad del 97,3%.

Si comparamos el método desarrollado por nosotros, en este caso para carbapenemas, seleccionamos 76 muestras simuladas en hemocultivos, ha de tenerse en cuenta que en el presente estudio se incluyen tanto hemocultivos simulados como reales (76 y 20 respectivamente), utilizando una sola concentración (4 mg/L) y un solo punto de corte (0,33), a fin de facilitar y sistematizar el procedimiento. Se utilizó además un solo tiempo de incubación de 2 horas, ya que los estudios previos habían demostrado que tiempos de incubación más cortos incrementaban la frecuencia de falsas resistencias, y por tanto reducían la especificidad de la técnica. Una de las posibles limitaciones que se pueden achacar a nuestro estudio, en este aspecto, es el bajo número de aislados resistentes a carbapenemas, en especial en hemocultivos reales, debido a la baja prevalencia de este tipo de aislados en nuestro centro.

En todo caso, de las muestras simuladas se obtuvieron solamente 2 resultados de falsa resistencia y ninguno de falsa sensibilidad. De este modo, la sensibilidad estadística fue del 100%, y la especificidad fue del 97,14%. Ha de tenerse además en cuenta que, al analizar los valores de estas muestras, los valores del cociente m/z para la proteína L34 en la espectrometría de masas MALDI-TOF con antimicrobiano, con respecto al crecimiento sin antimicrobiano, fueron de 0,35 y 0,36 en ambas muestras, muy próximos por tanto al punto de corte. El microorganismo identificado en ambos casos fue *Proteus mirabilis*. Ha de tenerse en

cuenta que, en general, la familia *Providencia* suele dar problemas con respecto a las carbapenemas incluso en los sistemas de sensibilidad automatizados.

En relación con los hemocultivos reales es cierto que el número de muestras no es muy elevado, pero de los 20 hemocultivos reales tan sólo se registró una falsa resistencia, por lo tanto la sensibilidad fue del 95%, sin diferencias significativas con la observada en los hemocultivos simulados. Al igual que en el caso anterior, el microorganismo identificado fue *Proteus mirabilis*, lo que parece corroborar que los resultados de resistencia, en la familia *Providenciae*, han de ser valorados con prudencia. En todo caso, el error más preocupante, que sería que se considerase como sensible a un microorganismo resistente, no se dio en ningún caso.

Para cefotaxima, ciprofloxacino, piperacilina-tazobactam y gentamicina, es necesario analizar el trabajo de Jung *et al.* mediante el cual ponen en práctica, de nuevo, el método MBT-ASTRA. En este estudio se utilizan 30 cepas inoculadas en hemocultivos para probar ciprofloxacino y gentamicina. De estos aislados, 17 son resistentes a ciprofloxacino y 13 a gentamicina. Por otro lado seleccionó 99 hemocultivos reales para el estudio con cefotaxima, piperacilina-tazobactam y ciprofloxacino. De ellos, 22 aislados eran resistentes a cefotaxima, 13 a piperacilina-tazobactam y 24 a ciprofloxacino.

En cuanto a las condiciones del estudio, son muy similares a las del estudio llevado a cabo por Languette *et al.* Adoptaron el mismo punto de corte de 0,4 y aumentaron el tiempo de incubación a 2,5 h e incluso a 3 h (Languette *et al.*, 2014).

En este estudio se alcanzó, para las cepas resistentes, una sensibilidad del 100% tanto para gentamicina como para cefotaxima, en el caso de cefotaxima tanto en hemocultivos simulados como en reales. En el caso de ciprofloxacino, inicialmente el sistema erró en 4 hemocultivos simulados. Analizados con más detenimiento, dos de ellos se consideraron definitivamente como falsos resistentes, otro se clasificó como sensible y en el último se hicieron varias mediciones y la media lo determinó como sensible. En lo que a hemocultivos reales de pacientes se refiere, los resultados fueron excelentes para ciprofloxacino en los 24 hemocultivos resistentes seleccionados.

Finalmente, para piperacilina-tazobactam, 5 cepas fueron mal clasificadas (3 *E.coli*, 1 *E. cloacae*, 1 *K. pneumoniae*) Dos de ellas, tenían CIM por debajo del punto de corte 2 µg/ml y 3 µg/ml y los valores obtenidos de crecimiento relativo fueron de 0.55 y 0.45 respectivamente. Ambas fueron interpretadas como falsos resistentes. En las otras 3 cepas, ocurrió al contrario, se clasificaron como sensibles con una CIM superior al punto de corte (*K. pneumoniae* CIM >256 µg/ml, *E. cloacae* CIM 48 µg/ml, *E. coli* CIM 96 µg/ml), estas tres cepas fueron repetidas desde un subcultivo en agar sangre y el método MBT-ASTRA determinó correctamente la resistencia de las tres.

Estos autores también llegaron a la conclusión de que es necesario aumentar el tiempo de incubación de 2,5 h a 3 h para antimicrobianos como cefotaxima y piperacilina-tazobactam. Observaron que, en los betaláctamicos, las diferencias de valores entre los crecimientos relativos de las cepas sensibles y resistentes no eran tan amplias como ocurría con otros antimicrobianos como la gentamicina. Esto está probablemente vinculado a la rapidez del efecto bactericida de los beta-lactámicos, que es más lento que en antimicrobianos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, que tienen un efecto bactericida muy rápido. Esta mayor lentitud hace que, con periodos de incubación de 1-2 horas, las diferencias entre la señal de las cepas sensibles y de las resistentes se estreche, lo que redundará en un mayor índice de falsos resistentes, al no alcanzarse una caída suficiente en el crecimiento en presencia de antimicrobiano, en relación con el control positivo. Este comportamiento se observó también con nuestro método, si bien no de manera sistemática, ya que se observó con penicilinas y con cefalosporinas, pero no con carbapenemas, cuyo comportamiento fue muy similar al de antimicrobianos de otros grupos.

En nuestro método, inicialmente, por homogeneidad y puesto que se trata de desarrollar un método que ofrezca resultados de sensibilidad a antimicrobianos en el menor tiempo posible, se utilizaron siempre 2 horas como tiempo de incubación.

Analizando los resultados de antibióticos beta-lactámicos con esta metodología, en el caso de cefotaxima, podemos decir de nuestro método que no encontramos ningún falso sensible tanto en cepas simuladas como en cepas reales, los aislamientos resistentes son clasificados como tal al 100%, como ocurría en el estudio de Jung et al. Sin embargo no ocurre lo mismo con las cepas susceptibles, en los hemocultivos simulados conseguimos correlacionarlos de forma adecuada en un 79,6% y en los reales tan sólo en un 58,82%. Dato que mejoramos al

subir el valor del crecimiento relativo, el valor de la caída del pico de la proteína L34, pasaría de 0.33 a 0.46, sin verse afectado ningún aislamiento resistente. De esta forma pasaríamos de ese 58,82% a un 73,3%.

En términos globales seríamos capaces de informar la sensibilidad correcta en el 76,5% de los casos de bacteriemia, teniendo en cuenta sólo los hemocultivos reales ya que es lo que podemos extrapolar de una forma más adecuada a una realidad clínica.

Ocurre algo similar en el caso de piperacilina-tazobactam, con la diferencia con otros estudios (Jung *et al.* 2016) de que en nuestro caso, los resultados son favorables en el sentido de que no obtenemos falsos sensibles, todas las cepas resistentes fueron informadas como resistentes por nuestro sistema si mantenemos el valor en 0.33, y tan sólo encontraríamos 2 cepas mal clasificadas si aumentamos ese valor a 0.64. Debo destacar que ambos casos se dieron en hemocultivos simulados y no en cepas procedentes de pacientes, donde se observó una clara diferencia entre susceptibles y resistentes, ya que aun aumentando el valor a 0.64, todas las cepas resistentes tenían valores superiores a 0.9. Sin embargo es cierto que en términos globales los datos son mejorables y deberíamos realizar más estudios para saber que ocurre con este tipo de antimicrobianos, ya que hablamos de una capacidad de correlación adecuada del 89,13% y del 70,6%, en hemocultivos simulados y reales respectivamente.

Nuestro grupo de trabajo decidió comprobar cómo funcionaban otro tipo de cefalosporinas, si seguían la línea de la cefotaxima o si por el contrario los resultados eran superiores y dependía no tanto de la familia de antimicrobianos como de la molécula de la propia cefotaxima. Ceftazidima y ceftriaxona, fueron las cefalosporinas elegidas, a pesar de que no hay trabajos al respecto con el que podamos comparar nuestros resultados.

Se observó con ceftazidima, que aun aumentado el valor de caída de la proteína L34 a 0.37 no conseguimos mejorar los resultados obtenidos con cefotaxima de una manera significativa, de hecho en hemocultivos simulados el porcentaje global de acierto fue menor de un 80,4% frente al 87,5% conseguido con cefotaxima. En hemocultivos reales si se ve un pequeño aumento del 82,35% frente al 76,5%. Pero se le suma un inconveniente a la ceftazidima y es que en ambos tipos de muestra se obtuvieron falsos sensibles, 2 en el caso de hemocultivos simulados con valores de 0.32 y 0.23, y 1 en hemocultivos reales con un valor de 0.18. El hecho de que esta cefalosporina tenga una actividad más antipseudomónica que frente a las

enterobacterias, que eran la base de nuestra selección de cepas, hizo que planteáramos testar otra cefalosporina para comprobar estos resultados e intentar mejorarlos, la elegida fue ceftriaxona.

Sin embargo, el experimento llevado a cabo con ceftriaxona, obtuvo resultados similares a cefotaxima. En este caso únicamente se utilizaron hemocultivos reales, en los hemocultivos con cepas resistentes a ceftriaxona la correlación de nuestro método con el método usado en clínica fue del 100%. Si bien es cierto, que en el caso de las cepas sensibles, 6 cepas fueron clasificadas como resistentes por nuestro método. Al analizar los valores de crecimiento relativo, nos encontramos que eran valores muy dispares y próximos a los valores de las cepas resistentes, de manera que no se pudo variar el valor para mejorar la sensibilidad del método. Aun así, en global, se obtuvo un 77,8% de acierto, esto reporta un beneficio en 7- 8 de cada 10 bacteriemias.

Al analizar las cepas sensibles que eran clasificadas por nuestro método como resistentes, observamos que muchas de ellas tenían valores de crecimiento relativo en cuanto a la proteína L34, entre 0.33 y 0.6. Esto hizo que nos planteáramos entonces la posibilidad aumentar el tiempo de incubación como se llevó a cabo en el estudio de Jung *et al.* para ver si esas cepas susceptibles pueden ser clasificadas como tal, justificando esta alternativa con la acción bactericida lenta que poseen estos antimicrobianos. De manera que seleccionamos 10 hemocultivos reales para testar ceftriaxona al azar, que fue el último antimicrobiano con el que trabajamos, y la única condición que buscamos, fue testar al menos un hemocultivo resistente para poder comprobar que ese aumento de incubación no nos llevaba a obtener falsos negativos. Al analizar los datos se modifica el valor de la caída de pico de la proteína L 34 a 0.4 en vez de 0.33. Se modifica el punto de corte porque se observan 2 cepas cuyo crecimiento relativo es de 0.37 y 0.38, la caída es evidente aunque no esté por debajo de 0.33. Con estas nuevas condiciones 8 de los 9 hemocultivos (88,9%) sensibles funcionan a la perfección sin necesidad de modificar nuestro valor de la proteína L 34. Y de estos 10 nos planteamos la posibilidad de probar al azar 5 hemocultivos con piperacilina- tazobactam y cefotaxima. Todos ellos fueron concordantes con nuestro método. Y el hemocultivo resistente no se vió afectado. El hemocultivo que clasificamos como resistente para ceftriaxona y es sensible, tiene un valor de caída de la proteína L34 de 0,62, siendo piperacilina-tazobactam y cefotaxima sensible en este caso, de manera que podríamos pensar que no le ha afectado lo

suficiente el antimicrobiano pero tampoco sigue el patrón de una cepa resistente, ya que los valores de éstos están por encima de 0.9, además el hecho de no ser resistente a cefotaxima nos ayuda a interpretar que no estamos frente una BLEE, por lo que podríamos pensar que esta cepa también podría ser sensible para ceftriaxona. Por lo tanto a 3 horas obtendríamos resultados entre el 90-100% de sensibilidad. De manera que en un futuro lo ideal sería prolongar el período de incubación a 3 horas para antimicrobianos de esta familia.

Desde el punto de vista de la estandarización del método, consideramos más oportuno plantearlo de esta forma. Establecer un punto de corte por microorganismo implicaría una batería previa de pruebas enormemente amplia, en cuanto a especies y en cuanto a número de aislados, para validar cada uno de los puntos de corte. De este modo, no sería necesario reajustar el punto de corte por especies, al menos en la mayor parte de los casos, lo que facilita significativamente el proceso.

Los resultados frente a gentamicina, son bastante similares a los observados en el estudio de Jung *et al.*, donde todos los aislados registrados tanto sensibles como resistentes mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, lo fueron también por los métodos convencionales. En nuestro caso sin embargo, en los hemocultivos simulados, 3 aislados fueron clasificados como resistentes con valores de crecimiento relativos superiores a 0.6 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, a pesar de ser sensibles en el antibiograma convencional. Sin embargo, en nuestro estudio a diferencia de Jung *et al.*, utilizamos además hemocultivo reales con gentamicina, en los cuales no se registró este problema, siendo la correlación del 100%.

Para ciprofloxacino, en el caso de hemocultivos simulados, en nuestro método, el 98,7% de los aislamientos susceptibles se clasificaron correctamente. Solamente un aislado sensible (MIC de CIP por E-test: 1 mg/L) se clasificó como resistente. El hecho de tratarse de un aislado con una CIM en los límites de sensibilidad, probablemente ya con alguna mutación asociada a sensibilidad reducida a fluoroquinolonas justifica en parte este comportamiento. De todos modos, otras cepas con CIMs similares no han tenido ese mismo comportamiento, de modo que deben existir otros factores, más allá de la simple concentración inhibitoria, que justifiquen un mayor crecimiento en presencia del antimicrobiano. Por otro lado, un aislado resistente se clasificó como sensible, frente a los 2 que aparecen en el estudio de Jung *et al.*, seguramente debido a haber puesto unos puntos de corte más exigentes, que reducen el riesgo de informa falsas sensibilidades. Sin embargo, en relación con los hemocultivos reales,

en nuestro estudio se obtuvo un resultado falsamente sensible, con un valor de crecimiento relativo de 0.04. Aun así, la sensibilidad del método sigue siendo bastante elevada por encima del 90% en hemocultivos reales, y por encima del 95% en hemocultivos simulados, siendo nuestro método adecuado, en muestras procedentes de pacientes, para el 94,3% (33/35). A efectos prácticos, y trasladándonos a la clínica, imipenem, gentamicina y ciprofloxacino tienen muy buenos resultados, de manera que sería fácilmente implantable para estos antimicrobianos. Los resultados relativos a imipenem, gentamicina y ciprofloxacino son los que se comportan de forma más estable y robusta, de modo que las modificaciones en tiempos de incubación o puntos de corte prácticamente no repercuten en los resultados.

Los resultados con cefalosporinas y piperacilina-tazobactam se muestran más dependientes, sobre todo del tiempo de incubación. Aunque la fiabilidad es discretamente menor a la que se observa en los antimicrobianos anteriores, se mantiene de forma bastante estable la fiabilidad de los resultados de sensibilidad. Es cierto que se obtienen con mayor frecuencia falsas resistencias, pero los resultados de sensibilidad son fiables casi al 100%, de modo que el único problema que plantearían estos antimicrobianos sería la instauración de tratamientos innecesarios con otros grupos, cosa que en todo caso ocurriría si se tuvieran que instaurar tratamientos totalmente empíricos. En todo caso, incluso esta discreta limitación se compensa en buena parte con la prolongación del tiempo de incubación a 3 horas. Esto probablemente tenga relación con una actividad bactericida más lenta por parte de estos microorganismos, que hace que el margen de diferenciación entre la prueba con y sin antimicrobiano a las 2 horas sea todavía escaso, mientras a las 3 horas se ve considerablemente aumentado, con lo que se reduce mucho el margen de error. En todo caso, un resultado de sensibilidad con cualquiera de estos antimicrobianos permite tanto instaurar tratamiento como desescalar, en caso de estar frente a un paciente al que se le está administrando una carbapenema, con alta fiabilidad, lo que repercute de manera evidente tanto en una reducción de la presión selectiva de aislados resistentes como en la reducción del gasto sanitario.

De forma global, a juzgar por los datos obtenidos en relación con cefalosporinas y piperacilina/tazobactam, en el peor de los casos, este procedimiento permitiría mejorar el manejo de al menos el 70-80% de las bacteriemias. Si se confirman los datos obtenidos con tiempos de incubación de 3 horas, este porcentaje podría incrementarse hasta el 90%.

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

En su conjunto, este método permite predecir la sensibilidad o resistencia a los antibióticos de los microorganismos, directamente desde el frasco de hemocultivo, después de 2 o 3 horas de incubación. El método proporciona información de sensibilidad de una manera precisa, rápida y económica. No es un método excesivamente laborioso, que podría ser llevado a cabo por el personal de un laboratorio clínico. El procedimiento de inoculación e incubación con y sin antibiótico es, en términos generales, metodológicamente similar a los métodos de sensibilidad por microdilución en caldo, por lo que podría ser susceptible de automatización, facilitando su implementación en la rutina de los laboratorios clínicos de microbiología. Sin poder concretar con datos, ya que todavía no hay estudios al respecto, el beneficio económico que esto supondría para un hospital probablemente sería elevado y hablaríamos de cifras importantes, en el momento en el que se podría administrar un antibiótico de espectro más reducido y de coste menor 24 horas antes de lo que se puede realizar en la actualidad.

Obviamente se trata de un estudio preliminar, que requiere ser continuado en al menos tres aspectos:

- Ampliar el estudio a otros microorganismos, en especial Gram positivos, implicados con frecuencia en bacteriemias, como *S. pneumoniae*, *S. aureus* y estafilococos no productores de coagulasa.
- Ampliar el estudio a otros grupos de antimicrobianos, en especial a antimicrobianos bacteriostáticos. Aunque el uso de este tipo de antimicrobianos en bacteriemias es reducido, será útil conocer si el comportamiento de estos antimicrobianos se asemeja a los probados en este estudio o difiere significativamente, a fin de plantear ampliar el uso de esta metodología a aislados extrahospitalarios. Ello permitiría extender esta metodología, con la consiguiente rapidez en la disponibilidad de datos de sensibilidad, a otras áreas como infección urinaria, digestiva, etc.
- Estandarizar el método ajustando las condiciones óptimas en cuanto a concentraciones de antimicrobiano, tiempos de incubación, etc., que permitan los resultados más fiables y homogéneos para el mayor grupo posible de microorganismos y antimicrobianos.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

1. El sistema desarrollado permite obtener resultados de sensibilidad a antimicrobianos, en bacterias Gram negativas, con un alto grado de fiabilidad, en 2-3 horas tras el inicio de la prueba, lo que supone no más de tres horas y media tras la positivización del hemocultivo.
2. La concentración de antimicrobiano que parece ofrecer mejores resultados está en torno a 2-4 veces el punto de corte convencional del antimicrobiano.
3. De forma global, parece una estrategia más realizable, desde el punto de vista de la práctica clínica, intentar establecer un solo punto de corte, y modular los tiempos de incubación.
4. Un tiempo de incubación de 2 horas es suficiente para antimicrobianos rápidamente bactericidas, como fluoroquinolonas o aminoglicósidos mientras que, para antimicrobianos con una actividad bactericida más lenta, como son la mayor parte de los beta-lactámicos, los resultados parecen mejores con 3 horas de incubación.
5. Los parámetros que mejor se correlacionan con la sensibilidad o resistencia del microorganismo a los antibióticos probados son el sumatorio de las intensidades de los picos obtenidos, y la intensidad del pico correspondiente a la proteína ribosómica L34. Los resultados son mejores mediante la combinación de estos dos parámetros que con cualquiera de ellos por separado.

6. Mediante los parámetros establecidos, la fiabilidad de los resultados de *sensible* obtenidos tienen una fiabilidad prácticamente del 100%.
7. En la mayor parte de los casos, los resultados obtenidos con hemocultivos reales son similares, o incluso discretamente mejores, que los obtenidos con hemocultivos simulados.
8. Los resultados discordantes no parecen acumularse de manera particular en ningún género ni especie de los probados.
9. El establecimiento final de la utilidad del método requerirá ampliar el estudio a otros grupos de microorganismos, especialmente a Gram positivos, y a otros grupos de antimicrobianos, para conocer sobre todo el comportamiento con este método de antimicrobianos bacteriostáticos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abrok M, Arcson A, Lazar A, Urban E, Deak J.** Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women. *J Microbiol Methods* 2015;114:23-25.
- Alcaide F, Palop-Borrás B, Domingo D, Tudó G.** Aplicación de la espectrometría de masas en micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 (Supl 2):31-35.
- Akanuma G, Nanamiya H, Natori Y, Yano K, Suzuki S, Omata S, Ishizuka M, Sekine Y, Kawamura F.** Inactivation of ribosomal protein genes in *Bacillus subtilis* reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation. *J Bacteriol* 2012;194:6282–6291.
- Akanuma G, Kobayashi A, Suzuki S, Kawamura F, Shiwa Y, Watanabe S, Yoshikawa H, Hanai R, Ishizuka M.** Defect in the formation of 70S ribosomes caused by lack of ribosomal protein L34 can be suppressed by magnesium. *J Bacteriol* 2014;196:3820-3830.
- Anhalt J. P., Catherine Fenselau C.** Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975;47:219–225.
- Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M.** Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol* 2010;10:285.
- Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P.** Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013;51:2875-2879.
- Balážová T, Makovcová J, Šedo O, Slaný M, FaldynaM, Zdráhal Z.** The influence of culture conditions on the identification of *Mycobacterium* species by MALDI-TOF MS profiling. *FEMS Microbiol Lett* 2014;353:77-84.
- Bernardo K, Pakulat N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fler S, Hüniger F, Krönke M.** Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted

laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002;2:747-753.

Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:467-470.

Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48:1549-1554.

Bizzini A, Jatón K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol* 2011;49:693-696.

Bjørnholt V, Nilsen SM, Noorland I, Wigemyr M, Løken CH, Müller CS, Ingebretsen A. MALDI-TOF mass spectrometry ID of bacteria directly from cerebrospinal fluid what you see is what you get. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011. p. O-345.

Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:601-608.

Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoS One* 2014;9:e86915.

Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen GX. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:2179-2182.

- Camara JE, Hays FA.** Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:1633-1638.
- Carbonnelle E, Mesquit C, Bille E., Day N., Dauphin B, Beretti JL,** Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011;44:104-109.
- Carvalhoes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, Assis DM, Juliano L, Machado AM, Gales AC.** Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2132-2136.
- Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, Ghelardi E.** Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One* 2016;11:e0152831.
- Ceyssens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, Kostrzewa M, Hendrickx M, Mathys V.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for combined species. Identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2017;55:624-634.
- Chen JH, Ho PL, Kwan GS, She KK, Siu GK, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC.** Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol* 2013;51:1733-1739.
- Chen JHK, She KK, Wong O-Y, Teng JLL, Yam W-C, Lau SKP, Woo PC, Cheng VC, Yuen KY.** Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. *J Clin Pathol* 2015;68: 652-656.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J.** Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010;48:1169-1175.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:547-603.

Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996;14:1584-1586.

Clerc O, Prod'hom G, Senn L, Jaton K, Zanetti G, Calandra T, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:355-360.

Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis* 2013;56:1101-1107.

Collignon PJ. Antibiotic resistance. *Med J Aust* 2002;177:325-329.

Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006;42 (Supl 1):S25-34.

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

Culebras E, Álvarez-Buylla A, Artacho Reinoso MJ, Lepe JA. Estudios de tipificación con MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 (Supl 2):42-46.

De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:e475-e484.

De la Pedrosa EG, Gimeno C, Soriano A, Cantón R. Studies of the cost effectiveness of MALDI-TOF and clinical impact. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 (Supl 2):47-52.

- Demarco ML, Burnham CA.** Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am J Clin Pathol* 2014;141:204-212.
- Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB.** Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2013;24:1194-1201.
- DingleTC, Butler-Wu SM.** MALDI-TOF Mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* 2013; 33: 589–609.
- Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, Dauphin B, Beretti JL, Alvarez AS, Degand N, Ferroni A, Rottman M, Herrmann JL, Nassif X, Ronco E, Carbonnelle E.** Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:998-1004.
- Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB.** Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000;49:295-300.
- El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Thomas I, Bome-Mannathoko N, Jones C, Reid M, Ben-Ismaeil B, Davies AR, Harris LG, Mack D.** Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 2012;69:47-55.
- Emonet S., Shah H. N., Cherkaoui A. and Schrenzel J.** Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1604-1613.
- Fang H, Ohlsson A-K, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS.** VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:3073-3077.
- Febbraro F, Rodio DM, Puggioni G, Antonelli G, Valeria Pietropaolo, and Trancassini M.** MALDI-TOF MS Versus VITEK[®] 2: Comparison of systems for the identification of microorganisms responsible for bacteremia. *Curr Microbiol.* 2016;73:843–850.

Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20:157-171.

Fernandez-Olmos A, Garcia-Castillo M, Morosini M-I, Lamas A, Maiz L, Canton R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2012;11:59-62.

Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñiz MC, González-Buitrago JM, Muñoz JL. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:492-497.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110-2115.

Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood culture. *PLoS One.* 2010;5:e14235.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Vega M, 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.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:546-551.

- Foster AG.** Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013;51:3717-3719.
- Frikmann H, Christner M, Donat M, Berger A, Essig A, Podbielski A, Hagen RM, Poppert S.** Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platforms. *PLoS One* 2013;8:e63222.
- Glán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, Rodríguez-Iglesias M.** Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33:372-378
- Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P.** MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15:5.
- Ghosh AK, Paul S, Sood P, Rudramurthy SM, Rajbanshi A, Jillwin TJ, Chakrabarti A.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:372-378.
- Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, Monnin V, van Belkum A, Hagen F, Meis JF, Durand G.** Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 87:7–10
- Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N.** A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:552–556.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Tess Urbanski T, Hamilton B, Venter D.** Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 2012;50:2918-2931.

Grundmann, H, and the CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusion from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 2010;15:pii 19711.

Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 2001;107:679–688.

He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tang Y-W. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J Clin Microbiol* 2010;48:3888-3892.

Herold M, Nierhaus KH. Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem* 1987;62:8826–8833.

Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GN, Weissman DN. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics* 2006;6:6416–6425.

Holland RD, Wikes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO, Jr.. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1996;10:1227-1232.

Homem de Mello de Souza HA, Dalla-Costa LM, Vicenzi FJ, Camargo de Souza D, Riedi CA, Filho NA, Pilonetto M. MALDI-TOF: a useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2014;63:1148-1153.

Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ramirez MD, Navarro-Marí JM. Bacterial identification from blood cultures by a rapid

matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry technique. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31:152-155.

Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerova T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:2441-2443.

Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:3222-3227.

Hrabák J, Chudácková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:839-853.

Hsueh P-R, Kuo L-C, Chang T-C, Lee T-F, Teng S-H, Chuang Y-C, Teng LG, Sheng WH. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2014;52:3095-3100.

Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, Collins CD, Nagel JL. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis* 2013;57:1237-1245.

Idelevich EA, Grunewald CM, Wüllenweber J, Becker K, Coste AT. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp.. From positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. *PLoS ONE* 2014;9:IDe114834.

Jamal WY, Shahin M, Rotimi VO. Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *J Med Microbiol* 2013;62:540-544.

- Jaroslav Hrabák, Eva Chudáčková, Radka Walková.** Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:103-114.
- Johansson A, Ekelöf J, Giske CG, Sundqvist M.** The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight. *BMC Microbiol* 2014;10:1489.
- Johansson A, Nagy E, Sóki J.** Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2014;63:1105-1110.
- Jordana-Lluch E., Martró Català E., Ausina Ruiz V.** La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:635-644.
- Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl HG, Parcina M, Bekeredjian-Ding I, Bierbaum G.** Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mecc complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2014;304:1018-1023.
- Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, Marco F, Vila J.** A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for therapeutic identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1353-1358.
- Jung JS, Eberl T, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S, Wieser A.** Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:949-955.
- Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S.** Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014;52:924-930.
- Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S.** Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2016;54:2820-2824.

Kassim A, Pflüger V, Premji Z, Daubenberger C, Revathi G. Comparison of biomarker based matrix assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BMC Microbiol* 2017;17:128.

Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e31676.

Khot PD, Fisher MA. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3711-3716.

Konrad R, Berger A, Huber I, Boschert V, Hörmansdorfer S, Busch U, Hogardt M, Schubert S, Sing A. Matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria associated bacteria. *Eurosurveillance* 2010;15:1-5.

Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, Groß U. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar *typhi* from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e40004.

Lambiase A, Del Pezzo M, Cerbone D, Raia V, Rossano F, Catania MR. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2013;92:145-149.

Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol* 2014;52:4155-4162.

- Lartigue M. F.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infection Genetics and Evolution* 2013;13:230–235.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, Naas T, Tandé D.** Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015;53:2163-2171.
- Leuschner RG1, 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* 2004;38:24-31.
- Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo MC, Bekal S, Lefebvre B, Tremblay C.** A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS One* 2015;10:e0144878.
- Lu JJ, Tsai FJ, Ho CM, Liu YC, Chen CJ.** Peptide biomarker discovery for identification of methicilin-resistant and vancomicine-intermediate *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF. *Anal Chem.* 2012;84:5685-5692.
- Malcolmson C, Ng K, Hughes S, Kissoon N, Schina J, Tilley PA, Roberts A.** Impact of matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight and antimicrobial stewardship intervention on treatment of bloodstream infections in hospitalized children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2016;23:piw033.
- MALDI Theory Mass Spectrometry Bruker Daltonics®.**
- March G. A., Eiros J. M.** Impacto de la metodología MALDI-TOF en la identificación clínica de agentes infecciosos. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed* 2012;1:60-65.
- March-Rosselló GA, Muñoz-Moreno MF, García-Loygorri-Jordán de Urriés MC, Bratos-Pérez MA.** A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing

mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:699-704.

Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. 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.

Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:2269–2281.

McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, Wilkey K, Burnham CA. Evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of clinically relevant filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2016;54:2068-2073.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, 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;46:1946-1954.

Mensa J, Barberan J, Llinares P, Picazo JJ, Bouza E, Alvarez Lerma F, Borges M, Serrano, R. León C, Guirao X, Arias J, Carreras E, Sanz MA, García Rodríguez JA. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter* 2008;21:234-258.

Morgenthaler NG and Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: Review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper Kit. *Int J Microbiol* 2015;2015:827416.

Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Pré'vost G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies

90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1631–1638.

Mulet M, Gomila M, Scotta C, Sanchez D, Lalucat J, Garcia-Valdes E. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:455-464.

Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM. Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33:369-371

Muñoz Bellido JL, Vega Castaño 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.

Nagel JL, Huang AM, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Lassiter J, Patel T, Newton DW. Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative *Staphylococcus* blood cultures in conjunction with rapid diagnostic testing. *J Clin Microbiol* 2014;52:2849-2854.

Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2011;60:1584-1590.

Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:256-259.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791–1798.

Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bocher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, Abdul-Redha R, Dargis R, Schouenborg P, Hojlyng N, Kemp M,

- Christensen JJE.** Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis* 2010;42:716-718.
- Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. *PLoS One*. 2016;11:e0159730.
- Ostergaard C, Hansen SGK, Moller JK.** Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 2015;305:838-847.
- Oviaño M, Boy G.** Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* by matrix-assisted desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;87:129-132.
- Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G.** Rapid detection of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:1146-1157.
- Oviaño M, Rojo MD, Navarro Marí JM, Bou G.** Detección rápida de resistencias antimicrobianas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 (Supl 2):36-41.
- Oviaño M, Ramírez CL, Barbeyto LP, Bou G.** Rapid direct detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1350-1354.
- Oviaño M, Rodríguez-Martínez JM, Pascual Á, Bou G.** Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6)-Ib-cr in *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1074-1080.
- Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JM, Mars-Groenendijk RH, Trip H, E. Margo Molhoek EM, Jansen HJ, Plas JVD, Ad Jong L, Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Speksnijder**

- AGC. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2015;305:446-452.
- Panagiotidis CA, Huang SC, Canellakis ES.** Relationship of the expression of the S20 and L34 ribosomal proteins to polyamine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:157–168.
- Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Tuma Z, Gniadkowski M, Miriagou V, Hrabak J.** Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2952-2957.
- Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015;53:1731-1735.
- Pascual Hernández A, Ballestero-Téllez M, Galán-Sánchez F, Rodríguez Iglesias M.** Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 (Supl 2):8-18.
- Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I.** A dual approach employing MALDI-TOF-MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiol Lett* 2012;328:46-53.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Wallace MA, Burnham CAD.** Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:1703-1712.
- Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, Musser JM.** Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect* 2014;69:216-225.
- Ponce-Alonso M, Rodríguez-Rojas L, Del Campo R, Cantón R, Morosini MI.** Comparison of different methods for identification of species of the genus *Raoultella*: report of 11

cases of *Raoultella* causing bacteraemia and literature review. Clin Microbiol Infect 2016;22:252-257.

Porras MI, Cañueto J, Ferreira L, García MI. Human dermatophytosis. First description in Spain and diagnosis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Enferm Infecc Microbiol Clin 2010;10:747-748

Powell EA, Blecker-Shelly D, Montgomery S, Mortensen JE. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of the fastidious pediatric pathogens *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus*, and *Kingella*. J Clin Microbiol 2013;51:3862-3864.

Quiles Melero I, Pelaez T, Rezusta Lopez A, Garcia-Rodriguez J. Aplicacion de la espectrometria de masas en micologia. Enferm Infecc Microbiol Clin 2016;34 (Supl 2):26-30

Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat 2010; 13:151-171.

Rasmussen, BA, Gluzman Y, Tally FP. Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:1590–1592.

Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2016;86:257-261.

Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Rychert JA, Westblade LF, Procop GW. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013;32:1571-1578.

Riederer K, Cruz K, Shemes S, Szpunar S, Fishbain JT. MALDI-TOF identification of Gram-negative bacteria directly from blood culture bottles containing charcoal: Sepsityper®

kits versus centrifugation-filtration method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;82:105-108.

Rodríguez JC, Bratos MA, Merino E, Ezpeleta C. Utilización de MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de la sepsis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34 Supl 2:19-25.

Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, Asensio A, Calbo E, Cercenado E, Cisneros JM, Cobo J, Delgado O, Garnacho-Montero J, Grau, S, Horcajada JP, Hornero A, Murillas-Angoitin J, Olivero A, Padilla B, Pasquau J, Pujol M, Ruiz-Garbajosa P, San Juan R, Sierras R. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:e1–22.e23.

Ruiz A, Cercenado E. Direct Identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O421-427.

Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Procop GW, Richter SS, Sercia L, Westblade LF, Ferraro MJ, Branda JA. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Grampositive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 2013;51:2225-2231.

Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F, Criado González M, Hernández Egidio S, de Frutos Serna M, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Pretreatment of urine samples with sds improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;52:335-338.

Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stîngu CS, Schellenberger W, Rodloff AC, Eschrich K. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit* 2012;18:MT71-77.

Schieffer KM, Tan KE, Stamper PD, Somogyi A, Andrea SB, Wakefield T, Romagnoli M, Chapin KC, Wolk DM, Carroll KC. Multicenter evaluation of the Sepsityper™

extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK(®) diagnostic blood culture systems. J Appl Microbiol 2014;116:934-941.

Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Bottger EC, Hombach M. Use of the Bruker MALDI Biotyper for the identification of molds in the clinical mycology laboratory. J Clin Microbiol 2014;52:2797-2803.

Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, Iwadate Y, Kuwabara S, Saeki N, Nomura F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. Clin Chim Acta 2014;435:59-61.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, 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;49:543-551.

Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010;28(Supl 1):12-18.

Sierra-Madero JG, Knapp C, Karaffa C, Washington JA. Role of beta-lactamase and different testing conditions in oxacillin-borderline-susceptible staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1988;32:1754-57.

Siller Ruiz M, Asensio Calle ML, Hernández Egido S, Calvo Sánchez N, Frutos Serna M, García García MI. ¿Es *Raoultella* un microorganismo infrecuente en infecciones humanas? XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia. Madrid 2013(SEQ).

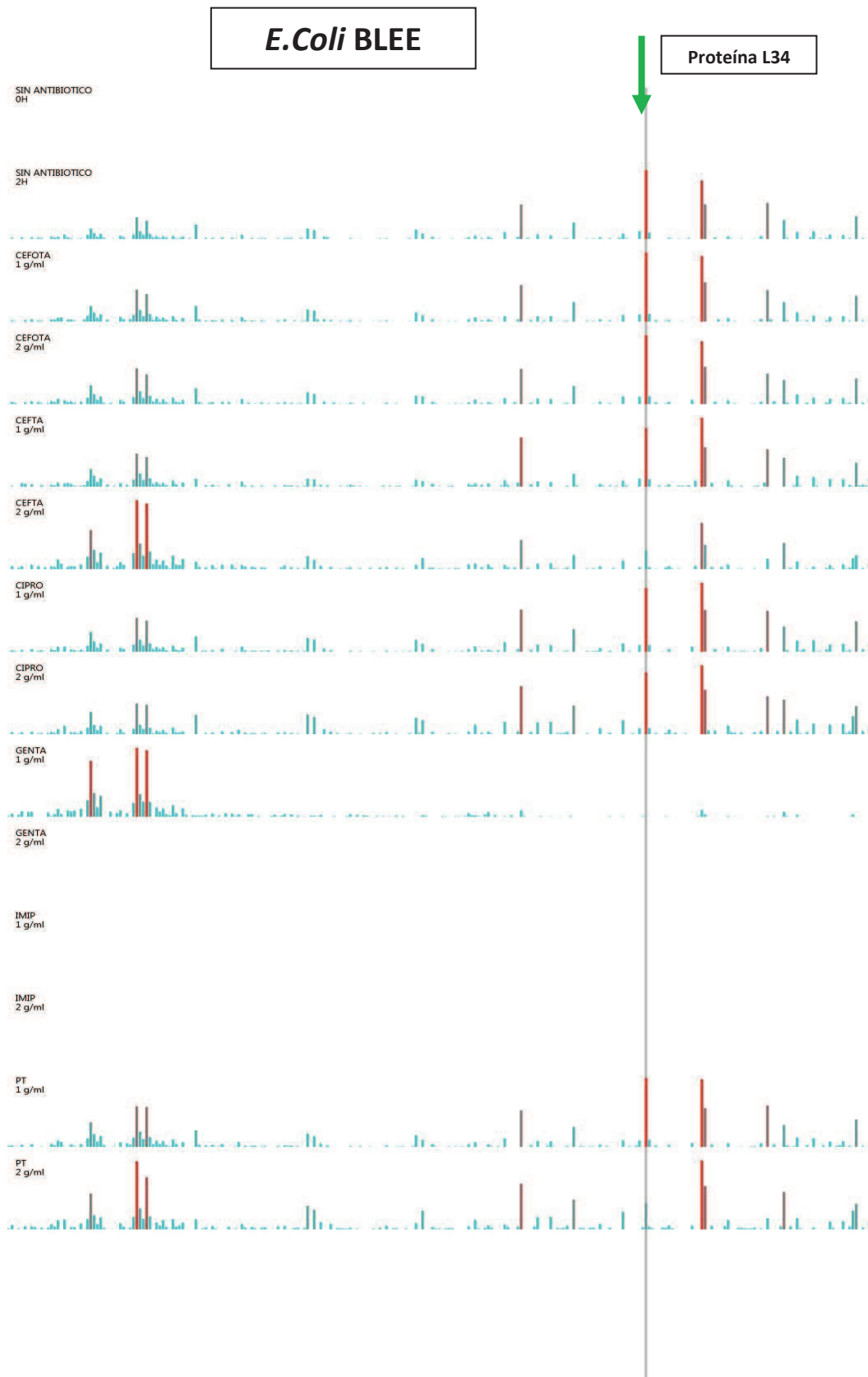
Siller Ruiz M, Hernández Egido S, Calvo Sánchez N, Muñoz Bellido JL. Unusual clinical presentations of *Actinotignum (Actinobaculum) schaalii* infection. Enferm Infecc Microbiol Clin 2017; 35:197-198

- Soki, J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord CE on behalf of the ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria.** Examination of cfiA-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:497–502.
- 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.
- Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012;50:927-937.
- Suberviola Cañas B, Jáuregui R, Ballesteros MÁ, Leizaola O, González-Castro A, Castellanos-Ortega Á.** Effects of antibiotic administration delay and inadequacy upon the survival of septic shock patients. *Med Intensiva* 2015;39:459-466.
- Szabados F, Kaase M, Anders A, Gatermann SG.** Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 2012;65:400-405.
- Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC.** Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol* 2012;50:3301-3308.
- TeKippe EM, Shuey S, Winkler DW, Butler M, Burnham CAD.** Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013;51:1421-1427.
- Vega-Castaño S, Ferreira L, González-Ávila M, Sánchez-Juanes F, García-García MI, García-Sánchez 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.

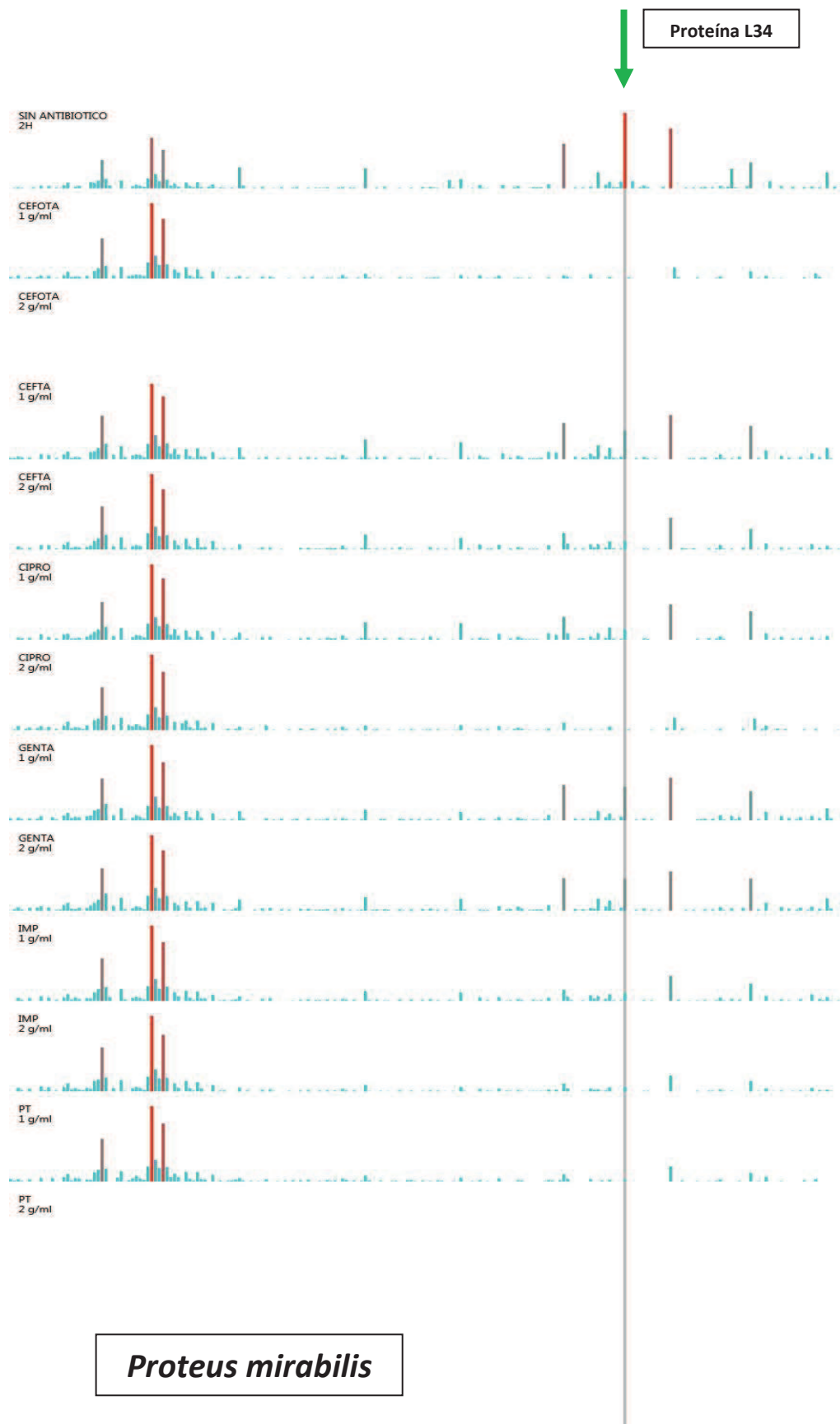
- Vila J, Zboromyrska Y, Burillo A y Bouza E.** Perspectivas de futuro de la espectrometría de masas en microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34(Supl 2):53-58.
- Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH.** Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012;7:e32589.
- Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci* 2013;26:430-436.
- Wang L, Han C, Sui W, Wang M, Lu X.** MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:5259-5266.
- Wilén CB, McMullen AR, Burnham CA.** Comparison of sample preparation methods, instrumentation platforms, and contemporary commercial databases for identification of clinically relevant mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015;53:2308-2315.
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF.** Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 2001;292:883–896.
- Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, Bosch J, Marco F, Vila J.** Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:561.e1-561.e6.
- Zhou C, Hu B, Zhang X, Huang S, Shan Y, Ye X.** The value of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identifying clinically relevant bacteria: a comparison with automated microbiology system. *J Thorac Dis* 2014;6:545–52.
- Zimmermann S.** Detecting aminoglycoside resistance by mass spectrometry. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2013; April 27-30 Berlin, Germany; Poster P-1549.

ANEXOS

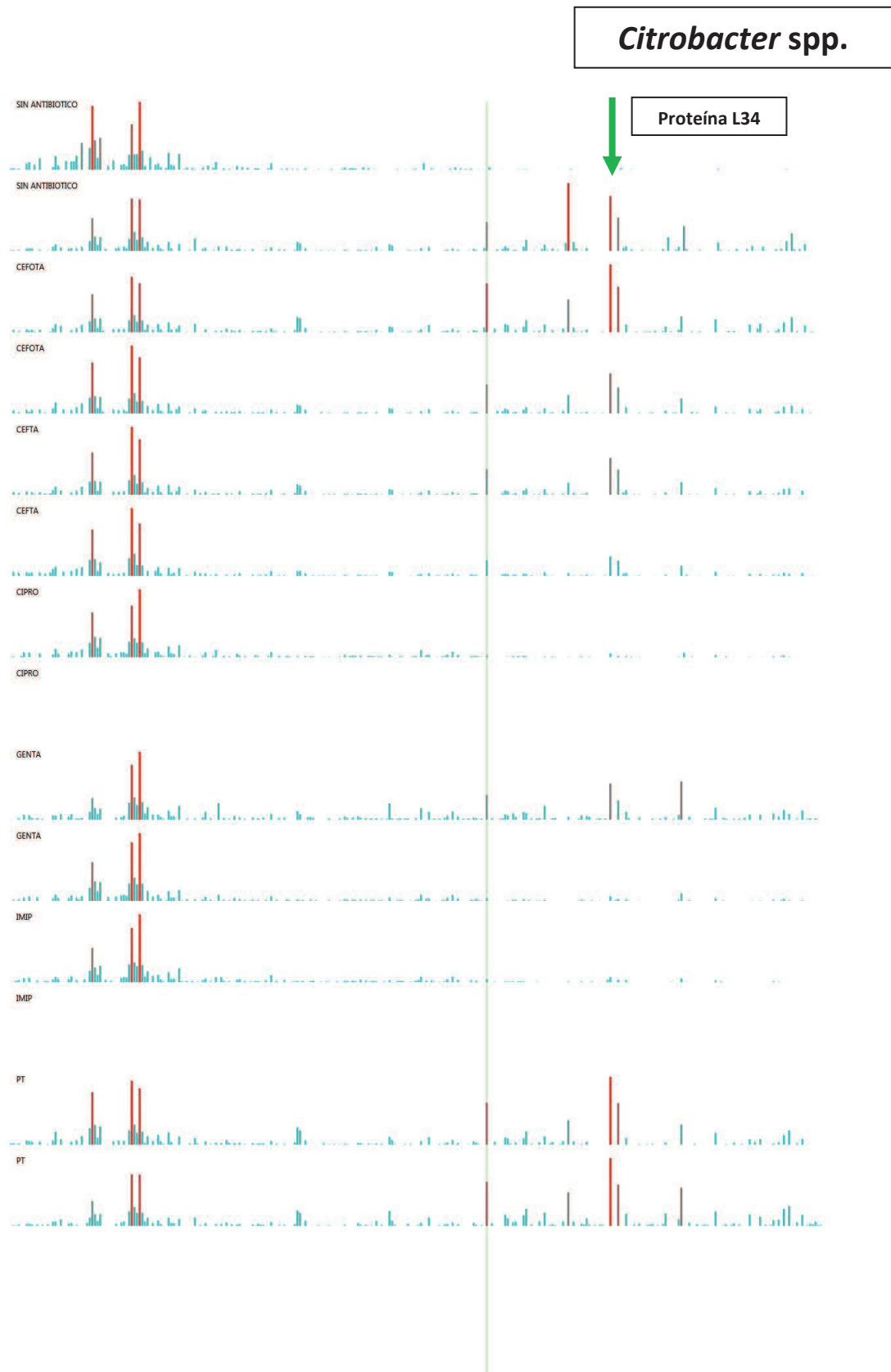
“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”



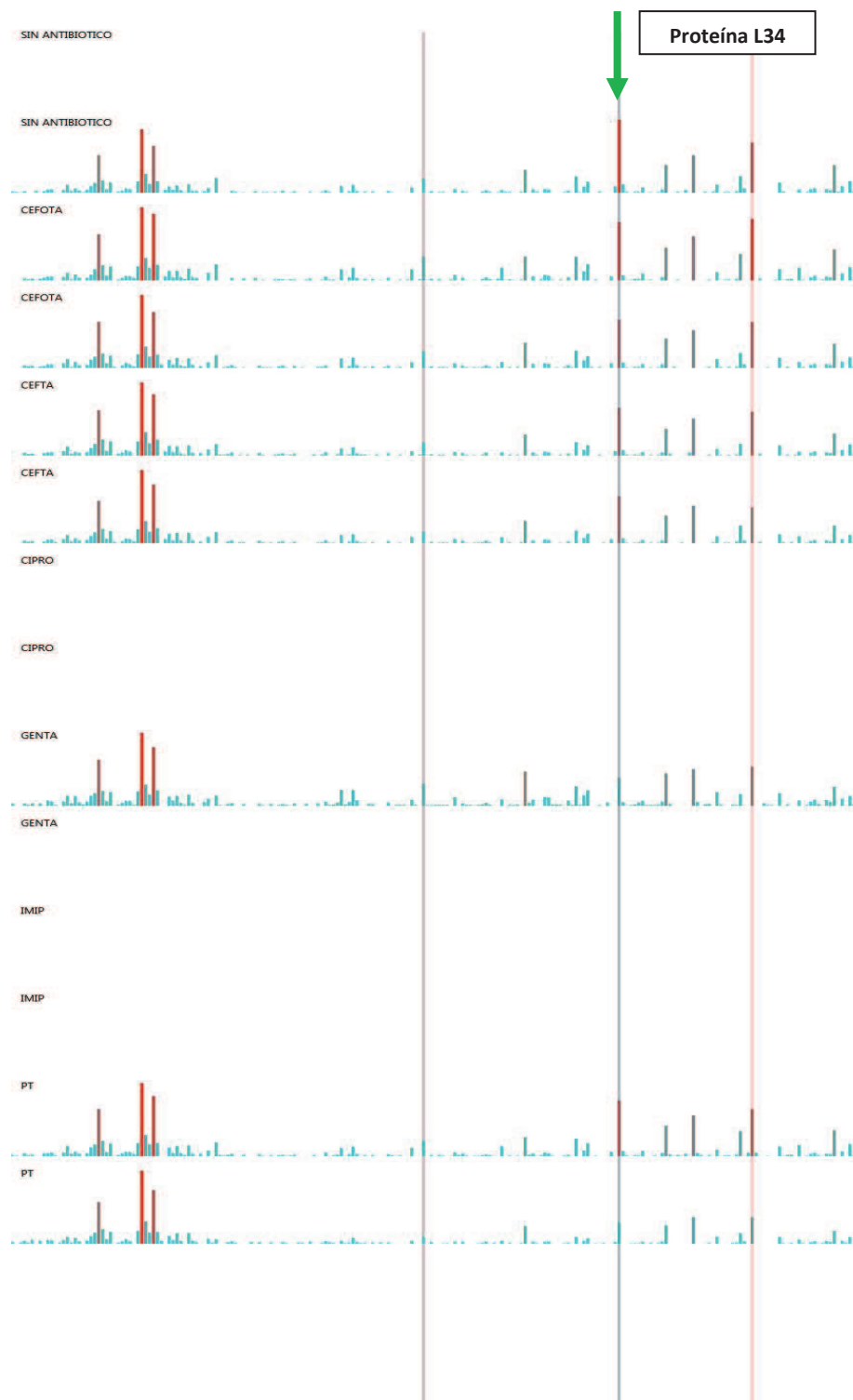
“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”



“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

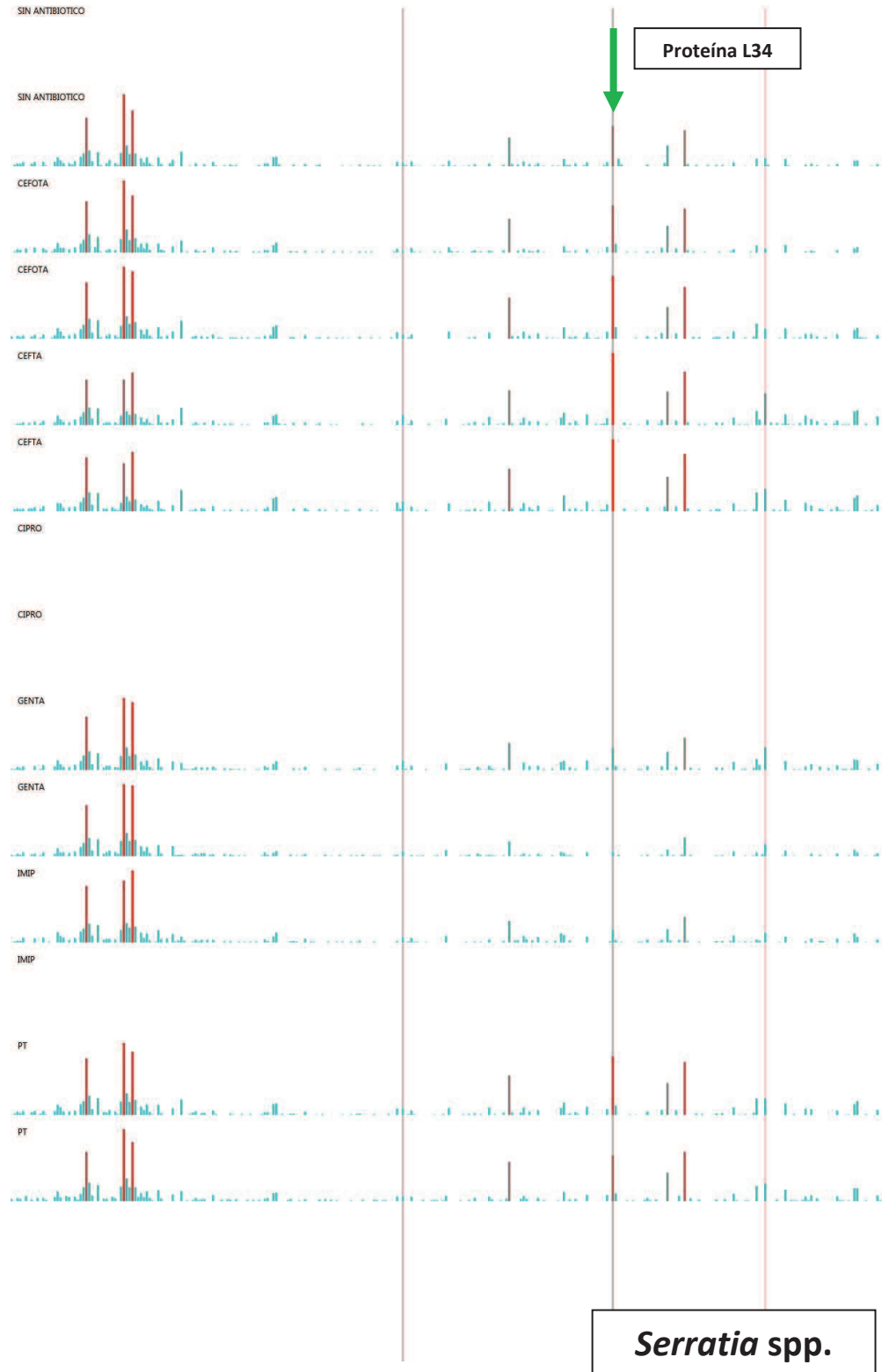


“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

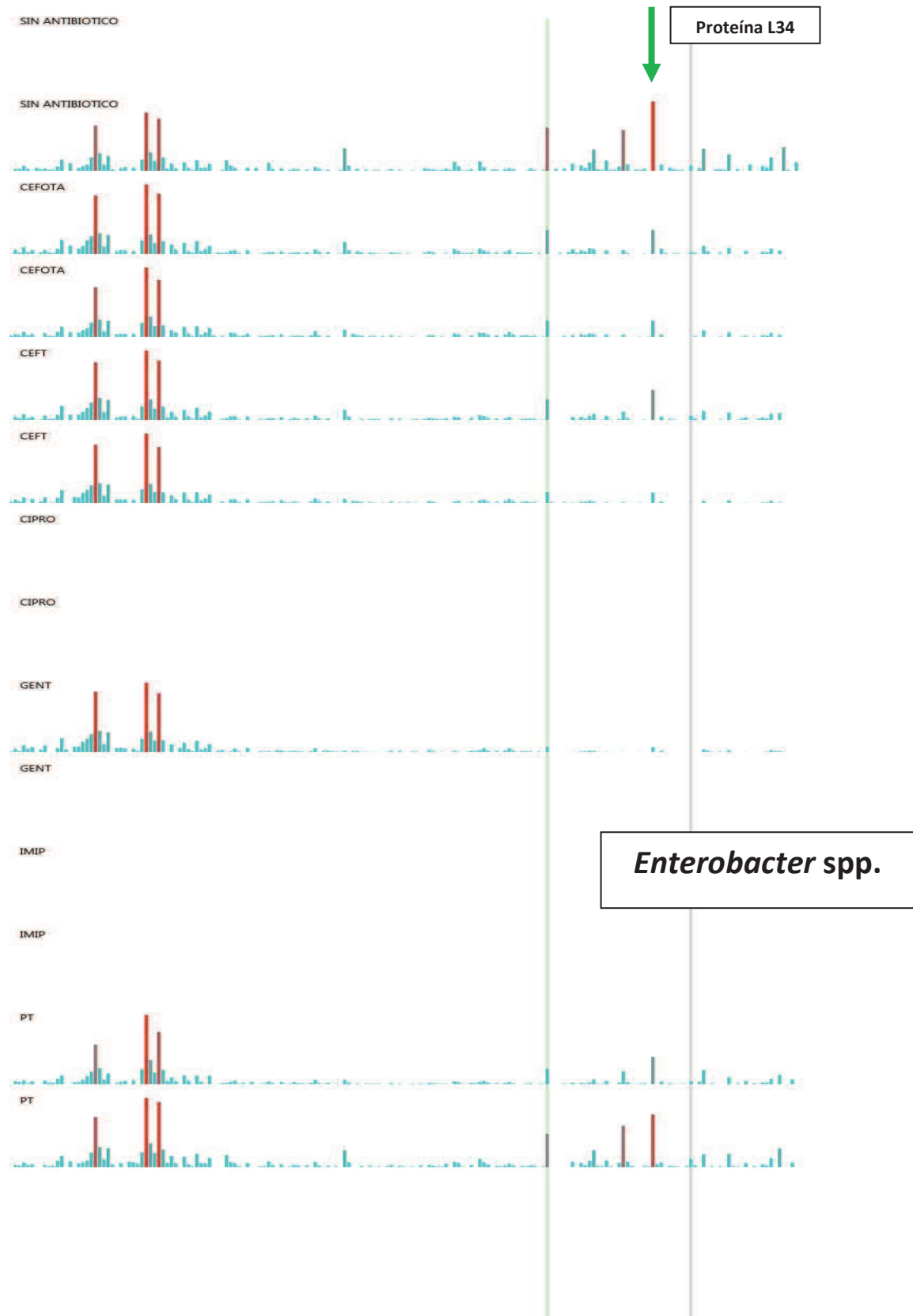


Morganella morganii

“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”



“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”



“Determinación de fenotipos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos bacterianos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa”

