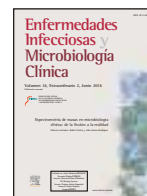




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Aplicación de la espectrometría de masas en micobacterias

Fernando Alcaide^{a,b,c,d,*}, Begoña Palop-Borrás^{c,e}, Diego Domingo^{c,f} y Griselda Tudó^{b,c,d,g}

^aServei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^bUnidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona (UITB), Barcelona, España.

^cGrupo de Estudio de Infecciones por Micobacterias (GEIM) de la SEIMC, Madrid, España

^dRed Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^eUnidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, España

^fServicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España

^gServei de Microbiologia-CDB, Hospital Clínic de Barcelona-ISGlobal, Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

RESUMEN

Palabras clave:
Espectrometría de masas
Micobacterias
Identificación
MALDI-TOF

Hasta la actualidad se han descrito más de 170 especies de micobacterias. Más de un tercio de ellas pueden ser patógenas para el ser humano, lo que supone una carga importante de trabajo en los laboratorios de microbiología. Su identificación se hace necesaria en la práctica clínica y ha supuesto durante años un importante problema debido a las carencias de los métodos fenotípicos o tradicionales y a la limitación y complejidad de las herramientas más modernas, basadas en su mayoría en técnicas de biología molecular. El objetivo de esta revisión es realizar una breve descripción de los diferentes aspectos relacionados con la utilización de la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) en la identificación de las micobacterias. Son varias las dificultades encontradas en la aplicación del método en estos microorganismos, derivadas fundamentalmente del elevado carácter patógeno de algunos miembros, que hace necesaria su inactivación, y la peculiar estructura de su pared celular, que requiere protocolos especiales de extracción de las proteínas. Otros temas de relevancia —como son los medios de cultivo de los que se parte, los métodos de referencia utilizados (*gold standard*) en la identificación final de las distintas especies y los puntos de corte que deben asumirse para aceptar un resultado como válido— son también motivo de análisis, así como las bases de datos de los diferentes sistemas disponibles. La EM es una técnica que ha revolucionado el diagnóstico de la microbiología moderna; sin embargo, futuras y puntuales mejoras son necesarias para consolidar su uso en la identificación micobacteriológica.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Application of mass spectrometry in mycobacteria

ABSTRACT

Keywords:
Mass spectrometry
Mycobacteria
Identification
MALDI-TOF

To date, more than 170 species of mycobacteria have been described, of which more than one third may be pathogenic to humans, representing a significant workload for microbiology laboratories. These species must be identified in clinical practice, which has long been a major problem due to the shortcomings of conventional (phenotypic) methods and the limitations and complexity of modern methods largely based on molecular biology techniques. The aim of this review was to briefly describe different aspects related to the use of MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria. Several difficulties are encountered with the use of this methodology in these microorganisms mainly due to the high pathogenicity of some mycobacteria and the peculiar structure of their cell wall, requiring inactivation and special protein extraction protocols. We also analysed other relevant aspects such as culture media, the reference methods employed (*gold standard*) in the final identification of the different species, the cut-off used to accept data as valid, and the databases of the different mass spectrometry systems available. MS has revolutionized diagnosis in modern microbiology; however, specific improvements are needed to consolidate the use of this technology in mycobacteriology.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: falcaide@bellvitgehospital.cat (F. Alcaide).

Introducción

Las micobacterias son un grupo amplio de microorganismos que incluye más de 170 especies¹, muchas de ellas con gran repercusión clínica, ya que son los agentes causales de infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. Algunas enfermedades, como la tuberculosis (TB) y la lepra, siguen siendo en nuestros días uno de los mayores problemas sanitarios en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2014 cerca de 9,6 millones de personas enfermaron de TB y 1,5 millones murieron por ella². Además, en los últimos años se ha asistido a la aparición y diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos. Asimismo, la lepra también es un problema de primer orden, donde la mayoría de los pacientes se encuentran en Asia, África y Sudamérica. Por otro lado, las micobacterias no tuberculosas (MNT) o ambientales han ido tomando un mayor protagonismo y representan, en la actualidad, entre el 30 y el 50% del total de micobacterias aisladas en gran parte de los servicios y laboratorios de microbiología clínica. Además, un gran número de ellas son patógenas para el hombre (micobacteriosis), requiriendo un tratamiento específico para cada caso^{3,4}. Por ello, ante cualquier aislamiento micobacteriano clínico, se recomienda llevar a cabo una identificación precisa de especie, incluso dentro del complejo *M. tuberculosis*.

La identificación microbiológica fenotípica o convencional es lenta, laboriosa y con escasa capacidad para discriminar las múltiples especies micobacterianas descritas en la actualidad. Los métodos moleculares comerciales son los más utilizados, pero están limitados a un número de especies y tienen un elevado coste⁵⁻⁹. La espectrometría de masas (EM) mediante el sistema MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) sirve para detectar perfiles proteicos y realizar en escasos minutos la identificación precisa de bacterias convencionales. Sin embargo, en las micobacterias aún no se ha introducido en la rutina habitual de los laboratorios de microbiología, ya que las características específicas de estas bacterias, sobre todo la pared bacteriana, dificultan su procesamiento e interpretación.

En esta revisión se abordan los diferentes aspectos y experiencia de la EM en la identificación micobacteriana, haciendo hincapié en las dificultades observadas y en las diferentes posibilidades de extracción proteica, así como de lectura y análisis de los resultados.

Estructura y composición de las micobacterias

Los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* presentan características distintas a aquellas que muestran las bacterias grampositivas y gramnegativas, especialmente en referencia a su pared celular, compuesta por una capa de peptidoglicano que contiene una estructura de lipoarabinomanano, similar a la de las bacterias gramnegativas. El factor relevante es la cantidad (alrededor del 60% del peso de la pared) y la complejidad de los lípidos encontrados en esta estructura. Entre ellos cabe destacar los ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga de 50 a 90 átomos de carbono), que están esterificados por el arabinogalactano, el cual está también unido al peptidoglicano, configurando el auténtico esqueleto de la pared celular de las micobacterias. Además, las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con la de numerosos lípidos y glucolípidos asociados con la pared¹⁰. Este hecho les confiere propiedades características como son la resistencia a ácido-alcohol, el crecimiento lento, la resistencia a detergentes y antimicrobianos habituales y la antigenicidad.

Esta complejidad en la estructura de la pared celular supone un hándicap importante en el estudio de las micobacterias, ya sea en la detección de ácidos nucleicos (hecho que ha dificultado de forma extraordinaria el diagnóstico rápido de *M. tuberculosis* a partir de muestra directa) o en el estudio de las proteínas para otros fines¹¹. Esta estructura es resistente a la lisis tanto química como enzimática.

Por ello, la ruptura mecánica se utiliza de forma habitual en combinación con las anteriores para la extracción de ácidos nucleicos y proteínas en este tipo de microorganismos.

Plataformas comerciales de espectrometría de masas para la identificación micobacteriana. Protocolos de extracción y bases de datos

Actualmente se han comercializado 2 espectrómetros de masas MALDI-TOF que permiten la identificación de micobacterias, el MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) y el VITEK MS (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Aunque en lo esencial son bastante similares, estos tienen algunas diferencias, sobre todo en las bases de datos y en la interpretación de los resultados obtenidos.

La piedra angular en la EM aplicada a las micobacterias se basa en una buena extracción proteica que permita lograr buenos espectros. De esta forma, cada fabricante recomienda unos protocolos de extracción que presentan algunas diferencias entre ellos (tabla 1)^{12,13}. Otro aspecto de suma relevancia son las bases de datos de estos sistemas, ya que van a condicionar los resultados obtenidos. Debido a las dificultades encontradas en un primer momento, las bases aún están en desarrollo y aparecen nuevas versiones que incorporan más especies y, por ello, mejora la precisión en la identificación. Con todo el número y variedad de especies susceptibles de ser identificadas con la EM es, en la actualidad, muy superior a los métodos moleculares comerciales disponibles. En concreto, el sistema MALDI Biotyper tiene una base de datos denominada "Mycobacteria library v2.0" que contiene 313 entradas. Para su creación se han utilizado 46 aislados clínicos y 254 cepas de distintas colecciones de cultivo. Aunque contiene 131 especies, el número real que puede diferenciar es 127, ya que hay 4 que están combinadas en diferentes grupos: *M. tuberculosis* complex, *Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium farcinogenes-Mycobacterium senegalense* y *Mycobacterium mucogenicum-Mycobacterium phocaicum*. Sin embargo, en algunos de estos grupos el sistema es capaz de identificar una u otra especie de forma preferente como, por ejemplo, es el caso de *M. chimaera* y *M. intracellulare*. En

Tabla 1

Comparación de los protocolos de extracción para la identificación de micobacterias mediante los sistemas MALDI Biotyper (Bruker) y VITEK MS (bioMérieux)

MALDI Biotyper	VITEK MS
Micobacteria + 300 µl de agua HPLC 95 °C durante 30 min (inactivación)	Micobacteria + 500 µl de etanol al 70% + 200 µl de bolas de cristal (inactivación) vórtex 15 min
Añadir 900 µl de etanol al 100% y vórtex	Incubar 10 min a TA para completar inactivación
Centrifugar a 13.000 rpm 2 min	Centrifugar a 13.000 rpm 2 min
Eliminar sobrenadante	Añadir 10 µl de acetonitrilo y vórtex suave
Eliminar sobrenadante	Centrifugar a 13.000 rpm 2 min
Añadir 10 µl de ácido fórmico al 70%	
Dejar secar el sedimento (para eliminar etanol) ≈ 2 min	
Añadir bolitas de cristal y acetonitrilo	
Mezclar con vórtex/agitador automático	
Añadir ácido fórmico al 70% y vórtex	
Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 min	
1 µl sobrenadante + 1 µl matriz*	
MALDI-TOF	

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*; TA: temperatura ambiente.

*Matriz: CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxibenzóico).

la actualidad, el sistema MALDI Biotyper se está actualizando en los laboratorios con la versión “Mycobacteria library v3.0”, que recoge 853 entradas, añade 21 especies ausentes en la anterior y elimina 3 que sí estaban presentes en la versión 2.0. Por lo tanto, llega a contener un total de 149 especies de las 174 (85,6%) existentes, si bien, como se ha comentado anteriormente, algunas están agrupadas en complejos. Además, Bruker ha presentado recientemente la nueva versión 4.0, que tiene 880 entradas, de las que 450 son aislados clínicos, y que incluye 159 especies.

En ocasiones, los espectros originados por las diferentes especies y subespecies son tan similares que dificultan la identificación. De esta forma, existen algunas especies que a pesar de que se muestran como especies diferentes, al tener espectros muy parecidos, se deberían incluir en las denominaciones de “especies similares” (p. ej., *Mycobacterium triplex* y *Mycobacterium triviale*) o “especies muy similares” (p. ej., *Mycobacterium canariense* y *Mycobacterium cosmeticum*), como ocurre en la “Mycobacteria library v2.0”. Aparte de esto, las bases de datos tienen otras limitaciones y características entre las que destacan las siguientes:

- Dentro del complejo tuberculosis ninguna diferencia todas las especies de este, si bien identifican correctamente el complejo como tal.

- En relación con el complejo *Mycobacterium avium*, aparte de identificar el grupo *M. intracellulare-M. chimaera*, la base de datos “Mycobacteria library v2.0” tiene registros para *Mycobacterium marseillense* y *Mycobacterium colombiense*. Además, diferencia subespecies como *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *silvaticum*. La base de datos VITEK MS IVD v3.0 separa *M. intracellulare* de *M. chimaera*, aunque la similitud es tan grande que los resultados no son concluyentes¹⁴.

- *Mycobacterium abscessus*, patógeno importante en pacientes con fibrosis quística y bronquiectasias, requiere pequeñas modificaciones para diferenciar las 3 subespecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* y *M. abscessus* subsp. *massiliensis*¹⁵.

Experiencia con la espectrometría de masas en micobacterias. Limitaciones y dificultades

Hay múltiples aspectos que dificultan e intervienen en los resultados obtenidos con la EM en la identificación de las micobacterias. Engloban factores como el protocolo de inactivación de los microorganismos, la extracción del material proteico teniendo en cuenta las características de su pared celular, el tipo de medio de cultivo y el tiempo de incubación, la diversidad de las especies micobacterianas, los puntos de corte a partir de los cuales se considera una identificación correcta con la EM, la composición y actualización de las bases de datos disponibles y el método de referencia (*gold standard*) considerado capaz de validar los resultados.

Inactivación de los microorganismos

A lo largo de los años se han desarrollado distintos protocolos para inactivar estos microorganismos con el fin de minimizar el riesgo de exposición del personal de laboratorio a las especies del complejo *M. tuberculosis* y aumentar la calidad de los espectros obtenidos. Entre estos cabe destacar el tratamiento por calor¹⁶, radiaciones¹⁷, agentes químicos¹⁸ y mediante la combinación de varios tratamientos¹⁹. En ocasiones las técnicas pueden alterar los componentes motivo de estudio, tal como ha ocurrido con la utilización del glutaraldehído al 2% o incluso el etanol que, según El Khéchine et al²⁰, puede influir en la obtención de espectros de peor calidad.

Con todo, en la actualidad los métodos más aceptados para la inactivación de las micobacterias —cuya finalidad es el estudio mediante EM— consisten en la utilización del calor (95 °C durante 30

min) y el tratamiento mecánico con bolitas de sílice, siguiendo el protocolo de MALDI Biotyper y VITEK MS, respectivamente, siendo este último de más corta duración²¹⁻²³. Para confirmar la eficacia del procedimiento se debe utilizar una cepa control de *M. tuberculosis* y proceder a sembrar los extractos (después de la inactivación) en Löwenstein-Jensen y medios líquidos como BACTEC MGIT (BD Diagnostics) e incubar al menos durante 6 semanas.

El protocolo de VITEK MS incluye 10-15 min de lisis con bolas de cristal en vórtex o 5 min en una batidora de bolas (*bead beater*) y 10 min adicionales de incubación con etanol a temperatura ambiente para completar la inactivación. Estudios de comprobación del procedimiento de inactivación demuestran que son totalmente bactericidas para *M. tuberculosis*, pero con algún fallo en cepas de *M. chelonae* y *Mycobacterium kansasii*, si se invierte el procedimiento con lisis mecánica tras la incubación con etanol²⁴. Por otro lado, este procedimiento permite utilizar estos extractos inactivados posteriormente durante un tiempo prolongado para realizar la EM, lo que facilitaría los flujos de trabajo en los laboratorios de microbiología clínica. Diversos estudios de comparación de ambos procedimientos demuestran que ambos son adecuados para este proceso de inactivación, aunque no son intercambiables entre las distintas plataformas ni bases de datos^{22,25}.

Métodos de preparación de la muestra

En cuanto a las micobacterias, diversas especies conllevan un riesgo biológico en su manipulación y por ello es necesario realizar un pretratamiento de inactivación de los microorganismos para la identificación tanto genómica como proteómica. A pesar de que algunos investigadores han sugerido que algunos de estos tratamientos de las muestras pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos con la EM, no existe un acuerdo final en la utilización de bacterias totales o el uso de extractos de estas²⁶⁻³¹. No obstante, con los protocolos de extracción “oficiales” sugeridos por los fabricantes en la identificación micobacteriana, el rendimiento global de la EM no ha sido óptimo. Así pues, se han propuesto y analizado múltiples modificaciones en la preparación de las muestras a analizar. En el estudio de El Khéchine et al²⁰ se examinaron 8 protocolos de extracción diferentes, con variaciones en el proceso de inactivación y en el tipo y composición de los reactivos utilizados para disgregar, lavar y precipitar las proteínas micobacterianas. En general, los mejores resultados se obtuvieron con la inactivación con calor en lugar de etanol al 70%. Dos años después, Saleeb et al³⁰ introdujeron el uso de bolitas de sílice que han mejorado la disgregación de la suspensión micobacteriana. Más recientemente, en sustitución de la agitación orbital tipo vórtex³²⁻³⁴, se han introducido otras modificaciones consistentes en el uso de diversos agitadores automáticos u homogeneizadores de tejidos. El uso de estos agitadores permite aplicar diversos e intensos movimientos que favorecen la ruptura y fragmentación de las micobacterias, alcanzando una mayor calidad en los espectros proteicos. Por otro lado, también se ha empleado el frío en sus diversas formas (desde la aplicación de etanol al 100% frío, hasta la congelación-descongelación del extracto inactivado) que ayuda en la disrupción mecánica de la bacteria³⁴⁻³⁷.

Medios de cultivo

Un factor condicionante importante en los resultados obtenidos con la EM en las micobacterias es el tipo de medio de cultivo del que se parte para la identificación. Así, se ha observado una gran variabilidad entre los medios de cultivo sólidos y líquidos. Aunque existen estudios donde el rendimiento es similar en ambos tipos de medios^{20,28,38}, en la mayoría se ha detectado un mayor rendimiento a partir de los medios de cultivo sólidos^{29,30,33,35}. Este fenómeno se ha observado tanto en medios con agar 7H10 y 7H11 de Middlebrook^{33,35}, como en el clásico Löwenstein-Jensen^{29,33,35,36}. La diferencia funda-

mental consiste en la mayor frecuencia en la obtención de los perfiles proteicos y en la mejor calidad de estos en los medios sólidos que en los líquidos. Aunque se ha sugerido que los suplementos añadidos en el medio líquido podrían interferir con el proceso de extracción²⁹, hay que tener en cuenta que estos son prácticamente los mismos que se usan en los medios sólidos. Por otro lado, los medios líquidos — mediante los sistemas automáticos de incubación y detección BACTEC MGIT960 (BD Diagnostics), BactT/ALERT 3D (bioMérieux) y VersaTREK (Thermo Scientific)— son más sensibles que los medios sólidos. Esta mayor sensibilidad implica que el crecimiento se detecte con un número más bajo de microorganismos. El menor inóculo, obtenido al usar el medio líquido, conllevaría una disminución en el sedimento o *pellet* necesario para una extracción óptima requerida en el análisis mediante EM^{30,36}. Otros estudios muestran que, más que el tipo de medio de cultivo, el período de incubación podría influir en la calidad del extracto y, por ende, en la obtención de buenos espectros proteicos. En este sentido, los mejores resultados se conseguirían con los cultivos más crecidos²⁹. Sin embargo, se ha observado que según se incremente la eficiencia de la extracción se pueden reducir las posibles diferencias en los resultados logrados con los medios de cultivo sólidos y líquidos^{29,33,38}.

Diversidad fenotípica y genotípica de las micobacterias

El grado de correlación entre la EM y los métodos estándares en la identificación del género *Mycobacterium* muestra algunas diferencias al analizar por separado el complejo *M. tuberculosis* y las MNT. Con respecto al primero, la correlación entre la EM y los métodos estándares ha sido buena y no ha generado ningún problema de error en la identificación del complejo^{30,33,38}. Sin embargo, no ocurre así entre las diversas especies que lo componen^{30,37}, siendo especialmente relevantes las dificultades en la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* —incluido el BCG (bacilo de Calmette-Guerin)— por el impacto clínico y terapéutico que ello comporta. Por otro lado, las MNT son un grupo muy amplio y diverso que siempre ha representado un reto en la identificación bacteriana. Así, se ha observado que la correlación entre la EM y los métodos estándares en la identificación de las MNT es variable y depende del tipo o grupo de especies de estas. Las mayores discordancias con los métodos de referencia se han detectado en especies filogenéticamente relacionadas^{28-30,33,38}. Muy probablemente, algunas de las discrepancias obtenidas pueden explicarse por el uso de bases de datos incompletas o no actualizadas en la EM. Otras no son más que un reflejo de la complejidad y dificultad intrínseca en la diferenciación e identificación de estas especies mediante los métodos estándar convencionales, incluso con la secuenciación parcial del gen del ARNr 16S. Este es el caso, por ejemplo, de *Mycobacterium intracellulare* y *M. chimaera*, que difieren en un solo nucleótido del gen del ARNr 16S³⁹. Otros grupos difíciles de identificar correctamente son: *M. parascrofulaceum*-*M. scrofulaceum*; *M. chelonae*-*M. abscessus*; *M. abscessus*-*M. massiliense*-*M. bolletii*; *M. fortuitum*-*M. porcinum*-*M. mageritense*; *M. mucogenicum*-*M. phocaicum*-*M. aubagnense*; *M. peregrinum*-*M. setense*, y *M. smegmatis*-*M. wolinskyi*^{23,25,29,33,34,36,37}.

Lectura e interpretación de los perfiles proteicos

La obtención de una identificación correcta mediante la EM está condicionada, en primer lugar, a la obtención de un buen perfil proteico y, en segundo lugar, a la calidad de la base de datos con que se debe comparar.

La lectura de los perfiles proteicos en las diferentes plataformas disponibles es automática, favoreciendo la resolución de los picos obtenidos en el espectro y disminuyendo otros parámetros como, por ejemplo, el ruido de fondo. No obstante, la lectura automática no siempre consigue el número de picos suficientes para que puedan ser valorados adecuadamente por los programas de análisis. Ello podría

deberse, entre otros, a factores como la extracción proteica o las condiciones del crecimiento de las micobacterias, que condicionarían la calidad de adquisición de los espectros proteicos y, por consiguiente, la identificación a nivel de especie³². Por todo ello, aparte de utilizar protocolos que mejoren la extracción proteica y emplear cultivos con una elevada carga bacteriana (como los comentados anteriormente), se podría intentar una lectura y análisis manual de la EM. Ello implica tener un importante bagaje científico y técnico en el uso de la EM. De esta forma, se podría seleccionar el lugar y el número de disparos con el láser. La elección del área de disparo sería visual y en virtud del grado de cristalización de la matriz con la muestra pretratada^{32,33,36,40}. No obstante, en relación con la lectura (tanto automática como manual), no existe en la actualidad un criterio definido o consensuado sobre el número de espectros acumulados necesarios para obtener una buena identificación, que varían en función del número de disparos a realizar con el láser. Otro aspecto relevante que hay que considerar es el número de réplicas de las muestras a estudiar. Así, el análisis de múltiples réplicas (> 1) puede incrementar la probabilidad de obtener buenos perfiles proteicos y conseguir así una identificación correcta^{20,29,32,33,35,37,38}.

Por otro lado, el valor de aceptación de un resultado como fiable en la identificación también ha sido motivo de controversia. Los programas de análisis de los distintos métodos comerciales establecen unos valores numéricos o *scores*. En el caso de Biotyper, el utilizado en bacteriología general es $\geq 2,0$ a nivel de especie⁴¹, usándose este mismo en el caso de las micobacterias. Además, también se han establecido unos valores menores para llegar a una identificación de género (1,7-1,9), aunque en algunos estudios posteriores se ha observado que, con índices inferiores a 2 (incluso 1,7), hay una concordancia en la identificación de especie con las primeras 4 opciones de las 10 posibles identificaciones que genera el sistema de análisis de la EM. Esto puede suponer un aumento en el número de cepas identificadas sin disminuir la eficacia de la técnica^{23,25,37}. Los resultados de VITEK MS vienen expresados en “valor de confianza”, que se identifica con la fiabilidad en la identificación del microorganismo. Estos valores tienen un intervalo de 0 a 100, siendo este último el mejor resultado con un punto de corte $\geq 90\%$ para la identificación de especie. No obstante, se han valorado intervalos de confianza diferentes (siempre mayores o iguales al 70%) y se ha observado que, al disminuir el valor (95, 90 y 85%), en ocasiones se logra un aumento del número de cepas identificadas sin incrementar el número de errores²⁵.

Método de referencia en la identificación micobacteriana

Otro aspecto importante que hay que tener en cuenta está relacionado con el método de referencia admitido para validar los resultados obtenidos con estas técnicas. Los distintos trabajos publicados han utilizado diversos métodos de comparación, incluyendo técnicas comerciales de hibridación, HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y de secuenciación del ADN de las regiones del ARNr 16S, *hsp65*, *rpoB* e ITS (*internal transcriber spacer*). En la actualidad, la secuenciación es el método de referencia más utilizado, si bien es una tecnología que no está disponible en todos los laboratorios de microbiología clínica^{23,25,37,42}.

Conclusiones

La EM mediante MALDI-TOF se vislumbra como una herramienta muy útil en la identificación de las micobacterias. No obstante, aún debe desarrollarse y mejorar para su completa implementación en los laboratorios de microbiología clínica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- List of prokaryotic names with standing in nomenclature. LPSN. Genus *Mycobacterium*. Disponible en: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Disponible en: www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NETcollaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42:1604-13.
- Prevost DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med*. 2015;36:13-34.
- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 9.^a ed. Madrid: SEIMC; 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>
- Alcaide Fernández de la Vega F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24 Supl 1:53-7.
- Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington DC: ASM Press; 2015. p. 536-69.
- Simmer P, Stenger S, Richter E, Brown-Elliott B, Wallace R, Wengenack N. *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 570-94.
- Brown-Elliott B, Wallace R. 2015. *Mycobacterium*: Clinical and laboratory characteristics of rapidly growing mycobacteria. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 595-612.
- Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:405-23.
- Lucas MC, Wolfe LM, Hazenfield RM, Kurihara J, Kruh-Garcia NA, Belisle J, et al. Fractionation and analysis of mycobacterial proteins. *Methods Mol Biol*. 2015;1285:47-75.
- Bruker Daltonics, Unc (2014). Standard operating procedure: Mycobacteria extraction (MycEX) method (version 3.0). Bruker Daltonics Inc., Bremen. Disponible en: <http://www.bruker.com/>
- Vitek Mass Spectrometry Identification: Vitek MS-ID Mycobacteria Test Method. Project Number: B1542. 2013. Disponible en: <http://www.vitekms.com/>
- Boyle DP, Zembower TR, Qi C. Evaluation of VITEK MS for rapid classification of clinical isolates belonging to *Mycobacterium avium* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:41-3.
- Fangous MS, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3362-9.
- Doig HL, Deagar DL, Watt B, Forbes KJ. The efficacy of the heat killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Pathol*. 2002;55:778-9.
- Murdoch LE, Maclean M, Endarko E, MacGregor SJ, Anderson JG. Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Mycobacterium* species in liquid suspension and on exposed surfaces. *Scientific World Journal*. 2012;137805-13.
- Elbir H, Abdel-Mushin A-H, Babiker A. A one-step DNA PCR-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on Lowenstein-Jensen media. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:316-7.
- Djelouagui Z, Drancourt M. Inactivation of cultured *Mycobacterium tuberculosis* organisms prior to DNA extraction. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1594-5.
- El Khéchine A, Couderc C, Claudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6:e24720.
- Machen A, Kobayashi M, Conelli MR, Wang YF. Comparison of heat inactivation and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media by use of Vitek matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51:4226-9.
- Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol*. 2014;52:130-8.
- Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, López-Roa P, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2737-40.
- Dunne WM Jr, Doing K, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, et al. Rapid Inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* Species before identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3654-9.
- Wilen CB, McMullen AR, Burnham CA. Comparison of sample preparation methods, instrumentation, platforms, and contemporary commercial database for identification of clinically relevant mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2308-15.
- Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004;76:5769-76.
- Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, et al. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics*. 2006;6:6416-25.
- Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1963-70.
- Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:4481-6.
- Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;49:1790-4.
- Wang J, Feng Chen WF, Li QX. Rapid identification and classification of *Mycobacterium* spp. using whole-cell protein barcodes with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in comparison with multigene phylogenetic analysis. *Anal Chim Acta*. 2012;716:133-7.
- Balázová T, Makovcová J, Šedo O, Slaný M, Faldyna M, 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.
- Tudó G, Monté MR, Vergara A, López A, Hurtado JC, Ferrer-Navarro M, et al. Implementation of MALDI-TOF MS technology for the identification of clinical isolates of *Mycobacterium* spp. in mycobacterial diagnosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1527-32.
- Struzka EA, Rodríguez D, Fernández R, Rodríguez D, Alcaide F. Identificación de micobacterias mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) a partir de cultivos sólidos y líquidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;33 Espec Congr 1:242-3.
- 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;51:2875-9.
- Quinlan P, Phelan E, Doyle M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria from MBAC ALERT 3D liquid cultures and Löwenstein-Jensen (LJ) solid cultures. *J Clin Pathol*. 2015;68:229-35.
- Mediavilla-Grado G, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez MA, Ortega-Torres M, Montielquezel-Guerraz N, et al. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous *Mycobacterium* species isolated from clinical specimens. *Biomed Res Int*. 2015;854078.
- Buchan BW, Riebe KM, Timke M, Kostrzewa M, Ledebor NA. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of *Mycobacterium* species in cultures using solid medium and broth. *Am J Clin Pathol*. 2014;141:25-34.
- Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1277-85.
- Panda A, Kurapati S, Saramantary JC, Myneedu VP, Verma A, Srinivasan A, et al. Rapid identification of clinical mycobacterial isolates by protein profiling using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31:117-22.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. 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;48:1169-75.
- Yam WC, Yuen KY, Kam SY, Yiu LS, Chan KS, Leving CG, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *J Med Microbiol*. 2006;55:529-36.