



Mireia Canal Aranda

Estudio de coste-efectividad de la aplicación de la técnica MALDI-TOF MS en la identificación de micobacterias atípicas

Canal Aranda M¹, Gómez Martínez J², Salvado Costa M³

¹Jefe de Servicio del laboratorio de Análisis Clínicos. Laboratorio de Referencia de Cataluña. Barcelona

²Coordinador de Microbiología. Laboratorio de Referencia de Cataluña (LRC). Barcelona

³Directora técnica. Laboratorio de Referencia de Cataluña (LRC). Barcelona

Dirección para correspondencia: mcanal@lrc.es

Resumen

Introducción: Tradicionalmente la identificación de micobacterias atípicas se ha basado en métodos fenotípicos y test bioquímicos, los cuales conllevan elevados costes asociados y prolongados tiempos de respuesta, interfiriendo de forma directa en el pronóstico del paciente. Actualmente han aparecido nuevos métodos alternativos con el objetivo de aumentar la eficiencia del proceso de identificación, siendo el método más importante el MALDI-TOF MS; basado en el cálculo del tiempo de migración de las proteínas de cada microorganismo y en la generación de un espectro de masas característico de cada especie.

Objetivo: Estudio de coste-efectividad comparando métodos habituales de identificación de micobacterias atípicas con el método MALDI-TOF.

Material y métodos: En este estudio se ha procedido a evaluar la eficacia de MALDI-TOF MS a partir del procesamiento de 171 muestras que habían sido inicialmente identificadas mediante técnicas actuales (INNO-LIPA seguida o no de secuenciación).

Resultados: La utilización de MALDI-TOF para la identificación de las 171 micobacterias habría supuesto, por una parte un ahorro, económico y por otra, una entrega más rápida de los resultados de identificación de dichas micobacterias.

Conclusiones: Se puede considerar el método de MALDI-TOF como una alternativa coste-efectiva a las técnicas actuales para la identificación de micobacterias.

Palabras clave: Micobacteria atípica; Identificación; MALDI-TOF.

Cost-effectiveness study of the application of MALDI-TOF MS technique in the identification of atypical mycobacteria

Abstract

Introduction: Traditionally the identification of atypical mycobacteria was based on phenotypic and biochemical test methods. Those methods involve high costs and long response times, interfering directly in the patient's prognosis. Currently there are new alternative methods in order to increase the efficiency of identification process, the most important method is MALDI-TOF MS; based on the calculation of the migration time of the proteins of each microorganism and the generation of a mass spectrum characteristic of each specie.

Objective: Cost-effectiveness study comparing standard methods of identifying atypical mycobacteria with the MALDI-TOF method.

Methods: This study was carried out to evaluate the effectiveness of MALDI-TOF-MS method by processing of 171 samples that were initially identified by current techniques (INNO-LIPA followed or not by sequencing).

Results: The use of MALDI-TOF for identification of 171 mycobacteria would give economic savings, and a faster identification of the results of delivery of said mycobacteria.

Conclusions: MALDI-TOF method can be considered as a cost-effective alternative to existing techniques for the identification of mycobacteria.

Keywords: Atypical mycobacteria; Identification; MALDI-TOF.

Introducción

El género *Mycobacterium* tiene en la actualidad más de 100 especies heterogéneas de crecimiento rápido y lento. En las últimas décadas las infecciones causadas por micobacterias se han incrementado¹. Un número considerable de micobacterias ambientales son responsables de muchas infecciones oportunistas; siendo más frecuentes en el individuo inmunodeprimido: infecciones de piel, linfadenitis, enfermedad pulmonar y enfermedad diseminada². Los mecanismos de transmisión suelen darse a través de la vía respiratoria y digestiva o mediante

inoculación directa en el caso de la piel. En algunos casos puede haber diseminación hematógena.

En los últimos 25-30 años, con la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ha pasado a ser una patología relativamente frecuente, incrementando paralelamente la investigación y el conocimiento de estas. Las micobacterias se encuentran asociadas también a otros factores de riesgo como el tabaquismo y enfermedades pulmonares subyacentes, tales como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, silicosis, tuberculosis residual y bronquiectasias³.

El tratamiento varía en función de la presentación clínica, la especie de micobacteria responsable y el estado inmunitario del enfermo. La resistencia *in vitro* a la mayoría de los fármacos antituberculosos de primera línea es una de las características más llamativas y el hecho que justificó, hasta hace poco tiempo, la necesidad de tratamientos agresivos con asociaciones de hasta cinco o seis fármacos durante largos periodos de tiempo. Por todo ello, un diagnóstico precoz y de calidad es de gran utilidad en este campo, puesto que un tratamiento inadecuado puede conducir a una resistencia al mismo o incluso a una exposición innecesaria a la toxicidad del medicamento. También cabe destacar que aquellos pacientes que no han sido diagnosticados, al recibir el resultado del laboratorio empiezan con el tratamiento correspondiente, evitando posibles complicaciones de salud que se darían si el paciente siguiera sin ningún tipo de tratamiento (figura 1).

Desde el punto de vista microbiológico el género *Mycobacterium* se define como bacterias aerobias, no móviles y ácido-alcohol resistentes. La característica principal del género es su pared celular, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa y rica en ácidos micólicos/micolatos. La superficie hidrofoba les confiere resistencia frente a las tinciones habituales de laboratorio, a muchos desinfectantes y a diferentes fármacos. A lo largo de las capas de la pared se intercalan proteínas transportadoras y porinas, que constituyen antígenos importantes para estimular la respuesta del huésped a la infección y pueden usarse como prueba pronóstica.

Según la velocidad de crecimiento, las micobacterias se dividen en crecedoras rápidas o lentas: las micobacterias que forman colonias claramente visibles a simple vista en los cultivos en un plazo de siete días se denominan de cultivo rápido, mientras que las que requieren periodos más largos se

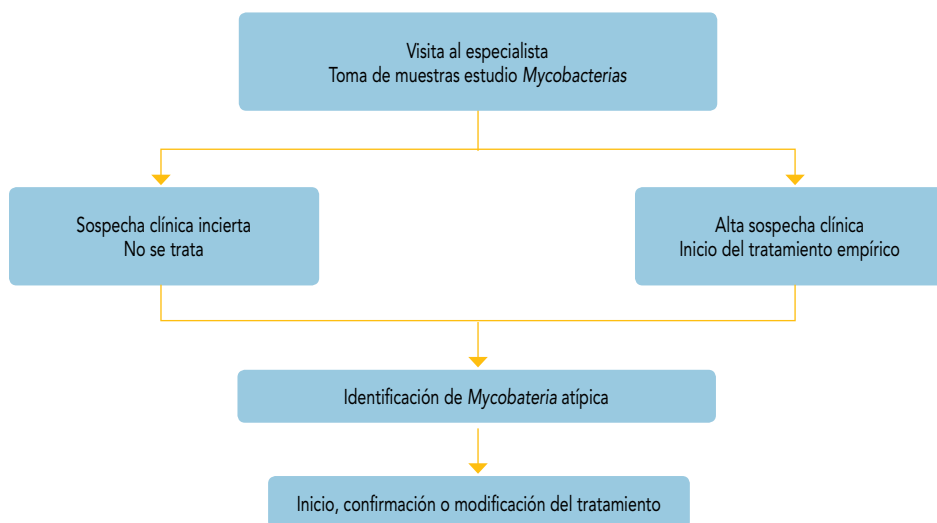


Figura 1. Algoritmo diagnóstico

denominan de cultivo lento. Su aislamiento en el laboratorio se realiza mediante el cultivo de las muestras.

La muestra recibida puede ser de origen estéril (sangre, líquidos biológicos...) o no (esputo, orinas, broncoaspirados, etc.). Si la muestra no es de origen estéril, puede ir acompañada de flora saprófita; en este caso se someterá a un proceso de descontaminación previo a la realización del cultivo para eliminar la presencia de otros microorganismos que crecen más rápido y pueden llegar a contaminar el medio.

La combinación N-acetil-L-cisteína con NaOH al 2% es el método de descontaminación-digestión más difundido y el recomendado para la mayoría de sistemas de cultivo automático en medio líquido.

Para cada muestra se realizan dos cultivos: el de Löwenstein-Jensen, que nos dará el resultado en ocho semanas como máximo, y el medio líquido, que nos dará el resultado negativo como máximo a las seis semanas. En caso de resultado positivo, se procederá a la identificación.

Tradicionalmente la identificación bacteriana se ha basado en la utilización de métodos fenotípicos así como en reacciones bioquímicas propias de cada especie.

Sin embargo, esto comporta una carga laboral y un consumo de tiempo importante para el laboratorio, ya que esta identificación puede prolongarse desde horas hasta días, interfiriendo de forma directa en el pronóstico del enfermo⁴.

Como consecuencia, se han buscado métodos alternativos que aumenten la exactitud y disminuyan los tiempos de respuesta en la identificación bacteria-

na. Entre estos métodos se encuentran los sistemas automatizados, que consiguen realizar la identificación en un periodo de tiempo más corto pero, en contrapartida, presentan un coste de implementación considerablemente elevado. No obstante, quizá el método que ha ganado mayor terreno en la actualidad es la biología molecular, que si bien es bastante precisa aún presenta tiempos prolongados de respuesta debido a la falta de automatización universal de sus procesos, lo que la hace susceptible de errores por contaminación⁵.

Es por esto que en los últimos tiempos ha irrumpido con fuerza la identificación bacteriana basada en la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS –por sus siglas en inglés: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*–, un método rápido para la identificación de rutina de microorganismos patógenos mediante el perfil de expresión de proteínas⁴.

La espectrometría de masas es un método que permite la identificación de una molécula mediante la medición de su masa en relación a su carga, así como de los fragmentos generados a partir de ella. El MALDI-TOF utiliza el cálculo del tiempo de migración (*time of flight*) de cada fragmento de una molécula, a través de un trayecto predeterminado, previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100 000 Da (dentro de los cuales se encuentran los péptidos y proteínas que forman parte de hongos y bacterias), permitiendo la identificación de estos microorganismos.

Dado que un microorganismo analizado mediante esta técnica presentará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes de los sistemas MALDI-

TOF MS han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan los diferentes microorganismos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. Por lo tanto, la identificación se realiza a través de la comparación del resultado de una bacteria con todos los espectros de masas que contiene la base de datos proporcionada por el fabricante⁶.

MALDI-TOF en la identificación de micobacterias

La técnica de MALDI-TOF MS se presenta como una alternativa de primera línea en la identificación rutinaria de la gran mayoría de bacterias cultivadas en los laboratorios de microbiología. Adquiere una especial importancia en la identificación de micobacterias ya que estas siempre han demostrado ser difíciles de identificar debido a una combinación de factores, principalmente su baja tasa de crecimiento y sus exigentes necesidades para que este crecimiento se produzca.

Los métodos tradicionales para la identificación fenotípica del género *Mycobacterium* se basan en test bioquímicos estándar que necesitan medios de crecimiento específicos y largos periodos de incubación. También se ha utilizado la técnica de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) para identificar los ácidos micólicos presentes en la pared celular específicos de cada especie⁷.

Con el paso de los años se han desarrollado nuevos métodos moleculares que proporcionan una vía rápida y reproducible de identificación, reduciendo el tiempo necesario de seis semanas a tres semanas. Pero el principal problema que presentan es que únicamente son aplicables para un número limitado de especies⁸.

La implementación de esta nueva técnica es importante ya que un rápido y acertado diagnóstico de infecciones por micobacterias es esencial para: poder iniciar de forma precoz un tratamiento para prevenir la aparición de posibles resistencias y dar un diagnóstico precoz que garantice la supervivencia del enfermo. Sin embargo, es importante destacar que se necesita un tratamiento específico del cultivo previo al uso de MALDI-TOF con el objetivo de minimizar la exposición del personal de laboratorio y maximizar la calidad del espectro obtenido⁹.

MALDI-TOF como alternativa a la metodología actual

Con el aumento de los patógenos oportunistas y la aparición de nuevas especies, la necesidad de tener un método rápido y reproducible para la identificación de microorganismos – especialmente micobacterias– es evidente⁹.

La tecnología MALDI-TOF MS ha introducido la utilización de la espectrometría de masas en el diagnóstico microbiológico de rutina, permitiendo la identificación de colonias de microorganismos mediante el análisis de proteínas (principalmente ribosomales) a través de un espectro de masas específico para cada especie¹⁰.

Por último, debemos considerar que las infecciones por micobacterias atípicas requieren tratamientos antimicrobianos específicos para cada especie. El médico especialista, al recibir la identificación de género y especie, establece una pauta empírica de tratamiento según los protocolos establecidos. Salvo el etambutol, los fármacos que se utilizan no están contemplados en los programas de tuberculosis y van a cargo del enfermo, con el descuento habitual (40-50%): macrólidos (claritromicina y azitromicina), fluorquinolonas

(levofloxacin y moxifloxacin) y aminoglicósidos (amikacina). En algunos casos específicos, se deben tratar con otros tipos de fármacos: linezolid, carbapenémicos (imipenem, meropenem) y tigeciclina.

En nuestro protocolo de trabajo realizamos siempre el estudio de la sensibilidad antibiótica de las micobacterias atípicas, ya sean de crecimiento rápido o lento, por el método de microdilución en caldo. Este método consiste en una placa que contiene diversos antimicobacterianos en las diluciones correspondientes. Las lecturas se efectúan siguiendo las directrices del fabricante y se realizan como máximo a los 14 días de realizar la preparación¹¹.

La introducción de la identificación microbiana basada en el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF ha permitido mejoras importantes en la rutina de trabajo de microbiología clínica. Entre estas, encontramos un ahorro significativo del tiempo necesario para llevar a cabo las identificaciones microbianas a partir de colonias crecidas.

Objetivo

Con estos antecedentes, el estudio propuesto es análisis coste-efectividad donde se compararían la identificación de las micobacterias atípicas realizadas según métodos habituales de laboratorio y lo que supondría utilizar el método de identificación del MALDI-TOF. Una identificación más rápida también supondría un beneficio para el paciente en cuanto a ser diagnosticado correctamente en un tiempo más corto.

Material y métodos

Se efectúa un estudio retrospectivo de los cultivos positivos por micobacte-

rias atípicas de los años 2012 y 2013, procedentes de diferentes tipos de muestras. Se analizan los datos correspondientes al tiempo transcurrido desde el crecimiento de la micobacteria en los medios de aislamiento hasta que fue identificada y se compara con el que se hubiera empleado utilizando MALDI-TOF.

El tiempo requerido para la identificación de las micobacterias atípicas por MALDI-TOF se evaluó mediante cepas congeladas de nuestra colección que habían sido identificadas previamente por técnicas moleculares.

El protocolo de identificación seguido en el laboratorio es el siguiente: cuando se observa crecimiento en los medios de aislamiento se realiza la prueba molecular INNO LIPA Mycobacteria V2; si mediante este método no se consigue la identificación se realiza la secuenciación. Seguidamente se exponen las bases de ambas técnicas y también la de la técnica propuesta, MALDI-TOF MS.

Protocolo de la técnica INNO-LIPA

La técnica INNO-LIPA Mycobacteria V2 se basa en el principio de la hibridación reversa, mediante la amplificación de la región espaciadora 16S-23S del RNA ribosómico. El ADN biotinilado es hibridado con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizados como líneas paralelas en tiras de nitrocelulosa¹².

Después de la hibridación se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que se unirá a cualquier híbrido biotinilado formado previamente. La incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato y el cromógeno nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) resulta en la formación de un precipitado púrpura/marrón.

Previa extracción del ADN, la región amplificada es la región espaciadora 16S-23S del ARN ribosomal. Los productos de amplificación son posteriormente hibridados junto con 22 líneas de sondas de ADN y dos líneas de sondas usadas como control. El material amplificado es usado en INNO-LIPA MYCOBACTERIA V2 para detectar el género *Mycobacterium* y las siguientes especies: *M. tuberculosis complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* y *M. ulcerans*, *M. celatum*, MAIS, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum*, *M. chelonae complex*, *M. fortuitum complex* y *M. smegmatis*.

Protocolo de secuenciación

La identificación se realiza por amplificación y posterior secuenciación de diferentes genes que se aplican de forma secuencial en función de los resultados obtenidos. Por tanto, es posible que para una especie sea posible la identificación con el uso de un solo gen, mientras que para otra se necesite continuar añadiendo genes hasta conseguir identificar el microorganismo.

Los genes más estudiados en la actualidad son los genes 16srDNA, hsp65 y rpoB¹³; el proceso se caracteriza por el uso de *primers* que amplificarán todas las especies micobacterianas, de manera que la diferenciación entre especies vendrá determinada por la región hipervariable de los *primers*. El análisis se realiza mediante la comparación de la secuencia obtenida con librerías de secuencias de micobacterias conocidas, por ejemplo MicroSeq library (AB) y GenBank BLAST (NCBI).

Protocolo MALDI-TOF MS para micobacterias

El instrumento MALDI-TOF MS utilizado ha sido el de Bruker Daltonic (Ale-

mania). El procedimiento estándar consiste en añadir 1 µl de extracto proteico (sobrenadante) en la tarjeta MALDI y dejar secar al aire a temperatura ambiente. A continuación se pipetea 1 µl de matriz* en solución a las muestras. Como control positivo se utiliza el test bacteriano estándar (Bruker Daltonics) y como control negativo, la matriz.

Después de secar brevemente la tarjeta se inserta en el MALDI-TOF MS Microflex LT y el láser de nitrógeno se dispara hacia la muestra, ionizándola. Así se consigue una relación masa/carga (m/z) para cada proteína ionizada de entre 2000 y 20 000 Da. Se mide cada punto usando 1000 disparos de láser a 60 Hz en grupos de 40 disparos por área de muestra¹⁴. El análisis se realiza de modo automático.

El resultado que informa MALDI-TOF después de contrastar el perfil proteico obtenido de la cepa problema con los existentes en la base de datos es una puntuación. Si esta es superior a 2 la identificación se admite con un alto grado de fiabilidad a nivel de género y especie, si se encuentra entre 1,7 y 2 se considera aceptable en menor grado (género) y si es inferior a 1,7 se aconseja utilizar otro método de identificación.

Obtención del extracto proteico

Debido a las características de su pared y por motivos de seguridad del personal, las micobacterias no pueden ser identificadas directamente desde el medio de cultivo. Se requiere un proceso de extracción previo con la

* Cumple dos roles fundamentales: expone las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y facilita la vaporización y la ionización de las proteínas mediante un haz de láser pulsante.

finalidad de exponer las proteínas intracelulares. Por esto, existe un protocolo propio para su análisis mediante MALDI-TOF MS.

Protocolo de extracción:

- Poner 300 µl de agua desionizada en un tubo de 1,5 ml Eppendorf.
- Transferir mediante un asa de cultivo colonias de la micobacteria.
- Añadir 900 µl de etanol 100% y mezclar bien usando un vórtex.
- Centrifugar a 13000 rpm durante dos minutos, decantar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de agua desionizada y resuspender el sedimento.
- Centrifugar dos minutos a máxima velocidad, con una pipeta eliminar el sobrenadante.
- Añadir 50 µl de agua desionizada para resuspender el sedimento.
- Inactivar en bloque térmico a 95 °C durante 30 minutos.
- Dejar enfriar.
- Centrifugar a máxima velocidad durante dos minutos y eliminar el sobrenadante. Si fuera necesario, se puede volver a centrifugar y eliminar con cuidado el resto de etanol haciendo uso de puntas de pipeta.
- Dejar secar el sedimento con el tubo abierto (dos minutos aproximadamente).
- Añadir las bolas de sílice (0,5 mm zirconia/silica beads).
- Añadir acetonitrilo puro (entre 10 µl y 50 µl, dependiendo del tamaño

del sedimento) y mezclar bien con vórtex o pipeta.

- Agitar el vórtex a máxima velocidad durante un minuto.
- Añadir ácido fórmico al 70% (el mismo volumen que el acetonitrilo) y mezclar con vórtex.
- Centrifugar a máxima velocidad durante dos minutos.
- Coger 1 µl de sobrenadante y depositarlo en la tarjeta MALDI. Dejar secar.
- Añadir 1 µl de la solución a la matriz y dejar secar completamente.

Se procede a la lectura. Cada muestra del estudio es colocada por triplicado en la tarjeta MALDI de lectura.

Evaluación de costes

Para evaluar los costes, se comparará el coste de la metodología empleada actualmente para la identificación de las micobacterias atípicas, INNO-LIPA seguida de secuenciación en los casos que procede, con el coste que supondría el uso de MALDI-TOF. Para evaluar la efectividad se considerará el tiempo ganado en días para efectuar un diagnóstico que permitirá establecer el tratamiento adecuado al paciente.

Ambas alternativas van seguidas de la realización del antibiograma de micobacterias por el método de microdilución en caldo, por lo tanto este no se contemplará en el estudio de costes.

Se consideran los siguientes costes:

- Costes directos:
 - Reactivos.
 - Controles.

- Amortización del equipo.
 - Personal técnico.
 - Personal facultativo.
 - Coste unitario por prueba: coste de reactivos, controles y amortización del equipo.
- Costes indirectos:
- Determinaciones de controles.
 - Costes estructurales.

Los precios aplicados para este análisis se basan en una estimación real de los costes del análisis en nuestro laboratorio. Para el cálculo de los costes del personal, se consideran los datos del convenio actual de sanidad privada¹⁵. Dentro del coste unitario por

prueba se incluyen los costes analíticos. Para realizar el estudio, se considerarán los costes indirectos como un 5% del precio total de la prueba.

Resultados

Se identificaron en este periodo (2012-2013) 171 micobacterias atípicas procedentes de diferentes tipos de muestras. De estas, 165 fueron identificadas por el método INNO-LIPA y se resumen en la tabla 1. El promedio de tiempo en qué tarda en ser identificada la micobacteria entre el crecimiento y la identificación por este método es de un día.

En los seis casos restantes (3,5% del total), identificados en la tabla 2, se requirió secuenciación y el promedio de tiempo pasó a ser de 31 días (20-75).

Tabla 1. Micobacterias atípicas identificadas por INNO-LIPA

Género	Número
<i>Mycobacterium abscessus</i>	11
<i>Mycobacterium africanum</i>	1
<i>Mycobacterium avium complex</i>	7
<i>Mycobacterium avium -paratuberculosis- silvaticum</i>	30
<i>Mycobacterium chelonae complex</i>	5
<i>Mycobacterium fortuitum-peregrinum</i>	11
<i>Mycobacterium gordonae</i>	26
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	20
<i>Mycobacterium kansasii</i>	8
<i>Mycobacterium marinum</i>	1
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	7
<i>Mycobacterium simiae</i>	1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1
<i>Mycobacterium sp</i>	9
<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	13
<i>Mycobacterium xenopi</i>	14
Total	165

Tabla 2. Micobacterias atípicas identificadas por INNO-LIPA + secuenciación

Género	Número
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1
<i>Mycobacterium arupense</i>	1
<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1
<i>Mycobacterium intermedium</i>	1
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1
Total	6

El tiempo necesario para la identificación por MALDI-TOF es de 90 minutos, contemplando la extracción del extracto proteico y el tiempo de análisis en el instrumento.

En la tabla 3 se reflejan las probabilidades de transición del cultivo de micobacterias. De las 14 531 muestras recibidas para cultivar, 1424 dieron un resultado positivo en el cultivo. Un 12% de estas muestras fueron identificadas como micobacterias atípicas. En la figura 2 se resume el árbol de decisiones.

Costes de identificación de micobacterias atípicas

Coste de la técnica INNO-LIPA

- Coste unitario por prueba: 53,95 €.
- Tiempo en el que se obtiene el resultado: seis horas.

- Tiempo de dedicación del personal técnico: dos horas.
- Tiempo de dedicación del personal facultativo: 30 minutos.
- Nivel de dificultad: alta.

Una de las ventajas de INNO-LIPA es que permite detectar posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. No obstante, es una técnica muy laboriosa con un elevado coste asociado.

Coste de la técnica de secuenciación

- Coste unitario por prueba: 20 €.
- Tiempo medio en el que se obtiene el resultado: siete días.
- Tiempo dedicación personal técnico: 60 minutos.

Tabla 3. Probabilidades de transición

Cultivo micobacterias	14631	Positivo	1424	Micobacterias	1253		
				Micobacterias atípicas	171	INNO-LIPA	165
						INNO-LIPA + secuenciación	6
Contaminado	964						
Negativo	12243						

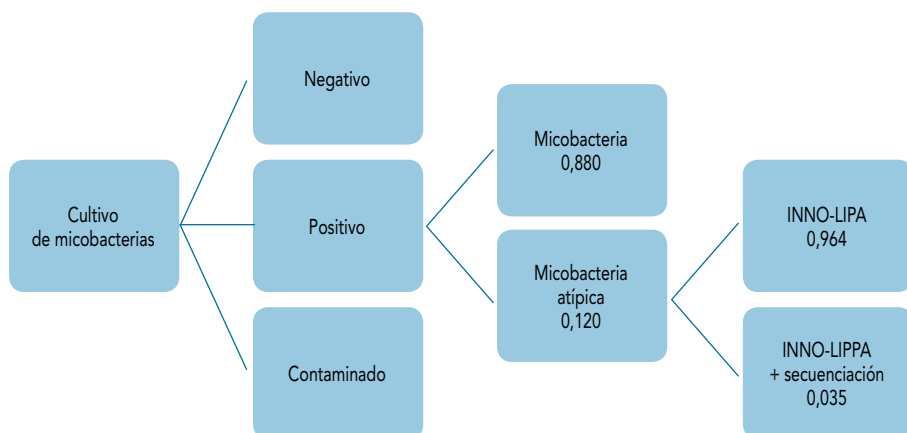


Figura 2. Árbol de decisiones DATA

- Tiempo dedicación personal facultativo: 15 minutos.
- Nivel de dificultad: alta.

Los principales inconvenientes de la técnica de secuenciación son que necesita personal altamente cualificado y que los resultados dependen en gran medida de la calidad de la base de datos utilizada.

Coste de la técnica MALDI-TOF MS

- Coste unitario por prueba: 2,5 €*.
- Tiempo en el que se obtiene el resultado: 90 minutos.
- Tiempo dedicación personal técnico: 20 minutos.
- Tiempo dedicación personal facultativo: 10 minutos.
- Nivel de dificultad: alta.

* El coste dependerá del tipo de pacto existente con el proveedor.

Coste de personal

- Coste personal facultativo: 31,35 euros/hora = 0,52 euros/minuto.
- Coste personal técnico: 15,84 euros/hora = 0,26 euros/minuto.

La principal ventaja del método MALDI-TOF MS respecto a los métodos actuales es su bajo coste, la rapidez en la obtención de los resultados y el bajo riesgo asociado debido a la previa inactivación de las muestras. No obstante, es importante ampliar la base de datos para permitir la identificación de micobacterias menos frecuentes. Los costes totales de las técnicas empleadas se muestran en la tabla 4.

Análisis de coste-efectividad

Alternativa 1:

- Técnica de identificación: MALDI-TOF MS.
- Casos que se podrían identificar por MALDI-TOF: 171.
- Coste 1 (C1) = $171 \times 13,02 = 2226,42 \text{ €}$.

Tabla 4. Costes en euros de las diferentes alternativas

Método	Coste personal técnico minutos	Coste personal facultativo minutos	Coste por prueba	Coste indirecto aproximado	Total	Tiempo en obtener identificación (minutos)
Molecular INNO LIPA	31,2	15,6	53,95	2,7	103,45	6 h = 360 m
Secuenciación	15,6	7,8	20	1	44,4	7 d = 10 080 m
Molecular INNO LIPA + secuencia	39	20,8	157,95	7,9	225,65	45 000 m
Madi TOF	5,2	5,2	2,5	0,12	13,02	90 m

- Tiempo medio de identificación: 90 minutos por caso.

Alternativa 2:

- Técnica de identificación: INNO-LIPA + secuenciación.
- Casos identificados por INNO-LIPA + secuenciación: seis.
- Coste 2 (C2) = $(6 \times 103,45) + (6 \times 44,4) = 887,1 \text{ €}$.
- Tiempo medio de identificación: siete días por caso.

Alternativa 3:

- Técnica identificación: INNO-LIPA.
- Casos correctamente identificados por INNO-LIPA: 165.
- Coste 3 (C3) = $165 \times 103,45 = 17 069,25$.
- Tiempo medio de identificación: seis horas por caso.

$$\text{Análisis de costes} = C1 - (C2 + C3) = 2226,42 - 17 956,35 = -15 729,93 \text{ €}.$$

La utilización del MALDI-TOF en la detección de micobacterias atípicas hubiera supuesto un ahorro de 15 729,93

euros correspondientes a los 171 casos detectados, lo que equivale a un promedio de 91,98 euros por caso identificado.

Efectividad

Considerando la efectividad como casos correctamente identificados, ambas alternativas son igual de efectivas.

Si consideramos la efectividad como el tiempo en que se entregan los resultados al clínico, observamos que la alternativa 1 y la 3 son bastante parecidas en cuanto a tomar las decisiones oportunas para el correcto tratamiento del paciente, pues el tiempo para la obtención de resultados tiene una diferencia de pocas horas.

En cambio, si consideramos los casos en que la identificación por INNO-LIPA se ha tenido que complementar con el proceso de secuenciación (alternativa 2), vemos que la efectividad de la alternativa 1 es muy alta puesto que permite entregar resultados un promedio de siete días antes y por lo tanto el paciente puede beneficiarse del tratamiento adecuado con antelación.

$$\text{Análisis de efectividad} = T1 - T3 = 90 \text{ minutos} - 360 \text{ minutos} = -4,5 \text{ horas}.$$

$$\begin{aligned}\text{Análisis de efectividad} &= T1 - (T2+T3) \\ &= 90 \text{ minutos} - 10 \text{ 440 minutos} \\ &= -7,18 \text{ días.}\end{aligned}$$

T1: tiempo necesario para la identificación en la alternativa 1.

T2: tiempo necesario para la identificación en la alternativa 2.

T3: tiempo necesario para la identificación en la alternativa 3.

Discusión

Limitaciones:

- No se considerarán en este trabajo los costes intangibles, que son aquellos relacionados con la morbilidad del paciente, debido a la dificultad que presenta su cuantificación. Tampoco se considera el personal de dirección y de calidad y consultoría puesto que la implicación es la misma en ambas opciones.
- Se estiman como costes indirectos un 5% del precio de la prueba.
- No se incluyen los costes del tratamiento o no tratamiento en aquellos pacientes en que se han realizado las técnicas de secuenciación.

MALDI-TOF es una tecnología coste efectiva siempre que en su base de datos contenga los espectros de las moléculas a determinar. Para este estudio todas las micobacterias que se han aislado están en la base de datos del MALDI-TOF.

Conclusiones

Si analizamos las alternativas presentadas observamos que la implementación de la técnica MALDI-TOF es

importante ya que un rápido y acertado diagnóstico de infecciones por micobacterias es esencial para poder iniciar un tratamiento adecuado y prevenir la aparición de posibles resistencias. Sobre todo en aquellos casos en que se requiere la combinación de las técnicas: INNO-LIPA seguida de secuenciación.

Además esta técnica es muy beneficiosa si observamos los costes que implica en nuestro laboratorio.

Los profesionales clínicos aprecian una entrega de resultados rápida, sobre todo en casos de micobacterias no diagnosticadas.

De cara a un futuro y una vez la técnica esté completamente implementada en nuestro laboratorio, se podría hacer un estudio prospectivo coste beneficio sobre el paciente midiendo el beneficio que supone entregar la identificación correcta en un tiempo de 90 minutos desde la detección de crecimiento en el medio de cultivo.

El tratamiento delante de sospecha de infección por *Mycobacterium* se basa en el uso de una terapia cuádruple con isoniacida, etambutol, rifampicina y pirazinamida aunque en función de otras patologías del paciente, el fármaco y la posología del tratamiento pueden variar. Cuando estamos delante de una micobacteria atípica, como en el caso del estudio realizado, el tratamiento se debe adecuar según la especie de la micobacteria obtenida; la duración del tratamiento y los fármacos empleados dependen de la localización de la infección y de la especie. El considerable adelanto, en algunos casos, de la entrega de la identificación mediante MALDI-TOF permitiría adecuar el tratamiento mucho antes que con los métodos moleculares.

Agradecimientos

La elaboración de este trabajo no habría sido posible sin los consejos y recomendaciones del doctor Julià Gómez y en especial de la doctora Margarita Salvado, que han participado activamente en este proyecto. También reconocer el esfuerzo de los profesionales que forman parte del departamento de microbiología, que han colaborado indirectamente con su trabajo diario. El trabajo en equipo de estos profesionales ha permitido la elaboración de este estudio. Quiero agradecerle a todos, y sobre todo a la doctora Margarita Salvado, el apoyo recibido.

Bibliografía

1. Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech.* 2001;20:325-37.
2. Caminero Luna JA. Micobacterias atípicas. *BSCP Can Ped.* 2001;25:237-48.
3. Valdés F, Cid A. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.* 2004;95:331-57.
4. Garcia P, Allende F, Legarraga P, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: una nueva mirada a la microbiología del s. XXI. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29:263-272.
5. Lin CS, Su CC, Hsieh SC, Lu CC, Wu TL, Jia JH, et al. Rapid identification of *Mycobacterium avium* clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013. pii: S1684-1182(13)00153-9.
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.* 2011;49:1790-4.
7. Pignone M, Greth K, Cooper J, Emerson D. Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1963-70.
8. Panda A, Kurapati S, Samantaray 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.
9. Mather C, Rivera S, Butler-Wu S. 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.
10. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chil Infectol.* 2013;30:140-6.
11. Información del kit MIC. TREK Diagnostic Systems: Sensititre®. En: Arup Laboratories.
12. Wengenack NL. Advances in Laboratory TB Diagnosis. Webinar. En: Mayo Clinic Center for Tuberculosis [en línea] [consultado el 16/02/2015]. Disponible: <http://centerfortuberculosis.mayo.edu/webinar-02122014---advances-in-lab-tb-diagnostics.html>

13. Theel ES. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacterial and fungal isolates. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2013;35:155-161.
14. RESOLUCIÓ EMO/2790/2012, de 3 de desembre, per la qual es disposa

la inscripció i la publicació del Conveni col·lectiu de treball d'establiments sanitaris d'hospitalització, assistència, consulta i laboratoris d'anàlisis clíniques per als anys 2012-2013 (codi conveni núm. 79000815011994) prorrogat fins a 31 de desembre del 2014.