



RENAEM

Red Nacional de Identificación
Microbiológica por Espectrometría de
Masas.

BOLETÍN INFORMATIVO

MAYO 2025



Foto: **Biblioteca Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina**

Identificación de Hongos filamentosos por MALDI-TOF MS, utilizando la base de datos de Bruker (MBT Filamentous Fungi Library Version 2022).

Autores: Ruben Antonio Abrantes, María Cristina Rivas, Alejandra Inés Hevia, Julián Fernández, Nicolás Refojo.
Servicio de Micosis Superficiales y Hongos Miceliales, Departamento Micología, Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
Email: rabrantes@anlis.gob.ar

La utilización de una herramienta de Identificación como MALDI-TOF MS, para los hongos, resulta un método de buen rendimiento para levaduras, sin embargo, para hongos filamentosos, su potencial se encuentra en desarrollo. Una de las dificultades que presenta es la falta de espectros de referencia de varias especies en las bases de datos asociadas, situación que suele ocasionar identificaciones erróneas. Otra dificultad, es la limitación para distinguir especies estrechamente relacionadas, que naturalmente presentan espectros de masa muy similares. Por lo que la utilización de este método, para la identificación de hongos filamentosos, resulta un desafío a futuro.

Cuando utilizamos cepas de hongos filamentosos identificadas por secuenciación de algún marcador molecular (Gold standard) y tratamos de identificarlas con MALDI-TOF MS, en todos los casos obtenemos puntajes de identificación que nos aseguren nivel de especie.

Por supuesto que la extracción proteica es una variable influyente, pero incluso realizando la extracción con la metodología de medio líquido (para generar espectros de referencia, Fungi Cultivation Procedure Version 1.0) no se obtienen en todos los casos buenos puntajes.

En gran parte, esto se explica por la falta de espectros de la especie que queremos identificar. Un aislado incógnita será enfrentado a espectros similares de especies cercanas (biológicamente más relacionadas) que pudieran encontrarse en la base de datos, pero no a la misma especie. En consecuencia, el puntaje de la identificación será aceptable en el mejor de los casos, para nivel de género o directamente no confiable.

Para ejemplificar qué sucede cuando faltan espectros de referencia de especies de hongos filamentosos, utilizaremos como ejemplo especies del complejo *Fusarium solani* (FSSC), que actualmente corresponden al género *Neocosmospora*. Este grupo resulta ser el más prevalente en las diferentes entidades clínicas de micosis, en relación a otros grupos de *Fusarium*. Si bien FSSC contiene más de 150 especies, podemos circunscribirlas a 5, como las más frecuentemente aisladas en ámbitos clínicos en nuestro país y a nivel mundial.

La identificación por MALDI-TOF MS de las 5 especies más prevalentes de FSSC previamente identificadas por secuenciación del marcador TEF-1 α , muestra como varían las puntuaciones de acuerdo a la existencia o no, de espectros de referencia en la base de datos de la especie a identificar (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de resultados de Identificación por secuenciación y MALDI-TOF MS de cepas de *Neocosmospora* (FSSC). Método de extracción en medio líquido (Fungi Cultivation Procedure Version 1.0). MBT Filamentous Fungi Library Version 2022 de Bruker, posee sólo 2 especies de FSSC: *Fusarium solani* y *Fusarium petroliophilum*.

Identificación por Secuenciación	Identificación Bruker	Score	Especies del complejo <i>Fusarium solani</i> en MBT Filamentous Fungi Library 2022
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	2,3	<i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium petroliophilum</i>
<i>Fusarium petroliophilum</i>	<i>Fusarium petroliophilum</i>	2,1	
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,64	
<i>Fusarium metavorans</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,50	

Cabe aclarar que con puntajes por debajo de 1,7 pueden aparecer especies pertenecientes a otros grupos menos relacionados a FSSC como por ejemplo *Fusarium graminearum* (especie del complejo *Fusarium graminearum*) o *Fusarium proliferatum* (especie del complejo *Fusarium fujikuroi*). Incluso pueden aparecer otros géneros, mucho menos relacionados que los antes mencionados.

Por otro lado, la similitud entre espectros de especies estrechamente relacionadas, también pueden producir resultados ambiguos, aun existiendo el espectro correspondiente a la especie en la base de datos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de resultado de Identificación por secuenciación y MALDI-TOF MS de un aislado de *Fusarium petroliophilum* (FSSC) con la librería MBT Filamentous Fungi Library Version 2022 de Bruker, que posee a *Fusarium solani* y *Fusarium petroliophilum*.

Identificación por Secuenciación	Identificación Bruker	Score	Especies del complejo <i>Fusarium solani</i> en MBT Filamentous Fungi Library 2022
<i>Fusarium petroliophilum</i>	<i>Fusarium solani</i>	1 1,95	<i>Fusarium solani</i>
	<i>Fusarium petroliophilum</i>	2 1,89	<i>Fusarium petroliophilum</i>

En los casos que incluso tuviéramos puntajes para informar a nivel de especie, debiéramos informar entonces especie del complejo *Fusarium solani*.

Para sumar otro ejemplo, utilizaremos especies de *Aspergillus* Sección *Fumigati*. Aunque *Aspergillus fumigatus* representa la mayor proporción de aislados de muestras clínicas, otras especies de la sección han sido recuperadas con mucha menor frecuencia, aunque no menos importantes, ya que algunas cepas, han sido reportadas con perfiles de CIM elevadas. En nuestro país circulan principalmente: *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*, *A. fumigatiaffinis* y *A. felis*.

En las mismas condiciones que con FSSC, identificamos las especies de *Aspergillus* Sección *Fumigati* previamente identificadas por secuenciación de los marcadores TUB y CAM (Tabla 3).



Tabla 3. Comparación de resultados de Identificación por secuenciación y MALDI-TOF MS de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*. Método de extracción en medio líquido (Fungi Cultivation Procedure Version 1.0). MBT Filamentous Fungi Library Version 2022 de Bruker, posee sólo 2 especies de *Aspergillus* sección *Fumigati*: *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus lentulus*.

Identificación por Secuenciación	Identificación Bruker	Score	Especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> en MBT Filamentous Fungi Library 2022
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,5	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus lentulus</i>
<i>Aspergillus lentulus</i>	<i>Aspergillus lentulus</i>	2,3	
<i>Aspergillus hirutsake</i>	<i>Aspergillus lentulus</i>	1,58	
<i>Aspergillus udagawae</i>	<i>Aspergillus lentulus</i>	1,64	
<i>Aspergillus felis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,50	
<i>Aspergillus felis</i>	<i>Aspergillus lentulus</i>	1,40	

También en el caso de las especies de *Aspergillus* Sección *Fumigati*, se observan el mismo fenómeno que produce la falta de espectros de referencia en las bases de datos y la similitud de espectros en las especies estrechamente relacionadas. Cuando no obtenemos puntajes aceptables, conviene referenciar a los aislados como *Aspergillus* Sección *Fumigati* y luego continuar los estudios a nivel de especie.

Siempre es conveniente utilizar la morfología (observación de estructuras características que permitan orientarnos a nivel genérico) y MALDI-TOF MS, como métodos complementarios en la identificación. Así podemos asegurarnos que lo que vemos en el microscopio tenga concordancia con los resultados de MALDI-TOF MS.

Para los hongos filamentosos la mejora en la identificación dependerá de la extensión de las bases de datos que incluyan espectros de referencia de alta calidad y que correspondan a cepas bien caracterizadas. Por otro lado, es necesario seguir trabajando para comprobar que grado de alcance puede tener MALDI-TOF MS en la resolución de especies estrechamente relacionadas.

Esperamos próximamente contribuir con algunos espectros de referencia (colección de cultivos DMic) de algunos grupos importantes como agentes micosis oportunistas y establecer hasta qué nivel de identificación podemos alcanzar utilizando este método.

Por último, como se desprende de los ejemplos presentados, es conveniente informar de forma conservadora, respetando la interpretación que sugiere el método y utilizando alguna categoría que represente al grupo de especies que no pueden ser totalmente diferenciadas.

🔍 Generación de Superespectros para Optimizar la Identificación de Microorganismos Clínicamente Relevantes en el Sistema VITEK® MS PRIME

Autores: Florencia Rocca, Paula Etcheverry

Servicio Bacteriología Especial, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

Email: mfrocca@anlis.gob.ar

La identificación precisa de microorganismos raros o poco representados en las bases de datos comerciales es un desafío constante en microbiología clínica. Con el objetivo de fortalecer la capacidad diagnóstica nacional, el Laboratorio Nacional de Referencia ha iniciado la creación de superespectros personalizados utilizando la plataforma VITEK® MS PRIME.

Esta actividad permitirá la futura incorporación de dichos perfiles a la base de datos RUO (Research Use Only) del sistema SARAMIS®, facilitando su transferencia y uso en los laboratorios de la red nacional que estén interesados en importar estos perfiles a sus bases de datos RUO.



Durante esta primera fase, en el LNR se desarrollaron superespectros de las siguientes especies a partir de cepas de referencia:

- *Vreelandella hamiltonii*
- *Ureibacillus massiliensis*
- *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
- *Enterococcus malodoratus*

La posterior distribución de esta información a los laboratorios de la red interesados, perfiles permitirá ampliar su capacidad para identificar microorganismos que actualmente no son reconocidos por las bases de datos comerciales, mejorando así el diagnóstico y la vigilancia de agentes infecciosos en el país.

La generación local de superespectros representa una estrategia efectiva para fortalecer el diagnóstico microbiológico en el contexto nacional. Esta iniciativa permitirá una respuesta más rápida y precisa frente a microorganismos de relevancia clínica que tradicionalmente no son identificados por las bases de datos comerciales. La implementación progresiva en la red de laboratorios contribuirá a mejorar la vigilancia epidemiológica y la toma de decisiones terapéuticas en el ámbito clínico.

Discusión de un Caso Clínico

Dra. Claudia Barberis
Hospital de Clínicas
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
Email: claudiabar07@gmail.com

-  Paciente: Mujer, 36 años
-  Muestra: Punción de lesión nodular en mama derecha
-  Tratamiento previo: Amoxicilina–ácido clavulánico (1 mes antes)

Hallazgos de Laboratorio

Examen directo: Reacción inflamatoria marcada. Sin bacterias observables.

Cultivo:

24 h: sin desarrollo.

72 h: colonias pequeñas (<0.5 mm), grises, opacas ( Foto 1).

Coloración de Gram: Bacilos gram positivos difteroides ( Foto 2).

Agar sangre + Tween 80 (0.5–1%): Estimula el crecimiento colonial ( Foto 3).

Identificación (MALDI-TOF MS): *Corynebacterium kroppenstedtii*, score 1.73

Sensibilidad (Etest):

-  Sensible: Penicilina, gentamicina
-  Resistente: Ciprofloxacina, clindamicina, TMS

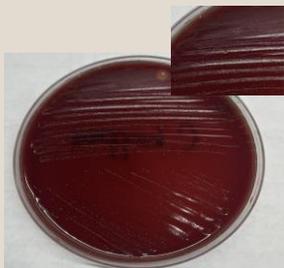


Foto 1

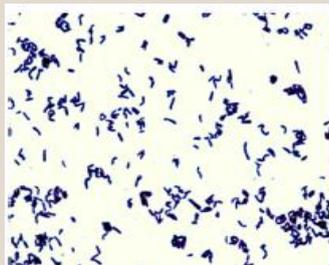


Foto 2



Foto 3

Puntos de discusión

a) ¿Por qué se prolongó el tiempo de incubación de los cultivos?

La incubación extendida (5-7 días) es clave en punciones de mama especialmente si el diagnóstico acompañante es de mastitis granulomatosa ya que los microorganismos que pueden estar implicados en dicha patología tienen un desarrollo más lento y requieren mayor incubación. Pese a su naturaleza lipofílica, *C. kroppenstedtii* es la especie con mayor frecuencia aislada en afecciones mamarias como abscesos y mastitis granulomatosa ⁽¹⁾ por lo que se aconseja la incubación prolongada de los medios primarios de aislamiento (agar sangre y agar chocolate) y en caso de observarse bacilos gram positivos difteroides en la coloración de Gram, adicionar una placa de agar sangre con Tween 80 del 0.5-1 % a fin de estimular su desarrollo (*)

Otras especies relevantes en este contexto son: *C. tuberculostearicum*, *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. striatum*

(*) En estos últimos años, una nueva especie *C. parakroppenstedtii*, muy cercanamente relacionada y difícil de distinguir de *C. kroppenstedtii* podría estar asimismo implicado en patología mamaria ⁽⁵⁾.

b) ¿Por qué se jerarquiza un aislamiento de una especie de una corinebacteria cuando las mismas son colonizantes habituales de piel?

Una especie de *Corynebacterium* debe ser informada cuando se aisle de un sitio estéril (ej. hueso en el contexto de una infección asociada a implante), hemocultivo y retrocultivo de un paciente con diagnóstico de bacteriemia relacionada a catéter; sangre de un paciente con diagnóstico de endocarditis de válvula protésica; etc); cuando se aisle en un cultivo puro con presencia de reacción inflamatoria y aún más si se observan bacilos gram positivos difteroides en la coloración de Gram ó en muestras de orina con reacción inflamatoria y recuentos significativos ($>10^4$ - 10^5 /ml) ⁽²⁾

En este caso, la clínica (lesión nodular) + el hallazgo puro de *C. kroppenstedtii* respaldan su rol patogénico.

c) ¿Es válido informar la especie si el score de MALDI-TOF es <2.0?

Sí. RENAEM validó la identificación al nivel de especie de *Corynebacterium* spp con score ≥ 1.7 y una divergencia de al menos el 10% con la especie diferente, basado en trabajos propios. ⁽³⁾

d) ¿Es adecuada la prueba de sensibilidad antibiótica realizada?

Sí, Etest se ha utilizado para evaluar la CIM de este género en comparación con la microdilución (gold standard).

Existen puntos de corte para *Corynebacterium* spp. tanto en CLSI (CIM) como EUCAST (CIM y difusión). También existen recomendaciones por otros autores utilizando el método por difusión para especies no lipofílicas⁽⁴⁾.

En relación a los antibióticos ensayados, si bien los antibióticos betalactámicos pueden ser activos, la actividad in vitro puede verse limitada dada la poca

distribución en ambientes lipídicos como la mama. En esta patología deberían recomendarse antibióticos lipofílicos como claritromicina, clindamicina, linezolid y doxiciclina. Sin embargo, el tratamiento antibiótico a menudo no es suficiente y se requiere intervención quirúrgica para la resolución del cuadro.

Mensaje final

Corynebacterium kroppenstedtii es un patógeno relevante en mastitis granulomatosa. Una correcta incubación, identificación y correlación clínico-microbiológica son esenciales para su diagnóstico y tratamiento exitosos.

Bibliografía

1. Sanchez Eluchans N y col. Rev Argent Microbiol. 2021 Oct-Dec;53(4):304-308.
2. Bernard K. J Clin Microbiol. 2012 Oct;50(10):3152-8.
3. Barberis C y col. PLoS One. 2014 Sep 3;9(9): e106303)
4. Barberis C y col., Sandoval E, Rodriguez CH, Ramírez MS, Famiglietti A, Almuzara M, Vay C. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Sep; 14:246-252.
5. Luo Q y col. Microbiol Spectr 2022 10: e01372-21.

ANUNCIOS

Talleres y Capacitaciones.

Durante este mes se llevó a cabo el taller de creación de librerías de perfiles proteicos en plataformas MALDI-TOF, que contó con una destacada participación y un gran interés por parte de los usuarios, brindó a los asistentes la oportunidad de aprender y aplicar técnicas avanzadas en el análisis de proteínas. Agradecemos a todos los participantes por su activa colaboración, lo que contribuyó a un ambiente de aprendizaje dinámico y



enriquecedor. Estamos ansiosos por seguir fomentando el desarrollo de habilidades en el ámbito de la proteómica en los próximos talleres.

Participaron microbiólogos/as de: Clínica Del Niño y la Madre- Laboratorio CEDEAC, Hospital Universitario Austral, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde, Hospital Británico, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Hospital de Alta Complejidad en Red El Cruce Dr N C Kirchner, Hospital Pirovano, Laboratorio de Zoonosis Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, INP Fatala Chaben – ANLIS, Hospital Garrahan, Hospital Regional de Concepción, Centro Rossi Laboratorio de Microbiología (Stambouliau), Representantes de Biomerieux y Becton Dickinson Argentina-

Próximos eventos y capacitaciones:

NOVIEMBRE 2025: nos encontramos en el XI Taller de la red nacional de identificación microbiológica por espectrometría de masas RENAEM y VI encuentro internacional de Espectrometría de Masas.

Para más información y actualizaciones, visita www.anlis.gov.ar/renaem/

Autores de este boletín: Rubén Antonio Abrantes, María Cristina Rivas, Alejandra Inés Hevia, Julián Fernández, Nicolás Refojo, Claudia Barberis, Maria Florencia Rocca .

Los saludan afectuosamente.

Equipo Coordinador RENAEM