

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/EP2013/065764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13742213 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2880450**

54 Título: **Detección de mezclas en la identificación de microbios por espectrometría de masas**

30 Prioridad:

03.08.2012 DE 102012015446

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2018

73 Titular/es:

**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)
Fahrenheitstrasse 4
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

**FRANZEN, JOCHEN;
KLEPEL, STEFAN;
KOSTRZEWA, MARKUS y
MAIER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 268 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de mezclas en la identificación de microbios por espectrometría de masas

La presente invención versa sobre la identificación de microbios en una muestra calculando las similitudes entre un espectro de masas de la muestra y espectros de referencia en bibliotecas espectrales; versa, en particular, sobre la detección de mezclas de microbios.

Técnica antecedente

La identificación rutinaria, rápida y libre de error de muchas muestras de microorganismos desempeña un importante papel, en particular en diagnósticos clínicos y extraclínicos de infecciones, en la monitorización de la higiene en hospitales o ríos y lagos usados para nadar, en análisis alimentarios, en la monitorización y el control de procesos biotecnológicos y en la investigación microbiológica. El término "microorganismos", aquí denominados "microbios" para abreviar, describe a todos los organismos microscópicamente pequeños; por ejemplo, hongos unicelulares (por ejemplo, levaduras), algas o protozoos (por ejemplo, los plasmodia como patógenos del paludismo). Sin embargo, la identificación se centra en las bacterias.

Básicamente, identificación de microbios significa determinar su especie y, así, catalogarlos en la jerarquía taxonómica, que va del nivel más alto —el dominio (bacterias, arqueas y eucariotas)— bajando hasta orden, familia, género y especie.

La práctica de la clasificación de microorganismos en especies se originó en una época en la que la taxonomía de los microbios se basaba en gran medida en distinguirlos por medio de reacciones bioquímicas. Es imprecisa en muchos casos y, a menudo, no clasifica por una relación genética uniforme. La definición biológica convencional para distinguir las especies entre sí es la capacidad limitada de reproducción sexual entre miembros de la misma especie, pero no entre miembros de diferentes especies. Naturalmente, esta definición no puede ser aplicada a microorganismos y, por lo tanto, la clasificación de especies es, a menudo, arbitraria. Los modernos métodos de la biología molecular han corregido muchas asignaciones de especies a un género, a una familia o incluso a un orden, han combinado muchas especies y definido nuevas especies. En el caso de las bacterias, se introdujeron clases taxonómicas adicionales, las subespecies, por debajo de las especies. Además, observaciones de medicina y biología celular han llevado a la inclusión de serovares o serotipos, que son distinguidos en particular por diferentes tipos de comportamiento de unión a las membranas celulares, pero no constituyen una especie o subespecie separada.

Las muchas definiciones nuevas y reasignaciones de especies a géneros y familias han dado como resultado en otros tantos nuevos nombres para microbios, pero estos no siempre se han establecido en la práctica diaria rutinaria. En consecuencia, el grado de relación entre microbios no siempre es reconocible a partir de los nombres habituales, y a veces trasnochados. Aún están pendientes de aceptación generalizada algunos hallazgos sobre reasignaciones y estructuras de relación más correctas. Se requiere un especialista informado para determinar estas relaciones.

A diferencia de la identificación tradicional de microorganismos, los nuevos métodos de identificación molecular-biológica se conocen desde hace algunos años. Estos están basados, por ejemplo, en el análisis de secuencias de ADN o ARN después de la amplificación de segmentos génicos especificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o en la detección espectrométrica de masas de componentes celulares moleculares específicos de los microorganismos. Estos nuevos métodos son muy superiores a los métodos convencionales en términos de especificidad (tasa de verdaderos negativos), sensibilidad (tasa de verdaderos positivos), de otras tasas de error y de la velocidad analítica.

La identificación de una muestra de microbios mediante medición por espectrometría de masas según se define en este documento suele conllevar determinar la especie, representada en efecto por el nombre de esta especie, como es práctica común en los laboratorios microbiológicos o en aplicaciones clínicas. En algunos casos, solo es posible determinar el género, representado por el nombre de género comúnmente usado. Solo ocasionalmente es posible determinar la subespecie o —en casos favorables— el serotipo o la cepa. En un sentido más amplio, la identificación también puede significar catalogación en términos de otras características, tales como la patogenicidad (capacidad de causar enfermedad) de un microorganismo, o la resistencia de un microorganismo a los antibióticos, pero estos tipos de identificación no son aquí el asunto que nos ocupa.

La identificación de bacterias mediante mediciones por espectrometría de masas ha sido descrita con detalle en la reseña de Van Baar (FEMS Microbiology Reviews, 24, 2000, 193-219: "Characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry"), por ejemplo. La identificación se logra por medio de un análisis de similitud entre un espectro de masas de las bacterias que han de ser identificadas y de espectros de masas de referencia (denominados simplemente espectros de referencia en lo que sigue) de bacterias conocidas. Durante el análisis de similitud, se asigna un indicador de similitud a cada uno de los espectros de referencia, caracterizando el grado de acuerdo entre el espectro de referencia y el espectro de masas de la muestra. Se puede considerar identificada una bacteria si, por ejemplo, el indicador de similitud es significativamente mayor que los indicadores de similitud para todos los demás espectros de referencia o mayor que una puntuación mínima

especificada. En lo que sigue, los indicadores de similitud también se denominan “puntuaciones de similitud” o, simplemente, “similitudes”.

5 Generalmente, los espectros de referencia están recogidos en una o más colecciones, para las cuales en lo que sigue se usa el término “biblioteca”. Así, una biblioteca comprende una o más colecciones de espectros de referencia. Para aplicaciones en diagnósticos médicos, tales bibliotecas de espectros de referencia deben ser validadas según estipulaciones legales. La validación de una biblioteca de espectros de referencia requiere que cada anotación pueda ser objeto de seguimiento y que esté documentada con gran exactitud. Los espectros de referencia se obtienen de cepas caracterizadas con precisión.

10 En el mundo entero se coleccionan en muchas instituciones microorganismos vivos en forma de cepas congeladas o liofilizadas. El término “cepa” describe una población que se ha multiplicado de un único organismo y que ha sido identificada, con certeza reconocida, en un laboratorio especializado. Dado que los microbios están recogidos y almacenados en diferentes lugares alrededor del mundo, también hay muchas cepas en el mundo entero que pertenecen a la misma especie o subespecie. Aunque estas cepas son clasificadas como la misma especie o subespecie, a veces muestras espectros de masas ligeramente diferentes, lo que indica que hay diferencias individuales (como ocurre con animales o plantas de la misma especie). Las cepas tienen designaciones acordadas internacionalmente según el nombre de la especie o la subespecie.

15 Por regla general, una biblioteca de espectros de referencia contiene no solo un espectro de referencia para una especie (o subespecie) microbiana, sino varios espectros de referencia procedentes de cepas, porque los espectros de masas de las cepas difieren ligeramente. Para introducir un nuevo espectro de referencia en una biblioteca, es a menudo crucial que difiera de los espectros de referencia existentes de esta especie para correlacionar claramente la amplitud de variación de los espectros de masas de esta especie o subespecie. Espectros de referencia idénticos para microbios de una especie particular, aunque se originen de cepas diferentes, no contribuyen a una mejor identificación. Debería haber disponibles al menos cinco, incluso mejor diez, quince o más espectros de referencia para una especie microbiana, especialmente si los espectros de masas de las cepas difieren significativamente entre sí. Sin embargo, hay casos en los que solo hay contenidos uno o dos espectros de referencia en la biblioteca, porque hay carencia de cepas que hayan sido identificadas con certeza.

20 La generación de espectros de masas de los microbios suele iniciarse con una colonia limpiamente aislada (un “aislado”) en un medio nutriente de cultivo sólido, habitualmente gelatinoso. Se usa un hisopo pequeño —por ejemplo, un palillo dental de madera higiénicamente limpio— para transferir una minúscula cantidad de microbios, en una operación rutinaria, de la colonia seleccionada al soporte de muestras del espectrómetro de masas. Ahí las células de la muestra son fraccionadas de la manera conocida; se añade sustancia matricial, y la muestra es analizada en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matriz. Los iones provenientes de cada impulso de luz láser dan como resultado un espectro individual de masas que, sin embargo, es estadísticamente poco fiable y, a menudo, tiene cantidades de ruido relativamente grandes. Para obtener espectros de masas fiables y sin ruido, se añaden varios centenares de estos espectros individuales de masas para formar un espectro suma de masas. Las expresiones “espectro de masas de un microbio” o simplemente “espectro microbiano” siempre denotarán este espectro suma de masas.

25 El espectro de masas de un aislado microbiano es el perfil de abundancia de los valores másicos de los iones del material microbiano soluble. De las decenas de miles de sustancias que hay en una célula microbiana, solo se miden aproximadamente de 50 a 200 componentes más abundantes (o los más fáciles de ionizar) por encima del umbral de medición. Aquí los iones son muy predominantemente iones proteínicos, y en particular iones de los diferentes tipos de proteínas que están contenidas en los ribosomas. Un ribosoma siempre contiene el mismo número de aproximadamente 40 a 60 proteínas idénticas específicas a la especie. Cada célula microbiana contiene muchos más de 10.000 ribosomas completamente idénticos; es decir, más de 10.000 moléculas de las proteínas específicas a la especie en cada caso. Por regla general, estas proteínas ribosómicas pertenecen a los picos más prominentes del espectro de masas. El perfil de las proteínas que este espectro microbiano reproduce es muy característico de la especie de microbio en cuestión, porque cada especie produce sus propias proteínas predeterminadas genéticamente, cada una de las cuales tiene su propia masa característica. De manera similar, la abundancia de las proteínas individuales en los microbios, en la medida en que puede ser medida mediante espectrometría de masas, también está predeterminada ya sea genéticamente o, como en los ribosomas, por la estructura de la célula. El medio nutriente y el grado de madurez de la colonia son casi irrelevantes aquí. Por lo tanto, las identificaciones son sumamente estables y apenas dependen en absoluto del tipo o de la duración del cultivo o de la preparación de la muestra. Los perfiles proteínicos son característicos de los microbios de la misma manera que las huellas dactilares son características de los seres humanos. En los espectros de masas, la información más útil para las identificaciones se encuentra en el intervalo de masas entre aproximadamente 3.000 daltons y 15.000 daltons.

30 A pesar de esta estabilidad, ha demostrado ser ventajoso estandarizar el cultivo y la preparación de muestras todo lo posible. Se generan espectros de referencia para bibliotecas espectrales produciendo colonias de microbios de cepas específicas, documentadas con precisión y obteniendo de ellas espectros de masas. Por razones estadísticas, para un espectro de referencia siempre se obtienen y se evalúan muchos espectros suma de masas. Los espectros suma de masas de microbios suelen contener entre aproximadamente 50 y 200 señales de masa que

- están claramente separadas, habitualmente por espacios vacíos en los espectros de masas, aunque muchas de ellas son puro ruido, porque la búsqueda de señales de masa está configurada con una sensibilidad muy alta. Por lo tanto, los espectros de referencia suelen reducirse a un número máximo de 70 o 100 señales de masa, por ejemplo, eliminando las señales de ruido y las señales cuya intensidad es demasiado baja. Los especialistas incluso
- 5 consideran que un límite de 50 señales de masa es suficiente. El contenido de información de un espectro de masas con 50 señales de masa en el intervalo de masa entre 3.000 y 15.000 dáltones, en el que pueden producirse muchas más de 2.000 señales de masa distinguibles, incluso con una potencia de resolución de masas reducida, es increíblemente alto, incluso sin tener en cuenta las diferencias de intensidad (teóricamente, pueden diferenciarse entre sí más de $2000^{50} \approx 10^{165}$ patrones).
- 10 Los espectros de masas de los microbios que han de ser identificados, denominados “espectros muestra” en lo que sigue para abreviar, son generados de forma similar a partir de espectros de repetición y están limitados a un número predeterminado de señales de masa para excluir las señales de ruido en la medida de lo posible. El número de señales de masa en estos espectros muestra suele seleccionarse para que sea ligeramente más alto que el número de señales de masa en los espectros de referencia.
- 15 La identificación de los microbios se basa en los análisis de similitud de los espectros de la muestra y de los espectros de referencia de una biblioteca. Hay diversos tipos de análisis de similitud, que suelen estar basados en las diferentes formas de los espectros de referencia. En la bibliografía se han dado a conocer varios tipos de algoritmo de identificación y bibliotecas de referencia, pero no serán abordados más aquí. Las similitudes entre dos espectros de masas suelen estar caracterizados por un “indicador de similitud” (también denominado en lo que sigue
- 20 “puntuación de similitud” o, simplemente, “similitud”). La empresa del solicitante ha desarrollado un método muy simple y rápido de identificación por espectrometría de masas que tiene una tasa de éxito extraordinariamente elevada, según han verificado numerosos estudios de grupos de investigación independientes. dado que las intensidades de las señales de masa varían muchísimo, el indicador de similitud se basa esencialmente en las masas de las señales de masa; las intensidades son tenidas en cuenta solo ligeramente.
- 25 El método anteriormente mencionado se basa en un método especial de cálculo para los indicadores de similitud. Dado que los indicadores de similitud son muy importantes en lo que sigue, se explica aquí su cálculo según se lleva a cabo en la empresa de los inventores. El método de cálculo está basado en tres medidas parciales. Una primera medida parcial del indicador de similitud está representada por el número de señales de masa del espectro microbiano y del espectro de referencia (“número de aciertos”) que coinciden dentro de un intervalo de tolerancia de masas, dividido por el número de señales de masa en el espectro de referencia, pero ponderándose por prorateo
- 30 todas las señales de masa con su presencia. La presencia es el porcentaje de la incidencia de esta masa en los espectros de referencia para las mediciones reiteradas. El intervalo de tolerancia de masas puede darse como una cifra absoluta en dáltones o como un valor relativo en ppm (partes por millón). Una segunda medida parcial es resultado del número de aciertos dividido por el número de señales de masa en el espectro microbiano, de nuevo ponderado por prorateo con las presencias en el espectro de referencia. Cada una de las medidas parciales primera y segunda puede tener un valor de hasta 1,00. La tercera medida parcial se calcula a partir de la similitud entre las respectivas intensidades de las señales de masa que coinciden, volviendo a tenerse en cuenta las presencias de forma multiplicativa. La tercera medida parcial es normalizada para todas las señales de masa para que, cuando todas las intensidades sean iguales, la medida parcial tenga el valor de 1,00.
- 35 A continuación, estas tres medidas parciales simplemente se multiplican entre sí y dan, así, el indicador de la similitud entre el espectro de referencia y el microbiano. Dado que cada una de las tres medidas parciales puede tener un valor de hasta 1,00, el máximo valor del indicador de similitud es, asimismo, 1,00. Cientos de miles de identificaciones verificadas realizadas por este tipo de cálculo de similitud han demostrado ya que la identificación fiable está ligada casi siempre a una puntuación de similitud superior a 0,10. Para deducir números que sean más fáciles de manejar, puede acometerse una transformación multiplicando por 1000 y luego tomando el valor
- 40 logarítmico, lo que resulta en un indicador máximo de similitud de $S = 3,00$ para espectros idénticos, y en un indicador mínimo de similitud de $S = 2,00$ requerido para la identificación de una especie. Esta transformación no es esencial, pero sí tiene un alto valor psicológico; también puede aplicarse cualquier otra transformación si resulta ser más practicable.
- 45 El cálculo de estos indicadores de similitud puede implementarse en un algoritmo muy rápido. Los ordenadores hoy usados con espectrómetros de masas requieren solamente algunos milisegundos para los reglajes de escala y los cálculos del indicador de similitud.
- 50 Los resultados suelen presentarse en un “listado de puntuaciones”, al menos como un resultado provisional, en el que se dan los espectros de referencia de máxima similitud, ordenados según los indicadores de similitud, junto con los nombres de las correspondientes especies, subespecies y cepas microbianas. Miles de identificaciones verificadas han demostrado que, con una certeza habitualmente muy por encima del 95%, indicadores de similitud entre $S_f = 1,70$ y $S_g = 2,00$ identifican al menos la familia y probablemente el género, mientras que indicadores entre $S_g = 2,00$ y $S_s = 2,30$ identifican definitivamente el género y probablemente la especie. Indicadores de similitud por encima de $S_s = 2,30$ identifican a la especie individual con un alto grado de certidumbre.
- 55 Los límites aquí declarados son sorprendentemente correctos en toda la clasificación bacteriana; han sido confirmados en muchos estudios a gran escala por diferentes grupos de investigación. Estas puntuaciones de
- 60

similitud son usadas en el sistema de identificación más común por espectrometría de masas, el “MALDI Biotyper®” de Bruker Daltonics. Para otros sistemas, deben llevarse a cabo conversiones cuando sea necesario.

Según se ha indicado ya sucintamente, en la historia del desarrollo de este método de identificación por espectrometría de masas, se ha convertido en práctica establecida crear un listado tabular de puntuaciones con los nombres de las cepas microbianas cuyos espectros de referencia resultaran en las mejores puntuaciones de similitud como resultado intermedio de la identificación. La lista es ordenada en el orden de la similitud con el espectro de la muestra. Por ejemplo, todos los espectros de referencia con una similitud por encima de una puntuación de $S = 1,50$ son presentados en forma de tabla; si hay más de 30 espectros de referencia de similitud máxima, la tabla puede ser acortada. Sin usar ningún umbral de similitud, el listado de puntuaciones contiene a menudo simplemente los entre 20 y 30 espectros de referencia de similitud máxima. La tabla también puede ser acortada si se produce un gran salto en las puntuaciones de similitud; por ejemplo, un salto de $\Delta S = 0,60$. A continuación, este listado de puntuaciones debería ser evaluado por un especialista, usando su experiencia para efectuar la identificación definitiva. El especialista debe evaluar en particular si la muestra es una mezcla de diferentes especies de microbios cuando en el listado de puntuaciones hay varias especies microbianas enumeradas.

Dado que el método de identificación por espectrometría de masas es usado actualmente en cientos de laboratorios que lo emplean de forma rutinaria, el requisito de contar con la evaluación de un especialista ya no es apropiada. Se demandan de forma creciente métodos que se ejecuten de forma automática en la medida de lo posible, pero que también tengan, no obstante, una alta certeza de identificación cuando haya presentes mezclas de microbios. Por lo tanto, la evaluación del listado de puntuaciones tiene que ser transferida en gran medida a un programa informático; solo en raros casos puede un resultado quedar indeterminado.

La identificación de microbios procedentes de colonias limpiamente separadas en una superficie de agar acaba en una identificación inequívoca en la mayoría de los casos. Sin embargo, colonias limpiamente separadas en una superficie de agar no son garantía, en modo alguno, de que no haya presentes, después de todo, mezclas de microbios. Hay microbios que tienen motilidad y se dispersan en una película a menudo invisible sobre la superficie de agar dentro del periodo de cultivo. Puede que eviten otra colonia si los productos metabólicos de desecho excretados de la colonia foránea no los atraen; pero si los productos metabólicos de desecho resultan atractivos, los microbios migrantes también pueden ser recogidos ahí y, así, formar una mezcla con los microbios de la colonia local. Los microbios migrados pueden incluso desarrollarse más que los microbios de la colonia local en términos de números.

Sin embargo, las muestras de microbios también pueden originarse en un cultivo en un líquido; por ejemplo, un cultivo sanguíneo. Después de la purificación y separación por centrifugación, las muestras de microbios suelen presentarse entonces en forma de gránulos. En más del 70% es estos casos, aquí tampoco hay mezcla alguna de microbios, porque, a menudo, solo hay una especie presente, o una especie se ha desarrollado mucho más que todas las demás especies de microbios. Hay excepciones si dos especies se toleran entre sí o incluso viven juntas simbióticamente. Por lo tanto, la probabilidad de que la muestra contiene una mezcla de dos o incluso de varias especies microbianas es una certeza del orden de un porcentaje expresado con dos cifras.

Se puede sospechar la presencia de una mezcla cuando hay espectros de referencia en los primeros 20 o 30 mejores aciertos del listado de puntuaciones que pertenezcan a al menos dos especies de microbios diferentes. Si se sospecha la presencia de una mezcla, pueden usarse métodos para la identificación de microbios en mezclas descritos en los documentos DE 10 2009 007 266 A1 (M. Kostrzewa et al., correspondiente a los documentos GB 2 467 636 A o US-2010-0248298-A1). Estos documentos están incluidos aquí por referencia. Estos documentos describen un método para la identificación de especies microbianas en mezclas que es designado más abajo como un “análisis de muestras por espectros de combinaciones”. En este método para la determinación de especies microbianas en mezclas, se generan todos los espectros de combinaciones posibles, cada uno de los cuales comprende dos espectros de masas del listado de puntuaciones, que no pertenecen a la misma especie microbiana. Si la puntuación de similitud de uno de estos espectros de combinaciones en relación con el espectro de la muestra es mayor que cualquiera de las puntuaciones de similitud de los espectros individuales usados, entonces es muy posible, pero en modo alguno seguro, que la muestra sea una mezcla de las especies microbianas implicadas en los espectros de combinaciones de similitud máxima. Si hay un grado de certidumbre de que la muestra es una mezcla, puede considerarse que las dos (o más) especies microbianas cuyos espectros resultaran en la mejor combinación son componentes de la mezcla.

Sin embargo, este método tiene un carácter autoconfirmatorio, que puede llevar a uno a creer que un espectro de combinación más similar corresponde siempre a una mezcla. Pero también puede ocurrir que el listado de puntuaciones contenga espectros de referencia de dos especies microbianas sin que la muestra sea una mezcla. Ocasionalmente, especies microbianas estrechamente relacionadas tienen espectros de masas que son tan similares que los espectros de referencia de la segunda especie microbiana deben inevitablemente aparecer entre los aciertos de mejor similitud. Si aquí se generan espectros de combinaciones y se comparan con el espectro de la muestra, cabe esperar con certeza casi absoluta que al menos uno de los espectros de combinaciones proporcione una mejor puntuación de similitud, dando así la falsa impresión de que hay presente una mezcla.

Por lo tanto, el documento DE 10 2009 007 266 A1 anteriormente citado para la terminación de los componentes de una mezcla recomienda que se determine el grado de relación entre los diferentes tipos de microbio. Si hay una estrecha relación, puede suponerse que la muestra no es una mezcla. Por las razones indicadas anteriormente, a menudo los nombres no reflejan el grado de relación, y, por ello, aquí vuelve a requerirse un especialista con experiencia para llevar a cabo esta tarea. Rara vez se encuentran tales especialistas en los laboratorios dedicados a realizar análisis rutinarios. Cuando se acomete una evaluación visual de los resultados provisionales, es fácil que personal menos experimentado de laboratorio suponga que la muestra es una mezcla.

Para las identificaciones espectrométricas de masas en microbios existe la necesidad de un método que pueda reconocer automáticamente, con tanta seguridad como sea posible, si la muestra es o no una mezcla de especies microbianas.

Cuando en lo que sigue se usa la expresión "listado de puntuaciones", ello significa los espectros de referencia más similares al espectro de la muestra y las designaciones de las cepas microbianas y las especies microbianas asociadas, aunque estas no tengan forma de lista, sino únicamente en forma, por ejemplo, de una colección de datos en la memoria del ordenador. Los espectros de referencia más similares pueden diferenciarse de todos los demás espectros de referencia de una biblioteca por un umbral especificado de similitud, o por un número especificado de los espectros de referencia más similares, o por una diferencia entre las puntuaciones de similitud y el siguiente espectro de referencia de máxima similitud que supere un valor especificado. Una especie microbiana puede estar representada en el listado de puntuaciones con solo un único espectro de referencia (si, por ejemplo, solo hay presente un espectro de referencia de esta especie microbiana) o con diez o 15, si realmente hay presentes tantos espectros de referencia de cepas de esta especie microbiana en la biblioteca y todos son correspondientemente similares al espectro de la muestra.

Objetivo de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar métodos para el reconocimiento de mezclas de dos o más especies de microbios y para la identificación de las especies microbianas pertinentes, cuando se lleva a cabo una identificación espectrométrica de masas de muestras de microbios.

Compendio de la invención

El método para la identificación de especies microbianas en mezclas que se denomina "análisis de muestras por espectros de combinaciones" recomienda en primer lugar una investigación de si las diferentes especies de microbios del listado de puntuaciones están estrechamente relacionadas entre sí si el listado de puntuaciones contiene espectros de referencia de varias especies microbianas. En los documentos se sugiere que habría de partir de la premisa de que no hay una mezcla presente si las diferentes especies de microbios del listado de puntuaciones están estrechamente relacionadas.

A menudo, esta relación no puede ser deducida de los nombres de los microbios. Por lo tanto, la investigación requiere un especialista de experiencia, y habitualmente no puede ser llevada a cabo regularmente en un laboratorio dedicado a realizar análisis rutinarios. Por esta razón, una primera realización de la invención propone hacer que un especialista con experiencia determine las relaciones entre los microbios de todos los espectros de referencia de la biblioteca una vez, y añadir a la biblioteca una lista de relaciones a modo de matriz con los nombres de las especies microbianas usados para los espectros de referencia. Esta lista es aquí denominada "lista de exclusiones", porque indica que se excluye una mezcla. La lista de exclusiones representa la relación entre cepas microbianas que tienen espectros de masas muy similares y están asignadas a diferentes especies de microbios. La relación puede ser descrita por medio de números r , siendo $r = 1,0$ para cepas estrechamente relacionadas de la misma especie, e indicando $r = 0,0$ que no hay en absoluto relación alguna. Con la ayuda de esta lista, el programa informático para la evaluación de los espectros de masas puede entonces determinar si existe tal relación cercana y negar la presencia de una mezcla cuando este sea el caso. Se ha hallado que esta lista de exclusiones no debe representar simplemente la relación entre especies microbianas, sino más bien las relaciones entre las cepas de una especie microbiana y las cepas de otras especies microbianas, de manera compleja.

Sin embargo, este método tiene la principal desventaja de que la lista de relaciones siempre debe ser actualizada y expandida cuando se amplía la biblioteca de referencia. Dado que debería seguir siendo posible en principio añadir más espectros de referencia a la biblioteca también en el laboratorio dedicado a realizar análisis rutinarios, siempre se requiere del especialista para mantener completa esta lista de relaciones.

Una segunda realización de la invención se basa en el hallazgo de que lo que importa no es la relación taxonómicamente determinada entre los microbios, sino únicamente el grado de similitud entre sus espectros de referencia. Si los espectros de referencia de dos cepas de diferentes especies de microbios son muy similares (con independencia de que estén o no clasificadas como relacionadas), los espectros de referencia de ambas cepas microbianas deben inevitablemente aparecer en el listado de puntuaciones cuando hay presente una de las dos cepas microbianas, siempre y cuando la similitud es suficientemente grande. Si un espectro de referencia de una de las dos cepas microbianas proporciona buenas puntuaciones de similitud en relación con el espectro de la muestra, la segunda cepa microbiana también debe tener espectros de referencia con similitud relativamente alta.

Para responder a la pregunta de si una muestra es o no una mezcla cuando hay dos o más especies de microbios en el listado de puntuaciones, una segunda realización de la invención propone investigar, por lo tanto, los espectros de referencia de las diferentes especies de microbios del listado de puntuaciones con respecto a su similitud mutua; por ejemplo, por medio del programa de evaluación para valorar el propio listado de puntuaciones. Esto puede hacerse usando diversos métodos matemáticos, pero la manera más simple es utilizar el mismo cálculo de similitud usado para las identificaciones. Si son muy similares, con puntuaciones de similitud por encima de un umbral de similitud determinado experimentalmente, no hay presente mezcla alguna. Si, por otro lado, los espectros de referencia de las diferentes especies de microbios no son similares entre sí, esto indica al usuario que la muestra debe ser una mezcla. Entonces puede llevarse a cabo el método de análisis de mezclas con espectros de combinaciones descrito anteriormente para identificar los microbios que componen la mezcla.

En una tercera realización, si hay contenidas varias especies microbianas en el listado de puntuaciones, siempre se lleva a cabo el método de "análisis de muestras con espectros de combinaciones" según los documentos DE 10 2009 007 266 A1, GB 2 467 636 A, o US-2010-0248298-A1, pero sin suponer ya firmemente la presencia de una mezcla. El programa informático repasa el listado de puntuaciones, empezando con el espectro de referencia de máxima similitud. Los espectros de referencia más similares suelen pertenecer todos a una sola especie microbiana cuando en la biblioteca hay presentes espectros de referencia de varias cepas de esta especie microbiana. Entonces, si el programa da con una segunda especie microbiana, se forman espectros de combinaciones con todos los espectros de referencia de la primera especie microbiana. A continuación, estos espectros de combinaciones son investigados en cuanto a su similitud al espectro de la muestra. Se aplica el mismo método para espectros de referencia adicionales de la segunda especie microbiana, y también para espectros de referencia de una tercera especie microbiana si hay una presente. Si se obtienen espectros de combinaciones cuyas similitudes al espectro de la muestra son mayores que las similitudes de todos los espectros de referencia en el listado de puntuaciones, puede haber presente una mezcla. Para la decisión definitiva de si hay presente una mezcla de microbios, se comparan entre sí las similitudes de los pares de espectros de referencia de los que se han generado las combinaciones más similares en cada caso. Si las similitudes son suficientemente bajas, por debajo de un umbral determinado experimentalmente, hay alta probabilidad de que haya una mezcla presente y esto es indicado al usuario. Se considera que los microbios de los espectros de referencia que han llevado a los mejores espectros de combinaciones son los componentes de la mezcla. El grado de similitud de los dos espectros de referencia de una combinación incluso permite que se haga una declaración sobre el nivel de probabilidad de que haya presente una mezcla.

Ilustraciones

La Figura 1 representa un diagrama de procedimiento de la segunda realización de la detección de mezclas.

La Figura 2 muestra un diagrama de procedimiento para la tercera realización de la detección de mezclas.

Realizaciones

La invención propone métodos para el reconocimiento de mezclas de microbios que pueden ser usados en el procedimiento de identificación por espectrometría de masas de una muestra de microbios calculando indicadores para la similitud entre el espectro de masas de la muestra de microbios (el "espectro muestra") y los espectros de referencia. Este método de identificación siempre implica determinar, en primer lugar, los espectros de referencia más similares e introducirlos en un listado de puntuaciones. El listado de puntuaciones puede contener dos o más especies de microbios que bien constituyen una mezcla o bien se originan de microbios muy estrechamente relacionados.

Una primera realización de un método según la invención para la detección de mezclas de microbios en la identificación de una muestra de microbios mediante espectrometría de masas con la compilación de un listado de puntuaciones se caracteriza por la determinación de los grados de relación entre las cepas microbianas con la ayuda de una lista de exclusiones, si hay presentes dos o más especies de microbios en el listado de puntuaciones. Los grados de relación pueden ser descritos por números r , siendo, por ejemplo, $r = 1,0$ para cepas estrechamente relacionadas de la misma especie, $r = 0,8$ para especies estrechamente relacionadas del mismo género, $r = 0,6$ para géneros estrechamente relacionados de la misma familia, indicando $r = 0,0$ que no hay ninguna relación en absoluto. Si indica que la muestra microbiana es una mezcla de microbios si la relación es suficientemente baja, con un grado de relación r por debajo de un valor especificado. Entonces puede llevarse a cabo el método de análisis de mezclas con espectros de combinaciones descrito anteriormente para identificar los microbios que componen la mezcla.

La lista de exclusiones debe ser elaborada por un especialista. El especialista puede limitar la investigación de los grados de relación a aquellos casos en los que las diferentes cepas microbianas de diferentes especies de microbios tengan espectros de masas muy similares. Estas cepas microbianas pueden ser escogidas automáticamente por un programa informático apropiado comparando todos los espectros de referencia con todos los demás. El especialista comprueba entonces únicamente esta lista de todos los pares de cepas microbianas cuyos espectros de masas sean muy similares entre sí.

Se ha descubierto que es imprescindible tener en cuenta las relaciones entre cepas individuales de una especie microbiana y todas las cepas de otra especie microbiana, no simplemente la relación entre las propias especies microbianas individuales, lo que hace muy compleja la lista de exclusiones. Por ejemplo, algunas cepas de *E. coli* están estrechamente relacionadas con cepas de microbios del género *Shigella*, mientras que otras cepas de *E. coli* están menos estrechamente relacionadas. Ambas pertenecen a la familia de las enterobacteriaceae. Las *Shigella* causan disentería bacilar o shigelosis, pero la mayoría de las subespecies de *E. coli* son miembros útiles de nuestra flora intestinal; por lo tanto, una correcta identificación es de importancia diagnóstica crucial. Los inventores se toman la libertad hacer notar aquí que algunos microbiólogos actuales tienen la opinión de que las *Shigella*, decididamente, no son un género por derecho propio con cuatro especies microbianas, y ni siquiera forman una especie independiente, sino que son en realidad únicamente subespecies de *E. coli*. Este punto de vista también tiene el apoyo del hallazgo de que hay subespecies adicionales de *E. coli* que producen la misma toxina que las cuatro especies microbianas del género *Shigella*. Este ejemplo muestra que realmente hace falta un especialista para determinar relaciones y compilar una lista de exclusiones. Muestra, además, que la taxonomía de los microbios sigue estando en un estado de continuo cambio y requiere reasignaciones adicionales.

La lista de exclusiones permite que el programa informático determine el grado de relación, aunque esta no pueda ser reconocida a partir de los nombres de las especies microbianas que están comparando, o sea incluso diferente para las diferentes cepas de una especie microbiana en relación con cepas de otra especie microbiana. Sin embargo, esta lista debe ser actualizada constantemente cuando se añadan a la biblioteca espectros adicionales de referencia. Esta es una ligera desventaja si tal expansión de la biblioteca de referencia es llevada a cabo no por el fabricante, sino en un laboratorio dedicado a realizar análisis rutinarios que no tiene disponible un especialista apropiado. Ni siquiera grandes bibliotecas de espectros de referencia puede abarcar la gran diversidad de microbios. La capacidad de añadir espectros de referencia a la biblioteca en un laboratorio dedicado a realizar análisis rutinarios es uno de los puntos fuertes de este método de identificación por espectrometría de masas y, decididamente, debería ser retenida.

Una segunda realización de un método según la invención para la detección de mezclas de microbios en la identificación de una muestra de microbios mediante espectrometría de masas con la compilación de un listado de puntuaciones se caracteriza por un procedimiento en el que, si hay presentes dos o más especies de microbios en el listado de puntuaciones, las similitudes entre los espectros de referencia de las diferentes especies de microbios son investigadas y se indica que la muestra de microbios es una mezcla de microbios si las similitudes son suficientemente bajas, por debajo de un umbral especificado de similitud. También aquí, entonces es posible llevar a cabo el método de análisis de mezclas con espectros de combinaciones descrito anteriormente para identificar los microbios que componen la mezcla.

En esta segunda realización, se determinan las similitudes entre los espectros de referencia de las dos o más especies de microbios del listado de puntuaciones, y no el grado de relación. Esta segunda realización de la invención se basa en el hallazgo de que, al final, el factor crucial no son las relaciones taxonómicamente determinadas entre los microbios, sino únicamente la similitud entre los espectros de referencia. Esto también elimina el complejo problema con las cepas microbianas y sus relaciones. Para excluir una mezcla, puede especificarse y establecerse un umbral de similitud para las similitudes entre los espectros de referencia. Este umbral es determinado óptimamente de forma experimental; por ejemplo, en estudios con mezclas producidas artificialmente. Habitualmente, hay presente una mezcla únicamente cuando las similitudes entre los espectros de referencia de diferentes especies de microbios están todas por debajo de este umbral especificado de similitud. A partir de estas similitudes, es incluso posible deducir la probabilidad de la presencia de una mezcla: cuanto menor sea la similitud, mayor es la probabilidad de una mezcla. Si se detecta una mezcla por el método según la invención, las especies microbianas implicadas deben ser identificadas entonces con el método of "análisis de mezclas con espectros de combinaciones" descrito anteriormente.

Una tercera realización de un método según la invención lleva no solo a la detección de mezclas de microbios, sino también inmediatamente a la identificación de los microbios implicados en la mezcla. Como en las realizaciones ejemplares anteriores, se compila un listado de puntuaciones en la identificación espectrométrica de masas llevando a cabo comparaciones de similitud entre el espectro de la muestra y todos los espectros de referencia de una biblioteca. El método adicional comprende las etapas siguientes:

- a) formar espectros de combinaciones a partir de los espectros de referencia de diferentes especies de microbios en el listado de puntuaciones,
- b) determinar las similitudes entre estos espectros de combinaciones y el espectro de la muestra,
- c) seleccionar los espectros de combinaciones cuya similitud al espectro de la muestra sea mejor que todas las similitudes entre el espectro de la muestra y los espectros puros de referencia,
- d) calcular las similitudes entre los espectros combinados de referencia que constituyen estos espectros de combinaciones más similares,

e) indicar una mezcla si las similitudes de los espectros combinados de referencia están por debajo de un umbral especificado de similitud, y, si hace falta,

f) identificar los microbios de la mezcla como aquellos cuyas combinaciones de espectros de referencia presentan las mayores similitudes al espectro de la muestra.

5 También aquí, los valores óptimos para el umbral especificado de similitud en la Etapa e) en esta tercera realización son determinados óptimamente de forma experimental.

Esta tercera realización del método para el reconocimiento de mezclas usa inicialmente los procedimientos de "análisis de mezclas con espectros de combinaciones" citado anteriormente si hay presentes varias especies microbianas entre los espectros de referencia de mayor similitud, pero sin suponer ya firmemente que hay una
10 mezcla presente. Esto puede sonar complicado y excesivamente largo, pero no lo es. La formación y el cálculo de similitudes para aproximadamente 100 espectros de combinaciones (suele ser considerablemente menos) llevan solo fracciones de segundo, tiempo insignificante cuando se compara con los cálculos de similitud del espectro de la muestra con los miles de espectros de referencia en una biblioteca.

La tercera realización del reconocimiento de muestras se lleva a cabo en detalle como sigue: En primer lugar, el
15 método de identificación se lleva a cabo con el cálculo de todas las puntuaciones de similitud entre el espectro de la muestra y los espectros de referencia, y se elabora el listado de puntuaciones de los espectros de referencia más similares con especies microbianas y cepas microbianas. El listado de puntuaciones no tiene que ser presentado en la pantalla; basta con recogerlo en la memoria del ordenador. A continuación, el programa informático repasa el listado de puntuaciones, empezando con el espectro de referencia de máxima similitud. En general, varias de las
20 mayores similitudes en la parte superior de la lista pertenecen todas a una sola especie microbiana si en la biblioteca hay presentes espectros de referencia de varias cepas de esta especie microbiana. Entonces, si el programa da con una segunda especie microbiana, se forman espectros de combinaciones a partir del primer espectro de referencia de esta segunda especie microbiana junto con todos los espectros de referencia de la primera especie microbiana, y cada uno de ellos es investigado en cuanto a su similitud al espectro de la muestra. Se usa el mismo método para
25 espectros de referencia adicionales de la segunda especie microbiana, y también para espectros de referencia de una tercera especie microbiana, si hay una presente. Los espectros de referencia de la tercera especie microbiana son combinados con todos los espectros de referencia de las especies microbianas primera y segunda. Si se obtienen espectros de combinaciones cuyas similitudes al espectro de la muestra son mayores que la mejor similitud del listado de puntuaciones, puede haber presente una mezcla, pero esto no es concluyente. Para decidir si ha de
30 indicarse que hay presente una mezcla de microbios, se comparan entre sí las similitudes entre los dos espectros de referencia que constituyen cada una de estas combinaciones mejores. Solo si están por debajo de un umbral especificado de similitud, el programa informático indica al usuario que lo más probable es que esto sea una mezcla. En función del grado de similitud entre los espectros de referencia de las combinaciones, puede incluso hacerse una declaración sobre el nivel de probabilidad de que haya presente una mezcla.

35 Así, la invención propone métodos que permiten un programa de evaluación automática para que los listados de puntuaciones reconozcan la presencia de una mezcla de microbios con un grado de certidumbre relativamente alta.

Naturalmente, los métodos propuestos pueden ser alterados y mejorados de diversas maneras. Por ejemplo, si un listado de puntuaciones está siempre limitado a los 20 o 30 espectros de referencia más similares (como suele suceder), se puede observar con frecuencia que los primeros cinco a 15 espectros de referencia más similares
40 pertenecen todos a diferentes cepas de la misma especie microbiana y que (casi) todos tienen puntuaciones de similitud elevadas, mientras que hay una gran separación en las puntuaciones de similitud hacia los siguientes espectros de referencia de mayor similitud. Es obvio que, en casos tan inequívocos, un programa informático adecuado puede indicar una identificación definida de las especies sin tener que comprobar la presencia de una mezcla. Por lo tanto, la presencia de una mezcla puede ser reconocida a menudo a partir de la estructura de las
45 puntuaciones de similitud para los espectros de referencia en el listado de puntuaciones. Si los espectros de referencia son ordenados según las similitudes, como es habitual, hay a veces saltos tan grandes en las diferencias entre espectros de referencia consecutivos que pueden desestimarse los espectros de referencia subsiguientes. Por otro lado, si el listado de puntuaciones contiene espectros de referencia de dos o más especies diferentes de microbios, ninguno de los cuales tiene un grado muy elevado de similitud al espectro de la muestra, esto no siempre
50 tiene que indicar una mezcla de especies microbianas. Si los espectros de referencia de las diferentes especies son similares entre sí, las dos especies microbianas pueden estar relacionadas con las especies microbianas de la muestra, pero no haber presente en la biblioteca ningún espectro de referencia de esta especie microbiana. Es posible integrar todos estos casos en el programa de evaluación por medio de umbrales de similitud determinados de un modo apropiado.

55

REIVINDICACIONES

1. Método para el reconocimiento de mezclas de microbios en la identificación de una muestra de microbios mediante espectrometría de masas, con la compilación de un listado de puntuaciones de los espectros de referencia de una biblioteca que tengan una similitud máxima con el espectro de la muestra, **en el que** se proporciona una lista de exclusiones además de la biblioteca, representando dicha lista de exclusiones la relación entre cepas microbianas que tienen espectros de masas muy similares y están asignadas a diferentes especies de microbios, y, si en el listado de puntuaciones hay presentes dos o más especies de microbios, las relaciones entre las cepas microbianas de diferentes especies de microbios que estén presentes en el listado de puntuaciones se determinan con la ayuda de una lista de exclusiones, y la muestra de microbios queda indicada como una mezcla de microbios si la relación está por debajo de un grado especificado.
2. Método para el reconocimiento de mezclas de microbios en la identificación de una muestra de microbios mediante espectrometría de masas, con la compilación de un listado de puntuaciones de los espectros de referencia de una biblioteca que sean similares al espectro de la muestra, **en el que**, si hay presentes dos o más especies de microbios en el listado de puntuaciones, se investigan las similitudes entre los espectros de referencia de las diferentes especies de microbios que estén presentes en el listado de puntuaciones, y la muestra de microbios queda indicada como una mezcla de microbios si las similitudes están por debajo de un umbral de similitud especificado.
3. Método según la Reivindicación 1 o 2 en el que, si ha quedado indicada una mezcla de microbios, se lleva a cabo un análisis de la mezcla usando espectros de combinaciones.
4. Método para la detección y la identificación de mezclas de microbios en la identificación de una muestra de microbios mediante espectrometría de masas, con la compilación de un listado de puntuaciones de los espectros de referencia de una biblioteca que sean similares al espectro de la muestra, **que comprende las etapas de**
- formar espectros de combinaciones a partir de los espectros de referencia de las diferentes especies de microbios del listado de puntuaciones,
 - calcular las similitudes entre estos espectros de combinaciones y el espectro de la muestra,
 - seleccionar los espectros de combinaciones cuya similitud al espectro de la muestra es mejor que las similitudes entre el espectro de la muestra y los espectros puros de referencia,
 - calcular las similitudes entre los espectros de referencia combinados para estos espectros seleccionados de combinaciones,
 - indicar una mezcla si las similitudes de los espectros combinados de referencia están por debajo de un umbral especificado de similitud, e
 - indicar las especies de microbios de la muestra como aquellos cuyas combinaciones de espectros de referencia demuestran las mejores similitudes al espectro de la muestra.
5. Método según una de las Reivindicaciones 2 o 4 en el que los umbrales especificados de similitud son determinados experimentalmente.
6. Método según una de las Reivindicaciones 1 a 5 en el que los espectros de referencia del listado de puntuaciones se diferencian de otros espectros de referencia de la biblioteca por un umbral especificado de similitud.
7. Método según una de las Reivindicaciones 1 a 5 en el que el listado de puntuaciones contiene un número especificado de espectros de referencia de máxima similitud.
8. Método según una de las Reivindicaciones 1 a 5 en el que el listado de puntuaciones contiene todos los espectros de referencia hasta el espectro de referencia, en el que tiene lugar un salto especificado en la puntuación de similitud en relación con el siguiente espectro de referencia de máxima similitud.

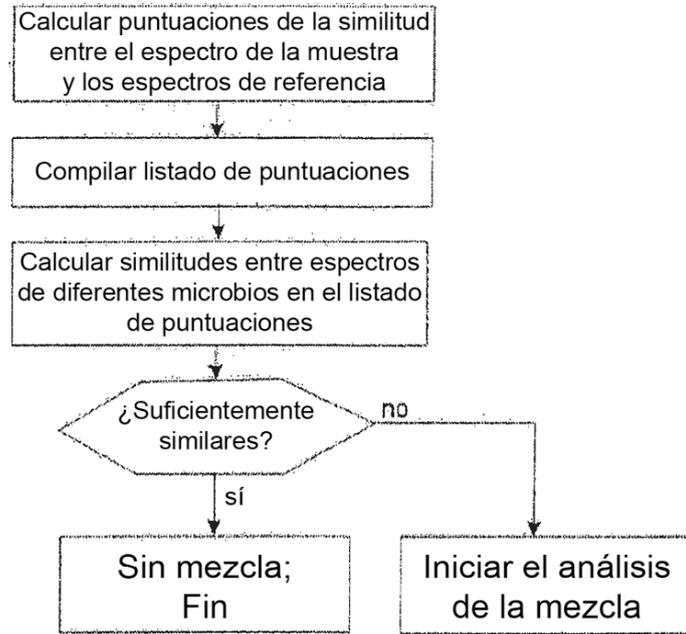


Figura 1

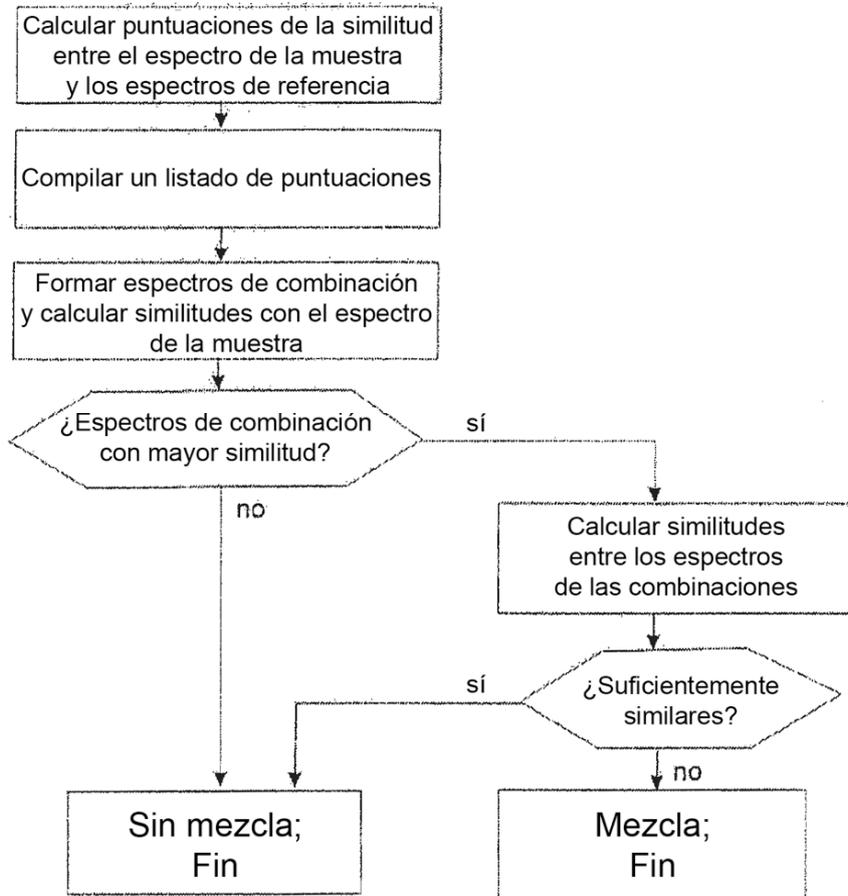


Figura 2