



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

## Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica

Juan Luis Muñoz Bellido<sup>a,b,c,\*</sup>, Silvia Vega Castaño<sup>a,b</sup>, Laura Ferreira<sup>c,d</sup>,  
Fernando Sánchez Juanes<sup>c,d</sup> y José Manuel González Buitrago<sup>c,d,e</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>c</sup> G.I.R. MICRAPE, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>d</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 2 de noviembre de 2011

Aceptado el 7 de noviembre de 2011

On-line el 28 de enero de 2012

#### Palabras clave:

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Identificación

Microbiología

### R E S U M E N

La espectrometría de masas (EM) *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF) se ha impuesto rápidamente en numerosos Servicios de Microbiología Clínica como un nuevo recurso tecnológico. Su utilidad en la identificación bacteriana está contrastada, aunque existen todavía dudas respecto a la identificación de grupos bacterianos concretos y de otros microorganismos, como los hongos filamentosos. Existen además otras diversas aplicaciones potenciales de esta tecnología en Microbiología Clínica, que están empezando a desarrollarse. En esta revisión se resumen los datos existentes respecto a la identificación de diferentes grupos de microorganismos, incluyendo aquellas que han planteado mayores problemas, como micobacterias, anaerobios y hongos filamentosos. Se analizan también sus aplicaciones en diagnóstico directo sobre muestra, su repercusión en la consideración como patógenos de diferentes microorganismos, y sus potenciales aplicaciones epidemiológicas. Finalmente, se resumen también los estudios existentes sobre su uso potencial en la determinación de sensibilidad a antimicrobianos, y su potencial utilización usando como sustrato amplificados génicos en lugar de extractos proteicos de los microorganismos.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Proteomic applications in the Clinical Microbiology laboratory

#### A B S T R A C T

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is rapidly becoming a new routine resource in Clinical Microbiology laboratories. Its usefulness for bacterial identification is now generally accepted, although there is still some reluctance as regards specific bacterial groups and some other microorganisms, such as moulds. There are other potential applications of this technology in Clinical Microbiology, which are beginning to be developed. A review is presented on the current data on the identification of microorganisms, including the most problematic groups, such as mycobacteria, anaerobic bacteria and moulds. We also analyse its applications for direct sample identification, its impact on pathogenic characteristics of microorganisms, and its potential epidemiological applications. Finally, we review the studies published on its applications for determining antimicrobial susceptibility, and its applications on amplicons, instead of microorganism protein extracts.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Introducción

Durante años, la identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología Clínica se ha venido llevando a cabo, de manera

rutinaria, de acuerdo a características fenotípicas de los microorganismos (morfología, estructura de la pared puesta de manifiesto mediante diferentes tinciones, capacidad del microorganismo para crecer en diferentes medios de cultivo y en distintas condiciones de atmósfera y temperatura, capacidad para degradar o utilizar mediante distintas vías bioquímicas sustratos diversos y, en algunos casos, características concretas de sensibilidad a ciertos antimicrobianos). Algunas de estas pruebas no han sufrido

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlmubel@usal.es (J.L. Muñoz Bellido).

una evolución tecnológica significativa en décadas. Otras han evolucionado en lo relativo a la miniaturización de las baterías de pruebas y la automatización de su realización y lectura, y han experimentado mejoras sensibles en lo relativo al tiempo de respuesta.

Sin embargo, la mayor parte de las técnicas microbiológicas convencionales continúan basándose en principios y pruebas que requieren el crecimiento del microorganismo, lo que hace que la identificación pueda retrasarse desde horas hasta varias semanas tras la recepción de la muestra. Por otra parte, estas técnicas tienen limitaciones evidentes en cuanto a su aplicabilidad y fiabilidad cuando se trata de microorganismos que crecen con dificultad, o no crecen en absoluto en medios de cultivo, o que muestran una actividad bioquímica muy limitada.

Hace ya años, se empezaron a desarrollar diferentes metodologías, basadas sobre todo en técnicas genéticas, dirigidas a salvar estas limitaciones. Estas técnicas han supuesto una aportación importante en algunos aspectos, como fiabilidad de la identificación y, en algunos casos, diagnóstico directo a partir de la muestra sin cultivo previo. Sin embargo, estas técnicas solo han conseguido hasta el momento imponerse a las técnicas clásicas en algunos casos, debido a diferentes problemas como complejidad técnica, disponibilidad solo para ciertos microorganismos y relación coste/beneficio. En conjunto, la irrupción de las técnicas genéticas ha tenido una repercusión muy importante en virología clínica, mientras en bacteriología, micología y parasitología esta repercusión ha sido, por el momento, menor.

### **Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF)**

La espectrometría de masas (EM), en sus distintas modalidades técnicas, ha sido una técnica muy utilizada para la identificación de moléculas en diferentes ramas de la ciencia durante buena parte del siglo XX. Hasta la década de 1990 las proteínas se habían resistido a su análisis por espectrometría de masas debido fundamentalmente a la dificultad de generar iones a partir de estas moléculas grandes no volátiles. A finales de los ochenta se presentaron dos métodos que permitirían la ionización de las proteínas. Estos eran la ionización por pulverización eléctrica (electrospray ionization, ESI) y la desabsorción/ionización por láser con ayuda de una matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI). A partir de ese momento la espectrometría de masas pudo utilizarse para estudios de proteínas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF. Se trata de un método que, mediante la aplicación de energía láser a una muestra embebida en una matriz, consigue vaporizar e ionizar esa matriz, que eventualmente puede arrastrar en esa vaporización e ionizar a su vez a una muestra representativa de las proteínas contenidas en la muestra. Esas proteínas ionizadas son sometidas a aceleración en un campo eléctrico y a una migración a través de un tubo de vacío hasta un detector. El tiempo que transcurre desde su vaporización/ionización hasta su detección dependerá del cociente masa/carga ( $m/z$ ) de esa proteína, y ese cociente  $m/z$  permitirá determinar la masa exacta de la proteína de manera extremadamente fiable. En el caso de los microorganismos, se genera de esta forma un perfil de proteínas con diferentes cocientes  $m/z$ , que se comporta como una huella dactilar, permitiendo identificar con gran fiabilidad al microorganismo a partir de dicho perfil.

### **Aplicación de la espectrometría de masas maldi-tof a la identificación de microorganismos**

La primera descripción del uso de la espectrometría de masas para la identificación bacteriana data de 1975. En aquella época el rango de masas estaba limitado a pequeñas moléculas, lo que

restringía las aplicaciones de la EM a lípidos bacterianos<sup>1-4</sup>. Las proteínas tienen un orden de magnitud mayor, y su análisis por EM tuvo que esperar a la llegada de las técnicas suaves de ionización como el MALDI. A partir de ese momento el MALDI-TOF comenzó a utilizarse en la identificación bacteriana por grupos de investigación. En el 2004, se describió la primera base de datos completa para la identificación bacteriana, basada en el análisis de moléculas de superficie, pero no fue bien acogida para ser utilizada como identificación rutinaria, ya que necesitaba una estandarización muy rigurosa debido a la variación de las proteínas de superficie. Sin embargo, el cambio de matriz permitió la ionización de proteínas, fundamentalmente ribosómicas, más conservadas que las anteriores, lo cual se consideró más adecuado para la identificación rutinaria de bacterias, ya que parecía que las condiciones de cultivo no variaban los resultados de la identificación. A partir de ese momento se desarrollaron sistemas comerciales con bases de datos y programas de manejo sencillo, empezando a usarse la EM MALDI-TOF como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana<sup>5</sup>. Se habían efectuado estudios parciales sobre su efectividad para la identificación de determinados microorganismos en condiciones controladas<sup>6-8</sup>, pero recientemente han empezado a aparecer numerosos trabajos relativos a su efectividad en la identificación de aislamientos clínicos, sometidos a esta prueba directamente desde los medios de cultivo rutinarios y sin condiciones especiales<sup>9</sup>.

### *Bacterias aerobias*

Los estudios disponibles sobre la identificación directa de microorganismos a partir del crecimiento en medios de cultivo habituales muestran excelentes resultados, con porcentajes de coincidencia con la identificación bioquímica convencional superiores al 90%. Estos altos niveles de correlación se dan tanto en gram positivos como en gram negativos. Por otra parte, cuando las discrepancias entre la EM y la identificación convencional se han comprobado mediante secuenciación del ARNr 16S, se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, esta técnica corroboraba los resultados ofrecidos por la EM MALDI-TOF. Así, uno de los primeros trabajos publicados con la tecnología disponible actualmente<sup>10</sup>, un estudio retrospectivo sobre 1.116 aislamientos clínicos y 108 cepas tipo, mostró un 93,5% de identificaciones correctas por MALDI-TOF para las cepas tipo, y un 95,2% para los aislamientos clínicos. Las identificaciones correctas estuvieron por encima del 90% en el caso de enterobacterias (95,5%), estafilococos (99,5%), enterococos (100%) y estreptococos (93,7%), mientras bajaron al 79,7% en bacilos gram negativos no fermentadores.

Los estudios prospectivos realizados a partir de ese momento sobre aislamientos obtenidos de muestras clínicas ofrecen cifras parecidas. Uno de los estudios que han tenido mayor trascendencia<sup>9</sup>, publicado en 2009 en *Clinical Infectious Diseases* y realizado sobre 1.660 aislamientos pertenecientes a 109 especies, muestra una eficacia en la identificación del 95,4% a nivel de género, y del 84,1% a nivel de especie. Un estudio publicado por Bizzini et al en 2010<sup>11</sup> sobre 1.371 aislamientos muestra un 98,5% de identificaciones correctas a nivel de género y un 93,2% a nivel de especie, con solo un 1,5% de identificaciones fallidas.

Un estudio publicado también en 2010 por Cherkaoui et al<sup>12</sup> sobre 720 aislamientos pertenecientes a 33 géneros, comparando dos sistemas comerciales (Bruker Daltonics y Shimadzu), mostró un 93,6% de identificaciones fiables a nivel de especie (score > 2,0) para el primer sistema y un 88,3% para el segundo, de las que un 99,1% fueron corroboradas mediante secuenciación de RNA 16S. Otro estudio publicado por Van Veen et al, también en 2010<sup>13</sup> sobre 980 aislamientos, muestra un 97,2% de correlación con la metodología convencional a nivel de género, y un 79,9% a nivel de especie. La mayor correlación a nivel de género o especie se obtuvo en

enterobacterias (97,7%), seguidas de estafilococos (94,3%), bacilos gram negativos no fermentadores (92%), estreptococos (84,8%) y, finalmente, del grupo *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella* (HACEK) con un 84%.

Otros estudios más reducidos publicados recientemente muestran resultados similares. Así, un estudio publicado por Risch et al<sup>14</sup> muestra una correlación entre MALDI-TOF y la identificación bioquímica convencional (Vitek, bioMérieux, Francia) del 88% en gram negativos y del 85% en gram positivos, pero no llega a discriminar entre ambos sistemas por una técnica de referencia como la secuenciación de rRNA 16S. Finalmente, un estudio reciente sobre 10.000 aislamientos publicado por Gravet et al<sup>15</sup> muestra una correlación a nivel de género y especie del 98,8%.

El estudio más amplio publicado hasta el momento en España<sup>16</sup> muestra una correlación del 100% a nivel de especie en una muestra de 65 gram positivos que incluye estreptococos, estafilococos, corinebacterias y *Listeria*, y una correlación del 87,7% a nivel de especie, y del 97,7% a nivel de género en una muestra de 229 gram negativos. En este caso tampoco se realizó estudio de rRNA 16S, con lo cual las discrepancias pueden deberse a error de cualquiera de los sistemas utilizados.

Como es evidente, no todos los grupos de microorganismos se identifican con la misma fiabilidad mediante EM MALDI-TOF. Los datos disponibles sugieren que se trata de un sistema extremadamente fiable en gram negativos fermentadores con algunas excepciones como la no discriminación entre *Escherichia* y *Shigella*, y bastante fiable en no fermentadores. Aunque los datos de diversos estudios muestran una correlación con los sistemas de identificación convencionales menor que en otros gram negativos, lo cierto es que esta discrepancia puede derivar de deficiencias en cualquiera de los dos sistemas. De hecho, un estudio publicado por Mellman et al en 2008<sup>17</sup> muestra que, en bacilos gram negativos no fermentadores, los resultados de MALDI-TOF se correlacionan con los obtenidos por secuenciación de rRNA 16S en más del 85% de los casos, una cifra sin duda superior a la que ofrecen los sistemas bioquímicos convencionales de identificación. La identificación en gram positivos aerobios es también bastante fiable, con la excepción de la frecuente confusión entre *Streptococcus pneumoniae* y otros estreptococos *viridans* (*S. mitis* fundamentalmente)<sup>18</sup>. En cuanto a otros grupos específicos como los microorganismos anaerobios o las micobacterias, los resultados son más heterogéneos.

#### Bacterias anaerobias

Ya en 2002, Shah et al auguraban que la EM MALDI-TOF iba a tener un impacto importante en el diagnóstico microbiano de los numerosos microorganismos anaerobios que crecen mal en los medios de cultivo habituales y son virtualmente inactivos en los sistemas de identificación convencionales<sup>19</sup>. Estudios aparecidos con posterioridad muestran buenos resultados en la identificación de *Clostridium* aunque, como es lógico, muy condicionados por la calidad de la biblioteca de espectros que se utilice como referencia<sup>20</sup>. Otro estudio reciente muestra asimismo buenos resultados en la identificación de especies de *Prevotella* aisladas de cuadros de periodontitis<sup>21</sup>. En un estudio más amplio sobre 270 aislamientos clínicos de bacterias anaerobias, el 97,5% fueron identificados de manera inequívoca (score > 2,00) por MALDI-TOF. Además, en 10 de los 11 aislamientos en que se observaron discrepancias con la identificación convencional, la secuenciación del rRNA 16S confirmó la identificación obtenida por MALDI-TOF<sup>22</sup>. Del mismo modo, otra publicación realizada en 2001 muestra un 95% de identificaciones correctas en cocos gram positivos anaerobios, en comparación con la secuenciación de rRNA 16S<sup>23</sup>.

Sin embargo, las publicaciones más recientes ofrecen resultados menos halagüeños. En un estudio comparativo de los dos sistemas

comerciales más difundidos (Bruker Daltonics y Shimadzu) sobre 79 aislamientos pertenecientes a 19 géneros, y usando como referencia la secuenciación de rRNA 16S, Shimadzu identificó correctamente el 71% de los aislamientos a nivel de género, y el 61% a nivel de especie. Bruker Daltonics obtuvo resultados inferiores, con un 61 y un 51%, respectivamente. No obstante, cuando el mismo estudio se realizó con una versión actualizada del software de Bruker Daltonics, los resultados se equipararon<sup>24</sup>. Otro estudio posterior, también publicado en 2011 sobre más de 500 aislamientos de bacterias anaerobias, muestra también porcentajes de identificación correcta del 61%<sup>25</sup>, y el estudio más reciente publicado hasta el momento muestra porcentajes similares (67% de identificaciones correctas con Bruker frente a 49% con Shimadzu)<sup>26</sup>. Estos estudios vienen de nuevo a incidir en la gran importancia de la amplitud y corrección de la base de datos para obtener buenos resultados con este sistema<sup>26</sup>. Otros autores coinciden en que la utilidad clínica de estos sistemas para la identificación de bacterias anaerobias pasa por una optimización de las bases de datos disponibles<sup>27</sup>. Probablemente las limitaciones de los métodos convencionales utilizados para la identificación de bacterias anaerobias han dado una visión erróneamente reducida de la variedad de especies anaerobias presentes en los diferentes nichos ecológicos. Como consecuencia, un número importante de aislamientos a los que por los métodos tradicionales se asignaba una identificación presuntamente fiable al presentar un comportamiento bioquímico similar al de especies conocidas, no se identifican por métodos más específicos, como MALDI-TOF, al no estar sus perfiles incluidos en las bases de datos. Esto es debido a que se trata, en realidad, de especies que se consideraban muy infrecuentes, o de especies totalmente nuevas. Así, en un estudio reciente<sup>25</sup> en que solo se identificaron el 61% de los aislamientos anaerobios por MALDI-TOF, el 39% se identificó mediante secuenciación de rRNA, hallándose entre ellas siete especies o géneros nuevos. Otro estudio reciente demuestra que, si se elaboran bases de datos de referencia amplias de los grupos fenotípicos basadas en una identificación inequívoca por secuenciación de rRNA 16S, los resultados posteriores de la EM MALDI-TOF en muestras clínicas mejoran sensiblemente<sup>23</sup>. Del mismo modo, un estudio reciente limitado al género *Bacteroides* muestra que la correlación con la secuenciación del rRNA 16S es mucho mayor en el caso de la EM MALDI-TOF que en el de la identificación bioquímica convencional, y que en la mayoría de los casos, las identificaciones erróneas derivan de la no inclusión de algunas especies descritas recientemente en las bases de datos<sup>28</sup>.

#### Micobacterias

Una de las áreas todavía menos exploradas es probablemente la de las micobacterias. El estudio más amplio disponible hasta el momento es el de Lotz et al<sup>29</sup>, realizado sobre 311 cepas pertenecientes a 31 especies y 4 complejos. El estudio compara la eficacia en la identificación a partir de Löwenstein-Jensen y de MGIT con un método directo (sin extracción), obteniendo un 97% de identificaciones correctas en el primero y un 77% en el segundo. No se produjo ningún error de identificación a nivel de género, pero las cepas pertenecientes a especies del complejo *tuberculosis* se identificaron solamente a nivel de complejo, siendo imposible su diferenciación a nivel de especie. Este resultado ha sido corroborado por un estudio posterior<sup>30</sup>, que también obtiene buenos resultados, pero en el que, al igual que en el estudio de Lotz et al<sup>29</sup>, las especies del complejo *tuberculosis* son identificadas solamente a nivel de complejo, pero no de especie. Del mismo modo, en este estudio, la EM MALDI-TOF no fue capaz de discriminar entre especies muy próximas como *M. abscessus*/*M. massiliense*, *M. mucogenicum*/*M. phocaicum*, y *M. chimaera*/*M. intracellulare*. Otro estudio más reciente, realizado mediante un protocolo de extracción desarrollado específicamente, que incluye inactivación por

calor, ruptura mecánica de la pared celular bacteriana y extracción de proteínas con acetonitrilo y ácido fórmico, permite obtener buenos perfiles proteicos a partir de cantidades pequeñas de bacterias ( $10^5$  UFC), y permitió identificar correctamente 87 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, 25 de *M. avium* y 12 de otras especies de micobacterias<sup>31</sup>.

#### Otros géneros y especies bacterianos

El espectro de bacterias susceptibles de identificación mediante este sistema, a priori, tiene muy pocas limitaciones, salvo que requiere al menos para su uso convencional crecimiento en un medio de cultivo, y que está muy vinculado a la amplitud y complejidad de las bases de datos de perfiles proteicos de referencia y el software utilizados. No obstante, puede presentar algunos problemas de especificidad entre géneros o especies muy próximos, como se ha descrito para *Shigella* y *Escherichia*<sup>32</sup>, *Streptococcus mitis* y *S. pneumoniae*<sup>18</sup>, o especies del género *Brucella*<sup>33</sup>, o especies muy próximas de micobacterias, como se ha mencionado en el apartado anterior<sup>30</sup>. Por lo demás, se ha demostrado su capacidad para identificar los géneros y especies más diversos, desde *Bacillus anthracis*<sup>34</sup> a *Listeria*<sup>35</sup>, *Brucella*<sup>33</sup>, el grupo HACEK<sup>36</sup>, *Nocardia*<sup>37</sup> o *Dermatophilus congolensis*<sup>38</sup>.

#### Hongos

Otro grupo con características particulares desde el punto de vista de la identificación son los hongos. En general, los datos disponibles muestran excelentes resultados respecto a la identificación de levaduras, mientras los resultados con hongos filamentosos son más irregulares.

Varios de los primeros estudios generales sobre identificación bacteriana introducen también grupos, en general pequeños, de aislamientos de levaduras, obteniendo buenos resultados. Así, Cherkaoui et al, en 2010, demuestran una eficacia del 95% en la identificación de especies del género *Candida*, aunque sobre un grupo de solo 24 aislamientos<sup>12</sup>. En un estudio del mismo tipo en el que se incluyen 61 aislamientos de levaduras, Van Veen et al obtienen un porcentaje de identificaciones correctas del 96,7% a nivel de género y del 85,2% a nivel de especie<sup>13</sup>.

Trabajos centrados más específicamente en levaduras y con mayor número de cepas muestran resultados similares. Así, un estudio sobre más de 200 aislamientos de 16 especies de levaduras mostró una exactitud en la identificación próxima al 100%, diferenciando además con gran exactitud *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*<sup>39</sup>. Otros estudios posteriores sobre mayor número de aislamientos ofrecen datos similares, con porcentajes de identificación correcta por encima del 95% y buena discriminación entre especies difíciles de diferenciar por otros métodos, como las referidas anteriormente o *C. glabrata* y *C. brachyensis*<sup>40–42</sup>. Los datos disponibles en nuestro laboratorio (datos no publicados) corroboran estos índices de eficacia en la identificación de levaduras. Solamente un estudio reciente refiere unos resultados algo peores, ya que entre 303 aislamientos clínicos de levaduras, 20 (6,6%) no fueron identificados por EM debido a carencias en la base de datos, y de 26 identificaciones discrepantes con Vitek-2, en 21 (6,9%) se consideró que la identificación mediante EM había sido errónea al comprobarlas por métodos genéticos<sup>43</sup>.

Existen muchos menos datos relativos a la identificación de hongos filamentosos. Aunque los primeros estudios sugerían unos resultados bastante aceptables<sup>44–47</sup>, existe la idea de que la fiabilidad de la EM MALDI-TOF en este grupo es sensiblemente menor. La heterogeneidad de los resultados obtenidos con hongos filamentosos probablemente se relaciona con los diferentes perfiles proteicos que muestran estos microorganismos en función de diferentes características del cultivo, como el tiempo o el propio medio

utilizado, y con la diferente composición proteica de las distintas partes del hongo<sup>48</sup>. Se ha sugerido una posible relación de esta situación con la inexistencia de protocolos optimizados para el procesamiento de estos microorganismos, de modo que protocolos más estrictos en cuanto a medios de cultivo, tiempos de incubación, etc. mejorarían los resultados. Sin embargo, el establecimiento de protocolos que obliguen a realizar subcultivos o a prolongar los tiempos de incubación, afectarían sensiblemente a una de las principales ventajas de esta tecnología, como es la posibilidad de identificar rápidamente desde la placa de cultivo primario. Por ello, probablemente tenga mayor interés la elaboración de bases de datos más complejas, que recojan mayor número de perfiles proteicos de cada especie en diferentes fases de cultivo.

De hecho, los estudios más recientes muestran que, cuando las bibliotecas de perfiles de referencia se elaboran usando colonias tanto jóvenes como maduras, los porcentajes de identificación correcta de *Aspergillus*, *Fusarium* y mucorales alcanzan valores superiores al 95%<sup>49</sup>. Asimismo, estudios recientes demuestran que añadiendo una base de datos suplementaria a la base de datos original y con algunos ajustes de los puntos de corte, la identificación de dermatofitos mejora muy significativamente (93 vs. 37,4% a nivel de género y 59,6 vs. 20,5% a nivel de especie)<sup>50</sup>.

#### Aspectos técnicos y relación beneficio/coste

Desde el punto de vista técnico, la incorporación de esta tecnología a la identificación rutinaria supone en muchos casos un aumento en la fiabilidad y en la rapidez de la misma, fundamentalmente cuando la identificación convencional depende de sistemas que requieren crecimiento del microorganismo, ya que este sistema permite la identificación en unos minutos. La mejora en tiempo y fiabilidad es relativamente modesta en aquellos casos en que la identificación convencional es aceptablemente rápida (18–24 horas como máximo) y fiable, lo cual es cierto que ocurre con buena parte de los patógenos más habituales. Supone, en cambio, una mejora importante en tiempo y fiabilidad cuando se trata de microorganismos en los que la identificación convencional requiere periodos de tiempo más largos, o cuando la fiabilidad de los métodos convencionales es menor. Ello afecta a un número no despreciable de especies, como numerosos bacilos gram negativos no fermentadores, bacilos gram positivos aerobios, bacterias anaerobias, y probablemente la mayor parte de las micobacterias, aunque con algunos de estos grupos la experiencia es todavía reducida.

Por otra parte, diferentes aportaciones técnicas van facilitando el procedimiento, ya inicialmente sencillo. Existen dos métodos de aplicación de la muestra: mediante extensión de la muestra directamente en la placa del espectrómetro de masas y adición sobre la misma de la matriz (aplicación directa), o mediante un paso previo de extracción proteica de la muestra con acetonitrilo y ácido fórmico. Hasta el momento, numerosos microorganismos se identificaban correctamente mediante el método de aplicación directa, mientras que los microorganismos más complejos (hongos, micobacterias, algunos anaerobios) requerían con frecuencia el paso de extracción, que aunque sencillo, introduce una complejidad algo mayor en la preparación de la muestra. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la simple adición de 1 ml de ácido fórmico a la muestra aplicada directamente en la placa mejora los resultados hasta cifras similares a las de la extracción convencional, simplificando de este modo este procedimiento cuando se considere necesario<sup>51</sup>.

En cuanto a la relación coste/beneficio, uno de los extremos más controvertidos ha sido el precio por identificación. Los equipos de EM tienen un coste de adquisición alto, pero en contrapartida el gasto en fungible es muy reducido. Otros sistemas de identificación, como es el caso de los sistemas de identificación bioquímica



automatizados, también requieren la amortización de uno u otro modo (compra, alquiler, etc.) de equipos costosos, y el gasto en fungible es sensiblemente mayor. Seng et al<sup>9</sup> han estimado que el coste de la identificación por MALDI-TOF (incluyendo consumibles, gastos de personal y amortización de equipos) estaría en torno al 25% del coste de la identificación bioquímica convencional (2,44 € frente a 4,6–13,9 €). Cherkaoui et al<sup>12</sup> llegan a una conclusión similar, cuando afirman que en su estudio sobre 720 aislados, el coste de la identificación por MALDI-TOF, incluyendo el de la reidentificación por métodos convencionales de los aislados que la EM MALDI-TOF no consiguió identificar, sería como media del 25% del coste de la identificación bioquímica sistemática de todos los aislados, y el tiempo requerido, en torno al 20%. Un estudio reciente muestra asimismo que el sistema es coste efectivo en la identificación de levaduras<sup>42</sup>. A ello hay que añadir otra serie de cuestiones quizá menores pero que, en conjunto, influyen de forma importante en el flujo y la carga de trabajo del personal técnico. Es el caso de los subcultivos frecuentemente necesarios para descartar enteropatógenos en coprocultivos, que con esta metodología pueden descartarse directamente a partir de una sola colonia, o los tipos respiratorios y aislamientos en bacterias anaerobias, que esta tecnología hace en muchos casos innecesarios.

### Identificación directa a partir de muestras clínicas

Un valor añadido, que podría convertirse en decisivo a la hora de propiciar la implantación definitiva de esta tecnología en los laboratorios de Microbiología Clínica, es su capacidad para la identificación de microorganismos directamente a partir de muestras biológicas o de hemocultivos.

#### Identificación directa en muestras de orina

Un estudio inicial comunicado al 19.º ECCMID mostraba que la EM MALDI-TOF era capaz de identificar microorganismos causantes de infección urinaria tras un paso de concentración de la orina<sup>52</sup>. No obstante, como afirma el grupo encabezado por Raoult et al<sup>53</sup>, este no parece un método práctico, dado el alto porcentaje de muestras negativas y el uso rutinario de otros métodos rápidos. Sin embargo, se ha demostrado que puede identificar con notable eficacia microorganismos causantes de infección urinaria directamente sobre muestras de orina siempre que los recuentos sean altos (por lo general,  $> 10^5$  UFC/mL)<sup>54</sup>, lo cual en combinación con métodos de cribado como los basados en citometría de flujo podría constituir una alternativa en el procesamiento de muestras de orina<sup>51</sup>.

#### Identificación directa en hemocultivos

La EM MALDI-TOF se ha mostrado capaz de identificar microorganismos causantes de bacteriemia directamente desde el hemocultivo, en el momento en que este es identificado como positivo por el sistema automatizado correspondiente, también con una alta fiabilidad<sup>55–59</sup>. Pese a que la identificación directa desde hemocultivo parece haber presentado algunas lagunas, como la identificación de algunos cocos gram positivos o la detección de candidemias, en algunos estudios<sup>58</sup>, otros muestran excelentes resultados también en estos aspectos<sup>60,61</sup>. Se trata de una aportación trascendente al manejo clínico de las bacteriemias, ya que puede permitir instaurar o modificar tratamientos con un conocimiento exacto del microorganismo implicado, minutos después de ser informado el hemocultivo como positivo. Ayuda a ello el hecho de que, aunque la sensibilidad es todavía mejorable para la identificación de algunas especies en estas circunstancias, la especificidad es excelente, de modo que cuando el sistema informa de la presencia de un determinado microorganismo con una puntuación suficiente, este dato es extremadamente fiable.

En este aspecto, los resultados, sobre todo en cuanto a sensibilidad, son variables debido en buena parte a que las metodologías propuestas para el procesamiento del hemocultivo, previamente a su introducción en el espectrómetro de masas, han sido múltiples (centrifugación, lisis con cloruro amónico, tubos con separador de suero, y últimamente sistemas comerciales suministrados por los propios fabricantes de los espectrómetros). Así, La Scola et al<sup>56</sup>, en un estudio sobre más de 500 hemocultivos, refieren la identificación correcta del 66% (91% de los gram negativos y 49% de los gram positivos), Prod'homme et al<sup>57</sup> refieren la identificación correcta del 79% (90% de los gram negativos y 73% de los gram positivos), si bien es cierto que sobre un número de hemocultivos muy inferior (122 hemocultivos) y Stevenson et al<sup>58</sup> refieren, en conjunto, el 76,4% de 212 hemocultivos positivos. Un estudio realizado por nuestro grupo<sup>59</sup> obtuvo una identificación coincidente con los métodos convencionales en gram negativos del 83,3% a nivel de especie, y del 96,6% a nivel de género. La correlación fue peor en gram positivos (31,8% a nivel de especie, 64,8% a nivel de género), sobre todo debido a la falta de correlación en la identificación a nivel de especie de los estafilococos no productores de coagulasa, y a los malos resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus*. De 18 fungemias detectadas por cultivo, solo una se detectó mediante MALDI-TOF. Sin embargo, Marinach-Patrice et al obtienen mejores resultados en la detección de fungemias<sup>60</sup>.

Ferroni et al<sup>61</sup>, mediante un método que solubiliza selectivamente las células hemáticas manteniendo intactas las membranas bacterianas, obtienen por encima del 90% de identificaciones correctas, tanto en bacteriemias como en candidemias, cifras similares a las referidas por otros autores<sup>62</sup>. Por su parte, Moussaoui et al<sup>63</sup>, en un estudio utilizando tubos con gel separador de suero, y solo 1,5 ml de hemocultivo, obtienen un 91% de identificaciones correctas a nivel de especie en gram negativos, y un 89% en gram positivos. Ha de tenerse en cuenta que también existen diferencias respecto a la interpretación de los *scores* obtenidos en hemocultivos, que pueden influir asimismo en los resultados. Mientras unos autores se ciñen a los *scores* convencionalmente aceptados de forma general (en el caso de Bruker Daltonics,  $\geq 2,00$  para identificación a nivel de especie,  $> 1,7$  para identificación a nivel de género), otros consideran puntos de corte más bajos (*scores* de 1,5, o incluso 1,3) cuando se obtienen repetidamente valores superiores a estos puntos de corte para la misma identificación en el mismo o distintos análisis<sup>56</sup>.

Algunos estudios han sugerido diferencias significativas en la eficacia de la identificación mediante EM MALDI-TOF entre los diferentes sistemas de hemocultivo disponibles comercialmente. Así, mientras la mayor parte de los estudios realizados usando el sistema BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU.) obtiene identificaciones correctas en más del 85% de los casos, algunos estudios realizados mediante el sistema BacT/Alert (bioMérieux, Francia) obtienen resultados muy inferiores, en torno al 30%<sup>64</sup>. Es cierto, no obstante, que son mucho más numerosos los estudios realizados con BACTEC, y que se requieren más estudios con el sistema BacT/ALERT para corroborar o no estos resultados. Un estudio reciente<sup>65</sup> que compara tres sistemas de hemocultivo (BACTEC, BacT/ALERT y VERSATREK (TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher, EE.UU.) muestra diferencias a favor de BACTEC (76,2 frente al 68,6% de VERSATREK y el 61,5% de BacT/ALERT), pero esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, otro estudio realizado recientemente en Alemania refiere de nuevo cifras muy superiores para BACTEC respecto a BacT/ALERT<sup>66</sup>. Así, en BACTEC en conjunto, la EM identificaría correctamente el 72% de los patógenos, frente al 45,6% de BacT/ALERT sin resinas, y al 23% de BacT/ALERT con resinas. Los resultados en gram negativos fueron del 86,6, 69,2 y 47,1%, respectivamente, pero la diferencia fue especialmente marcada en gram positivos con porcentajes de identificación correcta del 60,0, 28,8 y 5,4%, respectivamente.

Diversos estudios han ido simplificando la metodología. Un estudio realizado por nuestro grupo mostró recientemente que, en un 50% de los hemocultivos, la aplicación directa de la muestra ofrecía resultados muy similares a los obtenidos con extracción previa<sup>67</sup>. La Scola corrobora, en una revisión reciente, el potencial de estas técnicas simplificadas para el diagnóstico etiológico de la bacteriemia a partir del hemocultivo<sup>68</sup>.

Asimismo, recientemente se ha publicado un método basado en la lisis diferencial de las células hemáticas, y otro basado en el enriquecimiento de la muestra previamente a la espectrometría, que también mejorarían significativamente los resultados (> 85% de identificaciones correctas)<sup>69,70</sup>.

Finalmente, Bruker Daltonics ha comercializado un método de procesamiento específico para hemocultivos (MALDI Sepsityper<sup>R</sup> kit), que parece ofrecer buenos resultados con una identificación correcta del 100% a nivel de género tanto en gram positivos como en gram negativos, y una identificación correcta a nivel de especie del 91,4% en gram negativos y del 67,7% en gram positivos<sup>71</sup>. Asimismo, este sistema parece haber supuesto una mejora muy considerable en la identificación de levaduras directamente del hemocultivo. La única publicación disponible actualmente al respecto refleja que, en un estudio sobre 42 fungemias (28 *Candida albicans*, 8 *Candida parapsilosis*, 5 *Candida tropicalis* y 1 *Cryptococcus neoformans*), este método de procesamiento permitió la identificación del 100% de las levaduras a nivel de especie directamente del hemocultivo<sup>72</sup>.

Uno de los principales inconvenientes que se planteaban en relación con la identificación directa a partir de muestra era la imposibilidad de identificación cuando había más de un microorganismo implicado, ya que lo que aparecía era un perfil proteico no identificable, derivado de la superposición de los perfiles de los diferentes microorganismos implicados<sup>62</sup>, o identificaba en numerosos casos uno solo de los microorganismos<sup>63</sup>. Este puede constituir un problema de cierta relevancia, ya que estudios previos calculan en torno al 5% los hemocultivos en los que hay presente más de un microorganismo<sup>73,74</sup>. Esto parece haberse resuelto, al menos en parte, con el desarrollo de un nuevo software que es capaz de identificar las combinaciones de microorganismos que puedan generar los diferentes perfiles mixtos<sup>75</sup>, y que al parecer estará incluido en el software Biotyper 3.0 de Bruker Daltonics (M. Kostrzewa, comunicación personal).

#### Identificación directa en otro tipo de muestras

Existen pocos datos referentes a la identificación directa de microorganismos en otro tipo de muestras. Algún estudio inicial sugería la posibilidad de usarlo para la detección directa de bacterias causantes de meningitis con resultados aceptables<sup>76</sup>, pero estudios publicados con posterioridad no corroboran estos resultados<sup>77</sup>. Se trata, por otra parte, de una limitación previsible. La EM MALDI-TOF no es una técnica particularmente sensible, sino que necesita cantidades relativamente altas de microorganismos para obtener perfiles proteicos fiables. Los estudios realizados en muestras de infección urinaria demuestran que recuentos bacterianos inferiores a 60-70.000 UFC/mL repercuten de forma muy negativa en la posibilidad de identificación directa<sup>54</sup>, y se trata de recuentos muy superiores a los que aparecen habitualmente en la mayor parte de las meningitis y de otras infecciones de líquidos habitualmente estériles. Por tanto, *a priori*, no es previsible que sea un sistema útil, aplicado de manera directa, sobre muestras con cargas bacterianas reducidas.

#### Reevaluación de la prevalencia de patógenos conocidos y reconocimiento de nuevos patógenos

Un área en la que puede ejercer también una influencia notable esta tecnología, y en la que probablemente se ha hecho poco

hincapié hasta el momento, es la del reconocimiento de nuevos patógenos, o el cambio de consideración de algunas especies desde el punto de vista de su papel como patógenos.

Sobre todo en los primeros estudios, algunas discrepancias entre la EM y la identificación convencional derivaban de la incapacidad de la EM para diferenciar determinadas especies, o de la ausencia de algunas especies en las bases de datos del espectrómetro. Mientras las primeras limitaciones, con una notable trascendencia clínica, se mantienen en su mayor parte (identificación errónea de *Shigella* spp. como *E. coli*, identificación errónea de *S. mitis* como *S. pneumoniae*), las segundas se han ido haciendo menos frecuentes, a medida que las bases de datos se han ido ampliando en número de especies y número de espectros por especie. Actualmente, un porcentaje considerable de las discrepancias entre los métodos bioquímicos automatizados y la EM son debidas a que, bien por limitaciones de los métodos bioquímicos rutinarios para la identificación fiable de determinados géneros y especies (bacilos gram negativos no fermentadores, corinebacterias, bacterias anaerobias, etc.) o por insuficiencias o inexactitudes de sus bases de datos, algunos microorganismos se identifican simplemente a nivel de género, o si se hace a nivel de especie, es en muchas ocasiones con una fiabilidad relativa. Sin embargo, la disponibilidad de esta nueva metodología está permitiendo identificar con mayor fiabilidad estos aislamientos, lo cual está, en algunos casos, cambiando conceptos relativos al papel etiológico de diferentes microorganismos. Así, en el estudio de Mellmann et al<sup>17</sup> sobre 80 aislamientos clínicos de bacilos gram negativos no fermentadores obtenidos en diferentes centros de Estados Unidos en 2004, la EM MALDI-TOF identifica aislamientos de especies que difícilmente hubieran podido ser identificadas por la metodología convencional, como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas savastanoi* o *Pseudomonas monteilli*, todos ellos corroborados mediante secuenciación de rRNA 16S. En otros estudios<sup>11,16</sup> se identifican con relativa frecuencia aislamientos de especies (*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *P. monteilli*, *Pseudomonas corrugata*) que no se recogen en las bases de datos de algunos de los sistemas de identificación bioquímica más habituales, de modo que estos sistemas los informan a nivel de género, o los asimilan a especies con comportamientos bioquímicos similares (p.e. *asburiae* y *E. hormaechei* como *Enterobacter* spp. o *E. cloacae*, *P. monteilli* como *P. putida* o *P. fluorescens*). En otros casos, determinados géneros, pese a estar recogidos en las bases de datos de los sistemas de identificación bioquímica, en ocasiones no son capaces de identificarlos adecuadamente, de modo que se informa una identificación errónea (p.e. *Klebsiella* spp. en lugar de *Raoultella ornithinolytica*). Es cierto que en muchos casos, a la luz de los conocimientos actuales, se trata de diferencias con poca significación clínica<sup>14</sup>, desde luego menor que la de algunas de las carencias conocidas de la EM MALDI-TOF<sup>18</sup>, pero no cabe duda que una identificación más exacta es siempre deseable, y eventualmente puede llevarnos a cambiar los conceptos actuales sobre prevalencia y patogenidad de determinadas especies.

A las carencias conocidas derivadas de la similitud en los proteomas de algunos microorganismos, ya citadas, hay que añadir déficits con indudable repercusión clínica en nuestro medio, como son la ausencia de microorganismos como *Brucella*, *Francisella tularensis*, *B. anthracis* o ciertas especies de *Clostridium* toxigénicos, en algunas de las bases de datos utilizadas para la identificación de microorganismos por EM MALDI-TOF.

Esta posibilidad de identificación fiable de especies hasta ahora infrecuentemente identificadas, o incluso de nuevas especies, se hace aún más explícita en el caso de las bacterias anaerobias como han demostrado recientemente La Scola et al<sup>25</sup>. Un estudio reciente realizado por nuestro grupo confirma esta impresión, aunque también demuestra que las bases de datos no son todavía óptimas

en este área ya que, sobre 132 aislamientos de bacterias anaerobias estudiados, en los seis casos en que la EM MALDI-TOF no obtuvo una identificación fiable, se debía a que la especie, identificada posteriormente por secuenciación de rRNA 16S (2 *Bacteroides cellulosilyticus*, 1 *Negativicoccus succinivorans*, 1 *Olsenella* spp., 2 *Bacteroides ureolyticus*) no estaban incluidas en dichas bases de datos<sup>78</sup>. Algo similar ocurre con algunas especies de levaduras, como es el caso del grupo *Candida ortho- meta- y parapsilosis*, indistinguibles mediante la metodología bioquímica convencional, y que son en cambio diferenciadas con gran exactitud con esta metodología<sup>79</sup>.

La disponibilidad en un número amplio de centros de equipos que puedan identificar con fiabilidad todo este espectro de microorganismos de forma rutinaria puede, a medio plazo, obligarnos a modificar conceptos sobre patogenidad y frecuencia de algunas de ellas.

### Otras aplicaciones

Las posibilidades de la EM MALDI-TOF en Microbiología Clínica no se ciñen a la mera identificación, área en la que esa utilidad está ya contrastada. Estudios recientes abren nuevas perspectivas sobre su utilidad en otras áreas.

Un área en la que está empezando a ser aplicada es la de los estudios epidemiológicos. Con frecuencia, el perfil proteico que generan los microorganismos es más complejo que lo que el *software* desarrollado por los diferentes fabricantes necesita para llevar a cabo la identificación. Existirían así una serie de picos característicos de género o de especie, que podríamos denominar *perfil primario*, y que serían los principalmente valorados de cara a la identificación. Existirían además una serie de picos secundarios, más variables dentro de la especie, con lo que su utilidad para la identificación es menor, pero que podrían configurar un *perfil secundario*, cuya similitud fuera paralela a la proximidad genética de los microorganismos. Ello permitiría establecer niveles de proximidad entre los aislamientos equiparables a los que se establecen actualmente mediante diferentes técnicas genéticas (REP-PCR, PFGE, etc.). El planteamiento es atractivo ya que, de ofrecer resultados similares, se trataría de un método significativamente más rápido y barato que las técnicas genéticas vigentes. No obstante, se trata de un área en la que casi todo se mueve aun en el terreno de la hipótesis, ya que hay pocos estudios contrastados que lo avalen.

Entre 2000 y 2005 se publicaron varios trabajos que sugerían la posibilidad de diferenciar *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina mediante EM MALDI-TOF, e incluso de subtiparlos<sup>80–82</sup>. Sin embargo, no se han realizado trabajos posteriores con la metodología actual, que corroboren estos resultados y, sobre todo, que comparen los datos de proximidad entre aislamientos con los obtenidos por las técnicas genéticas de referencia. Del mismo modo, algunos autores han sido capaces de subtipar aislamientos de *S. pneumoniae* en función de diferencias en los perfiles proteicos<sup>83</sup>.

Del mismo modo Barbuddhe et al<sup>35</sup>, en 2008, demuestran no solo la eficacia de la EM MALDI-TOF para la identificación de 146 aislamientos de *Listeria*, sino que es capaz de establecer un subtipado completamente superponible al que se obtenía mediante PFGE.

Existen también algunos datos relativos a *Salmonella*. En 2003, Leuschner et al<sup>84</sup> publican un estudio en el que, mediante EM-MALDI-TOF, son capaces de encontrar en 22 aislamientos de *Salmonella* pertenecientes a seis serotipos, perfiles específicos para los seis serovars estudiados (Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Hadar, Derby y Anatum). Posteriormente, Dieckmann et al<sup>85</sup> han sido capaces de clasificar 126 aislamientos de *Salmonella*, mediante MALDI-TOF, a nivel de subespecie. No deja de ser llamativo que estos autores consigan estos resultados con *Salmonella*, que es precisamente una de las enterobacterias que presentan mayores

limitaciones para su identificación por EM-MALDI-TOF usando los parámetros convencionales de EM, sobre todo en cuanto a tamaño de proteínas detectadas (2–20 kDa). Usando estos parámetros, se consigue una identificación muy fiable a nivel de género, pero la identificación por debajo de este nivel es muy poco fiable<sup>16</sup>. Estos autores establecen unos parámetros definidos de forma específica para su estudio, obteniendo unos perfiles proteicos más complejos. Probablemente este sea uno de los campos en que queda más trabajo por desarrollar. Es previsible que los parámetros que se usan para identificación sean útiles solamente en este aspecto, pero los estudios epidemiológicos requerirán del establecimiento de parámetros específicos, que abarquen mayores rangos de peso molecular y generen perfiles proteicos más complejos y con mayor capacidad de discriminación.

Existe también algún estudio que sugiere la posible aplicación de la espectrometría de masas al diagnóstico de enfermedades infecciosas, pero no a través de la identificación del microorganismo, sino a través de alteraciones generadas en la composición proteica de diferentes fluidos. Así, un estudio reciente sugiere la posibilidad de diagnóstico de la infección por *H. pylori* a través del estudio por EM-MALDI-TOF del peptidoma urinario. El peptidoma urinario de pacientes infectados por *H. pylori* presentaba dos proteínas con m/z de 6788 y 1912. Mientras la primera no pudo ser identificada, la segunda correspondía a una fracción de fibrinógeno que, por motivos no aclarados, está aumentada en la infección por *H. pylori*<sup>86</sup>.

Otro campo en que se han sugerido aplicaciones de la EM MALDI-TOF es el de la detección de factores de patogenidad. Algunos estudios han demostrado la existencia de picos masa/carga en algunos perfiles que podrían relacionarse con la presencia de algunos de estos factores. Así, un estudio sobre más de 200 *S. aureus* productores de proteína de Pantón-Valentine, y un número similar de cepas no productoras, ha sugerido la asociación entre la aparición de un pico m/z de 4.448 Da y la producción de dicha leucocidina, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90,6%<sup>87</sup>. Sin embargo, estudios posteriores desmienten esta asociación<sup>88</sup>.

Uno de los campos en los que más actividad se ha registrado en los últimos meses es el de la detección de la resistencia a antimicrobianos. Se trata de un área en la que, desde el punto de vista teórico, la utilidad de la EM-MALDI-TOF se veía inicialmente problemática, ya que la obtención de un volumen de información con trascendencia clínica equiparable al que se obtiene con un antibiograma convencional tenía, *a priori*, grandes dificultades. Requeriría la detección de numerosísimas proteínas, con muy diferentes localizaciones dentro de la estructura bacteriana, producidas en cantidades muy variables y con un espectro de peso molecular muy amplio, pero en el que al mismo tiempo, pequeñas diferencias de peso molecular, asociadas a variaciones en un solo aminoácido, podrían generar perfiles de resistencia radicalmente distintos.

No obstante, ya hace algunos años aparecieron estudios que sugerían que la EM MALDI-TOF podía permitir detectar la resistencia a meticilina en *S. aureus*<sup>89–92</sup>. Sin embargo, se trataba de estudios con metodologías heterogéneas, bajo número de cepas, y esta capacidad de discriminación no terminó de quedar demostrada. Algún estudio reciente vuelve a sugerir esta posibilidad<sup>93</sup>, pero vuelve a tratarse de estudios con un número de cepas excesivamente corto (23 *S. aureus* sensibles a meticilina [MSSA] y 11 resistentes [MRSA] en este caso), por lo que los resultados son todavía escasamente fiables. Dada su trascendencia clínica y epidemiológica, la posibilidad de discriminar con fiabilidad entre cepas de MSSA y MRSA, en especial si fuera posible hacerlo directamente en hemocultivos, resulta enormemente atractiva, pero se requieren estudios prospectivos mucho más amplios, que establezcan una metodología bien estandarizada y determinen la sensibilidad y especificidad del método, y la posibilidad de que desplace al menos en parte a los métodos actualmente aceptados.



Algunos artículos recientes avalan la posibilidad de usar la EM MALDI-TOF para diferenciar entre *Bacteroides fragilis* portadores y no portadores del gen *cfiA*, que codifica una carbapenemasa de clase B (metalo  $\beta$ -lactamasa), basándose en que las cepas productoras y no productoras son genotípicamente distintas<sup>94,95</sup>. Sin embargo, en este caso no se trata de estudios de sensibilidad propiamente dichos, puesto que lo que permite la EM es deducir la presencia o no de este gen a partir de la pertenencia de la cepa a una u otra división, que tienen huellas proteómicas distintas.

Los estudios de sensibilidad propiamente dichos están empezando a ponerse en marcha con otra estrategia. Aunque algunos estudios iniciales parecían detectar la presencia de la  $\beta$ -lactamasa en el perfil proteico como un pico m/z de en torno a 26-27.000<sup>96</sup>, en general, lo que se busca es la huella proteómica derivada de la hidrólisis de antimicrobiano, que será distinta de la que deja el antimicrobiano intacto, y por tanto revela la existencia de enzimas capaces de producir esta hidrólisis<sup>97</sup>. Así, un estudio publicado este mismo año encuentra que este método es capaz de detectar la producción de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* con una sensibilidad y especificidad superiores al 95%<sup>98</sup>.

En relación con los estudios de sensibilidad a antifúngicos, también Marinach et al<sup>99</sup> proponen en 2009 una metodología para determinar la sensibilidad de *C. albicans* a fluconazol, basándose en el espectro generado por el microorganismo creciendo a diferentes concentraciones de antifúngico.

Además, se han ideado otras estrategias sobre las que están apareciendo diferentes estudios. Diversos estudios están empezando a plantear la utilización de la EM MALDI-TOF pero no sobre péptidos, sino sobre fragmentos genómicos y sobre amplificados con dos aplicaciones:

Como método de identificar mutaciones asociados a resistencia a antimicrobianos

Como método de tipado con una fiabilidad aparentemente muy alta.

Ya hace algunos años se empezó a usar este planteamiento en diversos aspectos diagnósticos, tanto en bacteriología como en virología. Así, en 2005, algunos autores, mediante polimorfismo de nucleótidos simples y EM MALDI-TOF, consiguen caracterizar mutaciones en las subunidades A de las topoisomerasas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a fluoroquinolonas con una excelente correlación con los métodos de secuenciación<sup>100</sup> y en 2007, con una metodología similar identifican mutaciones asociadas a resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*<sup>101</sup>. En 2006 se usó asimismo la combinación de amplificación y MALDI-TOF para caracterizar BLEEs del grupo SHV, aparentemente con buenos resultados<sup>102</sup>. Varios estudios publicados entre 2004 y 2006 demostraron asimismo que la EM MALDI-TOF de amplificados permitía detectar mutantes YMDD, resistentes a lamivudina, del virus de la hepatitis B, tanto cuando constituían una población mayoritaria como cuando constituían subpoblaciones tan reducidas como un 5%, dentro de una población mixta<sup>103–105</sup>. Posteriormente, un estudio de 2010 parece confirmar los estudios preliminares para detectar mutaciones asociadas a resistencia en *S. pneumoniae*, en este caso en relación con mutaciones en las PBP<sup>106</sup>.

En este aspecto del uso de la EM MALDI-TOF no sobre proteínas, sino sobre fragmentos genómicos o sobre amplificados, la tecnología más desarrollada en este momento es la basada en el polimorfismo de nucleótidos simples (single-nucleotide polymorphisms, SNP), determinado a través de un método de extensión de base simple (single-base extension) combinada con EM MALDI-TOF (iPLEX Gold, Sequenom, San Diego [CA], EE.UU.). Se trata de un método que, mediante PCR múltiple, amplifica determinadas áreas del genoma que pueden presentar polimorfismos y determinados genes binarios, analizando después el conjunto de amplificados obtenidos y su tamaño mediante MALDI-TOF. Este método se ha demostrado en estudios recientes como un método prometedor

para el tipado de MRSA<sup>107</sup> y para la identificación y tipado epidemiológico de *Mycobacterium tuberculosis* complex.<sup>108</sup>, así como para detección de mutaciones asociadas a resistencia a antiviricos en virus de la hepatitis B<sup>109</sup> y para la detección de variantes del virus con una alta sensibilidad<sup>110</sup>.

## Conclusiones

La EM, por sus características de rapidez y fiabilidad, está llamada a convertirse en una técnica básica de identificación bacteriana y micológica en los laboratorios de Microbiología Clínica, desplazando en una parte muy importante a las técnicas rutinarias actuales. Aunque las técnicas genéticas probablemente sigan siendo la referencia, su uso se verá reducido en el aspecto de la identificación a partir de colonia a las muestras en las que no se consiga una identificación fiable mediante EM. Aunque se ha discutido mucho sobre la capacidad de esta técnica para identificar determinados grupos de microorganismos (bacterias anaerobias, hongos filamentosos), cada vez existen menos dudas respecto a que el problema principal, en estos casos, deriva fundamentalmente de carencias en las bases de datos, y no se debe a limitaciones de la EM para generar espectros proteicos característicos. Estas limitaciones, en general, se van subsanando con rapidez.

La aplicación de la EM MALDI-TOF sobre muestra directa, hoy por hoy, se restringe fundamentalmente a los hemocultivos positivos en los que, una vez se va estableciendo un protocolo homogéneo, los resultados son muy positivos. Su uso en orina, aunque factible en orinas con alto recuento bacteriano, probablemente va a ser más difícil de integrar en la rutina del laboratorio al menos a corto plazo.

Sin embargo, otras aplicaciones se van abriendo paso. Así, su uso en epidemiología, como alternativa a la epidemiología molecular, es muy prometedor, y se empiezan a plantear alternativas para determinar la producción de factores de patogenicidad y orientar la sensibilidad a los antimicrobianos aunque, sobre todo en este último caso, estamos probablemente todavía lejos de que esta tecnología pueda desplazar a los métodos actuales.

Por último, la tecnología que asocia diferentes métodos de amplificación génica y miniselección a la EM MALDI-TOF empieza a mostrarse como una tecnología prometedora en diversos aspectos del diagnóstico microbiológico, incluido un campo, como el de la virología, que hasta ahora le estaba prácticamente vetado.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219–25.
2. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10:1227–32.
3. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10:1992–6.
4. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass 253 spectrometry and protein database searches. Anal Chem. 1999;71:2732–8.
5. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom Rev. 2001;20:157–71.
6. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol. 2000;49:295–300.
7. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 2004;76:5769–76.



8. Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:267–73.
9. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49:543–51.
10. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab.* 2009;55:289–96.
11. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1549–54.
12. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two MALDI-TOF mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1169–75.
13. Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010;48:900–7.
14. Risch M, Radjenovic D, Han JN, Wydler M, Nydegger U, Risch L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly.* 2010 Sep 24;140:w13095.
15. Gravet A, Camdessouens-Miehé G, Gessier M, Peluso AR, Vogelsperger-Fuchs B, Lohmann C, et al. The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. *Pathol Biol (Paris).* 2011;59:19–25.
16. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz MC, et al. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:492–7.
17. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1946–54.
18. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, Filimonova AV, Ilina EN, Dubovickaya VA, et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol.* 2011 Jul 21 [Epub ahead of print].
19. Shah HN, Keys CJ, Schmid O, Gharbia SE. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin Infect Dis.* 2002 Sep 1;35 Suppl 1: S58–64.
20. Grosse-Herrenthey A, Maier T, Gessler F, Schaumann R, Böhnel H, Kostrzewa M, et al. Challenging the problem of clonal identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe.* 2008;14:242–9.
21. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:372–6.
22. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M, ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15: 796–802.
23. Veloo AC, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34:58–62.
24. Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jan 17, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03467.x. [Epub ahead of print].
25. La Scola B, Fournier PE, Raoult D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe.* 2011;17:106–12.
26. Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, et al. Species Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *J Clin Microbiol.* 2011 Oct 12 [Epub ahead of print].
27. Veloo AC, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe.* 2011;17:211–2.
28. Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Gómez M, Picazo JJ. Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe.* 2011 Sep 22, doi:10.1016/j.anaerobe.2011.09.005. [Epub ahead of print].
29. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbone E, Guet-Revillet H, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4481–6.
30. 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.
31. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. *PLoS One.* 2011;6:e24720.
32. He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tang YW. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3888–92.
33. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One.* 2010 Dec 6;5:e14235.
34. Lasch P, Beyer W, Nattermann H, Stämmler M, Siegbrecht E, Grunow R, et al. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:7229–42.
35. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:5402–7.
36. Couturier MR, Mehincovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1104–6.
37. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4015–21.
38. Porras MI, Cañueto J, Ferreira L, García MI. Human dermatophilosis. First description in Spain and diagnosis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:747–8.
39. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2912–7.
40. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1359–65.
41. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3482–6.
42. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol.* 2011;9:1614–6.
43. Putignani L, Del Chierico F, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst.* 2011;7:620–9.
44. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, et al. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Anal Biochem.* 2008;380:276–81.
45. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, et al. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22:2555–60.
46. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gené J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:634–42.
47. Erhard M, Hippler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wostemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol.* 2008;17:356–61.
48. Santos C, Paterson RR, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol.* 2010;108:375–85.
49. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jul 27, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x. [Epub ahead of print].
50. Theel ES, Hall L, Mandrek J, Wengenack NL. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011 Sep 28 [Epub ahead of print].
51. Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M, Wilks M. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3441.
52. Borovskaya A, Ilina E, Govorun V. Bacterial species identification directly from urine samples by MALDI-TOF MS fingerprinting. Abstract number: P1065. En: 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2009.
53. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010;5:1733–54.
54. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110–5.

55. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:1620–5.
56. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2009;4:e8041.
57. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1481–3.
58. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:444–7.
59. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:546–51.
60. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One*. 2010 Jan 25;5:e8862.
61. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1542–8.
62. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1584–91.
63. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:1631–8.
64. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT(bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect*. 2011;1:192–5.
65. Romero-Gómez MP, Mingorance J. The effect of the blood culture bottle type in the rate of direct identification from positive cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Infect*. 2011;6:251–3.
66. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jun 23. doi:10.1007/s10096-011-1312-0. [Epub ahead of print].
67. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1007–10.
68. La Scola B. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11:287–98.
69. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. Novel, Improved Sample Preparation for Rapid, Direct Identification from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *J Mol Diagn*. 2011 Aug 31 [Epub ahead of print].
70. Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T, Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25:2247–9.
71. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption/ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011;6:e23285.
72. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption/ionization Biotyper system. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2528–32.
73. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJHM, Wolfhagen MJHM. Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol*. 2004;42:7–11.
74. Jordan JA, Jones-Laughner J, Durso MB. Utility of pyrosequencing in identifying bacteria directly from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2009;47:368–72.
75. Wenzel T, Kleppler S, Maier T, Stumpf S, Wegemann B, Kostrzewa M. Automated detection of mixed cultures of microorganisms by using MALDI-TOF MS. En: 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010. p. P-1783.
76. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Böcher S, Damkjær Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis*. 2010;42:716–8.
77. Bjørnholt V, Nilsen SM, Noorland I, Wigemyr M, Løken CH, Müller CS, et al. MALDI-TOF mass spectrometry ID of bacteria directly from cerebrospinal fluid-what you see is what you get. En: 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011. p. O-345.
78. Vega Castaño S, Ferreira L, González Ávila M, Sánchez Juanes F, García García MI, Rodríguez S, et al. Identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. En: 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011. p. R-2486.
79. Martínez-Lamas L, Pérez Del Molino ML, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of *Candida non-albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:568–72.
80. Edwards-Jones V, Claydon M, Evason D. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2000;49:295–300.
81. Walker J, Fox A, Edwards-Jones V, Gordon D. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods*. 2002;48:117–26.
82. Jackson K, Edwards-Jones V, Sutton C, Fox A. Optimization of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*. 2005;62:273–84.
83. Williamson Y, Moura H, Woolfitt A. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:5891–7.
84. Leuschner RKG, Beresford-Jones N, Robinson C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol*. 2003;38:24–31.
85. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole cell matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:7767–78.
86. Xiao D, Meng FL, He LH, Gu YX, Zhang JZ. Analysis of the urinary peptidome associated with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2011;17:618–24.
87. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM. MALDI-TOF MS for rapid detection of 351 staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:467–70.
88. Szabados F, Becker K, von Eiff C, Kaase M, Gatermann S. The matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:58–63.
89. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2000;49:295–300.
90. Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods*. 2002;48:117–26.
91. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74:5487–91.
92. Majcherzyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;255:233–9.
93. Sun Z, Zhang W, Chen X. Rapid method study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2011;40:375–8.
94. Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M, et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1961–4.
95. Nagy E, Becker S, Söki J, Urbán E, Kostzka M. Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2011;60:1584–90.
96. Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:1633–88.
97. Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van Belkum A, Goessens WH, Luidert TM. Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2011 Oct 21 [Epub ahead of print].
98. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudáková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3222–7.
99. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of 348 pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*. 2009;9:4627–31.
100. Vereshchagin VA, Il'ina EN, Zubkov MM, Pripitnevich TV, Kubanova AA, Govorun VM. Detection of fluoroquinolone resistance SNPs in *gyrA* and *parC* genes of *Neisseria gonorrhoeae* using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Mol Biol (Mosk)*. 2005;9:923–32.
101. Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM, Filimonova Olu, Grudina SA, et al. MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Antibiot Khimioter*. 2007;52:10–7.
102. Stürenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, et al. Detection and genotyping of SHV  $\beta$ -lactamase

- variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro-generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol.* 2006;44:909–15.
103. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol.* 2004;40:837–44.
104. Kim HS, Han KH, Ahn SH, Kim EO, Chang HY, Moon MS, et al. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther.* 2005;10:441–9.
105. Ding C, Wong VW, Chow KC, Chan HY, Hui AY, Wong GL, et al. Quantitative subtyping of hepatitis B virus reveals complex dynamics of YMDD motif mutants development during long-term lamivudine therapy. *Antivir Ther.* 2006;11:1041–9.
106. Savinova TA, Il'ina EN, Sidorenko SV. A mass-spectrometric analysis of genetic markers of *S. pneumoniae* resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2010;3:16–25.
107. Syrmis MW, Moser RJ, Whitley DM, Vaska V, Coombs GW, Nissen MD, et al. Comparison of a multiplexed MassARRAY system with real-time allele-specific PCR technology for genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Mar 23 [Epub ahead of print].
108. Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3292–9.
109. Zhou BP, Zhang HM, Li XH, Yuan J, Li W, Xu LM, et al. High throughput detection of drug-resistance gene mutations in HBV using MALDI-TOF mass spectrometry. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2008;22:351–3.
110. Luan J, Yuan J, Li X, Jin S, Yu L, Liao M, et al. Multiplex detection of 60 hepatitis B virus variants by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55:1503–9.