



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Aplicación de la espectrometría de masas en micología

Inmaculada Quiles Melero^a, Teresa Peláez^b, Antonio Rezusta López^c y Julio García-Rodríguez^{a,*}

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

^bServicio de Microbiología, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^cServicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

RESUMEN

Palabras clave:

Micología
MALDI-TOF
Hongos
Identificación

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se está convirtiendo en esencial en la mayoría de los laboratorios de micología clínica. En la actualidad, según un "perfil fúngico" característico, ya sea obtenido a partir de células intactas o mediante unos protocolos de extracción rápidos y reproducibles, la EM MALDI-TOF permite identificar hongos patógenos con un alto poder discriminatorio. Este hecho acorta enormemente los tiempos de respuesta y mejora el diagnóstico del laboratorio de micología clínica, optimizando la detección de las micosis. Esta revisión describe el estado actual del uso de EM MALDI-TOF para la detección en el laboratorio clínico de hongos patógenos humanos y presenta una perspectiva de las futuras aplicaciones de esta tecnología relativamente reciente, que está destinada a mejorar todavía más el diagnóstico micológico de rutina.

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

Application of mass spectrometry in mycology

ABSTRACT

Keywords:

Mycology
MALDI-TOF
Fungi
Identification

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) mass spectrometry (MS) is becoming an essential tool in most microbiology laboratories. At present, by using a characteristic fungal profile obtained from whole cells or through simple extraction protocols, MALDI-TOF MS allows the identification of pathogenic fungi with a high performance potential. This methodology decreases the laboratory turnaround time, optimizing the detection of mycoses. This article describes the state-of-the-art of the use of MALDI-TOF MS for the detection of human clinical fungal pathogens in the laboratory and discusses the future applications of this technology, which will further improve routine mycological diagnosis.

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

Introducción

La espectrometría de masas (EM) en su formato MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) aplicada al diagnóstico, ha provocado una revolución en los laboratorios de microbiología clínica¹ aportando rapidez y seguridad en las identificaciones microbiológicas de los aislamientos clínicos.

Las infecciones fúngicas más graves suelen producirse en pacientes especialmente susceptibles, como los inmunodeprimidos o los

pacientes críticos. El diagnóstico rápido y la instauración precoz de una terapia antifúngica adecuada son capitales para el pronóstico de dichos pacientes². Tradicionalmente, la identificación de las especies aisladas se realiza mediante estudios enzimáticos, bioquímicos y morfológicos (si se trata de levaduras) o mediante estudios fundamentalmente morfológicos en el caso de los hongos filamentosos³. En general estos procedimientos requieren subcultivos o pruebas bioquímicas que pueden retrasar el resultado microbiológico en más de 24 h desde el aislamiento del patógeno. Recientemente, las técnicas de biología molecular han facilitado la identificación rápida de las especies más frecuentemente aisladas en clínica^{4,5}. Sin embargo, estas técnicas exigen conocimientos en biología molecular junto a infraestructuras adecuadas, al no existir sistemas comerciales sencillos que permitan su utilización en la rutina clínica diaria.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juliogarciarodriguez@gmail.com (J. García-Rodríguez).

La rapidez, seguridad y sencillez de los procedimientos que ofrece MALDI-TOF en la identificación microbiana lo convierten en la herramienta ideal en el contexto clínico. Se ha utilizado con gran éxito en la identificación de levaduras^{6,7}, hongos filamentosos⁸, dermatofitos⁹, etc.

A continuación, se revisarán las ventajas y limitaciones de la EM en la identificación de las principales especies clínicas, así como otras aplicaciones de gran interés en el campo de la micología y su posible utilidad en los estudios de tipificación poblacional y en estudios de sensibilidad a los principales antifúngicos.

Identificación de levaduras

Una de las áreas donde MALDI-TOF está obteniendo mejor rendimiento es en la identificación de levaduras relacionadas con patología humana. La EM se viene utilizando desde hace más de 15 años en la identificación de levaduras o de proteínas específicas expresadas por estas¹⁰. Incluso ha mostrado ser una herramienta muy útil a la hora de buscar nuevos antígenos proteicos que podrían seleccionarse como biomarcadores de candidiasis sistémica. Pitarch et al¹¹ encontraron hasta 35 posibles marcadores antigénicos en *Candida albicans* que podrían emplearse potencialmente en el diagnóstico y el manejo de candidiasis sistémicas. Posteriormente, la aparición de sistemas MALDI-TOF comerciales específicamente preparados para su uso en la identificación microbiana rutinaria ha generado una verdadera avalancha de estudios clínicos que confirman su utilidad.

En la mayoría de los estudios realizados se compara con métodos bioquímicos convencionales y se utiliza la secuenciación de regiones específicas para resolver las discrepancias. Los 2 principales sistemas comercializados —MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Alemania) y VITEK MS (bioMérieux)— ofrecen muy buenos resultados, aunque estos varían en función del método de extracción proteica empleado, la librería de espectros utilizada como referencia y el punto de corte elegido para considerar correcta una identificación. Otras variables que también pueden afectar al rendimiento de la EM están relacionadas con las condiciones de crecimiento de las cepas, como el tiempo de incubación y los medios de cultivo utilizados.

El método de extracción de las proteínas parece esencial a la hora de obtener buenos resultados. El método simplificado que se emplea en la identificación bacteriana¹² se muestra insuficiente ante la rigidez de la pared fúngica, por lo que los distintos fabricantes recomiendan diferentes sistemas de extracción más o menos simples¹³. Este es un paso crítico, especialmente en el sistema de Bruker ya que algunos estudios han demostrado que la extensión directa de la colonia sobre la placa sin pretratamiento solo alcanza a identificar el 10% de los aislamientos⁵. Existen diferentes protocolos utilizados. El más simple consiste en agregar una pequeña cantidad de ácido fórmico (25-70%) sobre la colonia extendida en la placa de MALDI-TOF antes de añadir la matriz. Este sistema conocido como “extracción simplificada” es el de elección en VITEK MS¹⁴. Otros protocolos más completos incluyen un primer paso de inactivación de la levadura con etanol que además reduce la agregación celular e incrementa significativamente la calidad del espectro, y un segundo paso con la lisis celular mediante ácido fórmico al 70% seguido de acetónitrilo y unas centrifugaciones para recoger el sobrenadante. Aunque es algo más laborioso, es el que obtiene mejores resultados con el sistema de Bruker^{13,14}.

Otro elemento esencial para determinar el rendimiento de la EM es la librería de referencia. Mediante la técnica MALDI-TOF se obtienen unos espectros de cada espécimen analizado que deben compararse con una librería de referencia. Si las especies estudiadas no se encuentran en dicha librería, no se podrán identificar; por ello, algunos estudios han constatado que el porcentaje de identificaciones correctas se incrementa significativamente cuando se completa la librería con nuevos espectros¹⁵.

Finalmente, cada sistema comercial utiliza diferentes puntos de corte que informan del grado de seguridad en la identificación obte-

nida. La mayor parte de los autores confirman que, para la obtención de máximos rendimientos con el sistema de Bruker, es necesario rebajar el punto de corte con respecto a lo exigido en la identificación bacteriana^{6,16}.

Los factores relacionados con las condiciones de crecimiento de las levaduras también han sido evaluados recientemente por Pence et al¹⁶, quienes pudieron confirmar que los medios habitualmente utilizados en los laboratorios de micología (agar sangre, agar BHI [Brain Heart Infusion], medios cromogénicos o Sabouraud con cloranfenicol) no parecen tener un impacto significativo en el rendimiento del análisis. De igual forma, estos investigadores comprobaron que la prolongación de la incubación de los aislamientos no mejoró las tasas de identificación; al contrario, con el sistema de Bruker parece que los resultados podrían empeorar al prolongar la incubación de 24 a 48 h utilizando el protocolo sin extracción o con extracción simplificada.

La mayoría de los estudios muestran que los sistemas de EM obtienen mejores resultados en la identificación del género *Candida*, especialmente las especies más frecuentemente implicadas en clínica. Los porcentajes de identificación globales se incrementaron desde el 61,5 al 94,4% en el estudio de Vlek et al¹⁵. Otras publicaciones no ofrecen datos tan llamativos, pero sí coincidentes en el mismo sentido^{6,17}. A pesar de todo, MALDI-TOF se ha convertido también en una potente herramienta para la identificación de levaduras y hongos levaduriformes menos convencionales. En una reciente publicación de Kolecka et al¹⁸, los investigadores pudieron identificar a nivel de especie hasta el 98% de las 219 especies estudiadas de los géneros *Galactomyces*, *Saprochaete*, *Geotrichum*, *Magnusiomyces*, *Trichosporon* y *Guehomyces* spp. Otros autores también han confirmado la utilidad de la EM para la identificación de levaduras negras del género *Exophiala* aisladas en muestras clínicas⁷.

Identificación directa del hemocultivo

El inicio precoz de un tratamiento adecuado en las candidemias tiene un impacto directo en la mortalidad de los pacientes¹⁹, por lo que se han intensificado los esfuerzos encaminados a acelerar la identificación de la especie una vez que esta se aísla en el hemocultivo²⁰. La técnica MALDI-TOF, aplicada directamente sobre el *pellet* de un hemocultivo crecido, aporta seguridad y rapidez en la identificación de la especie y, por tanto, en la instauración precoz del tratamiento adecuado. Los estudios publicados revelan resultados excelentes con tasas de identificación correcta que oscilan entre el 91,3 y el 100,0%. Todos los investigadores realizan pretratamientos de la muestra para evitar interferencias con las proteínas sanguíneas antes de realizar una extracción proteica. Se han descrito distintos protocolos con buenos resultados que utilizan SDS (dodecilsulfato de sodio), saponina, Tween 80 o sistemas de lisis comerciales como Sepsityper (Bruker Daltonics)²¹⁻²⁴. Sin embargo, hay que considerar que el rendimiento en este contexto también depende directamente del tipo de botella de hemocultivo utilizada²⁵, teniendo en cuenta que los viales que contienen partículas de carbón ofrecen peores resultados por las interferencias que originan en el análisis espectrométrico²⁶.

Identificación de hongos filamentosos

El diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas causadas por hongos filamentosos mediante métodos de laboratorio convencionales se ha complicado aún más en los últimos años debido al aumento del número de pacientes susceptibles de padecer dichas micosis y al mayor número de hongos que pueden causarlas (como las emergentes especies crípticas de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, etc.), intrínsecamente resistentes a la mayoría de los antifúngicos utilizados en la práctica clínica.

Se sabe que una identificación rápida y fiable de la especie del hongo filamentoso causante de una micosis invasiva es esencial para

instaurar un tratamiento adecuado, debido a que en muchos casos la sensibilidad a los antifúngicos es especie-específica.

Sin embargo, la introducción de la EM MALDI-TOF en el laboratorio de micología se ha producido mucho más lentamente que en el laboratorio de bacteriología, por la mayor complejidad biológica de los hongos filamentosos. Existen diferentes factores que tienen una influencia significativa en el perfil fúngico como, por ejemplo, el hecho de que la lisis de las células fúngicas pueda no producirse adecuadamente debido al grosor de la pared celular, las diferentes etapas de maduración de las colonias seleccionadas, la presencia/ausencia simultánea de hifas y conidias, la presencia de melanina, etc. Además, la elección del protocolo de extracción y de la matriz puede introducir un mayor grado de variación en el número y la identidad de los espectros de masas obtenidos²⁷. Por lo tanto, para solucionar todos estos factores de variabilidad, varios investigadores han intentado estandarizar las condiciones de crecimiento y preparación de la muestra para la identificación de los hongos filamentosos con el fin de construir unos "perfiles fúngicos" y luego compararlos con las bibliotecas de referencia de la EM MALDI-TOF.

Cassagne et al²⁸ elaboraron un procedimiento estándar que consiste en una extracción química de las colonias de hongos filamentosos, cultivadas en medio de Sabouraud, con ácido fórmico y la elección como matriz del ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. Los autores lograron una identificación correcta, a nivel de especie, del 87% de los hongos filamentosos.

Por su parte, Alanio et al²⁹ desarrollaron un simple y rápido protocolo que consiste en depositar el material superficial (una mezcla en agua de las esporas y el micelio, conidióforos recogidos de la superficie de las colonias del hongo filamentosos) directamente sobre la placa de MALDI-TOF sin subcultivar o preparar la colonia. El resultado fue una correcta identificación en el 98,6% (138 de 140 aislados de *Aspergillus*) con el 100% de especificidad.

Por otro lado, Bruker utiliza cultivos líquidos de hongos filamentosos en Sabouraud para la construcción de una "biblioteca fúngica", en un esfuerzo de minimizar el efecto de las condiciones de cultivo, para ayudar a la producción de un micelio uniforme³⁰. No obstante, Lau et al³¹ han fabricado una base de datos de hongos filamentosos, cultivados en medios sólidos con una colonia de menos de 5 mm de diámetro y utilizando un procedimiento de extracción de proteínas, para su identificación en MALDI-TOF. Su "librería fúngica" con 294 aislados fúngicos de 76 géneros y 152 especies permitió la identificación exacta a nivel de especie (puntuación $\geq 2,0$) y a nivel de género (puntuación $\geq 1,7$) en el 88,9 y el 4,3% de los aislamientos, respectivamente.

En la actualidad, y considerando todos los estudios publicados³², los datos demuestran que se obtienen perfiles fúngicos más específicos (bien a partir del cultivo líquido o bien por raspado directo del micelio fúngico de placas de cultivo en agar³³) y que la forma de conseguir una identificación exacta es la creación de una base de datos que contenga varios perfiles proteicos para cada especie, y así mejorar la arquitectura de las bibliotecas de referencia²⁸.

A modo de esquema, las principales ventajas de la utilización de MALDI-TOF para la identificación de hongos filamentosos en el laboratorio de micología son:

- El tiempo de respuesta (calculado como el mínimo tiempo requerido para que la muestra produzca un resultado de identificación) es aproximadamente de 10 min, en lugar de las horas o días necesarios para la identificación genotípica o fenotípica.
- La realización de la identificación de los hongos filamentosos con mayor poder de discriminación, precisión y seguridad que los métodos de identificación convencionales.
- La capacidad de diferenciar especies estrechamente relacionadas y especies de hongos que son morfológicamente similares entre sí, pero con perfiles de sensibilidad antifúngica totalmente distintos, con el consiguiente impacto clínico.

En cuanto a las cuestiones aún por mejorar, estas son:

- Estandarizar los métodos de extracción.
- La ampliación de las bases de datos comerciales.

En conclusión, en un futuro inmediato, con una mayor validación y estandarización conjunta, MALDI-TOF SM mejorará la identificación de los hongos filamentosos ayudando a la optimización del diagnóstico micológico y del tratamiento antifúngico.

Identificación de hongos dermatofitos

Los hongos dermatofitos (HD) son responsables de una amplia variedad de infecciones de piel, uñas y pelo. Su identificación es con frecuencia complicada, basándose fundamentalmente en la morfología tanto macroscópica como microscópica y requiriendo un tiempo largo de respuesta y micólogos con amplia experiencia³⁴. Sin embargo, estos criterios pueden ser insuficientes debido a la variación intraespecie o a la similitud con otras especies³⁵. A pesar de estas dificultades, la identificación a nivel de especie es siempre recomendable desde el punto de vista epidemiológico³⁶, especialmente en especies como *Trichophyton tonsurans*, *Microporum audouinii*, *Trichophyton violaceum* y *Trichophyton soudanense*³⁵. A esto se suma que la respuesta terapéutica puede ser diferente³⁷.

Teniendo en cuenta estas dificultades y necesidades, cada vez se aplican más las técnicas de secuenciación, que en este momento son el *gold standard*³⁸ y que, en el caso de los HD, ha cambiado sustancialmente la taxonomía sin que haya un consenso. Un caso especial es *T. soudanense*, también indistinguible por secuenciación de *T. rubrum* y que no aparece en el atlas de De Hoog et al³⁹, pero sí en el libro de la Sociedad Americana de Microbiología³⁵. Por otra parte, esta especie figura en los controles NEQAS (National External Quality Assessment Service) de 2015 y esa es la denominación correcta.

Otra especie incluida en el complejo *T. rubrum* es *T. raubitschekii*, referida en recientes publicaciones como *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*, para separarla de alguna manera de *T. rubrum* clásico⁴⁰.

Considerando que la identificación convencional retrasa considerablemente los diagnósticos, y que si se utilizan los criterios actuales de secuenciación se puede perder información al incluir como *T. rubrum* a *T. soudanense* entre otros, es necesario buscar otro tipo de soluciones que puede proporcionar la EM.

Una cuestión esencial es la librería de espectros disponible, que no se ajusta a la epidemiología de nuestro medio (donde no hay datos publicados), excluyendo *T. soudanense* y *M. audouinii*.

En general, los artículos publicados sobre MALDI-TOF proporcionan un alto nivel de concordancia con la secuenciación, aunque presentan algunas limitaciones, ya que no utilizan protocolos estandarizados ni en el tiempo de incubación de las colonias ni en los sistemas de extracción empleados.

Cuando se utiliza el sistema de Bruker se obtienen mejores resultados en cultivos de más de 14 días; las identificaciones disminuyen considerablemente a los 7 días (80%) y aún más a los 3 días (40%)³⁸. Los datos reflejados por otros autores con este sistema varían notablemente, entre el 69,6⁴¹ y el 97,8%³⁴. Estos resultados empeoran considerablemente (36,8%) si se utiliza un punto de corte de $\geq 2^41$. En estos estudios, la confusión de *T. rubrum* con *T. soudanense* es el error más frecuente⁴¹. Theel et al⁴¹ también describen errores en la identificación de algunos *T. mentagrophytes* como *T. tonsurans*⁴¹.

Una limitación importante que muestran la mayoría de los trabajos sobre la EM deriva de la calidad de las librerías utilizadas. Algunos utilizan librerías complementarias^{34,38,41-43} y otros emplean librerías con muy pocas especies⁴⁴.

Por último, la mayoría de los autores utilizan extracción proteica^{34,38,42,45} debido a que los análisis directos, con o sin ácido fórmico, no dan resultados adecuados. Sin embargo, este procedimiento no está estandarizado y el más utilizado es el de Cassagne et al²⁸.

Como conclusión cabe destacar que, aunque MALDI-TOF parece una herramienta robusta y segura para la identificación de HD, hay 2 problemas pendientes de resolución: los propios derivados de la taxonomía^{35,46} y las limitaciones de las librerías de espectros. Los modelos de estudios multicéntricos como el de Vlek et al¹⁵ para levaduras podrían ser la respuesta.

Otros usos de MALDI-TOF en micología

Además de la capacidad de MALDI-TOF en la identificación de las especies fúngicas, se ha evaluado su utilidad para discriminar poblaciones con vistas a la detección precoz de brotes y para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos.

Tipificación de hongos

En los últimos años, la tipificación molecular de los aislados implicados en infecciones nosocomiales ha contribuido en gran medida a la comprensión de la epidemiología de las infecciones y de la transmisión cruzada de microorganismos. Son muchos los sistemas de tipificación genotípica ya conocidos para estudiar cepas relacionadas entre sí: PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), MLST (*multilocus sequence typing*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y MLP (*microsatellite length polymorphism*). Este último, por su alto poder discriminatorio, se usa con frecuencia en estudios epidemiológicos y en la tipificación de diferentes especies de hongos. En estudios recientes se ha utilizado MALDI-TOF como alternativa a estas técnicas para simplificar el análisis. En el contexto de un brote en una unidad de neonatología, Pulcrano et al⁴⁷ utilizaron MALDI-TOF para discriminar aislados de *Candida parapsilosis* y compararon sus resultados con PFGE y MLP. MALDI-TOF tuvo el mismo poder discriminatorio que MLP, con una buena concordancia entre los dendrogramas obtenidos por ambas técnicas. Otros investigadores utilizaron MALDI-TOF para tipificar aislados clínicos de *C. glabrata* de distintos orígenes geográficos en comparación con MLP⁴⁸ y testar su capacidad para diferenciar entre cepas sensibles y resistentes a fluconazol. La EM consiguió separar las cepas por su origen geográfico y diferenciar las cepas sensibles a fluconazol de las resistentes. Aunque la agrupación fue diferente a la obtenida con MLP, muchas cepas resistentes con idénticos genotipos se agruparon en diferentes clados con MALDI-TOF. Sin embargo, estos mismos autores observaron en otro estudio que MALDI-TOF no pudo discriminar clados de *C. albicans* analizados con MLP⁴⁹. Otro trabajo que comparó MALDI-TOF con AFLP en la tipificación del complejo *C. parapsilosis* concluyó que MALDI-TOF fue capaz de discriminar especies relacionadas entre sí dentro de un mismo complejo, aunque no pudo tipificar cepas dentro de una misma especie en comparación con AFLP⁵⁰. Debido a que el sistema presenta ciertas limitaciones y los espectros pueden depender de una gran variedad de variables (entre otros el número de subcultivos que pueden alterar el proteoma, fenómeno observado también en el campo de las bacterias⁵¹), se necesitan más estudios para estandarizar el sistema MALDI-TOF como herramienta de tipificación en el procedimiento de rutina.

Estudios de sensibilidad

Pocos estudios usan MALDI-TOF como herramienta para analizar la resistencia antifúngica. Estos se basan en el crecimiento del hongo en presencia de diferentes concentraciones de antifúngico de acuerdo con las normas CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y posterior análisis con EM de esas células recuperadas en los pocillos en microdilución. Marinach et al⁵² observaron que la exposición de *C. albicans* a diferentes diluciones de fluconazol durante 15 h provocó un cambio en la expresión de proteínas, variando así el proteoma y, por tanto, el espectro de masas en aquellas células cultivadas por encima de una determinada concentración de antifúngico frente a aquellas que crecieron por debajo. Se determinó así un nuevo de

punto de corte denominado “concentración mínima de cambio de perfil” (MPCC, *minimal profile change concentration*) o concentración mínima en la que el perfil del espectro de masas cambia significativamente en comparación con los espectros de células incubadas en diferentes niveles de antifúngico, una alternativa al valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) clásico. En este estudio se encontró una correlación del 94% entre CMI y MPCC. Los estudios publicados hasta la fecha adoptan este protocolo para testar la sensibilidad de *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. frente a caspofungina⁵³. En este estudio se encontró un 100% de similitud entre el valor de CMI y MPCC ± 2 diluciones. Sin embargo, con los puntos de corte propuestos ahora para la mayoría de especies de *Candida*, la concordancia entre los métodos fue del 94%. Además de caspofungina, la resistencia a triazoles frente a *Candida* spp. también se evaluó con el sistema MALDI-TOF⁵⁴ en concordancia con las técnicas tradicionales del 54 al 97%, la más alta para posaconazol frente a *C. glabrata*. En este mismo estudio se analizó la reproducibilidad del ensayo, que fue muy variable según la especie de *Candida* y el antifúngico, con valores entre el 54,0 y el 82,9%. La ventaja de rapidez diagnóstica es mínima (15 frente a 24 h). Una publicación reciente señala que, con períodos de incubación de antifúngico de 3 h, las cepas de *C. albicans* pueden clasificarse en sensibles o resistentes a caspofungina⁵⁵. El enfoque de MALDI-TOF como herramienta para analizar resistencias puede servir para discriminar aquellos hongos que presentan efecto *trailing* o lecturas subjetivas de aquellos que verdaderamente tienen una resistencia; es decir, permite eliminar la determinación visual y subjetiva. A pesar de que estos estudios muestran resultados prometedores, se debe optimizar la reproducibilidad y la metodología del proceso, estandarizando la técnica y definiendo los puntos de corte. Para ello se necesitan más estudios en los que se evalúen más cepas y antifúngicos.

En conclusión, MALDI-TOF va a tener un impacto significativo en el campo de la micología clínica por su rapidez y seguridad en la identificación de especies tanto de levaduras como de hongos filamentosos y se postula como una potente herramienta para el estudio de poblaciones en la tipificación de brotes. Se necesita más experiencia para valorar su posible utilidad en estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Seng P, Drancourt M, Gouret 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.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules*. 2014;19:1085-119.
- Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:39.e1-39.e15.
- Quiles-Melero I, García Rodríguez J, Romero-Gómez MP, Gómez-Sánchez P, Mingorance J. Rapid identification of yeasts from positive blood culture bottles by pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:21-4.
- Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother*. 2007;61 Suppl 1:i7-12.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Wallace MA, Burnham CAD. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1703-12.
- Özhak-Baysan B, Ögünç D, Döğen A, İlkit M, De Hoog GS. MALDI-TOF MS-based identification of black yeasts of the genus *Exophiala*. *Med Mycology*. 2015;53:347-52.
- 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*. 2012;18:475-84.

9. Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL. Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:4067-71.
10. Larsson T, Norbeck J, Karlsson H, Karlsson KA, Blomberg A. Identification of two-dimensional gel electrophoresis resolved yeast proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis.* 1997;18:418-23.
11. Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sánchez M, Nombela C, Gil C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* 2004;4:3084-106.
12. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;93:965-74.
13. Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics.* 2013;13:788-99.
14. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics.* 2013;10:151-64.
15. Vlek A, Kolecka A, Khayhan K, Theelen B, Groenewald M, Boel E, et al. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3023-9.
16. Dhiman N, Hall L, Wohlfel 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;49:1614-6.
17. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, et al. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;33:372-8.
18. Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegaki A, et al. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2491-500.
19. Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, Laupland KB. Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:613-8.
20. Foster N, Symes C, Barton R, Hobson R. Rapid identification of *Candida glabrata* in *Candida* bloodstream infections. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 12):1639-43.
21. Ferroni A, Suarez S, Beretti J-L, 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.
22. 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.
23. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2012;50:176-9.
24. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods.* 2013;94:262-6.
25. 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;62:251-3.
26. 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.* 2014;17:192-5.
27. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2107-10.
28. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2011;6:e28425.
29. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:750-5.
30. Bruker Daltonics MU. Bruker Daltonics. Fungi Library-MALDI Biotyper. 2012.
31. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:828-34.
32. Vermeulen E, Verhaegen J, Indevuyst C, Lagrou K. Update on the evolving role of MALDI-TOF MS for laboratory diagnosis of fungal infections. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6:206-14.
33. Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics.* 2011;11:3143-53.
34. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonnet N, Hendrickx M, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol.* 2013;51:713-20.
35. Borman AM, Summerbell RC. *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*, and Agents of Superficial Mycoses. En: *Manual of Clinical Microbiology.* 11th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2015. p. 2128-52.
36. Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol.* 2013;51:580-5.
37. Lipozenic J, Skerlev M, Orofino-Costa R, Zaitz VC, Horvath A, Chouela E, et al. A randomized, double-blind, parallel-group, duration-finding study of oral terbinafine and open-label, high-dose griseofulvin in children with tinea capitis due to *Microsporum* species. *Br J Dermatol.* 2002;146:816-23.
38. Packeu A, De Bel A, L'Ollivier C, Ranque S, Detandt M, Hendrickx M. Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: validation in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3440-3.
39. De Hoog S, Guarro J, Gené J, Figueras M. *Atlas of Clinical Fungi.* 4th ed. Utrecht/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili; 2014.
40. Hiruma M, Kano R, Sugita T, Mochizuki T, Hasegawa A, Hiruma M. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. *J Dermatol.* 2013;40:111-3.
41. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3093-5.
42. Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muiylova GK, Herrmann J, Rataj W, et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol.* 2013;51:17-24.
43. De Respinis S, Tonolla M, Pranghofer S, Petrini L, Petrini O, Bosshard PP. Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol.* 2013;51:514-21.
44. Erhard M, Hippler U-C, Burmester A, Brakhage AA, Wöstemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol.* 2008;17:356-61.
45. Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, Feuillade M, Dauphin B, Quesne G, et al. Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2277-81.
46. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The New species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia.* 2008;166:239-56.
47. Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2919-28.
48. Dhieb C, Normand AC, Al-Yasiri M, Chaker E, Euch El D, Vranckx K, et al. MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Med Mycol.* 2015;53:462-9.
49. Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, Gautier M, Vranckx K, El Euch D, et al. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *J Mass Spectrom.* 2015;50:371-7.
50. De Carolis E, Hensgens LA, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Med Mycol.* 2014;52:123-30.
51. McElvania Tekippe E, Shuey S, Winkler DW, Butler MA, Burnham CA. Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1421-7.
52. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics.* 2009;9:4627-31.
53. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, et al. Use of Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2479-83.
54. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol.* 2015; 53:736-42.
55. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, Posteraro P, Perlin DS, Kostrzewa M, et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2964-9.