



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras



MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Current situation and future perspectives

Juan Luis Muñoz Bellido ^{a,b,c,d,*} y José Manuel González Buitrago ^{c,d,e,f}

^a Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^b Servicio de Microbiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^c Grupo de Investigación Reconocido MICRAPE, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^d Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España

^e Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^f Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

En menos de 10 años, la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF ha pasado de ser una tecnología del todo ajena a los procedimientos diagnósticos de la microbiología clínica a ser primero, una prometedora novedad, y casi sin solución de continuidad, un procedimiento completamente integrado en la actividad clínica diaria.

Numerosos estudios han demostrado en los últimos años las ventajas de la EM MALDI-TOF para la identificación bacteriana^{1,2}. De hecho, las limitaciones de la EM MALDI-TOF asientan casi siempre más en la completitud de las bases de datos de referencia que en la capacidad del método para obtener perfiles fiables de casi cualquier microorganismo bacteriano. Lo mismo ocurre con las levaduras como demuestra, entre otros, un completo estudio que aparece en este mismo número^{3,4}. En el caso de los hongos filamentosos los resultados no son tan favorables⁵, pero de nuevo esta parece una limitación más asociada a la heterogeneidad de los perfiles proteicos generados por un hongo filamentoso a lo largo de su desarrollo, y a la incapacidad de las bases de datos, hasta el momento, para recogerlas⁶.

Una aportación que ha generado mucho interés por su utilidad clínica ha sido su utilización directamente sobre muestras clínicas (urocultivo sobre todo)^{7,8} o desde hemocultivo. En el primer caso, se ha usado combinado con diferentes métodos de cribado en infección urinaria con buenos resultados^{9,10}. En el caso de su utilización sobre hemocultivos positivos, los porcentajes de identificación directa son buenos, sobre todo en gram negativos^{11,12}, y la

orientación terapéutica inmediata que supone una aportación sin duda valiosa.

El siguiente paso que hemos de dar es, probablemente, el de la cuantificación de las ventajas que aporta esta tecnología. Dos estudios recientes demuestran que la introducción de la EM MALDI-TOF sobre hemocultivos positivos, acorta la identificación del microorganismo implicado en 1,45 días, reduce los costes globales del diagnóstico en un 56,9%¹³ y puede llegar a reducir la estancia media 2,5 días, y el coste por paciente en un 40%¹⁴. Es necesario disponer de estudios de este tipo relativos a otras potenciales aplicaciones de esta metodología, a fin de dilucidar cuales suponen realmente no sólo una aportación clínica útil, sino una mejora en la gestión de los recursos, condición actualmente casi *sine qua non* para conseguir la introducción de nuevas tecnologías de diagnóstico clínico en los hospitales.

La EM MALDI-TOF cuenta, *a priori*, con un inconveniente para su utilización de forma global sobre muestra directa: si bien puede ser un método diagnóstico muy específico, no se trata de un método especialmente sensible, ya que requiere una cantidad de proteína considerable para obtener perfiles fiables. Esto hace que, en numerosas muestras en las que la concentración de microorganismos o la cantidad de muestra que es posible obtener son pequeñas, (LCR, líquido articular, líquido peritoneal...), su sensibilidad sea baja. Existe la posibilidad de salvar, al menos parcialmente, esta limitación, mediante una incubación corta en medios líquidos, que incrementaría notablemente su sensibilidad y seguiría suponiendo un ahorro importante de tiempo en el diagnóstico. Aunque faltan estudios que sistematicen estos protocolos, es posible que esta estrategia ofrezca unas cifras de sensibilidad más atractivas, con una ganancia en rapidez todavía considerable. Habrá que determinar en qué medida esta metodología es compatible con la organización habitual en muchos servicios de microbiología (distribución de tareas, horarios, etc.), y si las ventajas clínicas obtenidas

Véase contenido relacionado en DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.003>

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jlmubel@usa.es, jlmubel@gmail.com (J.L. Muñoz Bellido).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.02.016>

0213-005X/© 2015 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

son proporcionales al esfuerzo de adaptación que puede suponer. De nuevo, se impone la realización de estudios de coste/eficacia que nos permitan cuantificar las ventajas que puede aportar esta tecnología y demostrar la conveniencia de su implantación en nuevos procesos diagnósticos.

Una de las limitaciones iniciales de la EM MALDI-TOF ha sido su difícil aplicación a la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos. En numerosos casos, la rapidez ganada en la identificación no era posible traducirla al 100% en eficiencia clínica, al no disponer de un sistema de estudio de sensibilidad a antimicrobianos que ofreciera una agilidad similar.

Conseguir, mediante técnicas proteómicas, perfiles de sensibilidad similares a los perfiles fenotípicos convencionales, con una rapidez y fiabilidad próximas a las logradas en la identificación es un desafío importante, dada la variedad de mecanismos de resistencia y la diversidad de proteínas implicadas en cuanto a tamaño, nivel de producción, localización, etc.

Se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de enzimas capaces de hidrolizar a determinados antimicrobianos, a partir del diferente cociente m/z generado por el antimicrobiano intacto y el hidrolizado, o la presencia de algunos mecanismos de resistencia, como *vanB*, a partir de la presencia de picos específicos¹⁵. Son estrategias que pueden ofrecer información útil y rápida respecto a grupos de antimicrobianos concretos, pero no podemos esperar obtener, mediante ellas, perfiles globales de sensibilidad. En muchos casos la resistencia a antimicrobianos está ligada a mecanismos no hidrolíticos, de modo que esta metodología puede permitir predecir resistencia, pero en ningún caso sensibilidad. Por otra parte, en el caso de determinados mecanismos de resistencia como las BLEE, la tendencia actual es a no considerar resistencia si no se alcanzan determinados niveles de CIM, aunque la enzima esté presente, con lo que la mera detección de hidrólisis, si esta no es cuantificable y extrapolable a CIM, no sería suficiente para emitir un informe de resistencia.

Estas limitaciones han estimulado el reciente desarrollo de 2 nuevas estrategias:

- MS-RESIST, plantea la incorporación al medio de cultivo de aminoácidos marcados junto con el antimicrobiano a probar. Los microorganismos sensibles no se multiplicarán o lo harán muy lentamente, y apenas incorporarán estos aminoácidos marcados. Los microorganismos resistentes se multiplicarán de manera mucho más activa, e incorporarán mayores cantidades de estos aminoácidos marcados que, al tener tamaños distintos, generarán perfiles diferentes a los sensibles. Se ha demostrado su utilidad en la identificación de SARM, y en la detección de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas¹⁶.
- MS MALDI-TOF cuantitativa, se basa en la cuantificación de picos menores en presencia y ausencia de antimicrobiano, y se ha mostrado sensible y específico frente a *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasas¹⁷.

Se trata de estrategias que, en teoría, permite estudiar la sensibilidad con independencia del antimicrobiano y de los mecanismos de resistencia implicados, salvando así una de las principales limitaciones de los métodos basados en hidrólisis de antimicrobianos.

Un campo con buenas perspectivas, aunque aún en fases muy iniciales de su exploración, es la potencial utilidad de la EM MALDI-TOF en el tipado de microorganismos. Habitualmente, solo algunos de los picos generados en el perfil de un microorganismo, los más estables y característicos, se utilizan a efectos de identificación. Algunas publicaciones sugieren la posibilidad de que otros picos menos estables, puedan en cambio ser característicos a nivel de cepa, de modo que se podrían utilizar como una alternativa al tipado molecular. De hecho, estudios parciales en algunos géneros como *Listeria*, *Salmonella* o *Legionella* sugieren que podría ser así¹⁸.

Sin embargo, diferentes medios y tiempos de cultivo, tratamientos estadísticos etc., pueden generar dendrogramas muy distintos, de modo que queda aún un importante trabajo de estandarización hasta conocer en qué medida la EM puede ser una alternativa a los métodos de epidemiología molecular.

Se ha planteado también la posibilidad de usar la EM MALDI-TOF para caracterizar factores de patogenicidad, fundamentalmente toxinas¹⁹. En los procedimientos habituales hasta ahora, los picos proteicos obtenidos no se caracterizan de manera individual, ya que no es necesario para la identificación de microorganismos. Sin embargo, esa posibilidad existe, de modo que la EM MALDI-TOF podría permitir la detección de proteínas concretas, incluyendo dichos factores de patogenicidad. De hecho, se ha usado EM MALDI-TOF para la detección de toxina de Shiga, toxinas de *Clostridium perfringens* y toxinas de *Staphylococcus aureus*. Actualmente este uso tiene todavía limitaciones importantes. Los espectrómetros en uso en microbiología clínica suelen detectar una «ventana» de tamaños de péptidos ajustada al tamaño de las proteínas ribosómicas, que son las más utilizadas para identificación. En la medida en que el tamaño de los factores de patogenicidad buscados quede fuera de esa ventana, su detección requeriría ajustes del equipo complejos, y poco compatibles con su uso simultáneo en la identificación rutinaria. Por otra parte, factores que se produzcan en pequeñas cantidades podrían pasar inadvertidos.

En resumen, una vez asentado su uso para la identificación microbiana, continúan surgiendo posibles aplicaciones de la EM MALDI-TOF en microbiología clínica. El principal desafío está actualmente en su sistematización, y en determinar cuáles tienen una utilidad práctica y una relación coste/eficacia que justifique su introducción, y el eventual desplazamiento de técnicas implantadas y con eficacia contrastada.

Bibliografía

1. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013;26:547–603.
2. 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.
3. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, et al. Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014; pii: S0213-005X(14)00340-1.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila 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.
8. Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F, Criado González M, Hernández Egidio S, de Frutos Serna M, et al. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2014;52:335–8.
9. March Rosselló GA, Gutiérrez Rodríguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduña Domingo A, Bratos Pérez MA. Nuevo procedimiento para la identificación rápida en muestras de orina de organismos causantes de infecciones del tracto urinario por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33:89–94.
10. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. PLoS One. 2014;9:e86915.

11. 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.
12. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Crèixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:421–7.
13. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: A bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3301–8.
14. Pérez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;37:1247–54.
15. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:179–94.
16. Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3741–8.
17. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative MALDI-TOF MS for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4155–62.
18. Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI-TOF MS profiling of bacteria at the level: A review. *Mass Spectrom Rev.* 2013;32:188–217.
19. Fagerquist CK, Zaragoza WJ, Sultan O, Woo N, Quinones B, Cooley MB, et al. Top-down proteomic identification of Shiga toxin 2 subtypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-tandem time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:2928–40.