

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Detección rápida de resistencias antimicrobianas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Marina Oviaño^a, María Dolores Rojo^b, José María Navarro Marí^b y Germán Bou^{a,*}

^aComplejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, España

^bComplejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, España

RESUMEN

Palabras clave:

Espectrometría de masas
MALDI-TOF
Mecanismos de resistencia
Detección rápida

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se ha establecido en los últimos años como una herramienta diagnóstica de primera línea en la identificación de microorganismos, incluyendo los que producen infecciones en el ser humano. La detección rápida de resistencias antimicrobianas es una de las aplicaciones futuras con más expectativas de éxito de esta técnica. En esta revisión se va a tratar de hacer una aproximación a los trabajos más relevantes que se han publicado en este campo, discutiendo los potenciales retos futuros y su aplicación clínica en los próximos años.

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

Rapid detection of antimicrobial resistance by MALDI-TOF mass spectrometry

ABSTRACT

Keywords:

Mass spectrometry
MALDI-TOF
Resistance mechanisms
Rapid detection

In recent years, MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) mass spectrometry has become established as a first-line diagnostic tool in the identification of microorganisms, including those producing human infections. Rapid detection of antimicrobial resistance is one of the future applications of this technique with the greatest likelihood of success. This review describes the most important studies published in this field and discusses potential future challenges and the clinical application of this technique in the next few years.

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

Introducción

La tecnología de espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) ha sido introducida en los servicios y laboratorios de microbiología clínica para la identificación de microorganismos de forma satisfactoria y está comenzando a utilizarse para otras aplicaciones diagnósticas como la detección de mecanismos de resistencias a los antimicrobianos. La principal ventaja de esta metodología es la obtención de resultados 24 h antes que los métodos fenotípicos, incluyendo los automatizados. Además, aunque los costes iniciales son altos, el coste por determinación es muy inferior al de los métodos fenotípicos, bioquímicos o moleculares. El propósito de esta revisión es resumir y analizar los trabajos que ya han sido publicados hasta la fecha en este campo y

discutir las perspectivas futuras en la determinación de resistencias por EM MALDI-TOF.

Detección directa de resistencias a través de la actividad enzimática

Detección de la actividad betalactamasa

Los ensayos basados en la monitorización directa de la actividad enzimática sobre el antibiótico betalactámico son el punto de partida de todos los ensayos sobre detección de resistencias a través de EM MALDI-TOF. Los antibióticos betalactámicos son inactivados por la hidrólisis del enlace amida en el anillo betalactámico, mediada por una molécula de agua. Esta molécula de agua se añade a la nueva estructura formada, dando lugar a un incremento del peso molecular en 18 Da. Este cambio de masa es lo que diferencia los aislados sensibles de los resistentes y permite que sea monitorizado por la EM MALDI-TOF. Además de la reacción de hidrólisis, tienen lugar reac-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: german.bou.avevalo@sergas.es (G. Bou).

ciones espontáneas —como la descarboxilación y la captación de iones de la matriz (Na y K)— dando lugar a nuevos cambios de masa. Los espectros proporcionados por la EM MALDI-TOF son una combinación de la relación relativa de intensidades de los diferentes picos de masas. Los patrones de picos de masa son únicos para cada antibiótico y pueden utilizarse para diferenciarlos.

La detección directa de la actividad betalactamasa se realiza de forma muy similar en todos los trabajos publicados. Un cultivo bacteriano fresco se suspende sobre un *buffer* de antibiótico y se incuba a 37 °C bajo agitación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifuga y el sobrenadante se mide bajo la acción de una matriz adecuada. Después, se podrá analizar el espectro obtenido.

El estudio que establece las bases de la detección directa de la resistencia a antibióticos betalactámicos fue publicado por Sparbier et al¹. Incluye la descripción espectrométrica de ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, imipenem y meropenem y sus productos de hidrólisis. El perfil de picos de masas de estas moléculas antes y después de la hidrólisis es lo suficientemente diferente en todos los casos para discriminar entre aislados sensibles y resistentes. El tiempo de incubación para los aislados fue de 3 h. Los espectros se calibraron con un estándar interno que consiste en bradiquinina-(1-5) y bradiquinina-(1-7) (Sigma-Aldrich, Alemania) más la matriz de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico). Introduce también la posibilidad de utilizar inhibidores en la reacción (ácido clavulánico, tazobactam y ácido 3-aminofenilborónico) para identificar la clase de betalactamasa y su futura aplicabilidad sobre muestras clínicas como los hemocultivos.

Jung et al² validaron un procedimiento utilizando 100 hemocultivos para detectar la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en Enterobacteriaceae y para la resistencia a aminopenicilinas en *Escherichia coli*. Se utilizó para ello la cefotaxima y la ampicilina. El tiempo de incubación se estableció en 90 min. Para el análisis de datos se utilizó un programa automatizado *ad hoc*. Los resultados se exponen en un diagrama de cajas con el cálculo del valor logRQ, o ratio de hidrólisis, entre la forma hidrolizada y sin hidrolizar.

Oviaño et al³ validaron un procedimiento para detectar y clasificar aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC en una serie de 141 hemocultivos. Para la detección de la resistencia se utilizó cefotaxima y ceftazidima y ácido clavulánico para la discriminación entre las 2 clases de mecanismos de resistencia. Para ello se emplearon diferentes betalactamasas. El tiempo del ensayo es de 90 min con una sensibilidad del 99%. Se obtuvo una relación cualitativa entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el grado de hidrólisis del antibiótico, comprobándose que el tiempo necesario para la hidrólisis es menor cuanto mayor sea la CMI. La cefotaxima da lugar a un menor tiempo de reacción y mayores valores de sensibilidad.

Detección de la actividad carbapenemasa

Hrabák et al⁴ utilizan una serie de 124 cepas incluyendo Enterobacteriaceae y *Pseudomonas aeruginosa* para detectar la resistencia a carbapenems utilizando meropenem como indicador. Las enzimas carbapenemasas representadas son IMP, VIM, NDM y KPC. Las bacterias se incubaron durante 3 h en un *buffer* con una solución de meropenem y se utilizó una matriz con ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) para facilitar la detección de los productos de hidrólisis. Sin embargo, la utilización de DHB como matriz da lugar a unas preparaciones heterogéneas, complicando la adquisición automática del espectro⁵. Este ensayo ha sido mejorado en 2 ocasiones, la primera con la adición del 0,01% de SDS (dodecilsulfato de sodio), que permite disminuir la concentración de la bacteria⁶, y con la modificación del *buffer* de reacción, incorporando NH_4HCO_3 , que permite la detección de los productos de degradación producidos por aislados portadores de OXA-48 sin disminuir la sensibilidad en la detección del resto de enzimas⁷.

Burckhardt et al⁸ utilizaron una incubación con ertapenem para detectar la resistencia a carbapenémicos. Los aislados portaban enzimas de tipo NDM-1, VIM-1, VIM-2, KPC-2 e IMP. Se estableció una incubación de 1 a 2,5 h. Johansson et al⁹ emplearon también el ertapenem para detectar la resistencia a carbapenémicos en Enterobacteriaceae y *P. aeruginosa* con tiempos de reacción desde 15 min para aislados de tipo KPC a 120 min para las metalobetalactamasas. Los aislados de OXA-48 necesitaron una incubación prolongada de 24 h para hidrolizar el ertapenem. Oviaño et al¹⁰ demostraron que con el uso de ertapenem más PBA (*phenylboronic acid*) y DPA (*dipicolinic acid*) como inhibidores es posible detectar y clasificar carbapenemasas. Como no se dispone de un inhibidor específico del grupo D, se introdujo el análisis estructural de la temocilina como un marcador de resistencia de este grupo, ya que estas enzimas muestran unos altos valores de resistencia a temocilina, al contrario de los expresados para los carbapenémicos. Se emplearon para ello un total de 161 Enterobacteriaceae. El ensayo tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93% en la detección de productores de OXA-48 para un test de 60 min con ertapenem y 15 min con temocilina.

Kempf et al¹¹ utilizaron el imipenem como un indicador de la resistencia a carbapenémicos en 106 aislados de *Acinetobacter baumannii*. Se calcula la ratio de hidrólisis del imipenem después de un tiempo de incubación de 4 h con excelentes valores de sensibilidad y especificidad (100%). Sauget et al¹² detectaron aislados productores de OXA-48 en una incubación de 90 min con imipenem en una serie de 372 aislados, utilizando una ligera modificación en la metodología descrita por Kempf et al. Un ensayo de 30 min para imipenem en Enterobacteriaceae es descrito por Lasserre et al¹³ sobre un total de 223 aislados. Se utilizó una ratio $\geq 0,82$ para clasificar los aislados entre sensibles y resistentes con un 99% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

La metodología EM MALDI-TOF para la detección de la actividad hidrolítica se ha aplicado para diferentes antibióticos y una amplia variedad de microorganismos como Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, portadores de diferentes tipos de betalactamasas. La metodología utilizada es bastante similar en todos los ensayos, habiendo pequeñas variaciones como la posibilidad de introducir un paso previo de lisis en el protocolo^{6,14} y la utilización de diferentes *buffers* de reacción, utilizando desde agua hasta hidrógeno citrato de sodio¹, Tris-HCl⁴ y bicarbonato de amonio⁷. Los hemocultivos también se han testado con excelentes resultados aplicando un procedimiento de extracción proteica (Sepsityper Kit; Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) para obtener un *pellet* bacteriano sobre el que llevar a cabo el ensayo de hidrólisis.

El ensayo MALDI-TOF para la detección directa de la actividad betalactamasa es una herramienta con un gran potencial para convertirse en un método de rutina en los laboratorios de microbiología clínica, con numerosos estudios validados y listos para la implementación clínica (fig. 1)¹⁵. Además, es un método que aporta ventajas como la rapidez y la sencillez del ensayo.

Detección de enzimas modificantes de aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos basada en la modificación enzimática del antibiótico es uno de los mecanismos de resistencia más comunes entre estos antibióticos¹⁶. La modificación enzimática comprende enzimas con actividad acetiltransferasa, fosfotransferasa y nucleotidiltransferasa. Además, el sustrato no es siempre el mismo grupo funcional, ya que la acilación puede afectar a un grupo hidroxilo y/o amino, dando lugar a una mayor complejidad en la reacción. Zimmermann et al¹⁷ desarrollaron un método para detectar resistencia a aminoglucósidos en bacilos gramnegativos mediada por N-acetiltransferasas en menos de 3 h. Los aislados habían sido previamente caracterizados con el gen de resistencia *aac-6*. No se han realizado más ensayos considerando la resistencia a aminoglucósidos, por lo que sería necesario investigaciones más exhaustivas.

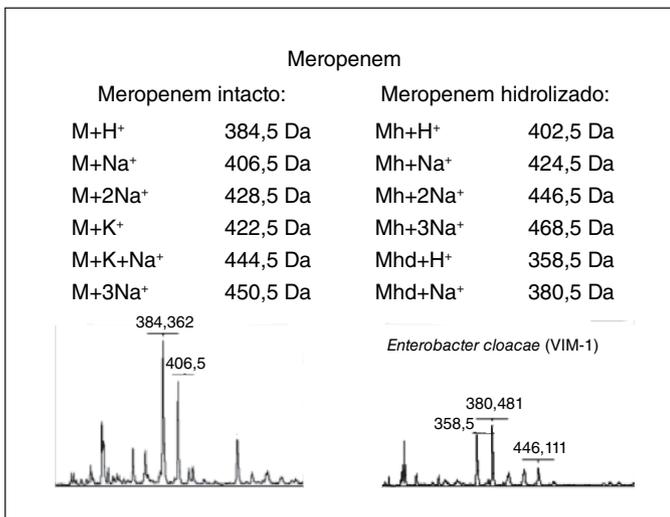


Figura 1. Espectro del meropenem después de la hidrólisis con una carbapenemasa de tipo VIM-1. d: descarboxilado; h: hidrolizado.

Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacteriano

Esta aplicación de MALDI-TOF se basa en la diferenciación de los microorganismos sensibles y resistentes de una misma especie a través de sus espectros, ya que la presencia de genes responsables de la resistencia se refleja en la expresión de proteínas produciéndose picos característicos en el espectro. Se ha utilizado con éxito en algunos estudios, aunque en general no están lo suficientemente optimizados y validados, no siendo aptos por el momento para realizar en la mayoría de los laboratorios clínicos.

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Con este fundamento, se ha estudiado la capacidad de MALDI-TOF para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), con resultados muy diferentes de un estudio a otro. Edwards-Jones et al¹⁸, usando células bacterianas intactas y como matriz 5-cloro-2-mercapto-benzotiazol, consiguieron diferenciar *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) y SARM, y detectaron 14 picos específicos para SARM y 2 para SASM. Observaron que SARM producía más picos (82-209) en el espectro que SASM (37-67), lo que facilitaba su diferenciación. Otros autores, como Du et al¹⁹, obtuvieron resultados similares. Bernardo et al²⁰ intentaron diferenciar los perfiles de SARM y SASM mediante la utilización de cepas caracterizadas como la ATCC 29213 (SASM) y la ATCC 43330 (SARM), así como 9 aislados clínicos. No encontraron un perfil específico para SARM, pero sí una excelente reproducibilidad en los espectros obtenidos, lo que puede hacer útil este método para caracterizar clonalmente cepas de *S. aureus* en el estudio de brotes nosocomiales. Lu et al²¹ identificaron marcadores específicos de SARM hospitalario (*SCCmec [staphylococcal cassette chromosome mec]* tipos I-III) y SARM comunitario (*SCCmec*, tipos IV-V). Concretamente, en el rango de 1.000-4.000 m/z, observaron 2 picos de 1.774,1 y 1.792,1 m/z correspondientes a los péptidos α 1-modulina fenol-soluble y α 2-modulina soluble en fenol, respectivamente, que aparecían en más del 95% de las cepas comunitarias y solo en el 8% de las hospitalarias. Sin embargo, no obtuvieron espectros específicos de SARM y SASM. Szabados et al²² estudiaron 2 cepas con el mismo origen genético, una portadora de *SCCmec* (resistente a oxacilina) y la otra no (sensible a oxacilina). Compararon los espectros obtenidos en MALDI-TOF y obtuvieron espectros virtualmente idénticos. Por otro lado, Wang et al²³, mediante la utilización de 100 cepas

de origen clínico, consiguieron diferenciar 2 grupos y localizaron la presencia de 2 picos de mayor intensidad (3.784 y 5.700 Da) presentes en SARM y no en SASM.

Detección de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

Griffin et al²⁴ describen la diferenciación de *Enterococcus faecium* portador del gen *vanB*, responsable de la resistencia a glicopéptidos, a partir de la creación de un modelo estadístico basado en los espectros obtenidos tras extracción con ácido fórmico. La validación prospectiva de los resultados demostró una sensibilidad y una especificidad del 96,7 y el 98,1%, respectivamente. Más recientemente, Nakano et al²⁵ han evaluado la capacidad de la EM MALDI-TOF para diferenciar *E. faecium* *vanA*-positivo (61 aislamientos) de *E. faecium* *vanA*-negativo (71 aislamientos), utilizando para analizar los espectros 3 algoritmos diferentes de ClinProTools v.2.2 y han obtenido una sensibilidad y una especificidad superiores al 90%. En ambos estudios los aislamientos pertenecían a la misma área geográfica, por lo que podrían estar relacionados clonalmente y condicionar los resultados obtenidos.

Detección de *Bacteroides fragilis* portador del gen *cfiA*

Wybo et al²⁶ consiguieron diferenciar 248 cepas clínicas que se agruparon en 2 clusters bien diferenciados (uno con el gen *cfiA* —co-dificante para carbapenemasas— y el otro no) en un dendrograma, calculado a partir de sus perfiles proteicos. Nagy et al²⁷, mediante la utilización de 28 cepas (9 portadoras del gen *cfiA* y 19 no portadoras), validaron un método basado en la presencia o ausencia de una serie de picos en el espectro obtenido por MALDI-TOF en el intervalo 4.000-5.500 Da y consiguieron una precisión del 100%. Johansson et al²⁸ aplicaron con éxito esta metodología para detectar la presencia de *B. fragilis* portador del gen *cfiA* directamente a partir de hemocultivos. Estos resultados sugieren que la EM MALDI-TOF puede ser una herramienta útil para la rápida detección de este mecanismo de resistencia en cepas de *B. fragilis*.

Detección de betalactamasas

La detección directa de betalactamasas en cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina por medio de la tecnología MALDI-TOF la realizaron por primera vez Camara y Hays²⁹, que consiguieron identificar en el espectro de extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos bacterianos en caldo un pico de aproximadamente 29 kDa específico de la betalactamasa. Sin embargo, Schaumann et al³⁰ no pudieron diferenciar de manera fiable aislamientos de Enterobacteriaceae y *P. aeruginosa* productores y no productores de betalactamasas, aplicando el mismo protocolo utilizado para identificación bacteriana, en un intento de integrar el cribado de estas enzimas en el flujo de trabajo de rutina. Más recientemente, Papagiannitsis et al³¹ han detectado en los espectros obtenidos a partir de extractos proteicos periplásmicos de Enterobacteriaceae productoras de cefalosporinasa tipo CMY-2 un pico específico de 39,850 kDa, en un ensayo que podría tener potencial para detectar otras betalactamasas de tipo AmpC.

Klebsiella pneumoniae con pérdida de porina *OmpK36*

La pérdida o expresión reducida de la porina *OmpK36* en *Klebsiella pneumoniae* puede tener un papel importante en la resistencia a carbapenems. Cai et al³² investigaron mediante EM MALDI-TOF la pérdida de esta proteína en 8 aislamientos de *K. pneumoniae* y un aislamiento de *K. oxytoca* resistentes a carbapenems e identificaron 2 picos, de 38.000 y 19.000 Da, como indicadores de la presencia de la porina *OmpK36*. Los autores concluyen que es necesario estudiar más cepas para establecer la robustez del análisis y validar este método.

MALDI-TOF como herramienta para la medida de los efectos antibióticos en la bacteria

Perfil de resistencia cuantitativo

Se trata de un ensayo basado en la comparación de los espectros derivados de aislados bacterianos idénticos cultivados en presencia y ausencia de un antibiótico. Lange et al³³ describieron este ensayo por primera vez relacionando las intensidades de los picos con el crecimiento bacteriano en presencia de un antibiótico. Los aislados resistentes muestran el mismo espectro antes y después de la incubación con el antibiótico, presentando un crecimiento relativo de 1. Los aislados sensibles muestran un descenso en las intensidades del patrón de picos de masas, siendo el crecimiento relativo sobre 0,4. El método está optimizado para la detección de la resistencia al meropenem en *Klebsiella* spp., con un tiempo de incubación de 1 h. La mayoría de las cepas analizadas eran del tipo KPC y no se encontraron resultados positivos para los aislados de tipo OXA-48. Es necesario llevar a cabo más estudios para confirmar la aplicabilidad del método, aunque es un método prometedor, ya que proporciona una evaluación automática de los espectros y en principio puede ser universalmente aplicable.

Perfiles de resistencia en levaduras

Marinach et al³⁴ monitorizaron el proteoma de *Candida albicans* en presencia de diferentes concentraciones de fluconazol, con un tiempo de incubación de 15 h. Los espectros de las levaduras se adquirieron para diferentes niveles de antibióticos. La concentración más baja a la que se detecta un cambio en el perfil del espectro se define como *minimal profile change concentration* (MPCC). La comparación de las MPCC con la CMI determinada por el método del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reveló un alto nivel de concordancia. De Carolis et al³⁵ aplicaron la misma metodología con algunas modificaciones a *Candida* y *Aspergillus* spp. para estudiar la sensibilidad a la caspofungina. Los aislados con el antifúngico se incubaron durante 15 h. Para analizar los resultados, se utilizó el *composite correlation index* (CCI) de Bruker Daltonics como herramienta estadística. Esta herramienta dispone los resultados en forma de una matriz, en la que cada espectro obtenido para cada concentración se compara con las concentraciones máxima y mínima. Los valores de CCI van desde 0, indicando que los espectros son totalmente diferentes, hasta 1, que indicaría la máxima similitud. Esta matriz permite la determinación de la MCC para caspofungina de todos los aislados. Vella et al³⁵ demostraron que el tiempo de reacción podía reducirse hasta 3 h. Para ello, se incubaron los aislados a 3 concentraciones diferentes, sin antifúngico, en la concentración del punto de corte y a concentración máxima. Se comparó el espectro obtenido en el punto de corte con los obtenidos sin antifúngico y con la concentración máxima de este. El análisis informático se realizó a través del análisis de correlación. Saracli et al³⁶ describen la detección de la resistencia a los triazoles (fluconazol, voriconazol y posaconazol) entre *Candida* sp. a través de MALDI-TOF. Para ello incuban los aislados durante 16 h a 3 concentraciones diferentes, sin antifúngico, en la concentración del punto de corte clínico por CLSI o punto de corte epidemiológico y a concentración máxima. De nuevo se utilizan los valores de CCI para calificar los aislados como sensibles o resistentes. Los valores de sensibilidad comparados con el método CLSI para la determinación de la susceptibilidad a antifúngicos varían entre un 54 y un 97%, y la reproducibilidad del ensayo entre el 54 y el 83% para las distintas especies.

Detección de resistencias a través del marcaje con isótopos estables

La incorporación de isótopos naturales estables a los medios de crecimiento con antibióticos permite analizar las resistencias a estos.

Los productos del metabolismo marcados isotópicamente tienen una masa superior respecto de los que no lo han incorporado, lo que facilita su detección por técnicas de EM^{37,38}.

En el trabajo desarrollado por Demirev et al³⁹ se utiliza como control un medio de cultivo comercial en el que el 98% de los átomos de carbono que contiene son ¹³C, al que adicionan estreptomycin y determinan la sensibilidad de distintas cepas de *Bacillus* sp. y *E. coli*. El crecimiento de la bacteria en el medio con antibiótico es la evidencia de su resistencia, que se manifiesta por la incorporación del ¹³C en el perfil proteico. Los resultados obtenidos se analizan usando distintos algoritmos bioinformáticos para informar de la sensibilidad o resistencia de la bacteria.

Sparbier et al⁴⁰ y Jung et al³⁸ incorporan los isótopos unidos a los aminoácidos en los medios de cultivo. En sus trabajos adicionan a los medios ¹³C₁₆-¹⁵N₂-lisina. Determinan, con buenos resultados, la sensibilidad de *P. aeruginosa* frente a meropenem, ciprofloxacino y tobramicina³⁸ y de *S. aureus* frente a oxacilina⁴⁰. El tiempo de incubación de los cultivos varía de 90 min con tobramicina a 180 min con meropenem, por lo que la prueba debe adaptarse a los mecanismos de acción de los antibióticos utilizados. Los resultados no se correlacionan con los valores de CMI obtenidos. No existe linealidad entre la intensidad relativa y la concentración del analito utilizado.

Minisecuenciación

Otra de las aplicaciones de MALDI-TOF es el análisis del ADN con la finalidad de detectar mecanismos de resistencia. El objetivo es detectar cambios en la masa del producto final en un ensayo de extensión a partir de un cebador. Para ello se usan oligonucleótidos específicos que permiten extender el producto unos pocos nucleótidos. Dependiendo del tipo de base introducida el cambio de masa es obviamente distinto y esto es medible en MALDI-TOF, limitándose el análisis a moléculas más pequeñas de 40 pb⁴¹.

Se ha usado esta aproximación para la detección de polimorfismos de nucleótidos simples para la identificación BLEE del tipo SHV y TEM, para la detección de resistencia a rifampicina e isoniazida en *Mycobacterium tuberculosis*, así como resistencia a betalactámicos, fluoroquinolonas, espectinomycin y tetraciclina en *Neisseria gonorrhoeae* y a amoxicilina en *Helicobacter pylori*⁴²⁻⁴⁴. Sin embargo, debido tanto al trabajo manual requerido como a las limitaciones inherentes al procedimiento (detalladas anteriormente), su implementación en los laboratorios de microbiología de manera rutinaria queda un poco en entredicho.

Retos futuros de MALDI-TOF en la detección de resistencias

Los ensayos MALDI-TOF para la detección de resistencias tienen un gran potencial como técnica microbiológica. Algunos métodos ya han sido validados y otros todavía necesitan desarrollarse. Creemos que el futuro de esta tecnología debería centrarse en investigar los siguientes aspectos:

– *Implementación en la rutina clínica de los ensayos de resistencia a betalactámicos a través de la monitorización del antibiótico.* Hasta el momento el procedimiento es todavía lento y los espectros pueden ser difíciles de interpretar para los usuarios no experimentados. El siguiente paso supondría la implementación de un programa informático para la adquisición automática de espectros y la consiguiente interpretación para generar un proceso integrado. En esta línea, y considerando la problemática en torno a las enterobacterias productoras de carbapenemasas, consideramos que la implementación de una prueba rápida para la determinación de estas resistencias en la rutina sería de gran utilidad.

– *Mejora de las bases de datos para la determinación proteómica de determinantes de resistencia.* Construcción de una librería proteómica, constituida por las principales proteínas responsables de la resis-

tencia, que permita la discriminación directa de aislados sensibles y resistentes.

– *Epidemiología molecular: tipado de complejos clonales en S. aureus y otras bacterias.* La detección directa de SARM a partir del perfil proteico plantea bastantes dudas actualmente, pero la aplicación parece prometedora para la diferenciación de complejos clonales.

– *Determinación de múltiples mecanismos de resistencia simultáneamente.* Considerando la etiología múltiple de la resistencia bacteriana en los microorganismos patógenos, MALDI-TOF deberá intentar detectar no solo uno, sino todos los posibles mecanismos de resistencia presentes en el microorganismo.

– *Aplicabilidad en muestras clínicas.* Siguiendo en la línea de la detección de betalactamasas en hemocultivos, creemos que el siguiente paso sería realizar ensayos de resistencia en otras muestras clínicas (como orina) con alta carga bacteriana, de forma que proporcione una respuesta lo más rápida posible.

Agradecimientos

Queremos dar las gracias a la Fundación Francisco Soria Melguizo por el apoyo técnico y logístico proporcionado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012;50:927-37.
- Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2014;52:924-30.
- Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mourinho C, Bou G. Rapid detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:1146-57.
- Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222-7.
- Horneffer V, Strupat K, Hillenkamp F. Localization of noncovalent complexes in MALDI-preparations by CLSM. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006;17:1599-604.
- Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3.
- Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1731-5.
- Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321-4.
- Johansson A, Ekelöf J, Giske CG, Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol.* 2014;10:14:89.
- Oviaño M, Barba MJ, Fernández B, Ortega A, Aracil B, Oteo J, et al. Rapid detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2016;54:754-9.
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7:e31676.
- Sauget M, Cabrolier N, Manzoni M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2014;105:88-91.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2163-71.
- Hooff GP, Van Kampen JJ, Meesters RJ, Van Belkum A, Goessens WH, Luider TM. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012;11:79-84.
- Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Suppl 4:24-32.
- Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 1997;5:234-40.
- Zimmermann S. Detecting aminoglycoside resistance by mass spectrometry. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). April 27-30, 2013; Berlin, Germany; Poster P-1549.
- 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.
- 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.
- Bernardo K, Pakulat N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fleer S, et al. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics.* 2002;2:747-53.
- Lu JJ, Tsai FJ, Ho CM, Liu YC, Chen CJ. Peptide biomarker discovery for identification of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF. *Anal Chem.* 2012;84:5685-92.
- Szabados F, Kaase M, Anders A, Gatermann SG. Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect.* 2012;65:400-5.
- Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci.* 2013;26:430-6.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Tess Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2918-31.
- Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, et al. Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laserdesorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:256-9.
- Wybo A, De Bel O, Soetens F, Echahidi K, Vandoorslaer M, Van Cauwenbergh, 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.
- Nagy E, Becker S, Söki J, Urbán E, Kostrzewa 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(Pt 11):1584-90.
- Johansson A, Nagy E, Söki J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 8):1105-10.
- 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;389:1633-8.
- Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stüing CS, et al. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit.* 2012;18:MT71-7.
- Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Tuma Z, Gniadkowski M, Miriagou V, Hrabak J. Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2952-7.
- Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen GX. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2179-82.
- Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4155-62.
- 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.
- Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, Posteraro P, Perlini 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.
- 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.
- Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl.* 2013;7:767-78.
- Jung JS, Eberl T, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S, et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:949-55.
- Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;24:1194-201.
- 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.

41. Pusch W, Wurmbach J-H, Thiele H, Kostrzewa M. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics*. 2002;3:537-48.
42. 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.
43. Ikryannikova LN, Afanas'ev MV, Akopian TA, Il'ina EN, Kuz'min AV, Larionova EE, et al. Mass-spectrometry based minisequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2007;70:395-405.
44. Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM, Zubkov MM, Pripitnevich TV, et al. Analysis of genetic markers of *N. gonorrhoeae* resistance to beta-lactam antibiotics. *Bull Exp Biol Med*. 2006;141:610-5.