

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Perspectivas de futuro de la espectrometría de masas en microbiología

Jordi Vila^{a,*}, Yuliya Zboromyrska^a, Almudena Burillo^b y Emilio Bouza^b

^aServicio de Microbiología, Hospital Clínic, Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

^bServicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CB06/06/0058), Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Espectrometría de masas
MALDI-TOF
Muestras clínicas
Toxinas
Antígenos
Virología
Parasitología

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se ha introducido con fuerza en muchos laboratorios de microbiología clínica para la identificación rápida y precisa de bacterias y hongos. De hecho, podemos considerar la implementación de esta metodología como una revolución en dichos laboratorios. Además de la identificación microbiana, la EM MALDI-TOF se está utilizando para la detección de algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos y para la tipificación molecular de bacterias. Sin embargo, existe una serie de aplicaciones actuales y futuras que aumentan la versatilidad de esta metodología. Entre estas cabe destacar la aplicación directa a partir de muestras clínicas; la detección de toxinas o de antígenos microbianos específicos, y las aplicaciones en el campo de la virología y de la parasitología.

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

Future applications of mass spectrometry in microbiology

ABSTRACT

Keywords:

Mass spectrometry
MALDI-TOF
Clinical samples
Toxins
Antigens
Virology
Parasitology

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) mass spectrometry (MS) has been vigorously introduced in many clinical microbiology laboratories for the rapid and accurate identification of bacteria and fungi. In fact, the implementation of this methodology can be considered a revolution in these laboratories. In addition to microbial identification, MALDI-TOF MS is being used for the detection of some mechanisms of antibiotic resistance and for the molecular typing of bacteria. A number of current and future applications that increase the versatility of this methodology may also be mentioned. Among these are its direct application on clinical samples, the detection of toxins or specific microbial antigens, and its application in the fields of virology and parasitology.

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

Introducción

En los últimos años la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) ha sido implementada en muchos laboratorios de microbiología clínica como una técnica rápida y fiable para la identificación de bacterias y hongos. Además, otras aplicaciones son una realidad en el día a día de muchos laboratorios, como la detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos, fundamentalmente la detección de betalactamasas, tanto de espectro extendido como carbapenemasas, así como

la tipificación molecular para investigar la clonalidad de los aislamientos de una misma especie. Sin embargo, la EM MALDI-TOF permite otras aplicaciones que se contemplan en esta revisión.

Aplicación directa a partir de producto patológico

La identificación de microorganismos aislados mediante EM MALDI-TOF es ya una realidad ampliamente utilizada no solo para la identificación de microorganismos a partir de una colonia aislada, sino que además permite la identificación de diferentes complejos clonales de la misma especie¹. Otra de las aplicaciones de la EM MALDI-TOF es la identificación de microorganismos a partir de la muestra directa, sin esperar a su crecimiento en medios de cultivo. Sin embargo, en la identificación de microorganismos mediante EM MALDI-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: JVILA@clinic.ub.es (J. Vila).

TOF a partir de muestras directas hay que tener en cuenta una serie de limitaciones. Primero, se necesita una cantidad suficiente de microorganismos para el análisis, lo que hace difícil el uso de esta técnica en las muestras con baja densidad microbiana. Segundo, se requiere un volumen suficiente de muestra que es inversamente proporcional a la densidad bacteriana. La tercera limitación es la presencia de sustancias que pueden interferir en el análisis de espectros (p. ej., restos celulares, distintas proteínas en los líquidos biológicos, restos de meconio en líquido amniótico, etc.) y que no se eliminan completamente durante el proceso de preparación de la muestra. Por otra parte, las muestras demasiado espesas o purulentas —en las cuales es casi imposible separar las células humanas de los microorganismos, sobre todo los leucocitos— son también problemáticas. Además, la presencia de microorganismos intracelulares puede requerir la inclusión de un paso adicional de lisis celular para liberarlos.

Por último, las muestras polimicrobianas no son aptas para la identificación directa, ya que no se dispone de herramientas que permitan discriminar más de un microorganismo en un mismo espectro.

A pesar de las limitaciones comentadas, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos centrados en la identificación microbiana mediante EM MALDI-TOF a partir de muestra directa.

Muestra de orina

Hasta el momento, la muestra clínica en la que se ha demostrado una mejor eficacia en la identificación directa mediante EM MALDI-TOF es la orina. Esta muestra presenta varias ventajas y permite solventar muchas de las limitaciones antes mencionadas: las muestras positivas suelen tener una alta densidad microbiana ($> 10^5$ unidades formadoras de colonias [UCF]/ml); habitualmente se dispone de un volumen suficiente de la muestra (≥ 10 ml), no suele ser espesa y, finalmente, más del 80% de las infecciones urinarias son monomicrobianas.

Se han publicado varios trabajos en los que se ha llevado a cabo la identificación de microorganismos mediante EM MALDI-TOF a partir de orina, aunque todos ellos requieren de algún paso de preparación de la muestra²⁻⁴. La aproximación mediante EM MALDI-TOF ha demostrado una concordancia de aproximadamente el 90% con la identificación convencional. Hay que destacar que la aplicación directa de EM MALDI-TOF a la muestra de orina requiere usar alguna técnica de cribado para descartar las muestras negativas, que representan más de dos tercios de las muestras procesadas en los laboratorios de microbiología. En algunos estudios anteriores el método de cribado empleado fue la citometría de flujo. En el estudio de Burillo et al⁵ se empleó la tinción de Gram como método para identificar las muestras de orina positivas aptas para ser procesadas directamente. En cuanto a los procedimientos de la preparación de la muestra para el análisis mediante EM MALDI-TOF, la mayoría de los autores emplearon centrifugaciones tanto para separar las células humanas como para sedimentar los microorganismos. No obstante, se han descrito otras técnicas (p. ej., diafiltración) para recuperar los microorganismos de la muestra directa de orina⁶ o también un pretratamiento de la muestra basado en la lisis de los leucocitos con una disolución al 10% de dodecilsulfato sódico para liberar las bacterias intracelulares⁷.

La orina es una muestra que, gracias a las características mencionadas anteriormente, no solo permite obtener una identificación directa mediante EM MALDI-TOF sin esperar al cultivo, sino también realizar un antibiograma con el mismo sedimento bacteriano. En un estudio se ha desarrollado un protocolo de procesamiento directo de las muestras de orina para adelantar el resultado microbiológico⁸. Para ello, primero se analizaron todas las muestras mediante citometría de flujo para detectar las muestras de orina con altos recuentos bacterianos. Después, las muestras presuntamente positivas se centrifugaban para separar las células inflamatorias y sedimentar las bacterias y, a continuación, el sedimento obtenido se usaba tanto

para la identificación mediante EM MALDI-TOF como para el antibiograma mediante el método de disco-placa. De este modo, se podía disponer de la identificación microbiana el mismo día de la recepción de la muestra y, además, adelantar el resultado del antibiograma 24 h.

Muestra de líquido cefalorraquídeo

Son varias las publicaciones donde se describe la identificación directa de microorganismos en líquido cefalorraquídeo (LCR). Se ha identificado *Streptococcus pneumoniae* en el LCR de un paciente con meningitis bacteriana⁹ o también *Klebsiella pneumoniae* de una paciente que desarrolló una meningitis bacteriana 2 semanas después de ser operada de un tumor cerebral¹⁰. En 2011, en el congreso anual de la ESCMID (Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas) se presentó un trabajo en el que los autores obtuvieron por EM MALDI-TOF los espectros de 183 muestras consecutivas de LCR, de los cuales 14 fueron positivos por cultivo¹¹. Se analizaron las muestras tras su centrifugación, así como sin centrifugar. Las 14 muestras positivas se procesaron sin y con la extracción previa de proteínas. En ningún caso se obtuvo una identificación válida. Además, los autores realizaron un estudio de sensibilidad de la técnica de EM preparando los inóculos de distintos microorganismos a diferentes concentraciones en muestras de LCR negativas por cultivo convencional y concluyeron que se necesita una densidad importante de microorganismos para usar esta técnica y que su sensibilidad es comparable con la de la microscopía óptica. Según nuestra experiencia, la principal limitación de este tipo de muestra es el escaso volumen de LCR que suele llegar al laboratorio. No obstante, las muestras obtenidas a través de drenajes ventriculares externos permiten la identificación directa con EM MALDI-TOF-MS con alta probabilidad de éxito en caso de infección (tabla 1) (datos no publicados). Esto se explica por 2 razones principales: se dispone de un mayor volumen de muestra y la densidad bacteriana suele ser alta, debido principalmente a la colonización de la superficie interna del tubo de drenaje.

Otro tipo de muestras

En cuanto a otros tipos de muestras, según nuestra experiencia, la posibilidad de aplicar la técnica EM MALDI-TOF dependerá en cada caso de las características de la muestra, del volumen disponible y de la densidad bacteriana. En la tabla 1 se recoge una serie de casos donde la identificación directa se llevó a cabo con éxito, lo que permitió adelantar el resultado al menos 18-24 h (datos no publicados). La concordancia con la identificación convencional realizada a partir del cultivo fue del 100%. Como se puede ver en la tabla 1, la muestra más rentable era el líquido amniótico, ya que presenta las mismas ventajas que la muestra de orina (alta densidad bacteriana, suficiente volumen de la muestra y ser una muestra poco densa). Además, una vez identificado el microorganismo causante de la infección, se puede realizar el antibiograma con el mismo sedimento bacteriano recuperado para el análisis con EM MALDI-TOF, siempre y cuando haya suficientes bacterias para obtener un inóculo en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

Hay que destacar que un número importante de las muestras no son aptas para la identificación directa, ya que presentan una o varias de las limitaciones discutidas con anterioridad. Por eso es necesario el desarrollo de técnicas de fraccionamiento y/o captura que permitan la recuperación de los microorganismos de muestras purulentas o viscosas y, de esta manera, anticipar el diagnóstico microbiológico.

Detección de toxinas o antígenos microbianos específicos

Aparte de las proteínas ribosomales, mayoritariamente representadas en el espectro generado mediante EM MALDI-TOF y utilizadas

Tabla 1

Muestras directas procesadas por espectrometría de masas MALDI-TOF con la identificación fiable (≥ 1.700) y su correlación con el cultivo convencional

Muestra	Tinción de Gram	Cultivo	Crecimiento en el cultivo	Identificación directa por EM MALDI-TOF
LAM	BGN	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	+++	<i>C. sputigena</i>
LAM	BGP	<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	<i>L. monocytogenes</i>
LAM	BGP	<i>L. monocytogenes</i>	+++	<i>L. monocytogenes</i>
LAM	BGN	<i>Proteus mirabilis</i>	+++	<i>P. mirabilis</i>
LAM	CPC	<i>Streptococcus agalactiae</i>	++	<i>S. agalactiae</i>
LAM	CPC	<i>S. agalactiae</i> , <i>Prevotella bivia</i>	+++	<i>S. agalactiae</i>
LAM	CPR	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	<i>S. aureus</i>
LAR	CPC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+++	<i>S. pneumoniae</i>
LCR	BGN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	<i>P. aeruginosa</i>
LCR	BGN	<i>P. aeruginosa</i>	+++	<i>P. aeruginosa</i>
LCR	BGN	<i>P. aeruginosa</i>	+++	<i>P. aeruginosa</i>

BGN: bacilos gramnegativos; BGP: bacilos grampositivos; CPC: cocos positivos en cadenas; CPR: cocos positivos en racimos; EM: espectrometría de masas; LAM: líquido amniótico; LAR: líquido articular; LCR: líquido cefalorraquídeo; MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*.

para la identificación microbiana, el análisis de espectros permite identificar otro tipo de proteínas de relevancia clínica o epidemiológica. Por ejemplo, en 2007, Camara y Hays¹² publicaron un estudio sobre la discriminación entre las cepas de *Escherichia coli* sensibles y resistentes a ampicilina mediante EM MALDI-TOF, basándose en la detección de un pico específico de 29 kDa presente exclusivamente en el espectro de las cepas resistentes y que correspondía a su betalactamasa. Gagnaire et al¹³ detectaron toxina delta mediante EM MALDI-TOF en el espectro de *Staphylococcus aureus*. La toxina delta es un indicador del funcionamiento de uno de los sistemas de *quorum sensing* de *S. aureus*, el sistema del gen regulador accesorio (*agr*, *accessory gene regulator*) que, a su vez, es responsable de regular la expresión de factores de virulencia, como distintas exotoxinas y proteínas involucradas en la adherencia y formación de biopelículas. En este trabajo, los autores identificaron el pico de la toxina delta (3.005 \pm 5 Da) usando la toxina purificada y comprobaron su detección en las cepas isogénicas de *S. aureus* positivas y negativas para la producción de esta toxina. Cabe resaltar que el método propuesto por Gagnaire et al¹³ permite la identificación de la producción de toxina delta mediante el análisis por EM MALDI-TOF de células bacterianas intactas, es decir, el mismo método empleado en la rutina para la identificación microbiana a partir de colonias.

Aparte de la identificación de proteínas directamente involucradas en la patogénesis o resistencia, como la toxina delta o las betalactamasas, es posible detectar ciertas proteínas que sirven como biomarcadores para la identificación rápida de cepas de interés clínico y/o epidemiológico. Así, en el trabajo de Lu et al¹⁴ publicado en 2012, los autores reportaron la presencia de 2 modulinas solubles en fenol (PSM, *phenol soluble modulin*) $-\alpha 1$ y $-\alpha 2-$ en los aislados de *S. aureus* resistente a metilicina (SARM) con SCCmec (*staphylococcal cassette chromosome mec*) tipo IV y V, que se suelen asociar con infecciones comunitarias por SARM. Este hallazgo permite discriminar rápidamente entre cepas de SARM comunitarias (SCCmec, tipos IV y V) e intrahospitalarias (SCCmec, tipos I-III). Además, se observó la asociación de otros 2 picos (m/z 1.835 y 1.863) en el espectro de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina.

Una alternativa para la detección de antígenos bacterianos directamente del producto patológico sería utilizar anticuerpos frente al antígeno en cuestión que estuvieran unidos a partículas magnéticas.

Tras la reacción específica antígeno-anticuerpo se procedería a la detección de la proteína antigénica mediante EM MALDI-TOF después de la disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Esta técnica aplicada al campo de la microbiología permite inmunocapturar y concentrar las proteínas de interés diagnóstico (como pueden ser la toxina de *Clostridium difficile*¹⁵, las toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénico¹⁶, etc.) para su posterior detección mediante EM MALDI-TOF. Soo et al¹⁷ describieron una estrategia similar mediante la utilización de nanodiamantes generados mediante detonación (*ultradispersed diamonds*) para capturar el antígeno secretado al medio de cultivo por *Mycobacterium tuberculosis* complex durante su crecimiento, seguido de su detección e identificación mediante EM MALDI-TOF.

Aplicaciones en virología

El uso de la EM en virología ha avanzado menos de lo que lo ha hecho para la identificación de bacterias y de hongos y, en la actualidad, no ha dado todavía el salto desde los laboratorios de investigación a los de diagnóstico clínico. Se empezó a emplear a mediados de los años noventa, acoplada a otras técnicas diagnósticas (p. ej., con amplificación previa de ácidos nucleicos mediante PCR [*polymerase chain reaction*]). Las razones para este retraso pueden deberse al relativo bajo contenido en proteínas de los virus¹⁸; al peso molecular más alto de las proteínas virales (por encima de los 20.000 Da), o a la presencia de restos de las células empleadas como sustrato para el cultivo in vitro de los virus^{19,20}. Además, se ha estimado que el límite inferior para la detección de virus en muestras clínicas está en 10⁴ copias del genoma/ml²¹. Hoy por hoy, parece que la sensibilidad de MALDI-TOF se queda corta (unas 100 veces por debajo de este límite de detección) por lo que, en muchos de los estudios publicados, se hace necesario cultivar previamente los virus en líneas celulares y, posteriormente, identificarlos mediante esta tecnología²². Pese a ello, sorprende que su uso experimental sea muy prometedor tanto en algunas muestras clínicas directas como para identificar virus cultivados en líneas celulares. Por ejemplo, para la identificación de Herpesvirus²³, virus del papiloma humano²⁴ o hepatitis B^{25,26}, entre otros. Para la identificación de virus también se ha empleado la combinación de la amplificación de ácidos nucleicos por PCR con su posterior identificación mediante EM, empleando equipamiento que se basa en la ionización de las moléculas mediante electronebulización²⁷. Al igual que en otros estudios que emplean esta tecnología, la sensibilidad aumentó a medida que aumentaba el número de copias por mililitro. Una ventaja importante es que se diagnosticaron infecciones mixtas que la PCR de rutina no detectó.

Entre otros campos de la virología en los que se ha empleado EM MALDI-TOF, está la epidemiología. Se ha destinado a tipificar, subtipificar y detectar polimorfismos y mutaciones (como en el caso del virus de la influenza y de los virus de la hepatitis B y C)²⁸⁻³⁰; a estudiar la transmisión de una determinada cepa viral o la relación genética entre varias cepas³¹, y también a estudiar la resistencia a antivirales³²⁻³⁵.

En cuanto a las ventajas del uso de MALDI-TOF para el análisis de virus que se recogen en los estudios publicados, cabe mencionar las siguientes: permite la caracterización de una variedad amplia de virus y el diagnóstico de coinfecciones y la identificación es fiable y rápida en comparación con los métodos de referencia, mucho más laboriosos. Se trata de un método exacto y reproducible que permite la automatización del proceso y es coste-eficaz en comparación con otros métodos más complejos, como los ensayos de neutralización. Además, la EM MALDI-TOF mejora el manejo clínico de los pacientes al ofrecer un diagnóstico etiológico rápido. Las desventajas más importantes están en la sensibilidad de la técnica, lo que por el momento se obvia con técnicas previas de amplificación del material genético, y en que la identificación viral está limitada por la base de datos del fabricante del aparato, que puede no incluir todos los espectros virales necesarios.

Se remite al lector a una excelente revisión³⁶ sobre el uso de esta tecnología para la identificación de virus. Se puede especular que, dado el potencial que tiene esta tecnología en el campo de la virología, en un futuro próximo todas estas aplicaciones se implementarán en los laboratorios hospitalarios de diagnóstico clínico.

Aplicaciones en parasitología y detección de biomarcadores

El uso de EM MALDI-TOF en parasitología está menos desarrollado que en la identificación de otros microorganismos. No obstante, esta tecnología se ha empleado con éxito en varios campos. En cuanto al diagnóstico etiológico de enfermedades parasitarias, se puede identificar *Plasmodium* spp. en hematíes, mediante ionización directa con láser ultravioleta de la protoporfirina IX (grupo hemo) en el interior del parásito³⁷. Con este sistema, el límite de detección es únicamente de 10 parásitos por microlitro de sangre. También ha demostrado su utilidad en la identificación a nivel de especie en cultivos de promastigotes de *Leishmania* spp. aislados de pacientes en quienes la identificación fue correcta en 66 de 69 casos³⁸. Asimismo, se ha aplicado para tipificar *Blastocystis* spp. en cultivo líquido, que fue correcto en todos los casos (n = 19)³⁹.

En cuanto a la metodología, si bien hoy en día existen otras estrategias para la búsqueda de biomarcadores, la EM MALDI-TOF se ha empleado también con dicha finalidad en el campo de la proteómica clínica. Mientras que el suero/plasma es una muestra valiosa para la investigación de biomarcadores proteicos, especialmente en el área de las enfermedades infecciosas, el rango dinámico del proteoma presenta un desafío técnico. El contenido proteico del suero/plasma está constituido por proteínas que se encuentran en elevadas cantidades, tales como albúmina, inmunoglobulinas o transferrina, las cuales constituyen casi el 90% del total de proteínas del suero/plasma y hacen que la detección e identificación de las proteínas poco abundantes sea metodológicamente difícil. Por ello son esenciales métodos de fraccionamiento y separación eficaces para detectar, mediante EM, proteínas presentes en pequeñas cantidades que puedan ser potenciales biomarcadores. Existen diversos métodos para deshacerse de las proteínas mayoritarias. Una vez limpiada la muestra de estas proteínas mayoritarias, el resto de proteínas se analiza mediante EM MALDI-TOF. La identificación de biomarcadores se lleva a cabo comparando el análisis proteómico de muestras de suero de pacientes que presentan la infección objeto de estudio y sueros de individuos control que no tienen la infección. Posteriormente, el análisis de los espectros proteicos de los 2 grupos permite definir el patrón de biomarcadores que hace posible la discriminación entre pacientes infectados y sanos. En una segunda fase, una vez definido el patrón de biomarcadores, se procede a determinar la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos mediante la utilización de una segunda colección de muestras de suero también procedentes de pacientes con la infección, de pacientes con otro tipo de infecciones y de individuos sanos (fig. 1).

Dicha metodología se ha empleado para identificar biomarcadores séricos que permitan diagnosticar la infección por *Trypanosoma cruzi*⁴⁰, *Plasmodium falciparum*⁴¹ o *Opisthorchis viverrini*⁴².

Otro uso ha sido el de buscar nuevos antígenos para el desarrollo de vacunas o de nuevos tests diagnósticos rápidos, como en el caso de *Schistosoma japonicum*⁴³, *Leishmania* spp.⁴⁴ o *Brugia malayi*⁴⁵. La EM MALDI-TOF se ha empleado también para comprender el mecanismo de acción de algunos fármacos antiparasitarios⁴⁶, así como para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios⁴⁷.

Aun así, es necesario optimizar técnicamente los protocolos de trabajo y ampliar el número de espectros incluidos en las bases de datos para permitir la identificación de un número mayor de organismos. Se espera que estas aplicaciones se puedan trasladar a los laboratorios de diagnóstico clínico en un futuro no muy lejano.

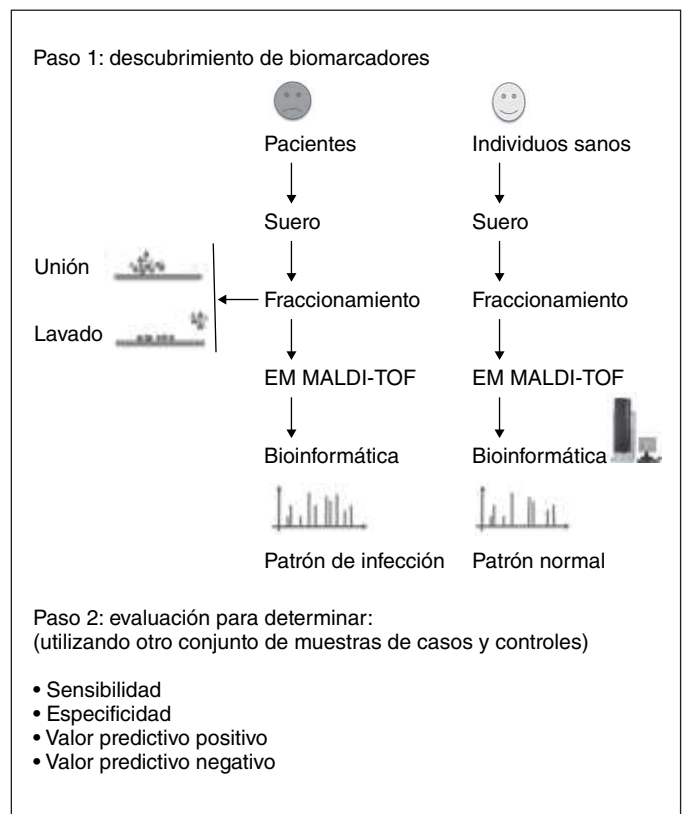


Figura 1. Esquema de la identificación de posibles biomarcadores en plasma/suero humano. EM: espectrometría de masas; MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*.

Papel futuro de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la cadena de diagnóstico rápido de un servicio de microbiología y en la política de los antimicrobianos de un hospital

La EM MALDI-TOF ha demostrado que identifica correctamente la mayoría de los patógenos causantes de bacteriemias y fungemia monomicrobianas, directamente de un hemocultivo positivo⁴⁸. Son varios los estudios publicados sobre este uso⁴⁹⁻⁵¹ y, en algunos, se asocia con recomendaciones de experto para la optimización del uso de antimicrobianos⁵². Se ha demostrado que permite optimizar el tratamiento antibiótico hasta en un 35% de los pacientes con bacteriemia por bacilos gramnegativos⁴⁹; acorta el tiempo hasta la instauración del tratamiento antibiótico eficaz en casi 2 días, y disminuye el consumo de antimicrobianos, la estancia en la unidad de cuidados intensivos en casi 7 días, la estancia hospitalaria en más de 2 días, la mortalidad hospitalaria en aproximadamente un 10% y el coste en un 40%^{50,53-55}. Además, permite suspender el tratamiento antibiótico cuando el microorganismo aislado de los hemocultivos es un contaminante y, por lo tanto, se solicitan menos determinaciones de concentraciones de vancomicina^{54,56}.

No en todos los estudios se obtienen estos excelentes resultados. Se acaba de publicar un pequeño estudio de 2 meses de duración en el hospital de la Universidad de Wisconsin en pacientes de riesgo (unidad de cuidados intensivos, hematológicos y trasplantados) con bacteriemia⁵⁷. Este hospital tiene una prevalencia baja de resistencias antibióticas y tiene implantado un programa muy sólido de recomendaciones de experto para la optimización del uso de antimicrobianos. Los autores no encontraron diferencias en la evolución entre los pacientes a los que se les aplicó esta tecnología diagnóstica y los que no, si bien el coste de identificación del laboratorio de microbiología fue inferior con el uso de EM MALDI-TOF.

Los estudios que evalúan el impacto del uso de esta tecnología tienen un nivel de evidencia bajo, dado que parece obvio que la EM MALDI-TOF permite adelantar considerablemente el diagnóstico etiológico de muestras positivas (p. ej., hemocultivos, urocultivos, etc.), y que ello resulta beneficioso para los pacientes. La mayoría de los estudios publicados son observacionales, con un diseño pre-post. Sería deseable tener estudios de mayor calidad, aunque éticamente es imposible justificar un ensayo clínico con un grupo control al que no se le aplique esta tecnología diagnóstica. Hasta ahora, solo hay una revisión sistemática de la bibliografía publicada en este campo⁵³. De igual forma, la EM MALDI-TOF permite la identificación directa de los uropatógenos causantes de infección urinaria cuando el punto de corte de las bacterias por mililitro de orina llega a un dintel, que oscila entre especies². La mejor sensibilidad se obtiene con recuentos de 10⁵ UCF/ml. Su uso permitiría orientar al clínico sobre la mejor decisión terapéutica con un margen de error de solo un 4%⁵. En los laboratorios de microbiología actuales no se discute ni la conveniencia ni la eficacia del uso de EM MALDI-TOF. Lo que es necesario resolver es su uso inmediato y continuo directamente en muestras clínicas y en aislados relevantes (en el momento en que se produce su positividad) o su uso en un momento determinado del día (por necesidades de la organización del laboratorio). Es importante tener en cuenta que si la EM MALDI-TOF se usa para procesar los hemocultivos positivos en tandas (es decir, 2 o 3 veces diariamente), el retraso en la emisión de la información puede llegar a las 5 h⁵⁸. La automatización de los laboratorios de microbiología y las nuevas posibilidades diagnósticas exigen adaptaciones del laboratorio y hoy (a nuestro juicio) es posible crear rutinas en las que, por ejemplo, los crecimientos que se produzcan en hemocultivos a cualquier hora sean inmediatamente examinados con EM MALDI-TOF, identificados y comunicados al clínico responsable en el acto. En el caso de muestras de orina con detección de microorganismos (mediante tinción de Gram o por citometría de flujo) se puede procesar estas muestras inmediatamente de manera automática con la identificación del patógeno responsable mediante EM MALDI-TOF y comunicar al clínico la información. Además, la incubación robótica y la lectura automatizada de las placas permitirán señalar qué colonias precisan pasar automáticamente a identificación por EM MALDI-TOF.

Todo ello nos llevará a cambiar muchas rutinas de trabajo microbiológico; a decidir qué muestras deben ser examinadas inmediatamente en tiempo real; a seleccionar estudios de antibiograma rápido, y a elegir las pautas de comunicación más eficientes con los clínicos.

La automatización se enfrenta a múltiples problemas de orden práctico⁵⁹, de los que nos gustaría resaltar uno en particular. La automatización puede aumentar la disponibilidad de resultados fuera del horario de atención tradicional de los clínicos, lo que exige la implementación de nuevos sistemas que permitan tomar las decisiones clínicas pertinentes conforme a la recepción de dichos resultados.

Estos son retos a los que no solo la EM MALDI-TOF, sino también los servicios de microbiología y de enfermedades infecciosas, las comisiones de antibióticos, los comités de infecciones hospitalarias y las gerencias de los hospitales deberán dar respuesta en un futuro inmediato.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2015;22:161.e1-7.
2. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110-5.
3. Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J Microbiol Methods.* 2013;92:231-5.
4. March Rossello GA, Gutiérrez Rodríguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduña Domingo A, Bratos Pérez MA. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:89-94.
5. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Creixems 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.
6. Demarco ML, Burnham CA. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am J Clin Pathol.* 2014;141:204-12.
7. Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F, Criado González M, Hernández Egido 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.
8. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect.* 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.025>
9. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bocher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis.* 2010;42:716-8.
10. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta.* 2014;435:59-61.
11. Bjørnholt V, Nilsen SM, Noorland I, Wigemyr M, Løken CH, Müller CS, et al. MALDI-TOF mass spectrometry ID of bacteria directly from cerebrospinal fluid—what you see is what you get. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011. p. O-345.
12. 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.
13. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, Ader F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7:e40660.
14. 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.
15. Kiyosuke M, Kibe Y, Oho M, Kusaba K, Shimono N, Hotta T, et al. Comparison of two types of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer for the identification and typing of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2015;64:1144-50.
16. Kuo FY, Chang BY, Wu CY, Mong KK, Chen YC. Magnetic nanoparticle-based platform for characterization of Shiga-like toxin 1 from complex samples. *Anal Chem.* 2015;87:10513-20.
17. Soo PC, Kung CJ, Horng YT, Chang KC, Lee JJ, Peng WP. Detonation nanodiamonds for rapid detection of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex in broth culture media. *Anal Chem.* 2012;84:7972-8.
18. Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15:397-402.
19. Cobo F. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: a review. *Open Virol J.* 2013;7:84-90.
20. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:380-407.
21. Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Heikens E, Trip H, Hulst AG, De Jong AL, Viveen MC, et al. Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry. *J Virol Methods.* 2015;213:75-83.
22. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep.* 2014;4:6803.
23. Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2008;46:540-5.
24. Cricca M, Marasco E, Alessandrini F, Fazio C, Prossomariti A, Savini C, et al. High-throughput genotyping of high-risk human papillomavirus by MALDI-TOF mass spectrometry-based method. *New Microbiol.* 2015;38:211-23.
25. Jurinke C, Zöllner B, Feucht HH, Jacob A, Kirchhübel J, Lüchow A, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Genet Anal.* 1996;13:67-71.
26. Luan J, Yuan J, Li X, Jin S, Yu L, Liao M, et al. Multiplex detection of 60 hepatitis B virus variants by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55:1503-9.
27. Zhang C, Xiao Y, Du J, Ren L, Wang J, Peng J, et al. Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2549-54.
28. Iliina EN, Malakhova MV, Generozov EV, Nikolaev EN, Govorun VM. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (mass spectrometry) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2810-5.

29. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol.* 2004;40:837-44.
30. Schwahn AB, Wong JW, Downard KM. Rapid typing and subtyping of vaccine strains of the influenza virus with high resolution mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom.* 2010;16:321-9.
31. Ganova-Raeva LM, Dimitrova ZE, Campo DS, Lin Y, Ramachandran S, Xia GL, et al. Detection of hepatitis C virus transmission by use of DNA mass spectrometry. *J Infect Dis.* 2013;207:999-1006.
32. Kim HS, Han KH, Ahn SH, Kim EO, Chang HY, Moon MS, et al. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther.* 2005;10:441-9.
33. Lee JH, Hachiya A, Shin SK, Lee J, Gatanaga H, Oka S, et al. Restriction fragment mass polymorphism (RFMP) analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry for detecting antiretroviral resistance in HIV-1 infected patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E263-70.
34. Posthuma CC, Van der Beek MT, Van der Blij-de Brouwer CS, Van der Heiden PL, Marijt EW, Spaan WJ, et al. Mass spectrometry-based comparative sequencing to detect ganciclovir resistance in the UL97 gene of human cytomegalovirus. *J Clin Virol.* 2011;51:25-30.
35. Zurcher S, Mooser C, Luthi AU, Muhlemann K, Barbani MT, Mohacsi P, et al. Sensitive and rapid detection of ganciclovir resistance by PCR based MALDI-TOF analysis. *J Clin Virol.* 2012;54:359-63.
36. Ganova-Raeva LM, Khudyakov YE. Application of mass spectrometry to molecular diagnostics of viral infections. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13:377-88.
37. Demirev PA, Feldman AB, Kongkasuriyachai D, Scholl P, Sullivan D Jr, Kumar N. Detection of malaria parasites in blood by laser desorption mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74:3262-6.
38. Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, et al. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:551-7.
39. Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, et al. Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:529-36.
40. Ndao M, Spithill TW, Caffrey R, Li H, Podust VN, Perichon R, et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1139-49.
41. Thezenas ML, Huang H, Njie M, Ramaprasad A, Nwakanma DC, Fischer R, et al. PPHPT: a new biomarker candidate of acute *Plasmodium falciparum* infection. *J Proteome Res.* 2013;12:1211-22.
42. Khoontawad J, Laothong U, Roytrakul S, Pinlaor P, Mulvenna J, Wongkham C, et al. Proteomic identification of plasma protein tyrosine phosphatase alpha and fibronectin associated with liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, infection. *PLoS One.* 2012;7:e45460.
43. Boamah D, Kikuchi M, Huy NT, Okamoto K, Chen H, Ayi I, et al. Immunoproteomics identification of major IgE and IgG4 reactive *Schistosoma japonicum* adult worm antigens using chronically infected human plasma. *Trop Med Health.* 2012;40:89-102.
44. Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics.* 2006;6:4187-94.
45. Wongkamchai S, Chiangjong W, Sinchaikul S, Chen ST, Choochote W, Thongboonkerd V. Identification of *Brugia malayi* immunogens by an immunoproteomics approach. *J Proteomics.* 2011;74:1607-13.
46. Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 2011;6:e26660.
47. Frearson JA, Wyatt PG, Gilbert IH, Fairlamb AH. Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends Parasitol.* 2007;23:589-95.
48. 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:O421-7.
49. Clerc O, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis.* 2013;56:1101-7.
50. Tamma PD, Tan K, Nussenblatt VR, Turnbull AE, Carroll KC, Cosgrove SE. Can matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) enhance antimicrobial stewardship efforts in the acute care setting? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:990-5.
51. Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One.* 2012;7:e32589.
52. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis.* 2013;57:1237-45.
53. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:863-76.
54. Nagel JL, Huang AM, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Lassiter J, et al. Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative *Staphylococcus* blood cultures in conjunction with rapid diagnostic testing. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2849-54.
55. Perez 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;137:1247-54.
56. Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gerard M, Aoun M, Martin C, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E568-81.
57. Buss BA, Schulz LT, Reed KD, Fox BC. MALDI-TOF utility in a region with low antibacterial resistance rates. *Clin Infect Dis.* 2015;62:66-7.
58. Schneiderhan W, Grundt A, Worner S, Findeisen P, Neumaier M. Work flow analysis of around-the-clock processing of blood culture samples and integrated MALDI-TOF mass spectrometry analysis for the diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem.* 2013;59:1649-56.
59. Burnham CA, Dunne WM Jr, Greub G, Novak SM, Patel R. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Chem.* 2013;59:1696-702.