

La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica

Natalia Maldonado^{a,*}, Carlos Robledo^a, Jaime Robledo^{a,b}

Resumen

Los métodos fenotípicos empleados para la identificación de microorganismos dependen de procesos metabólicos que requieren de tiempos de incubación mínimos para alcanzar resultados confiables. La espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) se ha instaurado como una metodología relevante para la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, a través de la creación de un espectro de masas específico de género y especie. En esta revisión, se presenta MALDI-TOF MS como una tecnología precisa para la identificación de bacterias, levaduras, mohos, en incluso de virus, que además, permite la reducción del tiempo para obtener un resultado de identificación, que puede impactar los costos de atención y duración de la estancia hospitalaria. La identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas y la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos, prometen un mayor impacto clínico y epidemiológico con el desarrollo e implementación de esta tecnología en los laboratorios de microbiología clínica.

Palabras clave: MALDI-TOF MS, espectrometría de masas, diagnóstico microbiológico, identificación de patógenos, proteómica, infección del torrente sanguíneo, infección del tracto urinario.

MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories.

Abstract

Phenotypic methods used for the identification of microorganisms depend on metabolic processes that require minimum incubation times to achieve reliable results. For this reason, MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) has been established as a relevant methodology for the identification of microorganisms using analysis of proteins, through the creation of a mass spectrum specific for genus and species. In the present review, MALDI-TOF MS is presented as an accurate technology for identifying bacteria, yeasts, molds and viruses; Its use allows reduction of the time to obtain an identification result, which may impact the costs of care and length of hospital stay. The identification of microorganisms directly from biological samples and the detection of mechanisms of antimicrobial resistance, promise an additional clinical and epidemiological impact with the development and implementation of this technology in clinical microbiology laboratories.

Keywords: MALDI-TOF MS, mass spectrometry, microbiological diagnostic, pathogen identification, proteomics, blood stream infection, urinary tract infection.

Introducción

La identificación de microorganismos se ha realizado tradicionalmente por métodos basados en tinciones que permiten la clasificación de la morfología microscópica con el fin de apoyar decisiones diagnósticas y terapéuticas tempranas; así como en pruebas *in vitro* basadas en reacciones bioquímicas utilizadas por sistemas manuales o automatizados, que integran pruebas con diferentes sustratos, incrementando la rapidez y simplicidad de la identificación. Sin embargo, estos métodos fenotípicos tienen limitaciones relacionadas con su dependencia de los procesos metabólicos de los microorganismos, que requieren de un cultivo con crecimiento adecuado y tiempos de incubación mínimos para alcanzar un resultado.

Otros métodos de identificación alternativos que superan las dificultades de los tradicionales han ganado espacio en el laboratorio de microbiología clínica. Las técnicas moleculares se han establecido como procedimientos complementarios a los métodos fenotípicos o incluso como referencia para identificación de microorganismos, en especial la secuenciación del ácido ribonucleico (ARN) ribosómico 16S o la detección de genes seleccionados por reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real¹. El desarrollo de la tecnología MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) ha permitido la utilización de la espectrometría de masas en la identificación

^a Laboratorio Médico de Referencia, Medellín, Colombia

^b Corporación para Investigaciones Biológicas, Unidad de Bacteriología y Micobacterias; Universidad Pontificia Bolivariana, Escuela de Ciencias de la Salud, Medellín, Colombia

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: investigaciones@labmedico.com

Dirección: Calle 63 No. 41-27 Edificio CIMA Piso 2 - Teléfono: 2959000 ext. 9815 - Fax: 2920793

Recibido: 07/12/2016 Aceptado: 20/04/2017

Cómo citar este artículo: N. Maldonado, et al. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio* 2018; 22(1): 35-45

de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie². En este artículo se presenta una revisión descriptiva a partir de una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed realizada en agosto de 2016, con un límite de seis años, en español e inglés. Los términos usados fueron *maldi-tof AND identification*. Se seleccionaron los artículos de investigación, reportes de caso, revisiones de tema y meta-análisis que incluyeran el uso de la tecnología MALDI-TOF MS para el diagnóstico clínico microbiológico.

La espectrometría de masas se ha empleado en los laboratorios clínicos como una herramienta de análisis en química clínica para el diagnóstico de algunos tipos de cáncer, trastornos hereditarios y nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades³. El uso de la espectrometría de masas para identificar bacterias a través de la detección de biomarcadores fue propuesta en 1975 por Anhalt y Fenselau⁴, mediante un estudio que combinó métodos de pirólisis y espectrometría de masas para la caracterización de especies bacterianas patógenas; en el que, al analizar pequeñas moléculas derivadas de bacterias liofilizadas, los autores lograron diferenciar organismos taxonómicamente distintos, pero no lograron diferenciar entre aquellos estrechamente relacionados. En estos primeros experimentos sólo se analizaron moléculas de baja masa molecular; sin embargo, a finales de los años ochenta la inclusión de técnicas de ionización suave en la espectrometría de masas permitieron el análisis de macromoléculas biológicas⁵, desarrollo que mereció el Premio Nobel de Química en el año 2002, compartido por el químico y profesor universitario estadounidense John B. Fenn y el ingeniero químico japonés Koichi Tanaka⁶. A finales de los años noventa, se encontró que la aplicación de la espectrometría de masas en células bacterianas enteras producía espectros de proteínas característicos y reproducibles que podían utilizarse para la identificación bacteriana a nivel de género y especie^{7,8}; el desarrollo de bibliotecas de espectros con cepas de referencia, integradas a programas informáticos con algoritmos de decisión, permitió la aplicación de la espectrometría de masas en el análisis de la composición proteínica de los microorganismos de manera rutinaria en los laboratorios de microbiología con alto grado de precisión, ya que estas proteínas, en su mayoría de origen ribosómico en el rango de masas de 2-20 kDa, así como sus variaciones, generan espectros de masas que son específicos de género y especie^{9,10}.

Fundamento de la técnica

Un espectrómetro de masas se compone de tres unidades funcionales, una fuente de ionizante para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa, un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un dispositivo de detección para monitorizar los iones separados¹¹.

Como se ilustra en la figura 1, en el método que emplea células intactas del microorganismo, una pequeña porción de una colonia de bacterias crecida en medio de cultivo sólido se deposita directamente sobre una placa metálica conductora; un pequeño número de células entre, 10^4 a 10^5 unidades formadoras de colonias son necesarias para el análisis¹². Microorganismos cuya lisis es más difícil, como ciertas bacterias Gram-positivas, micobacterias, levaduras y mohos, a menudo requieren un tratamiento previo adicional con un ácido orgánico fuerte o por lisis mecánica¹³. Posteriormente, a la placa con el microorganismo se adiciona una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, denominada matriz. Tras el secado, la muestra del microorganismo y la matriz se cristalizan y forman un depósito sólido de muestra incrustado en la matriz, la cual es esencial para la ionización exitosa de la muestra pues actúa como un "andamio" en el cual puede ocurrir la ionización y como un proveedor de protones para la ionización³.

Después de la cristalización de la matriz y del compuesto, la placa metálica se introduce en el espectrómetro de masas, en donde la mezcla es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser UV (por lo general, un haz de láser con longitud de onda de 337 nm). La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, causados por la absorción de la energía del haz, desencadena una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación (por ello se denomina "ionización suave"). Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (*peptide mass fingerprinting*)³.

Una vez generado, el perfil espectral del microorganismo de prueba es comparado automáticamente mediante un programa informático con una base de datos de espectros que es construida a partir de cepas de referencia, permitiendo la identificación del microorganismo¹⁴.

La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies¹⁵. Aunque la reproducibilidad de los espectros depende de las condiciones de cultivo de los microorganismos, Valentine y colaboradores demostraron en su estudio que, a pesar de que se presentan diferencias visibles en los espectros al someter a los microorganismos a diferentes condiciones de crecimiento, un conjunto básico de proteínas permanece constante, permitiendo la identificación consistente de microorganismos¹⁶; ya que la mayoría de los espectros de masas del MALDI-TOF se componen de proteínas muy conservadas que son afectadas en un grado mínimo por las condiciones ambientales¹¹.

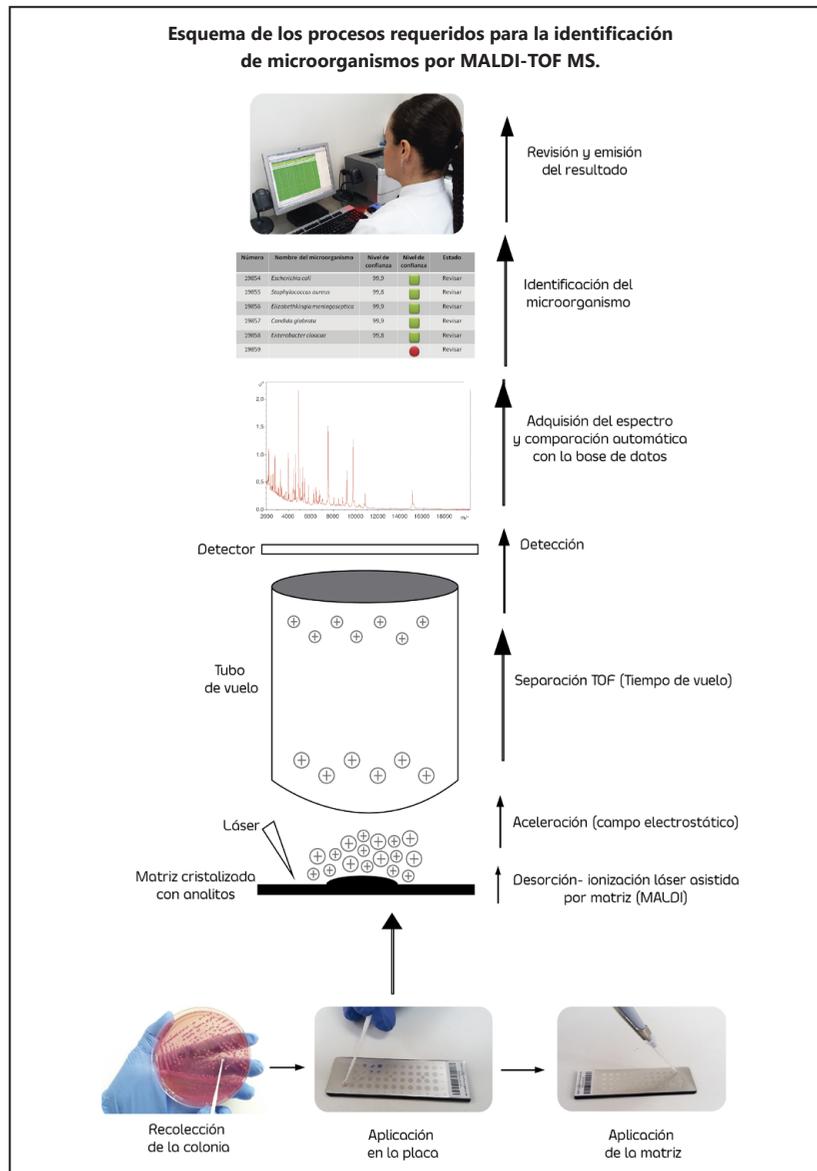


Figura 1. Una pequeña porción de una colonia bacteriana se deposita directamente sobre una placa metálica conductora. Después de la cristalización de la matriz y el material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas y se bombardea con pulsos de láser breves. Las moléculas ionizadas se aceleran a través de un campo electrostático y son expulsadas a través de un tubo de vuelo de metal sometido a vacío hasta que alcanzan un detector, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes, por lo tanto, los analitos son separados para crear un espectro de masas que está compuesto por picos masa a carga (m/z) con intensidades variables. Un espectro es una firma del microorganismo que se compara automáticamente con una base de datos para la identificación a nivel de género y especie. Los resultados son revisados con base en el valor de puntuación (Bruker) o nivel de confianza (Biomérieux) y, de ser aceptables, son posteriormente exportados o consignados en el sistema de información propio del laboratorio. (Adaptado de Croxatto y colaboradores)¹¹.

Los sistemas comerciales más empleados en la actualidad que usan la tecnología MALDI-TOF MS para identificación de microorganismos son el sistema VITEK® MS (bioMérieux, Durham, NC) y el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes, por lo que la capacidad de agregar espectros y construir bases de datos personalizadas es importante para un análisis dis-

criminatorio adicional usando MALDI-TOF MS que además, permita la tipificación de cepas e investigaciones epidemiológicas³. Debido a que los espectros obtenidos por MALDI-TOF MS generalmente no son completamente idénticos a los que están incluidos en las bases de datos, estos sistemas asignan un valor de puntuación (MALDI Biotyper®) o nivel de confianza (VITEK® MS) a cada coincidencia, con base en las similitudes del microorganismo de prueba con los espectros de referencia.

Aunque los principios técnicos de los sistemas VITEK®MS y MALDI Biotyper® son similares, existen diferencias en las bases de datos de espectros de referencia, sistemas operativos y en los algoritmos empleados para la identificación, por lo que los resultados numéricos de ambos sistemas no son directamente comparables⁹.

Sistema VITEK®MS

La base de datos SARAMIS fue creada por AnagnosTec GmbH (Zossen, Alemania) y comercializada por Shimadzu junto con los espectrómetros de masas Axima (Shimadzu, Columbia, MD), antes de ser adquirida por bioMérieux en el año 2010 para su incorporación a la plataforma VITEK®MS⁹. En la actualidad, el sistema VITEK®MS posee dos configuraciones: VITEK®MS IVD and VITEK®MS *Research Use Only* (RUO). El módulo RUO está avalado para uso en investigación y posee una base de datos abierta de espectros de referencia y "Super Espectros", éstos últimos son conglomerados de espectros de al menos 15 aislamientos, obtenidos bajo diferentes condiciones de crecimiento y medios de crecimiento e identificados por métodos ampliamente aceptados, como fenotipificación bioquímica o genotipificación. Este módulo permite determinar la relación de los diferentes aislamientos y llevar a cabo una agrupación jerárquica de los mismos, representando los resultados en dendrogramas. Permite también la creación de nuevos "Super Espectros" que sean representativos de un entorno particular⁹. Para la configuración IVD del sistema VITEK®MS, el software compara el espectro obtenido con el espectro esperado de cada organismo o grupo de organismos contenido en la base de datos, obteniendo una identificación con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad y el número de opciones de microorganismos posibles. El porcentaje de probabilidad se refiere a qué tanto el espectro observado se asemeja al espectro típico de cada organismo. El rango de probabilidades para una identificación correcta es 60-99% y valores cercanos a 99,9% indican una aproximación más exacta. Cuando el porcentaje de probabilidad es menor al 60% el microorganismo se considera como no identificado¹⁷.

Sistema MALDI Biotyper®

El sistema MALDI Biotyper® fue creado y comercializado por Bruker Daltonics (Billerica, MA). El paquete del software Biotyper®, acoplado a los espectrómetros de masas de la línea Flex, es una plataforma abierta que permite guardar los espectros analizados para expandir la base de datos. En el sistema MALDI Biotyper®, el espectro del microorganismo es traducido electrónicamente a una lista de picos que es comparada, mediante el uso de un algoritmo estadístico, con las listas de picos de los microorganismos contenidos en la base de datos de referencia. El sistema emplea un valor de puntuación que oscila entre 0,000 y 3,000 que correlaciona la similitud del microorganismo de prueba a nivel del género y de la especie dentro de la base de datos. Una puntuación que oscila entre 2,300 y 3,000 es interpretada por el software como

una identificación altamente probable a nivel de especie. Las puntuaciones de registro entre 2,000 y 2,299 representan la identificación segura del género y la identificación probable a nivel de especie. En ambos casos, los resultados suelen liberarse como una identificación positiva. Las puntuaciones de registro que van desde 1,700 a 1,999 representan una probable identificación de género, que requiere pruebas adicionales para una identificación positiva a nivel de la especie del microorganismo. Las puntuaciones de registro que van desde 1,699 a 0,000 no se consideran una identificación fiable^{3,17}.

Desempeño del MALDI TOF MS en el laboratorio de microbiología clínica

Diferentes estudios han evaluado el desempeño del MALDI-TOF MS para identificar aislamientos bacterianos a partir del cultivo, con niveles de concordancia superiores al 90%, frente a los métodos convencionales de identificación. En el estudio de Seng y colaboradores¹⁸, se realizó la identificación de 1660 aislamientos clínicos de bacterias (45 géneros y 109 especies) por espectrometría de masas con el sistema comercial MALDI Biotyper®, en paralelo con la identificación fenotípica convencional. Las discrepancias se resolvieron por secuenciación del rRNA 16S y de genes *rpoB*. Se encontró un 95,5% de identificaciones idénticas por ambos métodos, con un 84,1% de concordancia a nivel de especie. La identificación por MALDI-TOF MS requirió un tiempo promedio de seis minutos por aislamiento y un costo estimado del 22-32% del costo total de los métodos estándar de identificación (calculados para el año 2008 como 1,43 € por MALDI-TOF MS, 4,6-6,0 € por la galería de pruebas bioquímicas API (bioMérieux), 5,9- 8,23 € por sistema Vitek 2 (bioMérieux) y 12,65 € por sistema Phoenix de BD Diagnostics)¹⁸.

Otro estudio realizado por Van Veen y colaboradores¹⁹ tras el análisis 327 aislamientos clínicos previamente identificados por métodos convencionales utilizó el sistema de espectrometría de masas Microflex (Bruker Daltonics Inc.). En el estudio se encontró una identificación correcta del 95,1% y 85,6% a nivel de género y especie, respectivamente. Posteriormente, en un estudio de validación con 980 aislamientos clínicos de bacterias y hongos, este grupo demostró que el desempeño de este sistema de espectrometría de masas fue significativamente superior al de los sistemas bioquímicos para la correcta identificación de especie (92,2% frente 83,1%) y produjo menor número de identificaciones incorrectas a nivel del género (0,1% y 1,6%, respectivamente). La correcta identificación de la especie por MALDI-TOF MS en *Enterobacteriaceae* fue el 97,7%, en bacilos gramnegativos no fermentadores de 92%, en *Staphylococcus* spp. de 94,3%, 84,8% en *Streptococcus* spp. y 85,2% en levaduras. La identificación errónea fue claramente asociada con la ausencia de espectros suficientes en la base de datos a partir de cepas de referencia.

Wang y colaboradores²⁰, en un estudio más reciente que comparó los resultados de identificación de 1181 aislamientos analizados en paralelo por el sistema de espectrome-

tría de masas VITEK®MS y los métodos convencionales de identificación, encontraron que el 99,5% de los aislamientos fueron adecuadamente identificados por MALDI-TOF MS, 95,7% identificados a nivel de la especie y 3,6% sólo a nivel del género. El 0,1% de los aislamientos fueron identificados erróneamente y en un 0,4% no se obtuvo resultado de identificación debido a que correspondieron a especies no incluidas en la base de datos. Resultados similares fueron encontrados por Guo y colaboradores²¹ en 1025 aislamientos, en los cuales, el mismo sistema comercial de espectrometría de masas, identificó adecuadamente el 99,6% a nivel de género y 93,37% a nivel de la especie del microorganismo.

La comparación del desempeño entre los dos dispositivos de MALDI-TOF MS disponibles MALDI Biotyper® y VITEK®MS, así como sus bases de datos, ha sido descrita en un estudio realizado por Cherkaoui y colaboradores²², en 720 aislamientos clínicos, empleando como referencia los resultados de los métodos de identificación bioquímica convencionales y resolviendo discordancias por secuenciación de los genes 16S. Se encontró un mejor rendimiento para MALDI Biotyper®, arrojando identificaciones de alta confianza para 680 aislamientos (94,4%), comparado con 639 (88,8%) para el sistema VITEK®MS. Entre las identificaciones de alta confianza, el 0,9% y 0,5% de éstas fueron incorrectas para el sistema MALDI Biotyper® y VITEK®MS, respectivamente. Un estudio más reciente realizado en 1341 aislamientos clínicos, incluyendo 160 de hongos, demostró una identificación precisa a nivel de especie del 97,17% y 96,79% del VITEK®MS y Microflex LT (Bruker Diagnostics Inc.), respectivamente¹⁷.

La tecnología MALDI-TOF MS ha demostrado un buen desempeño para la identificación de aislamientos clínicos de difícil identificación por métodos convencionales, en el estudio de McElvania y Burnham²³, se analizaron 168 aislamientos inusuales y la concordancia entre los métodos convencionales y los dos sistemas comerciales de MALDI-TOF MS fue del 84,5%. Dos aislamientos (1,2%) fueron identificados exclusivamente por VITEK®MS y siete (4,2%) por MALDI Biotyper®, pero ningún aislamiento fue identificado exclusivamente por métodos fenotípicos. El porcentaje de identificaciones correctas a nivel de género fue de 86,3% y 92,3% para VITEK®MS y MALDI Biotyper® respectivamente, mientras que para nivel de especie fue de 85,1% para ambos sistemas comerciales.

Levaduras

La identificación de levaduras por MALDI-TOF MS también ha demostrado ser precisa, y permitir la diferenciación de especies estrechamente relacionadas y fenotípicamente indistinguibles, como las pertenecientes al complejo *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. En el estudio realizado por Rellosio y colaboradores²⁴, se evaluaron 193 aislamientos de levaduras provenientes de muestras clínicas identificados por métodos convencionales (morfología, cultivo en agar cromogénico, sistema API ID 32C y Vitek 2) y MALDI-TOF MS con un espectrómetro de masas Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.). Se encontró una concordancia entre ambos méto-

dos a nivel de especie de 95,38%. Dos aislamientos clínicos previamente identificados como *C. parapsilosis* por métodos convencionales fueron identificados como *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* por MALDI-TOF MS, resultados que fueron confirmados por secuenciación. En otros tres casos de discrepancia, dos fueron resueltos a favor de MALDI-TOF MS.

Un hallazgo similar fue reportado por Galán y colaboradores²⁵, en un estudio realizado en 600 aislamientos de levaduras. De acuerdo con la identificación genotípica, 580 (96,7%) fueron identificadas correctamente a nivel de especie por espectrometría de masas con el instrumento Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.), técnica capaz de discriminar aislamientos pertenecientes a especies que han precisado métodos moleculares para su identificación, como son *C. dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, por lo que los autores concluyen que MALDI-TOF MS es un método rápido que permite la identificación rutinaria de la mayoría de las levaduras de importancia clínica, incluidas especies poco frecuentes, así como la diferenciación de especies estrechamente relacionadas y solamente diferenciables por métodos genómicos.

Hongos filamentosos

Algunos estudios han demostrado que la técnica de MALDI-TOF MS puede ser utilizada para la identificación rutinaria de mohos clínicamente relevantes. Su implementación en el diagnóstico se ha retrasado debido a las dificultades para estandarizar un método de extracción de proteínas eficiente, así como a las limitaciones en las bases de datos disponibles. En consecuencia, algunos grupos de investigación han desarrollado bases de datos suplementarias obtenidas en condiciones experimentales²⁶⁻²⁸. El estudio realizado por Cassagne y colaboradores²⁶ evaluó cinco métodos para la preparación de aislamientos de mohos filamentosos a partir de cultivo y su posterior identificación por espectrometría de masas con el sistema de Bruker Daltonics Inc. de 143 aislamientos, combinando variables relativas a las condiciones de cultivo (caldo/agar), tratamiento con y sin etanol y uso de tratamientos térmicos y procedimientos de lisis mecánica. El método que utilizó la extracción química con ácido fórmico y acetónitrilo a partir de las colonias obtenidas en agar sabouraud suplementado con gentamicina y cloranfenicol, mostró mejor calidad de los espectros y mayor reproducibilidad técnica. Empleando este procedimiento de extracción y la identificación por MALDI-TOF MS los autores construyeron la librería de espectros de referencia con 143 aislamientos de hongos filamentosos. El análisis posterior de 177 aislamientos clínicos arrojó un resultado de identificación a nivel de especie en el 87% y un 12% de fallos, éstos últimos debidos a la ausencia de espectros de referencia en la librería. Entre los aislamientos identificados, la concordancia entre la identificación por MALDI-TOF MS y los métodos fenotípicos fue del 96,15%.

Hallazgos similares fueron encontrados por Lau y colaboradores²⁷ en un estudio que comprendió la construcción de una base de datos de mohos filamentosos con 294 aislamientos

de 76 géneros y 152 especies. La validación posterior en 421 aislamientos clínicos empleando el software Biotyper® en un espectrómetro de masas MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Inc.) obtuvo un 88,9% de identificaciones precisas a nivel de especie. Este desempeño fue superior al obtenido con la librería de espectros de referencia acoplada al equipo en el que sólo un 0,7% y 6,2% de los aislamientos fueron identificados a nivel de especie y género.

Virus

El desarrollo de la identificación de virus por MALDI-TOF MS no ha sido tan prolífico como el observado en bacterias y levaduras, pero se han reportado algunos estudios recientes, en la mayoría de los cuales el material genético viral ha sido amplificado por PCR antes de su análisis por espectrometría de masas. En el estudio de Piao y colaboradores²⁹ se evaluó un protocolo para la detección simultánea de ocho tipos de virus asociados con infecciones entéricas, mediante el uso de PCR multiplex acoplada a MALDI-TOF MS con interpretación de los espectros utilizando el sistema MassARRAY Typer Analyzer (Sequenom, San Diego, CA). En 101 muestras clínicas de materia fecal positivas para virus entéricos por RT-PCR, el protocolo analizado proporcionó resultados con una concordancia de 93,1%. De la misma manera, en el estudio de Peng y colaboradores³⁰ se demostró la utilidad del ensayo combinado entre PCR y MALDI-TOF MS para la detección de enterovirus humanos causantes del exantema vírico de manos, pies y boca. Un estudio reciente que evaluó el desempeño de la espectrometría de masas empleando el sistema MassARRAY MALDI-TOF MS (Sequenom, San Diego, CA) para la detección de 16 tipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (asociados con cáncer) en muestras de citología cervical, encontró una concordancia global casi perfecta en la discriminación de las muestras positivas de las negativas y en los tipos 16, 35, 56 y 66 del VPH, en comparación con un kit comercial de genotipificación³¹.

Identificación de microorganismos a partir de las muestras biológicas

La identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas es una de las aplicaciones con mayor impacto clínico potencial de la tecnología MALDI-TOF MS, ya que contribuye a una instauración más oportuna de la terapia antimicrobiana dirigida³². Su uso ha demostrado un incremento en la supervivencia de los pacientes y la reducción de los costos derivados de la atención en salud³³. Diversos protocolos se han validado con el fin de subsanar algunas de las limitaciones de la identificación directa de microorganismos por MALDI-TOF MS como la interferencia de las proteínas humanas y del medio de cultivo en el caso de los hemocultivos y la alta densidad de microorganismos requerida para obtener un buen espectro de proteínas, ya que MALDI-TOF MS requiere alrededor de 10⁵ unidades formadoras de colonias para tener una cantidad suficiente de proteínas que permitan obtener un espectro confiable y específico^{34,35}.

Sangre

Se ha reportado una variedad de protocolos diseñados para identificar directamente y con precisión los microorganismos presentes en hemocultivos positivos con diferentes procedimientos de preparación de la muestra³⁶; algunos incluyen el empleo de tubos con gel separadores de suero para separar eritrocitos y proteínas a partir de los caldos de hemocultivo³⁷, lisis de las células sanguíneas con ácido fórmico o ácido trifluoroacético³⁸, centrifugaciones diferenciales³⁴ o filtración a través de membranas^{39,40}.

Ferreira y colaboradores³⁴ emplearon un protocolo de preparación de la muestra consistente en una centrifugación a baja velocidad (2000 g por 30 segundos) utilizada para eliminar los leucocitos y otra a alta velocidad (15,500 g 5 minutos) para concentrar bacterias, seguida de un procedimiento de extracción con etanol absoluto, ácido fórmico al 70% (v/v) y acetonitrilo. En 318 hemocultivos positivos encontraron una concordancia entre la identificación por MALDI-TOF MS, empleando el espectrómetro de masas Auto-flex III (Bruker Daltonics Inc.) y los métodos convencionales del 96,6% para el género y 83,3% para especies de bacilos gram-negativos, una concordancia mucho menor se encontró para 239 microorganismos gram-positivos (64,8% y 31,8% a nivel de género y especie, respectivamente).

Estudios más recientes han evaluado la introducción de un procedimiento de filtración a través de membranas para eliminar células sanguíneas y proteínas séricas que permite obtener espectros microbianos libres de interferencias, con concordancias cercanas al 80% que muestran también un desempeño superior para bacterias gramnegativas y levaduras^{39,40}.

El estudio de Lagacé-Wiens y colaboradores⁴¹, mediante el uso del kit de preparación de la muestra Sepsityper® (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y análisis por MALDI Biotyper® de 61 hemocultivos monomicrobianos y dos hemocultivos polimicrobianos encontró una concordancia del 95,1% frente a los métodos convencionales; con una reducción del tiempo promedio del resultado de 34,3 horas en un escenario ideal y de 26,5 horas en una situación más práctica en la que los microorganismos requieren subcultivos y pruebas adicionales para su caracterización definitiva. Un meta-análisis publicado recientemente, que incluyó 21 artículos de investigación que evaluaron el desempeño del estuche Sepsityper® en el sistema de espectrometría de masas Microflex Biotyper®, encontró un porcentaje global de identificación correcta a nivel de especie en el 80% de 3320 botellas de hemocultivo positivo. En bacterias gram-negativas los resultados fueron consistentemente superiores (90%) en comparación con las bacterias gram-positivas (76%) o levaduras (66%)³⁵.

Orina

La identificación rápida de patógenos en muestras de orina es esencial para establecer una terapia antibiótica empírica adecuada para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU), ya que la confirmación microbiológica suele tardar

entre 24 y 48 horas. Algunos estudios han evaluado el desempeño del MALDI-TOF MS para la identificación directa de microorganismos en muestras de orina, en conjunción con el uso de pruebas de tamización iniciales para determinar la positividad de la muestra. En el estudio de Wang y colaboradores⁴², se realizó la comparación entre los resultados de los métodos convencionales de urocultivo, con MALDI-TOF MS con un espectrómetro de masas Auto-flex III (Bruker Daltonics Inc.) acoplado a citometría de flujo (UF-1000i) para tamizar las orinas positivas de individuos con sintomatología de infección urinaria. Los resultados de MALDI-TOF MS fueron consistentes con los obtenidos por los métodos convencionales en 1373 de las 1456 muestras analizadas (94,3%), incluyendo 982 muestras negativas. La concordancia entre la identificación de microorganismos por ambos métodos fue del 90,0% en las muestras monomicrobianas, mientras que en las muestras de orina con dos microorganismos, el MALDI-TOF MS pudo identificar ambos microorganismos en el 9,0% de los casos. Así mismo, Burrillo y colaboradores⁴³ evaluaron el uso conjunto de la tinción de gram y la identificación por el espectrómetro de masas Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.) en muestras de orina, encontrando que en el 82,7% de los casos se obtuvo un resultado anticipado al obtenido por cultivo, con 13,4% de errores menores y 3,9% de errores mayores. Aunque el impacto clínico de estas estrategias debe ser evaluado a través de indicadores referentes a la terapia antimicrobiana, se puede inferir su impacto potencial al proveer resultados de identificación de microorganismos en el transcurso de una hora.

El estudio realizado por Ferreira y colaboradores⁴⁴ comparó el desempeño del MALDI-TOF MS utilizando el sistema MALDI Biotyper®, frente a los métodos convencionales de identificación en 269 muestras de orina positivas. De las 220 muestras con recuentos de colonias > 10⁵ UFC/mL, la identificación por MALDI-TOF MS fue concordante a nivel de especie en 91,8% de los aislamientos. Sin embargo, el desempeño para la identificación de microorganismos en muestras con recuentos bacterianos inferiores no fue satisfactorio, hallazgo confirmado en otros estudios⁴⁵⁻⁴⁸.

Köhling y colaboradores⁴⁶, tras el análisis de 107 muestras de orina de pacientes con sospecha clínica de infección, encontraron una identificación inequívoca del microorganismo por el espectrómetro de masas Voyager DE™ STR MALDI-TOF (Applied Biosystems™, Foster City, CA) de 60,7% de las muestras; sin embargo, en los espectros de 40 de las 45 muestras positivas para las cuales no se obtuvo identificación, se observó un triplete de picos intensos correspondientes a las defensinas humanas 1, 2 y 3, que redujeron la intensidad de los picos de las proteínas bacterianas impidiendo la comparación con la base de datos, lo que demuestra que tanto los bajos recuentos bacterianos como la presencia de sustancias interferentes presentes en las muestras, reducen el desempeño del MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos en muestras de orina.

Líquido cefalorraquídeo

Escasos reportes describen el uso del MALDI-TOF MS para la identificación directa de microorganismos causantes de meningitis o encefalitis. Dos reportes de caso recientes, en los cuales se realizó la identificación del microorganismo en líquido cefalorraquídeo, muestran resultados prometedores. En el reporte de Segawa y colaboradores⁴⁹ se realizó un procedimiento de centrifugación para remover leucocitos y concentrar bacterias, seguido de extracción con etanol absoluto, ácido fórmico al 70% y acetonitrilo al 100%. El espectro obtenido por MALDI-TOF MS empleando el instrumento Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.), correspondió a *Klebsiella pneumoniae*, identificación que fue confirmada por los métodos convencionales. Así mismo, un caso de meningitis neumocócica en el que se utilizó MALDI-TOF MS para identificar con éxito el agente causal, fue reportado por Nyvang Hartmeyer y colaboradores⁵⁰.

Identificación de marcadores de resistencia a los antimicrobianos

Además de la identificación de microorganismos, la tecnología MALDI-TOF MS se ha aplicado a la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, en especial, en la determinación de la producción de β -lactamasas. En estos ensayos, una solución tamponada del antibiótico es mezclada con el cultivo e incubada. Esta mezcla es centrifugada y el sobrenadante es analizado por MALDI-TOF MS. Las bacterias productoras de β -lactamasas inactivan el anillo β -lactámico del antibiótico y tanto el desplazamiento de las masas de las formas no hidrolizadas del antibiótico a las hidrolizadas, como la aparición de nuevos picos por la formación de productos de la degradación del mismo son detectados en el espectro de masas, permitiendo confirmar la presencia o ausencia de bacterias productoras de estas enzimas⁵¹.

Sparbier y colaboradores⁵², empleando un espectrómetro de masas Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.), demostraron que la hidrólisis enzimática del anillo de β -lactámico resulta en la desaparición del pico original en el espectro, a través de un desplazamiento de la masa molecular de +18 Da del agente antibiótico intacto. Esta hidrólisis es seguida por una descarboxilación del producto hidrolizado, lo que resulta en un desplazamiento del pico de -44 Da más de la forma hidrolizada, cambios en los espectros que son fácilmente detectados por MALDI-TOF MS. Mediante este principio, y empleando diferentes agentes inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, tazobactam o ácido 3-aminofenilborónico (APBA), los mismos autores describieron la detección de resistencia a ampicilina en *E. coli*, de cefotaxima y ceftazidima en *E. coli* y *K. pneumoniae*, así como la hidrólisis de carbapenémicos por *K. pneumoniae* a través del uso de la tecnología MALDI-TOF MS. Adicional a los procedimientos basados en la hidrólisis, recientemente se ha reportado la utilidad de esta tecnología para la detección de cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo clonal ST131, productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), mediante la visualización de un pico específico en el espectro de masas^{53,54}.

El estudio de Hrabák y colaboradores⁵⁵ realizado en 124 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyó 30 aislamientos productores de carbapenemasas (VIM, IMP, NDM-1 y KPC-2). Mediante el uso de MALDI Biotyper® y el software flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics Inc.) se determinó el perfil de la molécula intacta de meropenem detectando tres picos correspondientes a meropenem y sus aductos monosódico y disódico, de 383, 405 y 427 m/z respectivamente; y posteriormente, los picos de los productos de la degradación del antibiótico mediante la hidrólisis alcalina que provoca la ruptura del enlace amida del anillo β -lactámico. La determinación de la presencia de la enzima carbapenemasa se estableció por la desaparición del pico de meropenem intacto y del aducto monosódico en el espectro, con una sensibilidad de 96,67%, y especificidad de 97,87% y un tiempo de respuesta de 4 horas partiendo del cultivo puro. Varios estudios posteriores han demostrado que el ensayo de hidrólisis del antibiótico con detección por MALDI-TOF MS es un método rápido para la detección de carbapenemasas clínicamente relevantes, incluyendo IMP, NDM, KPC, VIM, OXA; sin embargo la variabilidad en las metodologías y en el antibiótico empleado como sustrato, muestra la dificultad para definir un método universal para los ensayos de hidrólisis de antibióticos en espectrometría de masas⁵⁶⁻⁵⁹.

La capacidad de MALDI-TOF MS para detectar resistencia a glicopéptidos también ha sido objeto de análisis con resultados prometedores. Griffin y colaboradores⁶⁰, mediante un estudio realizado con el sistema Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.) demostraron que MALDI-TOF MS es capaz de discriminar con rapidez y precisión los aislamientos de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina portadores del gen *vanB*, basado en la presencia de picos específicos en los espectros de masas que corresponden a una serie de péptidos que están específicamente relacionados con la expresión de esta resistencia. Los resultados de la validación prospectiva obtenidos tras la incorporación del procedimiento en el flujo de trabajo de laboratorio demostraron una sensibilidad y especificidad del 96,7 y 98,1%, respectivamente. Este estudio señaló además el potencial de MALDI-TOF MS para identificar la relación entre los aislamientos analizados mediante el análisis de conglomerados, lo que puede ser útil en sospecha de brote para determinar si los casos son el resultado de la transmisión local.

En el año 2000 se publicó el primer estudio sobre la rápida capacidad de discriminación de MALDI-TOF MS entre aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR) y *S. aureus* sensible a meticilina (SAMS), al detectar una serie de picos en el espectro de proteínas resultante del análisis por un espectrómetro de masa Kompact MALDI II (Kratos Analytical Ltd., subsidiaria de Shimadzu Corporation), algunos de ellos conservados a nivel de la especie, y otros característicos del estado de sensibilidad a oxacilina, seis picos para SAMR (m/z 891, 1140, 1165, 1229 y 2127) y dos para SAMS (m/z 2548 y 2647)⁶¹.

Más recientemente, mediante el análisis de los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF MS con el sistema Microflex LT (Bruker Daltonics Inc.), de aislamientos pertenecientes a los cinco grandes complejos clonales de SARM adquirido en el hospital, Wolters y colaboradores⁶² reportaron la existencia de diferencias reproducibles en los espectros, que permiten la discriminación entre los complejos clonales. El análisis posterior de 60 aislamientos clínicos arrojó 15 perfiles de proteínas diferentes y la agrupación jerárquica de estos espectros mostró alta concordancia con los complejos clonales, demostrando la capacidad de MALDI-TOF MS para proporcionar una tipificación de SARM rápida y de bajo costo, con un impacto potencial en el control de infecciones. En un estudio más reciente con 59 aislamientos de *S. aureus* estudiados por el sistema de espectrometría de masas Autoflex I (Bruker Daltonics Inc.), y métodos avanzados de análisis de los espectros, Lasch y colaboradores⁶³ no pudieron identificar biomarcadores que permitieran realizar una sub-diferenciación de estos aislamientos al nivel de clones o complejos clonales distintos, así como tampoco lograron una discriminación evidente de los aislamientos con resistencia a meticilina.

Impacto del uso del MALDI TOF MS

La introducción de nuevas tecnologías en el laboratorio de microbiología, dando por sentado su buen desempeño y capacidad para complementar o reemplazar las tecnologías existentes, requiere el análisis de los costos como etapa final de la implementación. El MALDI-TOF MS no es la excepción, aunque todavía son escasos los estudios que abordan este aspecto.

Una de las principales ventajas de la tecnología MALDI-TOF MS es la facilidad de uso y la automatización del procedimiento que conlleva a mejorar la oportunidad de los resultados. La capacidad para analizar un gran número de aislamientos simultáneamente permite incrementar el rendimiento; además, una vez cargado el instrumento, las identificaciones se pueden realizar en <1 minuto⁶⁴. Esta mejora en el tiempo de respuesta representa un beneficio sustancial en la oportunidad del resultado y la atención del paciente^{65,66}, así como en el ahorro que genera en los costos de atención³³. Sin embargo, la elección de esta tecnología conlleva costos importantes relacionados con la adquisición o arrendamiento del equipo, además de los costos de mantenimiento que han sido calculados de hasta un 10% del costo del equipo anualmente⁶⁷.

Una de las características de MALDI-TOF MS es el menor costo de identificación por aislamiento comparado con el de otros sistemas^{18,22,65,68}. Un estudio prospectivo que evaluó específicamente los aspectos de tiempo para detección y costo efectividad del uso de MALDI-TOF MS en un laboratorio hospitalario en 952 aislamientos clínicos, determinó que el MALDI-TOF MS realizó la identificación de microorganismos 1,45 días más temprano que la metodología estándar del laboratorio, y que la incorporación de esta tecnología permitió ahorrar 52% en costos laborales y reactivos invertidos en la identificación de microorganismos por año⁶⁶. Además, se ha

demostrado que con el uso del MALDI-TOF MS se reduce hasta en una sexta parte el volumen de los residuos de riesgo biológico generados, en comparación con los producidos usando los métodos convencionales⁶⁷.

Esto también fue reportado por Bilecen y colaboradores¹⁷, en un estudio en 1341 aislamientos clínicos que demostró que MALDI-TOF MS arrojó resultados de identificación en un periodo entre 5 a 30 minutos, superando en oportunidad del resultado a los métodos bioquímicos convencionales, que tardan entre 6-18 horas.

La importancia de la introducción de una tecnología diagnóstica debe medirse por el impacto en la atención del paciente relacionado con instauración de un pronto tratamiento dirigido, disminución de la morbilidad, mortalidad y estancia hospitalaria, entre otros. En una revisión sistemática reciente se analizaron diez estudios que cumplían los criterios seleccionados entre 775 reportados en la literatura³³, se encontró que el uso del MALDI-TOF MS se asoció con una disminución en los costos de atención hospitalaria y días de estancia, con reducción en los tiempos de instauración de una terapia adecuada.

Conclusión

La espectrometría de masas MALDI-TOF ha demostrado ser una tecnología precisa y rápida para la identificación de microorganismos.

La capacidad de MALDI-TOF MS para identificar con precisión diversos tipos de microorganismos como bacterias, levaduras, mohos y virus, la hacen superior a los métodos convencionales de identificación; lo que a su vez representa un reto para los laboratorios de microbiología, pues abre un espectro de "nuevos" géneros y especies no identificadas de manera rutinaria, cuyo hallazgo podría tener implicaciones clínicas y epidemiológicas. Es por esta razón que es recomendable que los resultados de microorganismos inusuales obtenidos por espectrometría de masas, se acompañen de una revisión de la bibliografía existente con el fin de que el laboratorio esté en la capacidad de orientar al médico en el significado de este tipo de aislamientos dentro del contexto de cada paciente, información útil para la toma de decisiones terapéuticas y de manejo, así como para el servicio de control de infecciones institucional e incluso para los sistemas de vigilancia en microbiología, locales y nacionales.

La posibilidad de identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas por espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece una ventaja sobre los procedimientos de microbiología tradicionales basados en el cultivo, pero es recomendable que su implementación esté integrada a algoritmos diagnósticos que integren los resultados de estas nuevas tecnologías, con los de técnicas convencionales de laboratorio como las coloraciones o el análisis citoquímico

de las muestras, que permitan incrementar su desempeño y proporcionarle al médico un resultado que además de ser rápido, sea preciso.

Finalmente, la implementación de protocolos para la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos, representa una revolución en los procedimientos de microbiología tradicionales; no obstante, a la fecha, MALDI TOF MS no reemplaza el resultado del antibiograma tradicional que permite la determinación de la sensibilidad *in vitro* a un panel completo de antimicrobianos.

La incorporación de la espectrometría de masas al flujo de trabajo del laboratorio de microbiología permite obtener un resultado de identificación definitivo en un tiempo no imaginable con los métodos convencionales de identificación. Con el objetivo de lograr que la reducción en el tiempo del resultado redunde en una instauración temprana de la terapia antimicrobiana adecuada, así como en la disminución de los costos de atención y de la duración de la estancia hospitalaria, se precisan canales directos e inmediatos de comunicación entre el laboratorio y el médico. Por esto, la implementación de tecnologías de diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas debe estar integrada a un programa institucional de gerenciamiento de antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*, en inglés), permitiendo la optimización de la toma de decisiones en beneficio del paciente.

La espectrometría de masas MALDI-TOF va a ser una tecnología de uso común en los laboratorios de microbiología. Sus evidentes ventajas, a pesar del costo significativo de la adquisición o arrendamiento del instrumento; además de los bajos costos de operación comparados con los de otros métodos convencionales, hacen de esta una tecnología que puede reemplazar en el futuro, muchos de los procedimientos utilizados hasta ahora en el laboratorio de microbiología.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que ha seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes

Financiación. Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno declarado

Referencias

- Nolte FS, Caliendo AM. Molecular Microbiology. In: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011. P. 27-27-59
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):100-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770. Epub
- 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(3):547-603.
- Anhalt J, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219-25.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2:151-153
- Nobel Prize [Internet]. Suecia: Nobel Media AB 2014; [cited 2017 MAR 27]. "The Nobel Prize in Chemistry 2002". Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol. 1996 Nov;14(11):1584-6.
- Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10(15):1992-6.
- Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis. 2013;57(4):564-72.
- Petti CA, Weinstein MP, Carroll KC. Systems for Detection and Identification of Bacteria and Yeasts. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 15-26.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):380-407.
- Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. Biochim Biophys Acta. 2015 Jun;1854(6):528-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022. Epub 2014 Nov 1.
- Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. Clin Lab Med. 2013 Sep;33(3):589-609. doi: 10.1016/j.cll.2013.03.001.
- Murray PR. What Is new in clinical microbiology: microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology. J Mol Diagnostics. 2012;14(5):419-23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmol.2012.03.007>
- Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory Clin Biochem. 2011 Jan;44(1):104-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017. Epub 2010 Jul 8.
- Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2005 Jan;71(1):58-64.
- Bilecen K, Yaman G, Ciftci U, Laleli YR. Performances and Reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF Mass Spectrometry Systems for the Identification of Clinical Microorganisms. Biomed Res Int. 2015;2015:516410. doi: 10.1155/2015/516410. Epub 2015 Dec 17.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49(4):543-51.
- Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48(3):900-7.
- Wang W, Xi H, Huang M, Wang J, Fan M, Chen Y, et al. Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. J Thorac Dis. 2014;6(5):524-33.
- Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. J Thorac Dis. 2014;6(5):534-8.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1169-75.
- McElvania TeKippe E, Burnham C a D. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;(May 2013):2163-71.
- Rellosso MS, Nievas J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluation of mass spectrometry: MALDI-TOF MS for fast and reliable yeast identification. Rev Argent Microbiol. 2015 Apr-Jun;47(2):103-7. doi: 10.1016/j.ram.2015.02.004. Epub 2015 Apr 14.
- 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. 2015 Jun-Jul;33(6):372-8. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.003. Epub 2014 Nov 29.
- Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, 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(12):e28425. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028425>
- Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a Clinically Comprehensive Database and a Simple Procedure for Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol [Internet]. 2013;51(3):828-34. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.02852-12>
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella a., Florio a. R, 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 [Internet]. 2012;18(5):475-84. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14625532>
- Piao J, Jiang J, Xu B, Wang X, Guan Y, Wu W, et al. Simultaneous Detection and Identification of Enteric Viruses by PCR-Mass Assay. PLoS One [Internet]. 2012;7(8):e42251. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042251>
- Peng J, Yang F, Xiong Z, Guo J, Du J, Hu Y, et al. Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis. J Clin Virol [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;56(2):170-4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653212004088>
- 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 [Internet]. 2015;38(2):211-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938746>.
- 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 Sep;137(9):1247-54. doi: 10.5858/arpa.2012-0651-OA.
- 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;863-76.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porrás-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(4):546-51.
- Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. Int J Microbiol [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1-10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2015/827416/>
- Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. J Infect Public Health. 2016 Jun 13. pii: S1876-0341(16)30068-5. doi: 10.1016/j.jiph.2016.05.011. [Epub ahead of print]
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol [Internet]. 2010;48(2):444-7. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01541-09>

38. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* [Internet]. 2009;4(11):e8041. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008041>
39. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wayne Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3):805–9.
40. Farina C, Arena F, Casprini P, Cichero P, Clementi M, Cosentino M, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures using the lysis-filtration technique and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a multicentre study. 2015;245–50.
41. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky J a., Nichol K a., Pang PF, Guenther J, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3324–8.
42. 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(3):231–5.
43. 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(1).
44. Ferrer 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(6):2110–5.
45. Kim Y, Park KG, Lee K, Park Y. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens From Urine Samples Using the Vitek MS System Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. 2015;416–22.
46. Köhling HL, Bittner A, Müller KD, Buer J, Becker M, Rübber H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol*. 2012 Mar;61(Pt 3):339–44. doi: 10.1099/jmm.0.032284-0. Epub 2012 Jan 23.
47. Rosselló GAM, Rodríguez MPG, de Lejarazu Leonardo RO, Domingo AO, Pérez MÁB. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2014;33(2):89–94.
48. Demarco ML, Burnham CAD. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(2):204–12.
49. 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. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.024>
50. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Böcher S, Damkjær Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(9):716–8.
51. Hrabák J, Chudáková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):103–14.
52. 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(3):927–37.
53. Lafolie J, Sauget M, Cabrolier N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J Hosp Infect*. 2015 Jul;90(3):208–12. doi: 10.1016/j.jhin.2014.12.022. Epub 2015 Feb 28.
54. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichihama S. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* using VITEK MS Plus matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:7–9. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.016. Epub 2015 Sep 28.
55. 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(9):3222–7.
56. Knox J, Jadhav S, Seviar D, Agyekum A, Whipp M, Waring L, et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J Clin Microbiol*. 2014 Nov;52(11):4075–7. doi: 10.1128/JCM.02121-14. Epub 2014 Sep 3.
57. 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 Oct;105:88–91. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.004. Epub 2014 Jul 9.
58. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol*. 2014 Apr;58(4):325–9. doi: 10.1111/lam.12203. Epub 2013 Dec 18.
59. 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 Sep;49(9):3321–4. doi: 10.1128/JCM.00287-11. Epub 2011 Jul 27.
60. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, 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(9):2918–31.
61. Edwards-Jones V, Claydon M a., Evason DJ, Walker J, Fox a. J, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2000;49(June 1999):295–300.
62. Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* [Internet]. Elsevier GmbH; 2011;301(1):64–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S143842211000072X>
63. Lasch P, Fleige C, Stämmeler M, Leyer F, Nübel U, Witte W, et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods*. 2014 May;100:58–69. doi: 10.1016/j.mimet.2014.02.015. Epub 2014 Mar 12.
64. Mitsuma SF, Mansour MK, Dekker JP, Kim J, Rahman MZ, Tweed-Kent a., et al. Promising new assays and technologies for the diagnosis and management of infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2013;56(7):996–1002.
65. Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, et al. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016 Jun 24. pii: S1684-1182(16)30063-9. doi: 10.1016/j.jmii.2016.06.002. [Epub ahead of print]
66. 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 T. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012;50(10):3301–8. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01405-12>
67. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Bacterial Species Identification: A Review of Diagnostic Accuracy and Clinical and Cost-Effectiveness [Internet]. Ottawa; 2011 [cited 2015 Oct 1]. Available from: https://www.cadth.ca/sites/default/files/pdf/htis/april-2011/L0259_MALDI-TOF_Final.pdf
68. Legarraga P, Moraga M, Lam M. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chil infectología*. 2013;30(2):140–6.