
Revisión

Yuliya Zboromyrska¹
Mario Ferrer-Navarro²
Francesc Marco^{1,2}
Jordi Vila^{1,2}

Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas

¹Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

²Centro de Salud Internacional (CRESIB), Barcelona.

RESUMEN

En la última década hemos asistido a un notable incremento en el número de cepas aisladas en el medio hospitalario que son productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o, más recientemente, de carbapenemasas. Esta situación hace patente la necesidad de disponer de un sistema de detección rápida de estos mecanismos de resistencia que permita seleccionar de forma precoz el antibiótico más adecuado para poder mejorar la asistencia al paciente. Estudios recientes avalan la posibilidad de usar sistemas de espectrometría de masas (MS), específicamente sistemas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight) para identificar determinados mecanismos de resistencia ya que su empleo ofrece diversas ventajas. En primer lugar, el coste económico de cada determinación es claramente inferior al de las técnicas moleculares clásicas de detección de genes de resistencia. En segundo lugar, la detección de resistencias mediante MALDI-TOF permite reducir el tiempo de obtención de resultados en comparación con los métodos de rutina actualmente empleados. Por último, cabe la posibilidad de que nos permita detectar enzimas no descritas previamente, de las que no se dispone de información acerca de los genes que las codifican. Por todo ello, creemos que ésta puede ser una metodología muy útil para implementar en los laboratorios de microbiología clínica. En esta revisión se pretende exponer los últimos avances en esta área.

Detection of antibacterial resistance by MALDI-TOF mass spectrometry

ABSTRACT

In the last decade we have witnessed a remarkable increase in the number of strains isolated in hospitals that are producing extended spectrum β -lactamases (ESBL) or, more recently, carbapenemases. This makes clear the need for a system for rapid detection of these resistance mechanisms that allow the selection of the most suitable antibiotic treatment in order to improve patient care. Recent data support the possibility of using mass spectrometry (MS), specifically MALDI -TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization, Time-of-Flight) systems to identify specific resistance mechanisms and their use offers several advantages. First, the economic cost of each determination is clearly inferior to the classical molecular techniques for detection of resistance genes. Second, detection of resistance by MALDI -TOF reduces the time for obtaining results compared to the routine methods currently employed. Finally, the possibility that this method allows us to detect enzymes not previously characterized, that there is no information about the genes that encode them. Therefore, we believe that this may be a good tool to implement in clinical microbiology laboratories. This review aims to present the latest developments in this field.

INTRODUCCION

El principal objetivo de un laboratorio de microbiología clínica es proporcionar lo más rápidamente posible información fiable sobre el agente etiológico responsable de una infección y si se trata de una bacteria, su sensibilidad antibiótica. Dado el notable incremento en el número de cepas aisladas en el medio hospitalario que son productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o incluso carbapenemasas, es cada vez más importante disponer de sistemas de detección rápida de estos mecanismos de resistencia. La información obtenida nos debe permitir instaurar el tratamiento antimicrobiano más adecuado que mejore la asistencia dispensada al paciente al mismo tiempo que contribuya a mejorar el control

Correspondencia:
Jordi Vila
Servicio de Microbiología, Hospital Clinic
Villarroel, 170; 08036 Barcelona
E-mail: jvila@ub.edu

de la aparición de bacterias resistentes y disminuir el gasto en antibióticos.

El sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight) es una plataforma adoptada en algunos laboratorios de microbiología clínica que permite la identificación, de forma rápida y sencilla, de los microorganismos (bacterias, levaduras) más habituales.

Estudios recientes han demostrado la posibilidad de que el sistema MALDI-TOF también pueda emplearse para identificar diversos mecanismos de resistencia a distintos agentes antimicrobianos. Para este fin han sido propuestas varias estrategias. En el año 2000, Edwards-Jones *et al.* emplearon la espectrometría de masas para discernir entre cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles (SASM) y resistentes a meticilina (SARM)¹. El estudio se llevo a cabo analizando siete cepas sensibles y siete resistentes a la meticilina y además, se incluyeron en el estudio seis estafilococos coagulasa-negativos. A pesar de que los autores demostraron las diferencias en el perfil proteico entre SASM y SARM, el bajo número de cepas estudiadas hace que los resultados tengan escasa fiabilidad. Durante los años posteriores aparecieron más estudios en este campo que, a pesar de múltiples limitaciones, confirmaron la potencial utilidad del sistema MALDI-TOF para la rápida discriminación entre SASM y SARM²⁻⁴. Por otro lado, Majcherczyk *et al.* exploraron con éxito, en el año 2005, la capacidad de esta metodología para detectar diferencias sutiles encontradas entre los perfiles proteicos generados por cepas isogénicas de SARM, sensibles y resistentes a meticilina o teicoplanina⁵. Así mismo, esta tecnología también permitió diferenciar entre aislados de *Enterococcus faecium* portadores del gen *vanB* y cepas sensibles a vancomicina⁶.

Uno de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos es la producción de enzimas que modifican o hidrolizan los antibióticos, como las β -lactamasas. Su rápida detección mediante el empleo de sistemas MALDI-TOF ha sido objeto de varios estudios. Por ejemplo, Camara y Hays⁷ estudiaron los perfiles generados por dos cepas de *Escherichia coli*, sensible y resistente a ampicilina, tras incubadas en presencia o ausencia del antibiótico. En el perfil proteico obtenido de la cepa resistente incubada con ampicilina fueron capaces de detectar el pico correspondiente a la β -lactamasa responsable de la resistencia al antibiótico. Por otro lado, Wybo *et al.*, mediante el uso de MALDI-TOF, lograron discernir aislados de *Bacteroides fragilis* portadores del gen *cfiA*, responsable de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos, de cepas *cfiA* negativas⁸. En este estudio se determinó que los dos grupos de cepas estudiadas eran genotípicamente distintos mediante el empleo de diferentes técnicas de genotipado. Para la comparación objetiva de los espectros de espectrometría de masas obtenidos se utilizó el índice de correlación compuesto del sistema (composite correlation index (CCI), MALDI Biotyper), un robusto método estadístico que permite diferenciar dos poblaciones. Además, los autores resaltan que la discriminación entre cepas portadoras y no-portadoras del gen *cfiA* no se basa exclusivamente en la presencia o ausencia de un único pico específico, corres-

pondiente al enzima que codifica dicho gen, sino en un análisis completo de los espectros de espectrometría de masas característicos de cada grupo genético. A pesar de que el método ha demostrado un valor predictivo positivo y negativo del 90% y 99,2%, respectivamente, usando puntos de corte de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), hay que destacar que en raras ocasiones podemos esperar que aislados sensibles y resistentes a un antimicrobiano presenten perfiles proteicos diferentes. Unos meses más tarde estos resultados fueron corroborados por Nagy *et al.*⁹.

Recientemente han sido publicados diversos trabajos donde se ha llevado a cabo la detección de actividad β -lactamasa usando una metodología basada también en la espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta nueva estrategia se basa en la comparación del perfil de picos que genera el agente antimicrobiano intacto (no-hidrolizado) con el perfil obtenido después de la hidrólisis de anillo β -lactámico por parte de las β -lactamasas presentes en el microorganismo objeto de análisis. Burckhardt y Zimmermann propusieron el uso de la tecnología MALDI-TOF para la detección de la actividad carbapenemasa en bacilos gramnegativos (BGN)¹⁰. El antibiótico de elección para la detección de la actividad carbapenemasa fue el ertapenem. Brevemente, el protocolo es el siguiente: los aislados de bacterias sensibles y resistentes a carbapenems son cultivados en placas de agar sangre durante 18-24 h a 36°C. A continuación, un inóculo bacteriano recogido con un asa de 10 μ l es resuspendido en 1 ml de 0,45% NaCl con y sin ertapenem a una concentración de 0,5 g/L. Después de un tiempo de incubación máximo de 2,5 horas a 36°C la suspensión bacteriana es centrifugada durante 90 segundos a 12,000 rpm y se deposita un microlitro del sobrenadante sobre la placa de lectura del espectrómetro de masas y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se aplica 1 μ l de la solución de matriz [ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), a 5 mg/ml en acetonitrilo:agua, 1:1] sobre cada pocillo con muestra y se deja evaporar a temperatura ambiente. Finalmente la placa se introduce en el equipo MALDI-TOF para la adquisición de los espectros de espectrometría de masas correspondientes a cada muestra. El rango de masas en que se realizó el análisis es de 438 a 530 Da, ya que es el rango de masas donde se encuentra el ertapenem y el producto de degradación derivado de la actividad carbapenemasa. El resultado se interpreta como positivo para la actividad carbapenemasa si los picos propios de ertapenem intacto (476 Da) y los aductos generados debido a la incorporación de átomos de sodio (499 Da: uno sodio, y 522 Da: dos sodios) desaparecen y aparece el pico correspondiente al antibiótico hidrolizado y descarboxilado (450 Da). El procedimiento requiere establecer previamente un perfil del compuesto β -lactámico puro que se pretende estudiar, así como los picos de los productos de su degradación (hidrólisis y descarboxilación). Los autores del citado trabajo observaron que el tiempo necesario para hidrolizar la cantidad añadida de antibiótico depende del tipo de carbapenemasa que posee el microorganismo y no de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibiótico determinada por los métodos de rutina. Así pues, las cepas con los enzimas de resistencia NDM-1

y IMP-1 necesitan solo 1 hora para la degradación completa de ertapenem, mientras que las cepas que expresan el enzima VIM-2 necesitan de 2.5 horas para la degradación completa de ertapenem. En este trabajo se analizaron diversas enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* y también *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas. Por otro lado, Hrabák *et al.* emplearon esta metodología para la detección de actividad carbapenemasa en varias especies de enterobacterias y *P. aeruginosa*, pero esta vez utilizando meropenem como antibiótico diana¹¹. En este trabajo, en primer lugar se determinaron los picos que correspondían a los productos de degradación de meropenem mediante una hidrólisis alcalina (NaOH) del antibiótico lo que provoca la ruptura del enlace amida de anillo β -lactámico. Esto se debe a que el hidróxido sódico provoca la hidrólisis del meropenem de la misma forma que la cataliza la carbapenemasa, pero si bien el NaOH provoca esta reacción en condiciones extremas de pH, la carbapenemasa la lleva a cabo en condiciones fisiológicas. De este modo se pudieron detectar los picos correspondientes al meropenem hidrolizado (401,483 m/z) y sus aductos: monosódico (423,462 m/z), disódico (445,441 m/z) y trisódico (467,420 m/z). Por otro lado, se determinó el perfil del antibiótico intacto detectando 3 picos de 383, 405 y 427 m/z que corresponden a meropenem y sus aductos monosódico y disódico, respectivamente. El meropenem, su producto de hidrólisis y los aductos correspondientes fueron empleados para llevar a cabo la calibración interna del equipo de espectrometría de masas. Por último, los autores probaron diferentes formulaciones en la preparación de la matriz para determinar que formulación de matriz era la más adecuada para la visualización de los picos deseados, así como diferentes concentraciones de meropenem para determinar el límite de detección del equipamiento de espectrometría de masas empleado. Se observó que la matriz DHB (ácido 2,5-dihidrobenzoico) preparada en 50% etanol a una concentración de 10 mg/mL produce un menor número de picos de fondo en el rango de espectro de masas analizado (360–600 m/z). A diferencia del estudio de Burckhardt y Zimmermann¹⁰, en el trabajo de Hrabák *et al.*¹¹, las cepas estudiadas fueron cultivadas en placas de agar Mueller-Hinton. Posteriormente se preparó un inóculo equivalente a una turbidez McFarland de 8 en tampón Tris-HCl y después de un paso de centrifugación, el sedimento se utilizó para el ensayo de hidrólisis de meropenem. Las diferentes cepas fueron incubadas con el antibiótico durante 3 horas y a continuación, las muestras fueron centrifugadas y un microlitro del sobrenadante fue utilizado para el análisis mediante MALDI-TOF. En este estudio el resultado de la prueba se consideró positivo para la detección de actividad carbapenemasa si desaparecía tanto el pico de meropenem intacto (382,975 m/z) como del aducto monosódico (405,193 m/z). Se analizaron 124 cepas de bacilos gramnegativos, entre ellas 30 cepas productoras de carbapenemasa. No se observó ningún resultado falso-positivo o falso-negativo con el grupo de enterobacterias, pero se produjeron dos resultados falsos positivos y un falso-negativo entre 25 cepas estudiadas de *P. aeruginosa*. Ambas cepas tenían CMI elevadas tanto por microdilución

en caldo (meropenem) como por E-test (imipinem), pero se consideraron no productoras de carbapenemasa mediante el ensayo espectrométrico de hidrólisis de imipinem. Los autores atribuyen estos resultados falsos-positivos a otros mecanismos como, por ejemplo, la interacción de meropenem con componentes de la pared celular o sobreproducción de AmpC o bien debido a la presencia de una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE). El resultado falso-negativo podría ser explicado, según los autores, por la baja expresión de la carbapenemasa. El ensayo demostró una sensibilidad y especificidad de 96,67% y 97,87%, respectivamente. Hay que destacar que el método descrito es capaz de detectar la actividad carbapenemasa independientemente de los valores de CMI a los carbapenémicos. Un año más tarde, los mismos autores publicaron otro trabajo donde se modificaron algunos parámetros del ensayo¹². En este trabajo se analizaron 108 aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas, 2 cepas de *Acinetobacter baumannii* productor del enzima NDM-1 y 35 enterobacterias resistentes a compuestos carbapenémicos mediante otros mecanismos. En este estudio no se registró ningún resultado falso negativo o positivo, aunque hay que apuntar que en este segundo trabajo Hrabák *et al.* no incluyeron ninguna cepa de *P. aeruginosa*, que fue el microorganismo que generó los falsos resultados en el trabajo anterior¹¹.

Más recientemente, Sparbier *et al.*¹³ realizaron un estudio basado en el empleo de la metodología basada en MALDI-TOF para la detección rápida de resistencias a una amplia gama de antibióticos β -lactámicos incluidos ampicilina, piperacilina, ceftazidima, cefotaxima, imipinem, ertapenem y meropenem. Para demostrar la presencia real de las β -lactamasas se procedió a la inhibición de las mismas realizando el ensayo combinando los antibióticos con agentes inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, tazobactam o ácido 3-aminofenilborónico (APBA). Igual que en los estudios previamente descritos, el método se basa en el análisis de los espectros de masas obtenidos después de la incubación de los diferentes microorganismos estudiados en presencia o ausencia de los antibióticos. Tras una incubación en placa de agar sangre, se recogió la bacteria correspondiente con un asa de un microlitro, se resuspendió en 10 μ l de la solución del antibiótico correspondiente y finalmente fue incubada durante 3 h a 37°C. De igual forma a los estudios descritos previamente, tras un paso de centrifugación para separar las células del sobrenadante, se empleó un microlitro de sobrenadante para su análisis mediante MALDI-TOF. El resultado se interpretó como positivo para la actividad carbapenemasa si tenía lugar la desaparición de los picos que corresponden al antibiótico intacto y, en la mayoría de los casos, a sus aductos, así como también a la presencia de los productos de hidrólisis y sus aductos correspondientes. Con frecuencia, la hidrólisis del antibiótico es seguida de un proceso de descarboxilación dando lugar a la presencia de un pico adicional correspondiente a la forma hidrolizada y descarboxilada del antibiótico. En algunas ocasiones, como en el caso de meropenem e imipinem, no se llegó a detectar ningún producto de hidrólisis tras 3 horas de incubación, a pesar de la desaparición en el espectro del pico característico del antibió-

tico intacto. Cabe destacar que la presencia de actividad carbapenemasa, en estos casos, se confirmó mediante inhibición de la actividad enzimática en presencia de APBA, conservando el patrón del espectro propio de microorganismos sensibles a los compuestos carbapenémicos. Este fenómeno podría ser atribuido a diferentes causas como la extrema inestabilidad de los productos de hidrólisis, la dificultad de estos productos para ser ionizados mediante la ionización por MALDI o su probable interacción con componentes celulares de las bacterias que impide su presencia en el sobrenadante de la muestra analizada. En cuanto a otros hallazgos, en el mismo trabajo de Sparbier *et al.*, algunos antibióticos han mostrado ser muy inestables bajo las condiciones del ensayo sufriendo procesos de degradación distintos a la hidrólisis enzimática. Así, la cefotaxima, por ejemplo, pierde el grupo acetilo dando lugar a la aparición de un pico adicional tras la incubación con bacterias sensibles a dicho antibiótico. Además, después de la incubación con bacterias resistentes, los autores no pudieron detectar los productos de hidrólisis de la molécula intacta de cefotaxima, pero en su lugar detectaron la forma hidrolizada y desacetilada del antibiótico. Un fenómeno parecido se observa con la ceftazidima, en cuyo espectro, tras la incubación con bacterias sensibles, aparte del pico de antibiótico intacto también se observa la aparición de otro pico que se corresponde con la pérdida del anillo de piridina. Por otro lado, después de la incubación con bacterias resistentes no se detectaron productos de hidrólisis de la molécula completa de ceftazidima, pero sí, de la forma sin el anillo de piridina. Además de la detección de la actividad carbapenemasa a partir de las colonias de bacterias gramnegativas en agar sangre, Sparbier *et al.* realizaron el mismo ensayo con las bacterias obtenidas directamente de los frascos de hemocultivo positivo, utilizando el ertapenem como antibiótico diana. En el ensayo, los viales de hemocultivos se incubaron previamente con cepas de *Klebsiella pneumoniae* sensibles y resistentes a los carbapenems. Después de la incubación de los frascos en el sistema Bactec y tras la detección de crecimiento bacteriano, las bacterias se aislaron utilizando el kit MALDI Sepsityper (Bruker Daltonik GMBH). Los espectros adquiridos fueron similares a los obtenidos en el ensayo de hidrólisis de ertapenem a partir de las colonias de *K. pneumoniae* en agar sangre, excepto por la presencia de un pico adicional de 450 Da. Este último es superponible al pico de la forma hidrolizada y descarboxilada del ertapenem (450,7 Da) observado en el ensayo de hidrólisis a partir de las colonias. Sin embargo, en el ensayo con hemocultivos positivos este pico se detectó tanto en el espectro con los aislados resistentes como sensibles de *K. pneumoniae*, motivo que llevó a considerarlo como contaminación y excluirlo del análisis. Los autores destacan la necesidad de optimizar los parámetros del instrumento para mejorar la sensibilidad del ensayo y, sobre todo, la importancia de realizar una buena calibración del espectrómetro de masas para evitar amplias desviaciones de las masas moleculares de sus valores esperados. En este trabajo, para la calibración se empleó bradikininina 1-5 y 1-7, así como también picos de la propia matriz HCCA. A la hora de valorar los resultados se tuvo en cuenta la desaparición, en los espectros obtenidos, de los

iones que corresponden al antibiótico puro con y sin sus sales como consecuencia de la hidrólisis enzimática del antibiótico β -lactámico. Pero de todos modos, los autores insisten en que la detección concomitante de los productos correspondientes a la degradación enzimática del agente antibacteriano proporciona un resultado más fiable. Ocasionalmente, en el espectro de muestras incubadas con cepas sensibles a un antimicrobiano dado se ha observado un pequeño pico correspondiente a la forma hidrolizada de antibiótico debido a una hidrólisis espontánea del mismo. Para una valoración objetiva de los espectros se han comparado las intensidades de los picos de formas hidrolizadas y no-hidrolizadas de antibióticos. Las cepas se han clasificado como sensibles si la intensidad de los picos de formas hidrolizadas y no-hidrolizadas ha sido comparable con los controles negativos; como resistentes si la intensidad de los picos de formas hidrolizadas ha sido igual o superior al 80% de los picos de formas no-hidrolizadas e hidrolizadas de los controles sensibles; e intermedias si la intensidad ha sido inferior al 80%. A pesar de que los espectros observados en este trabajo han sido bastante complejos, hay que destacar un análisis detallado realizado por los autores para caracterizar cada uno de los picos obtenidos durante el estudio. Por otro lado, el estudio ha demostrado una excelente concordancia entre los resultados de la detección convencional de resistencias a β -lactámicos y la tecnología MALDI-TOF. Los resultados de este trabajo corroboran los datos presentados en los estudios comentados anteriormente y confirman una vez más la utilidad de espectrometría de masas para la rápida detección de resistencias mediadas por β -lactamasas.

A diferencia de los estudios anteriores donde los ensayos se llevaron a cabo con algunas especies de enterobacterias y *P. aeruginosa*, en el trabajo publicado en 2012 por Kempf *et al.*¹⁴ emplearon el sistema MALDI-TOF para la detección de resistencias a los carbapenémicos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en Francia y Algeria. *A. baumannii* es un agente etiológico responsable de infecciones intrahospitalarias que, con frecuencia, plantea problemas de tratamiento debido a su resistencia tanto intrínseca como adquirida a múltiples agentes antimicrobianos. Los antibióticos carbapenémicos constituyen una de las opciones terapéuticas de primera línea en el tratamiento de infecciones producidas por este microorganismo. De ahí la importancia de disponer de un método rápido y sensible para la detección de resistencias a este grupo de antibióticos. En el estudio de Kempf *et al.* se analizaron un total de 149 bacterias gramnegativas, entre ellas 43 *A. baumannii* sensibles a imipenem y 63 resistentes. Las CMI se determinaron por el método de E-test. Todos los aislados resistentes fueron analizados mediante PCR para detectar la presencia de genes que codifican para carbapenemasas con los siguientes resultados: 57 cepas positivas para el gen *bla*_{OXA-23}; 3 cepas para *bla*_{OXA-24} y 3 cepas para ambos genes. El ensayo de hidrólisis de imipenem se realizó según el protocolo descrito por Burckhardt y Zimmermann¹⁰ usando imipenem en diferentes concentraciones (0,25–2 mg/mL) como antibiótico diana y un tiempo máximo de incubación de 4 horas. Hay que destacar que en el espectro de las muestras incubadas con cepas de *A.*

baumannii sensibles a imipenem se detectó la presencia de un pico de baja intensidad que corresponde a la forma hidrolizada de antibiótico (254 m/z). Este fenómeno de hidrólisis espontánea ya fue descrito anteriormente por otros autores^{10,13}. El resultado se interpretó como positivo si se observaba la desaparición del pico de imipenem (300,0 m/z) mientras que el pico correspondiente al producto de su hidrólisis (254,0 m/z) aumentaba con un cociente entre el área del pico de imipenem y el de su producto de hidrólisis siempre inferior a 0,5. Los resultados del estudio fueron los siguientes: después de 2 horas de incubación el pico de imipenem desapareció en 60 de las 63 cepas resistentes, mientras que en 3 aislados fueron necesarias 4 horas de incubación. Hay que destacar que aunque el pico de imipenem no desapareció por completo en 3 cepas resistentes después de 2 horas de incubación, el cociente entre el área de los picos de imipenem y el producto de su hidrólisis fue inferior a 0,5 en los tres casos. Este método ha mostrado una sensibilidad y especificidad en la detección de la actividad de carbapenemasa de 95,2% y 100,0%, respectivamente, después de 2 horas de incubación, y de 100% y 100%, respectivamente, después de 4 horas de incubación de *A. baumannii* con imipenem. Así pues, las condiciones óptimas establecidas durante el estudio han sido el tiempo de incubación de 4 horas y la concentración de imipenem de 0,25 mg/mL. Al igual que en algunos de los estudios descritos previamente, los autores probaron diferentes tipos de preparación de la matriz. Finalmente, para este estudio se seleccionó el HCCA diluido en una mezcla de acetona, etanol y ácido trifluoroacético (TFA) ya que producía la mínima aparición de picos adicionales dentro del rango de masas moleculares analizado, facilitando la lectura e interpretación de espectros. A diferencia de los estudios descritos anteriormente donde se empleó el espectrómetro de masas Microflex (Bruker Daltonics), en este trabajo los análisis se llevaron a cabo con el espectrómetro de masas Ultraflex I (Bruker Daltonics). Este último posee una serie de ventajas con respecto al Microflex. Primero, permite mejorar la resolución de los picos debido a una mayor longitud del tubo de vuelo. También tiene una mejor sensibilidad debido a que estos espectrómetros de masas están equipados con mejores detectores. Cabe destacar también que en este último trabajo se utilizaron las placas de análisis conocidas como AnchorChipTM. En estas placas, cada pocillo tiene un centro hidrófilo rodeado por un anillo hidrófobo que favorece la concentración de los analitos a ionizar y ayudando, por la tanto, a incrementar la sensibilidad. Los autores resaltan también que el método usado en su estudio (Ultraflex +AnchorChip+HCCA) detecta solo el pico molecular de imipenem sin la aparición de aductos de sales de sodio detectadas en estudios anteriores.

Resumiendo todos los trabajos descritos, podemos decir que la espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser una técnica muy útil para la detección rápida y fiable de resistencias debidas a la degradación enzimática de agentes antimicrobianos. Sin embargo, hay varios aspectos a tener en cuenta a la hora de utilizar esta tecnología para los estudios de sensibilidad. En primer lugar, la eventual presencia de picos que corresponden a los productos de hidrólisis de los agentes anti-

microbianos tras la incubación con bacterias no-productoras de enzimas. Este fenómeno puede ser explicado por la inestabilidad del antibiótico en disolución y su degradación espontánea. Los productos de hidrólisis espontánea han sido detectados tanto en el estudio de Burckhardt *et al.* con ertapenem¹⁰ como en el de Kempf *et al.* con imipenem¹⁴ y el trabajo de Sparbier *et al.* con ampicilina y piperacilina¹³. Para evitar los errores de interpretación y tratar de estandarizar el análisis de espectros obtenidos los autores han propuesto diferentes soluciones. Así, Kempf *et al.*¹⁴ utilizan el cociente entre el área de los picos de imipenem y su producto de hidrólisis como marcador de presencia de hidrólisis, teniendo que ser este valor inferior a 0,5. Sparbier *et al.*¹³ también compararon las áreas de los picos de las formas hidrolizadas y no-hidrolizadas en el caso de ampicilina.

Entre los estudios descritos existen, además, diferencias en cuanto a los parámetros de ensayo, como, por ejemplo, las soluciones de matriz y sus diluyentes, calibradores o, incluso, el tipo de espectrómetro de masas utilizado. En el caso de la identificación de microorganismos mediante el sistema MALDI-TOF se suele analizar un rango de masas que oscila entre 2.000 y 20.000 Da. De esta manera, los picos producidos por la matriz quedan fuera del rango de masas analizado. En el caso de los estudios de resistencias se analizan espectros comprendidos entre 0 y 1.000 Da. Por ello, los picos que corresponden a la matriz pueden dificultar la interpretación de espectros generados por un antimicrobiano y sus productos de hidrólisis, por lo tanto hay que seleccionar muy bien la matriz que se utilizará en el análisis para evitar la presencia de picos que dificulten la correcta interpretación de los resultados.

Por otro lado, es necesario realizar un estudio de la estabilidad de cada agente antimicrobiano estudiado. Como ya hemos comentado con anterioridad, los antibióticos pueden sufrir un proceso de hidrólisis espontánea, dando lugar a los picos de productos de degradación sin estar estos expuestos a actividad enzimática. La elección de los tampones empleados también parece tener importancia tanto para el proceso de hidrólisis espontánea así como para la formación de aductos de sales de los agentes antimicrobianos. Así, en el estudio de Hrabák *et al.*¹¹ se empleó como tampón Tris-HCl ajustado a un pH de 6,8, ya que se observó una rápida formación de aductos de moléculas de meropenem por la incorporación de uno o dos átomos de sodio a pH más elevados. Así mismo, los autores han resaltado la necesidad de establecer un tiempo óptimo de cultivo de las cepas para el estudio de hidrólisis, debido a que el uso de cultivos viejos (48h) puede afectar negativamente a la actividad de carbapenemasa debido a la presencia de enzimas proteolíticas¹¹. Todos estos aspectos ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar los parámetros del método para que sea fácilmente reproducible. Muchas veces los espectros obtenidos son complejos y es por ello que se requiere de algoritmos para el análisis automático de datos que facilita el trabajo de interpretación. Además, este sistema de identificación de resistencias a agentes antimicrobianos debe ser probado con otras especies bacterianas productoras de enzimas no analizadas hasta ahora. Potencialmente, este puede ser un método muy

útil en cuanto a la detección de resistencias a otros grupos de compuestos antimicrobianos cuyo mecanismo es debido a la hidrólisis o modificación enzimática del antibiótico, como, por ejemplo, los aminoglucósidos.

La principal limitación de este método para estudios de sensibilidad es la posibilidad de que la resistencia a un agente antimicrobiano estudiado sea debida a otros mecanismos diferentes de la actividad enzimática, como, por ejemplo, pérdida de porinas o bombas de expulsión.

Sin embargo, la espectrometría de masas MALDI-TOF presenta importantes ventajas respecto a los métodos empleados actualmente. El bajo coste por muestra respecto a las técnicas moleculares de detección de genes de resistencia así como el poco tiempo requerido para realizar este tipo de análisis hace que esta metodología sea muy atractiva para centros donde se procesan un elevado número de muestras diarias, permitiendo aparte de reducir costes, reducir el tiempo en que se administra el tratamiento pertinente al paciente. Así mismo, podría detectar enzimas no descritos previamente y de los que no se dispone de información acerca de los genes que los codifican.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49:295-300.
2. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74:5487-91.
3. Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods* 2002; 48:117-26.
4. Sun Z, Zhang W, Chen X. Rapid method study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Wei Sheng Yan Jiu* 2011; 40:375-8.
5. Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 233-239.
6. 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; 50:2918 -2931.
7. 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.
8. Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M, et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1961-4.
9. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (*cfiA* negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2011; 60:1584-90.
10. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; 49, 3321-3324.
11. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49, 3222-3227.
12. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2441-2443.
13. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50, 927-937.
14. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012; 7, e31676.