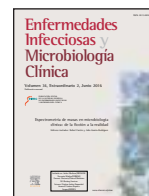




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología

Jesús Mingorance<sup>a,\*</sup>, Benito Regueiro<sup>b</sup> y Juan Luis Muñoz-Bellido<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, España

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, A Coruña, España

<sup>c</sup>Departamento de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Espectrometría de masas  
MALDI-TOF  
Proteínas  
Microbiología clínica

La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis que permite caracterizar muestras midiendo las masas (estrictamente las razones masa-carga) de las moléculas componentes. Cuenta con más de un siglo de historia y evolución tecnológica y a lo largo de los años ha ampliado su alcance desde los isótopos a moléculas pequeñas, moléculas orgánicas más complejas y, en las últimas décadas, macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). La EM MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) es una variante que permite el análisis de mezclas complejas de proteínas y que se ha aplicado recientemente a la identificación de microorganismos en cultivo, convirtiéndose en una herramienta rápida y eficaz para el diagnóstico microbiológico que ha conseguido entrar en poco tiempo en la rutina de muchos servicios de microbiología clínica. El gran impacto que ha tenido está impulsando el desarrollo de nuevas aplicaciones en el campo de la microbiología clínica.

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

### Historical perspective of mass spectrometry in microbiology

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Mass spectrometry  
MALDI-TOF  
Proteins  
Clinical microbiology

Mass spectrometry (MS) is an analytical technique that allows samples to be characterized by measuring the masses (strictly speaking their mass-to-charge ratio) of the component molecules. This technique has been used for more than one hundred years and technological development throughout this time has broadened its scope from isotopes to small molecules, more complex organic molecules, and in the last few decades, macromolecules (nucleic acids and proteins). MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) MS is a variant that allows analysis of complex mixtures of proteins and has recently been applied to the identification of cultured microorganisms, making it a rapid and effective tool for microbiological diagnosis. In a short time, MALDI-TOF MS has become a routinely used technique in many clinical microbiology services and its strong impact is prompting the development of new applications in the field of clinical microbiology.

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

### Breve historia de la espectrometría de masas

Hace ya varios años que la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) llegó a los servicios de microbiología de nuestro país y aún nos sorprende que sea tan simple y, al mismo tiempo, tan potente. Pero la simplici-

dad es solo aparente y detrás hay más de 100 años de evolución tecnológica<sup>1,2</sup>.

El principio de la historia podría situarse en la segunda mitad del siglo XIX con el desarrollo de los tubos de Crookes, o tubos de rayos catódicos. Estos dispositivos, que se utilizaban para estudiar las propiedades de la materia, eran tubos de cristal que contenían gases muy rarificados a través de los que se hacían pasar descargas eléctricas. Arthur Schuster y posteriormente J.J. Thomson —ambos en el Laboratorio Cavendish de la Universidad de Cambridge— los utilizaron para estudiar la desviación (deflexión) de las trayectorias de los rayos producida por campos eléctricos y magnéticos. En 1897 Thom-

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jesus.mingorance.idipaz@gmail.com](mailto:jesus.mingorance.idipaz@gmail.com) (J. Mingorance).

son llegó a la conclusión de que los rayos catódicos estaban formados por partículas muy ligeras con carga negativa (los electrones), determinó su relación masa-carga y recibió por ello el Premio Nobel de Física en 1906.

Durante los años siguientes, el trabajo de Thomson se centró en la contrapartida de los rayos catódicos, los rayos anódicos o rayos canales, formados por iones con carga positiva producidos por las descargas eléctricas. Mediante la introducción de combinaciones de campos eléctricos y magnéticos observó, con la ayuda de F.W. Aston, que el gas neón está formado por 2 tipos diferentes de átomos que pueden separarse y diferenciarse por su masa ( $\text{Ne}^{20}$  y  $\text{Ne}^{22}$ ). Durante los años siguientes, Aston desarrolló el equipo para conseguir mayor resolución y lo aplicó al estudio de los isótopos no radioactivos; trabajos por los que recibió el Premio Nobel de Química en 1922.

Durante las décadas siguientes se introdujeron en los equipos modificaciones para enfocar las partículas desviadas y mejorar la resolución. Se introdujeron también sistemas de ionización que ampliaban el rango de materiales que podían analizarse. Durante este período las principales aplicaciones de la EM fueron el análisis y la obtención de isótopos. Para esta última aplicación se construyeron grandes equipos preparativos, como el Calutron, que se utilizó para producir el uranio-235 de las primeras bombas atómicas.

Los equipos basados en la desviación de las trayectorias (deflexión) producida por un campo magnético, o por combinaciones de campos eléctricos y magnéticos con diversas geometrías, fueron los más utilizados durante la segunda mitad del siglo xx. Sin embargo, ya en los años cuarenta y cincuenta aparecieron esquemas de separación de masas diferentes, como el tiempo de vuelo (TOF), los cuadrupolos o las trampas de iones.

El sistema TOF, objeto de este monográfico, fue diseñado en 1946 por W.E. Stephens, entonces en la Universidad de Pensilvania. En este sistema, la separación de los iones se produce al acelerarlos en un campo eléctrico; todos los iones sometidos al campo adquieren la misma energía cinética, lo que implica que los de menor relación masa-carga alcanzan mayor velocidad. En el diseño más básico, los iones siguen una trayectoria rectilínea de longitud conocida entre el campo eléctrico y el detector, y lo que se mide es el tiempo que tardan en llegar de un punto a otro. Aunque inicialmente no podían competir en resolución con los equipos de deflexión, estos sistemas han resultado ser más rápidos y más baratos, y con el tiempo han incorporado mejoras que les han permitido ser muy competitivos en diversas áreas.

La ionización de la muestra es otro aspecto de la tecnología que ha evolucionado para ampliar el rango de muestras analizables. Las descargas eléctricas utilizadas en los primeros equipos eran demasiado energéticas para permitir el análisis de moléculas complejas. En 1959, la introducción de la ionización por impacto de electrones permitió acoplar la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas de tipo TOF y abrió la puerta al análisis de moléculas orgánicas. Durante las décadas siguientes se desarrollaron métodos de ionización más suaves (*soft ionization*), como la ionización química (1966), los diferentes métodos de desorción (de campo en 1969, por plasma o por láser en 1974, MALDI en 1985), la ionización por electro spray (ESI, *electrospray ionization*) en 1968, por haces de iones (SIMS, *secondary ion mass spectrometry*) en la década de los cincuenta, o de átomos (FAB, *fast atom bombardment*) en 1981, permitiendo el análisis de moléculas no volátiles, frágiles, o de alto peso molecular.

Finalmente, hay que recordar que, durante el último cuarto del siglo xx, el desarrollo de los componentes electrónicos y de la informática (*hardware* y *software*) ha dado un enorme impulso a todo este conjunto de tecnologías proporcionando detectores más rápidos y más sensibles, mayor potencia de computación y almacenamiento de datos, equipos más pequeños, más baratos y más robustos y, en definitiva, sacando la EM del laboratorio especializado y convirtiéndola en una herramienta accesible para muchos otros laboratorios.

## Aplicaciones de la espectrometría de masas a la microbiología clínica en la era pre-MALDI-TOF

Durante las décadas de los setenta y los ochenta proliferaron las aplicaciones de la EM al análisis de biomoléculas, algunas de ellas orientadas al diagnóstico microbiológico rápido. Las tecnologías eran diversas, y en general se basaban en equipos de tamaño medio, con analizadores TOF o cuadrupolos. Entre ellas cabe destacar las técnicas de pirólisis y cromatografía de gases acopladas al espectrómetro de masas<sup>3,4</sup>, aunque también se utilizaron haces de partículas<sup>5</sup>.

Tanto la pirólisis (rotura térmica de las moléculas en ausencia de oxígeno) como la cromatografía de gases se utilizaron para generar espectros característicos (*fingerprints*) e identificar especies o incluso diferenciar cepas de una misma especie. En ambas técnicas, el rango de masas era limitado y las moléculas analizadas eran relativamente pequeñas<sup>3</sup>: ácidos micólicos para identificar especies de micobacterias<sup>6</sup>, *Nocardia* y táxones relacionados<sup>7,8</sup>; ácidos grasos para identificar *Legionella pneumophila*<sup>9</sup>, o monosacáridos para identificar especies de *Lactobacillus*<sup>10</sup>. La mayoría de estos métodos requerían una preparación específica de la muestra larga y laboriosa, aunque en algún trabajo ya se utilizaron células intactas<sup>11</sup>. Un problema de estos métodos era su sensibilidad a variaciones en el estado metabólico de las células, o en los medios de cultivo, que limitaba la reproducibilidad intra e interlaboratorios y dificultaba la estandarización. El uso reciente de métodos e instrumentos que mejoran la estandarización de la preparación de las muestras y las condiciones de ionización y obtención de los espectros, así como métodos de análisis capaces de reducir el ruido, podría dar un nuevo impulso a estas aproximaciones<sup>12</sup>.

En busca de mayor universalidad y reproducibilidad, se orientaron muchos esfuerzos a desarrollar métodos para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos se ha dirigido en general a productos de PCR (*polymerase chain reaction*) cuyos tamaños se determinan con gran precisión por EM MALDI-TOF o EM ESI-TOF. Son métodos muy potentes cuyas limitaciones son las de la PCR. Pero, sin lugar a dudas, la aplicación que más éxito ha tenido es la proteómica, el análisis de las proteínas celulares. El análisis de péptidos de hidrólisis de las proteínas mediante sofisticados sistemas que combinan HPLC (*high performance liquid chromatography*) o electroforesis bidimensional y 2 espectrómetros de masas en tándem (cuadrupolo-TOF o TOF-TOF) combina gran capacidad y alta resolución<sup>13,14</sup>. Sin embargo, y pese a la automatización, la metodología es muy lenta y compleja para ser útil en la rutina clínica.

Sorprendentemente, el gran éxito de la EM aplicada a la identificación de microorganismos llegó del análisis de proteínas intactas, que por su tamaño quedaban fuera del alcance de la mayoría de los sistemas. El desarrollo de algunos de los métodos necesarios para ello fue premiado con la mitad del Premio Nobel de Química del año 2002 (la otra mitad fue para Kurt Wüthrich por sus trabajos en resonancia magnética de macromoléculas en solución), capítulo de la historia en torno al que existe cierta confusión<sup>2</sup> y que merece una sección aparte.

## El nacimiento de la tecnología MALDI

El principal reto para el análisis de macromoléculas es encontrar la manera de proporcionarles la energía suficiente para ionizarlas sin destruirlas. Una de las aproximaciones que lo consiguió con éxito fue la ESI, que se basa en la pulverización de una solución consistente en un solvente volátil y solutos no volátiles para generar pequeñas gotas ionizadas. Al evaporarse el solvente quedan las moléculas de soluto ionizadas y en estado gaseoso. Aunque fueron varios los grupos que trabajaron en esta tecnología durante las décadas de los sesenta y los setenta, finalmente fue John B. Fenn, de la Universidad de Yale, quien consiguió en 1988, tras 2 décadas de investigación, "dar alas a los elefantes moleculares" y analizar proteínas mediante EM ESI<sup>15</sup>. Por

estos trabajos fue premiado con una cuarta parte del Premio Nobel de Química de 2002<sup>16</sup>.

De manera independiente, en la década de los ochenta se había extendido el uso del láser para ionizar y volatilizar moléculas a partir de muestras sólidas (*laser desorption*), y el reto era de nuevo ionizar las macromoléculas sin degradarlas, es decir, encontrar la manera de transferir a las muestras la energía justa para ionizar algunas moléculas sin romper los frágiles enlaces químicos (*soft laser desorption*). Koichi Tanaka (un ingeniero de Shimadzu Corp.) consiguió en 1987, utilizando como matrices suspensiones de nanopartículas metálicas en glicerol, demostrar que era posible ionizar y detectar proteínas con masas en el rango de las decenas de kDa<sup>17</sup>. Por su trabajo recibió también una cuarta parte del Premio Nobel de Química de 2002<sup>18</sup>.

Pero fue otro grupo que trabajaba en ionización con láser el que desarrolló la técnica conocida como MALDI. Michael Karas y Franz Hillenkamp, del Instituto de Biofísica de la Universidad de Frankfurt, introdujeron el uso de una matriz orgánica capaz de absorber la energía del láser y transferir una parte a las moléculas de la muestra e ionizarlas. Aunque inicialmente Karas y Hillemkamp utilizaron el método para analizar aminoácidos, en 1988 publicaron sus primeros análisis con proteínas<sup>19</sup>. La técnica, a la que llamaron MALDI, resultó ser más sencilla y más sensible que la de Tanaka, y rápidamente se extendió su uso. En 1996 se demostró que podían utilizarse los perfiles de proteínas obtenidos mediante EM MALDI-TOF para identificar bacterias partiendo de células intactas<sup>20-22</sup> y pocos años después salían al mercado los primeros sistemas comerciales. El método de Karas y Hillemkamp es el precursor de la metodología actual y el que mayor impacto ha tenido; sin embargo, en una controvertida decisión, el Comité Nobel no les incluyó en el premio.

### La revolución de MALDI-TOF en microbiología clínica

En 2009 se publicó el que probablemente fue el artículo clave para dar a conocer de forma general a los especialistas implicados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas las posibilidades de la EM MALDI-TOF<sup>23</sup>. Apenas un año después, se publicó en España el primer artículo en el que se hacía una valoración global de la utilidad de la EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos de origen clínico<sup>24</sup>.

Desde entonces, el número de publicaciones sobre aplicaciones clínicas de la EM MALDI-TOF se ha incrementado exponencialmente, sobre todo en lo que se refiere a la identificación de diferentes grupos de microorganismos a partir de cultivos<sup>24-27</sup>. En conjunto, todos estos estudios demuestran una alta eficacia en la identificación de bacterias y levaduras. La eficacia alcanzada en el caso de bacterias gramnegativas y levaduras es, en la mayor parte de los casos, excelente, mientras que en bacterias grampositivas y bacterias anaerobias es algo inferior. No obstante, debe tenerse en cuenta que son varios los factores que pueden influir en estos resultados y en diferentes sentidos. Es cierto que en algunos casos la similitud de los perfiles proteicos entre especies es tan alta (*Streptococcus viridans*, especies de *Brucella*, *Escherichia coli* frente a *Shigella*) que resulta complicado establecer identificaciones fiables a nivel de especie. Sin embargo, en algunos de los primeros estudios en realidad no se determinaba tanto la fiabilidad de la EM MALDI-TOF como su nivel de correlación con los métodos de identificación bioquímicos convencionales. Cuando se utilizó la secuenciación del gen del ARNr 16S como referencia, se comprobó que la falta de correlación se debía más a inexactitudes de los métodos bioquímicos que de la EM MALDI-TOF. Así, un estudio sobre bacterias anaerobias publicado en España en 2012<sup>28</sup> demostró que, de 34 discrepancias a nivel de especie entre la identificación bioquímica y la EM MALDI-TOF, en 32 casos la secuenciación de ARNr 16S corroboró la identificación de la EM MALDI-TOF.

Ya este estudio apunta un extremo que se ha corroborado después, sobre todo en lo relativo a la identificación de hongos filamen-

tosos, como es la importancia del tamaño y la extensión de la base de datos que utiliza el *software* como referencia para comparar los perfiles obtenidos. En la totalidad de los aislamientos que no fueron identificados por EM MALDI-TOF, o en los que se obtuvo por este método una identificación que fue refutada por la secuenciación, se trataba de especies que no estaban contempladas en la base de datos de referencia. Del mismo modo, los resultados mediocres que se obtenían en un principio en relación con los hongos filamentosos<sup>24</sup> mejoran sensiblemente cuando se establece una base de datos específica que contemple las diferentes fases de desarrollo del microorganismo<sup>29</sup>.

Otro grupo de microorganismos que ha planteado dificultades desde el principio han sido las micobacterias. Se han publicado resultados heterogéneos<sup>30-32</sup>, probablemente en relación con la falta de estandarización de los protocolos de extracción y la baja reproducibilidad de los métodos. Un factor clave en el procesamiento parece ser la adecuada disrupción de las micobacterias<sup>33</sup>. En los últimos meses han aparecido nuevos métodos de extracción que combinan los métodos químicos habituales con métodos físicos (sonicación, partículas de sílice) y que parecen ofrecer un rendimiento superior, además de simplificar y acelerar la extracción<sup>34,35</sup>. De afianzarse, estos métodos podrían suponer una alternativa interesante a la identificación mediante sondas u otros métodos genéticos, ya que podrían procurar una fiabilidad similar con un coste notablemente inferior.

### Otras aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica

En los últimos años han surgido numerosos trabajos que plantean nuevas aplicaciones de la EM MALDI-TOF en el campo de la microbiología clínica. Con frecuencia se trata de pruebas de concepto que deberán ser validadas y adaptadas a la rutina clínica. Entre las aplicaciones más prometedoras se encuentra el uso de la EM MALDI-TOF para la identificación directa de microorganismos en muestras clínicas, por ejemplo orina<sup>36</sup>, y en hemocultivos. Si el subcultivo de los frascos positivos de los hemocultivos en medio sólido permite una rápida identificación usando MALDI-TOF de forma convencional<sup>37</sup>, la identificación podría acelerarse aún más utilizando directamente el medio de los hemocultivos positivos. Para ello se han probado protocolos que incluyen pasos de centrifugación y lavados, lisis selectiva de glóbulos rojos, tubos de separación de suero, filtración o métodos comerciales como el Sepsityper (Bruker Daltonics). Aunque el rendimiento está sesgado hacia las bacterias gramnegativas<sup>38</sup> y presenta limitaciones en las infecciones polimicrobianas<sup>39,40</sup>, el uso del MALDI facilita la detección de contaminaciones, la selección de pruebas complementarias y acorta la identificación en aproximadamente 24 h<sup>41</sup>. Combinando MALDI y PCR puede incluso acelerarse la detección de algunas resistencias a antibióticos<sup>42</sup>.

También se han explorado diversas estrategias para identificar resistencias a antibióticos mediante EM MALDI-TOF. El problema que se plantea es que los mecanismos de resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias son tan variados que es difícil una solución universal<sup>43</sup>. Una aproximación es la detección de la actividad enzimática responsable de la resistencia. Añadiendo el antibiótico a un cultivo fresco durante el tiempo apropiado y adaptando la EM al rango de tamaños adecuado pueden detectarse tanto el antibiótico como los productos de su degradación si los hay. Este método se ha utilizado especialmente para la detección de actividad betalactamasa. La hidrólisis del enlace amida del anillo betalactámico y la decarboxilación que sucede tras la hidrólisis producen un cambio de masa molecular que puede detectarse por espectrometría<sup>44-46</sup>. Además, se han introducido variaciones como el uso de la matriz CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) y una placa modificada (AnchorChip)<sup>47</sup> o el uso de lisados libres de células<sup>48</sup>.

El análisis del estado de metilación del ARNr se ha utilizado para caracterizar resistencias a aminoglucósidos, cloranfenicol y clinda-

micina mediada por ARNr metiltransferasas<sup>49,50</sup>, aunque es aún muy laborioso para aplicarse a la rutina del laboratorio de diagnóstico.

También se ha explorado, con éxito diverso y resultados prometedores, el análisis directo de las células mediante el uso de 5-cloro-2-mercapto-benzotiazol en la matriz<sup>51</sup>, la selección de proteínas en una matriz de intercambio catiónico débil (SELDI [*surface-enhanced laser desorption ionization*]-TOF)<sup>52,53</sup>, o el uso de extractos celulares crudos<sup>54,55</sup> o parcialmente purificados<sup>56</sup> en lugar de células intactas. Sin embargo, como ya se ha comentado, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno complejo y el análisis de algunos de sus determinantes no permite un análisis completo, por lo que todavía no se está en situación de sustituir los tests convencionales de susceptibilidad a los antibióticos<sup>43</sup>.

Por último, la tipificación de aislados clínicos por MALDI-TOF podría ser una herramienta de gran valor para la caracterización en tiempo real de brotes epidémicos. Esta aplicación se enfrenta al problema de discriminar espectros muy similares, lo que requiere el desarrollo de algoritmos de análisis específicos<sup>57,58</sup> y el desarrollo de herramientas bioinformáticas que los hagan accesibles a la rutina de los laboratorios clínicos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Maher S, Jjunju FPM, Taylor S. Colloquium : 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. *Rev Mod Phys.* 2015;87:113-35.
- Griffiths J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80:5678-83.
- Drucker DB, Jenkins SA. Applications of mass spectrometry including combined gas chromatography-mass spectrometry in taxonomic studies of bacteria. *Biochem Soc Trans.* 1989;17:245-9.
- Simmonds PG. Whole microorganisms studied by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry: significance for extraterrestrial life detection experiments. *Appl Microbiol.* 1970;20:567-72.
- Sinha MP, Platz RM, Friedlander SK, Vilker VL. Characterization of bacteria by particle beam mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49:1366-73.
- Sweczyk R, Kowalski K, Janiszewska-Drobinska B, Druszczynska M. Rapid method for Mycobacterium tuberculosis identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76:298-305.
- Alshamaony L, Goodfellow M, Minnikin DE. Free mycolic acids as criteria in the classification of Nocardia and the "rhodochrous" complex. *J Gen Microbiol.* 1976;92:188-99.
- Alshamaony L, Goodfellow M, Minnikin DE, Mordarska H. Free mycolic acids as criteria in the classification of Gordonia and the "rhodochrous" complex. *J Gen Microbiol.* 1976;92:183-7.
- Fisher-Hoch S, Hudson MJ, Thompson MH. Identification of a clinical isolate as Legionella pneumophila by gas chromatography and mass spectrometry of cellular fatty acids. *Lancet.* 1979;2:323-5.
- Rizzo AF, Korkeala H, Mononen I. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:2883-8.
- Gutteridge CS, Puckey DJ. Discrimination of some Gram-negative bacteria by direct probe mass spectrometry. *J Gen Microbiol.* 1982;128:721-30.
- Alusta P, Buzatu D, Williams A, Cooper WM, Tarasenko O, Dorey RC, et al. Instrumental improvements and sample preparations that enable reproducible, reliable acquisition of mass spectra from whole bacterial cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015;29:1961-8.
- Emerson D, Agulto L, Liu H, Liu L. Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. *Bioscience.* 2008;58:925-36.
- Smith RD. Advanced mass spectrometric methods for the rapid and quantitative characterization of proteomes. *Com Funct Genom.* 2002;3:143-50.
- Fenn JB. Electrospray ionization mass spectrometry: how it all began. *J Biomol Tech.* 2002;13:101-18.
- Fenn JB. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003;42:3871-94.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988;2:151-3.
- Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003;42:3860-70.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60:2299-301.
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996;14:1584-6.
- Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996;10:1992-6.
- Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996;10:1227-32.
- Seng P, Drancourt M, Scola B La, Fournier P, Rolain JM. Ongoing revolution in bacteriology : routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49:543-51.
- Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz MC, et al. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:492-7.
- Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo MC, Bekal S, Lefebvre B, et al. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS One.* 2015;10:e0144878.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2912-7.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1549-54.
- Vega-Castaño S, Ferreira L, González-Ávila M, Sánchez-Juanes F, García-García MI, García-Sánchez JE, et al. Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:597-601.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:475-84.
- Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4481-6.
- Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1790-4.
- Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol.* 2014;52:130-8.
- Machen A, Kobayashi M, Connelly MR, Wang YFW. Comparison of heat inactivation and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media by use of vitek matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:4226-9.
- O'Connor JA, Lynch-Healy M, Corcoran D, O'Reilly B, O'Mahony J, Lucey B. Improved matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based identification of *Mycobacterium* spp. by use of a novel two-step cell disruption preparatory technique. *J Clin Microbiol.* 2016;54:495-6.
- Adams LL, Salee P, Dionne K, Carroll K, Parrish N. A novel protein extraction method for identification of mycobacteria using MALDI-ToF MS. *J Microbiol Methods.* 2015;119:1-3.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110-5.
- Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:1001-6.
- Nonnemann B, Tvede M, Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS.* 2013;121:871-7.
- Chen JH, Ho PL, Kwan GS, She KK, Siu GK, Cheng VC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1733-9.
- Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:0421-7.
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015; 61:100-11.
- Chan WS, Chan TM, Lai TW, Chan JF, Lai RW, Lai CK, et al. Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR-melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:441-7.
- Hrabák J, Chudácková 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;26:103-14.
- Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222-7.

45. 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  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012r;50:927-37.
46. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321-4.
47. 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.
48. Hooff GP, Van Kampen JJ, Meesters RJ, Van Belkum A, Goessens WH, Luider TM. Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012;11:79-84.
49. Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:5420-31.
50. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 2005;57:1064-73.
51. 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.
52. Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, et al. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34:81-6.
53. Dubska L, Pilatova K, Dolejska M, Bortlicek Z, Frostova T, Literak I, et al. Surface-enhanced laser desorption ionization/time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS) as a phenotypic method for rapid identification of antibiotic resistance. *Anaerobe.* 2011;17:444-7.
54. 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.
55. 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;50:2918-31.
56. Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen GX. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2179-82.
57. Josten M, Reif M, Szeekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1809-17.
58. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, et al. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:603-6.