



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

## Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica

Juan Luis Muñoz Bellido<sup>a,b,c,\*</sup>, Silvia Vega Castaño<sup>a,b</sup>, Laura Ferreira<sup>c,d</sup>,  
Fernando Sánchez Juanes<sup>c,d</sup> y José Manuel González Buitrago<sup>c,d,e</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>c</sup> G.I.R. MICRAPE, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

<sup>d</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 2 de noviembre de 2011

Aceptado el 7 de noviembre de 2011

On-line el 28 de enero de 2012

#### Palabras clave:

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Identificación

Microbiología

#### Keywords:

MALDI-TOF mass spectrometry

Identification

Microbiology

### R E S U M E N

La espectrometría de masas (EM) *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF) se ha impuesto rápidamente en numerosos Servicios de Microbiología Clínica como un nuevo recurso tecnológico. Su utilidad en la identificación bacteriana está contrastada, aunque existen todavía dudas respecto a la identificación de grupos bacterianos concretos y de otros microorganismos, como los hongos filamentosos. Existen además otras diversas aplicaciones potenciales de esta tecnología en Microbiología Clínica, que están empezando a desarrollarse. En esta revisión se resumen los datos existentes respecto a la identificación de diferentes grupos de microorganismos, incluyendo aquellas que han planteado mayores problemas, como micobacterias, anaerobios y hongos filamentosos. Se analizan también sus aplicaciones en diagnóstico directo sobre muestra, su repercusión en la consideración como patógenos de diferentes microorganismos, y sus potenciales aplicaciones epidemiológicas. Finalmente, se resumen también los estudios existentes sobre su uso potencial en la determinación de sensibilidad a antimicrobianos, y su potencial utilización usando como sustrato amplificados génicos en lugar de extractos proteicos de los microorganismos.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Proteomic applications in the Clinical Microbiology laboratory

#### A B S T R A C T

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is rapidly becoming a new routine resource in Clinical Microbiology laboratories. Its usefulness for bacterial identification is now generally accepted, although there is still some reluctance as regards specific bacterial groups and some other microorganisms, such as moulds. There are other potential applications of this technology in Clinical Microbiology, which are beginning to be developed. A review is presented on the current data on the identification of microorganisms, including the most problematic groups, such as mycobacteria, anaerobic bacteria and moulds. We also analyse its applications for direct sample identification, its impact on pathogenic characteristics of microorganisms, and its potential epidemiological applications. Finally, we review the studies published on its applications for determining antimicrobial susceptibility, and its applications on amplicons, instead of microorganism protein extracts.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Introducción

Durante años, la identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología Clínica se ha venido llevando a cabo, de manera

rutinaria, de acuerdo a características fenotípicas de los microorganismos (morfología, estructura de la pared puesta de manifiesto mediante diferentes tinciones, capacidad del microorganismo para crecer en diferentes medios de cultivo y en distintas condiciones de atmósfera y temperatura, capacidad para degradar o utilizar mediante distintas vías bioquímicas sustratos diversos y, en algunos casos, características concretas de sensibilidad a ciertos antimicrobianos). Algunas de estas pruebas no han sufrido

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlmubel@usal.es (J.L. Muñoz Bellido).

una evolución tecnológica significativa en décadas. Otras han evolucionado en lo relativo a la miniaturización de las baterías de pruebas y la automatización de su realización y lectura, y han experimentado mejoras sensibles en lo relativo al tiempo de respuesta.

Sin embargo, la mayor parte de las técnicas microbiológicas convencionales continúan basándose en principios y pruebas que requieren el crecimiento del microorganismo, lo que hace que la identificación pueda retrasarse desde horas hasta varias semanas tras la recepción de la muestra. Por otra parte, estas técnicas tienen limitaciones evidentes en cuanto a su aplicabilidad y fiabilidad cuando se trata de microorganismos que crecen con dificultad, o no crecen en absoluto en medios de cultivo, o que muestran una actividad bioquímica muy limitada.

Hace ya años, se empezaron a desarrollar diferentes metodologías, basadas sobre todo en técnicas genéticas, dirigidas a salvar estas limitaciones. Estas técnicas han supuesto una aportación importante en algunos aspectos, como fiabilidad de la identificación y, en algunos casos, diagnóstico directo a partir de la muestra sin cultivo previo. Sin embargo, estas técnicas solo han conseguido hasta el momento imponerse a las técnicas clásicas en algunos casos, debido a diferentes problemas como complejidad técnica, disponibilidad solo para ciertos microorganismos y relación coste/beneficio. En conjunto, la irrupción de las técnicas genéticas ha tenido una repercusión muy importante en virología clínica, mientras en bacteriología, micología y parasitología esta repercusión ha sido, por el momento, menor.

### **Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF)**

La espectrometría de masas (EM), en sus distintas modalidades técnicas, ha sido una técnica muy utilizada para la identificación de moléculas en diferentes ramas de la ciencia durante buena parte del siglo XX. Hasta la década de 1990 las proteínas se habían resistido a su análisis por espectrometría de masas debido fundamentalmente a la dificultad de generar iones a partir de estas moléculas grandes no volátiles. A finales de los ochenta se presentaron dos métodos que permitirían la ionización de las proteínas. Estos eran la ionización por pulverización eléctrica (electrospray ionization, ESI) y la desabsorción/ionización por láser con ayuda de una matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI). A partir de ese momento la espectrometría de masas pudo utilizarse para estudios de proteínas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF. Se trata de un método que, mediante la aplicación de energía láser a una muestra embebida en una matriz, consigue vaporizar e ionizar esa matriz, que eventualmente puede arrastrar en esa vaporización e ionizar a su vez a una muestra representativa de las proteínas contenidas en la muestra. Esas proteínas ionizadas son sometidas a aceleración en un campo eléctrico y a una migración a través de un tubo de vacío hasta un detector. El tiempo que transcurre desde su vaporización/ionización hasta su detección dependerá del cociente masa/carga ( $m/z$ ) de esa proteína, y ese cociente  $m/z$  permitirá determinar la masa exacta de la proteína de manera extremadamente fiable. En el caso de los microorganismos, se genera de esta forma un perfil de proteínas con diferentes cocientes  $m/z$ , que se comporta como una huella dactilar, permitiendo identificar con gran fiabilidad al microorganismo a partir de dicho perfil.

### **Aplicación de la espectrometría de masas maldi-tof a la identificación de microorganismos**

La primera descripción del uso de la espectrometría de masas para la identificación bacteriana data de 1975. En aquella época el rango de masas estaba limitado a pequeñas moléculas, lo que

restringía las aplicaciones de la EM a lípidos bacterianos<sup>1-4</sup>. Las proteínas tienen un orden de magnitud mayor, y su análisis por EM tuvo que esperar a la llegada de las técnicas suaves de ionización como el MALDI. A partir de ese momento el MALDI-TOF comenzó a utilizarse en la identificación bacteriana por grupos de investigación. En el 2004, se describió la primera base de datos completa para la identificación bacteriana, basada en el análisis de moléculas de superficie, pero no fue bien acogida para ser utilizada como identificación rutinaria, ya que necesitaba una estandarización muy rigurosa debido a la variación de las proteínas de superficie. Sin embargo, el cambio de matriz permitió la ionización de proteínas, fundamentalmente ribosómicas, más conservadas que las anteriores, lo cual se consideró más adecuado para la identificación rutinaria de bacterias, ya que parecía que las condiciones de cultivo no variaban los resultados de la identificación. A partir de ese momento se desarrollaron sistemas comerciales con bases de datos y programas de manejo sencillo, empezando a usarse la EM MALDI-TOF como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana<sup>5</sup>. Se habían efectuado estudios parciales sobre su efectividad para la identificación de determinados microorganismos en condiciones controladas<sup>6-8</sup>, pero recientemente han empezado a aparecer numerosos trabajos relativos a su efectividad en la identificación de aislamientos clínicos, sometidos a esta prueba directamente desde los medios de cultivo rutinarios y sin condiciones especiales<sup>9</sup>.

#### *Bacterias aerobias*

Los estudios disponibles sobre la identificación directa de microorganismos a partir del crecimiento en medios de cultivo habituales muestran excelentes resultados, con porcentajes de coincidencia con la identificación bioquímica convencional superiores al 90%. Estos altos niveles de correlación se dan tanto en gram positivos como en gram negativos. Por otra parte, cuando las discrepancias entre la EM y la identificación convencional se han comprobado mediante secuenciación del ARNr 16S, se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, esta técnica corroboraba los resultados ofrecidos por la EM MALDI-TOF. Así, uno de los primeros trabajos publicados con la tecnología disponible actualmente<sup>10</sup>, un estudio retrospectivo sobre 1.116 aislamientos clínicos y 108 cepas tipo, mostró un 93,5% de identificaciones correctas por MALDI-TOF para las cepas tipo, y un 95,2% para los aislamientos clínicos. Las identificaciones correctas estuvieron por encima del 90% en el caso de enterobacterias (95,5%), estafilococos (99,5%), enterococos (100%) y estreptococos (93,7%), mientras bajaron al 79,7% en bacilos gram negativos no fermentadores.

Los estudios prospectivos realizados a partir de ese momento sobre aislamientos obtenidos de muestras clínicas ofrecen cifras parecidas. Uno de los estudios que han tenido mayor trascendencia<sup>9</sup>, publicado en 2009 en *Clinical Infectious Diseases* y realizado sobre 1.660 aislamientos pertenecientes a 109 especies, muestra una eficacia en la identificación del 95,4% a nivel de género, y del 84,1% a nivel de especie. Un estudio publicado por Bizzini et al en 2010<sup>11</sup> sobre 1.371 aislamientos muestra un 98,5% de identificaciones correctas a nivel de género y un 93,2% a nivel de especie, con solo un 1,5% de identificaciones fallidas.

Un estudio publicado también en 2010 por Cherkaoui et al<sup>12</sup> sobre 720 aislamientos pertenecientes a 33 géneros, comparando dos sistemas comerciales (Bruker Daltonics y Shimadzu), mostró un 93,6% de identificaciones fiables a nivel de especie (score > 2,0) para el primer sistema y un 88,3% para el segundo, de las que un 99,1% fueron corroboradas mediante secuenciación de RNA 16S. Otro estudio publicado por Van Veen et al, también en 2010<sup>13</sup> sobre 980 aislamientos, muestra un 97,2% de correlación con la metodología convencional a nivel de género, y un 79,9% a nivel de especie. La mayor correlación a nivel de género o especie se obtuvo en

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3401329>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3401329>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)