

ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MALDI-TOF Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

Aura Palencia M¹ , Gabriela Romero B¹ .

¹Unidad de Investigación en Toxicología Molecular, Módulo 5, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, Venezuela. C.P. 2005

Recibido para publicación el 15 julio 2019. Aprobado para publicación el 14 agosto 2019.

RESUMEN:

La introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF (una técnica basada en principios físicos-químicos destinada originalmente a otras aplicaciones) en el diagnóstico clínico, puede aumentar o complementar la eficiencia de diversas técnicas. Actualmente, esta técnica se ha convertido en una alternativa no solo para el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también para estudios epidemiológicos que favorecen nuevas estrategias de prevención y control, sin desplazar a la biología molecular, más bien complementándola. En este artículo se revisan diferentes estudios que evalúan la concordancia en la identificación de bacterias, virus, hongos y parásitos por MALDI-TOF MS, PCR y técnicas microbiológicas convencionales evidenciándose la eficacia, confiabilidad y excelente desempeño de la espectrometría de masas incluso en cuanto a costo y tiempo.

Palabras claves: Espectrometría de masas, biología molecular, proteómica, huella peptídica.

MASS SPECTROMETRY / MALDI-TOF AND POLYMERASE CHAIN REACTION: COMPLEMENTARY TECHNIQUES IN THE IDENTIFICATION OF BIOMOLECULES

SUMMARY

Introduction of MALDI-TOF mass spectrometry (a technique based on physical-chemical principles originally intended for other applications) in clinical diagnosis can increase or complement the efficiency of various techniques. Currently, this technique has become an alternative not only for early diagnosis of infectious diseases but also for epidemiological studies that favor new prevention and control strategies, without displacing molecular biology, rather complementing it. This article reviews different studies that evaluate concordance between identification of bacteria, viruses, fungi and parasites by MALDI-TOF MS, PCR and conventional microbiological techniques, demonstrating efficacy, reliability and excellent performance of mass spectrometry even in terms of cost and time.

Key words: Mass spectrometry, molecular biology, proteomics, peptide fingerprint.

Introducción

En la actualidad, la investigación basada en biología molecular ofrece un inmenso campo de posibilidades para un mejor entendimiento de los fenómenos biológicos que nos rodean, valiéndose de técnicas cuyo fundamento es aislar ácidos nucleicos o extraerlos con alta pureza, visualizarlos, cortarlos, pegarlos, amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas, cortar una determinada región con enzimas de restricción para determinar si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción, entre otras múltiples variantes (1). Dichas técnicas poseen diversas aplicaciones, generalmente en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, búsqueda de alelos o marcadores moleculares asociados a características

de interés (2), detección y determinación de especies, genotipo y/o cepa de agentes patógenos humanos, entre otras (3). Las implicaciones que tiene este nuevo conocimiento abarcan campos tan diversos como la medicina, la conservación medio ambiental y la industrial (4,5).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es el ejemplo clásico de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, considerada hoy como una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética (6). Esta técnica está basada en el uso de cebadores y una enzima, ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), que permite amplificar el segmento señalado por los cebadores (oligonucleótidos). Es un proceso cíclico de

Solicitar copia a: Aura Palencia (adpalencia@uc.edu.ve)

aproximadamente unas 40 repeticiones de tres pasos que suceden a diferentes temperaturas: desnaturalización, alineamiento o fijación de los cebadores y extensión. Esta progresión es controlada en el tiempo y por los cambios de temperatura (7).

Se han desarrollado variantes de la PCR que amplían su versatilidad dentro de las que se encuentran: PCR múltiple, RT-PCR, PCR anidada, PCR de extensión solapada (mutagénesis), PCR *in situ*, amplificación mediante activación progresiva de la polimerasa, amplificación con rampa decreciente de temperaturas, amplificación asimétrica, amplificación cuantitativa (PCR en tiempo real), amplificación en chips. Hoy existen sistemas capaces de realizar ambas funciones, tanto la RT como la polimerización del ADN, y entonces el proceso se denomina RT-PCR (6). Después de la amplificación el producto de la PCR puede ser detectado por medios, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis capilar (5,7).

En este contexto, aun cuando es indiscutible el papel de la PCR para la investigación de diversos organismos de interés clínico, el surgimiento de técnicas basadas en principios físicos-químicos o destinados originalmente a otras aplicaciones pueden aumentar o complementar la eficiencia de dichas técnicas en el diagnóstico clínico. En este sentido, la espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF SM) por sus siglas en inglés, es capaz de analizar cualitativa y cuantitativamente mezclas complejas de diversas sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto y la de los diversos fragmentos que resultan de la rotura del mismo, proporcionando información sobre la estructura del compuesto inicial (8).

El análisis de perfiles de proteínas mediante MALDI-TOF SM, ha permitido en el campo de la proteómica comparar los espectros de masas obtenidos por dicha técnica con una base de datos biológica de proteínas (9) cuya secuencia se conoce o bien de información genómica, esto es, mediante un enfoque *in silico*. Para esto, se emplean herramientas de software capaces de traducir las secuencias nucleotídicas del genoma, depositadas en la base de datos, a secuencias de aminoácidos (esto es, los componentes de las proteínas); luego, se corta teóricamente la secuencia de la cadena polipeptídica y se calculan las masas absolutas de los péptidos obtenidos (10). Dicha comparación entre huella de tamaños de péptidos obtenida con las depositadas en la base de datos permite asociar

estadísticamente la proteína desconocida con la más semejante de la base de datos (asociación que puede ser de identidad) (11). Específicamente, la huella peptídica es única para cada microorganismo, lo que permite identificarlo (12).

Desde hace treinta años, la espectrometría de masas se ha utilizado como una herramienta poderosa para el análisis y la caracterización de proteínas. Sin embargo, es sólo recientemente que esta tecnología, especialmente MALDI-TOF MS, ha entrado en el campo de la microbiología clínica habitual (11,13), permitiendo un diagnóstico más fácil y rápido de patógenos humanos que a través de los métodos de identificación molecular y fenotípica convencional, con una fiabilidad incuestionable y una relación coste-eficacia favorable. Actualmente, se ha convertido en una alternativa no solo para el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también para estudios epidemiológico que favorecen nuevas estrategias de prevención y control, sin desplazar la biología molecular, más bien complementándola (14). Aunado a esto, MALDI-TOF SM se está desarrollando como alternativa a la electroforesis en gel para visualizar fragmentos de ADN generados de forma análoga al procedimiento seguido en el método de secuenciación Sanger y que pueden ser diferenciados en función de su masa, de manera que los polimorfismos de un solo nucleótido pueden ser detectados por la diferente masa de los distintos nucleótidos que formen la secuencia de ADN en cada caso (15).

Con base en lo anteriormente expuesto, a continuación, se presenta una revisión sobre la aplicación de MALDI-TOF SM en la identificación de microorganismos, bien sea caracterizados a través de técnicas moleculares o métodos convencionales.

Espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF SM)

La espectrometría de masas (EM) es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En la EM la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de

Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad (11).

Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos. Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito (16).

El MALDI-TOF MS utiliza el cálculo de tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada (17). Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Dalton, dentro de las cuales están los péptidos y proteínas que forman parte de microorganismos. Dado que un microorganismo analizado en el MALDI-TOF MS presentará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes de los sistemas MALDI-TOF MS han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan estos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. La identificación se realiza a través de la comparación (correlación) del resultado del microorganismo con todos los espectros de masas que contiene el archivo comercial proporcionado por el fabricante, y de acuerdo a puntos de corte definidos para estas correlaciones (18). Estos archivos junto con los programas informáticos necesarios para su manejo permitieron finalmente el uso de esta herramienta en el campo de la microbiología clínica.

MALDI-TOF SM y microbiología

Está claro que la PCR está reemplazando el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar. Hay varias razones para esta tendencia, teniendo en cuenta que el aislamiento requiere la presencia de los microorganismos que se replican (virus o bacterias),

cultivos celulares costosos y el mantenimiento de las instalaciones, hasta varias semanas para completar el diagnóstico en algunas ocasiones y una pericia especial que se está perdiendo o disminuyendo hoy en muchos laboratorios. Aunque los ensayos de la PCR inicialmente eran caros y engorrosos, hoy en día son herramientas relativamente accesibles, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico.

Por su parte, MALDI-TOF MS se puede utilizar para la identificación precisa y rápida de diversos microorganismos tales como bacterias Gram-positivas, enterobacterias, levaduras, bacterias no fermentadoras (12), anaerobias (13) y micobacterias (19). La ventaja sorprendente del método de espectro de masas sobre procedimientos fenotípicos y genotípicos es la preparación simple de la muestra en corto tiempo para el análisis (20-22) y existen proyecciones de innovaciones a esta técnica que la harán más versátil ampliando su utilidad diagnóstica en cuanto a matrices (23).

MALDI-TOF MS permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales (24), a partir de colonias; este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie (22, 25). 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 subespecies (11). No obstante, los datos publicados en relación con ciertos grupos de microorganismos son todavía controvertidos (22).

En general, los sistemas de identificación de MALDI-TOF MS han recibido la aprobación de la FDA (26), existen dos grandes fabricantes que comercializan esta tecnología, una de ellas es Bruker Daltonics, Bremen (Alemania) (27) cuya técnica se describirá a continuación pues en general ilustra el procedimiento. Para la preparación de la muestra se requiere un inóculo tomado a partir de una colonia aislada en cultivo puro, el cual se deposita por duplicado sobre una tarjeta de análisis y se deja secar a temperatura ambiente. Luego, los pocillos son cubiertos con la matriz (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxycinámico en 50% acetonitrilo y 2,5% ácido trifluoro-acético. Los parámetros del equipo se ajustan según recomendaciones del fabricante. Para la calibración del espectrómetro se utiliza una prueba estándar consistente en el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas

adicionales (BTS; Bruker Daltonics). El estándar BTS se utiliza también como control positivo para validar la corrida. Los espectros para cada aislado se obtienen con 240 disparos del láser en seis regiones distintas en el mismo pocillo y dichos espectros son analizados por el software IMALDI Biotyper RTC 3.0. Los espectros son creados considerando el tiempo requerido por las proteínas para llegar al detector lo que depende de la relación masa/carga de éstas. Cada espectro al ser comparado con la base de datos permite la asignación de un puntaje. Los criterios de identificación señalados por el fabricante son los siguientes: puntaje > 2,000 indica identificación a nivel de especie, puntaje entre 1,700-1,999 indica identificación confiable sólo a nivel de género, mientras que valores < 1,700 no permiten identificación (13, 15, 20-22).

Cuando se requiere la extracción, se realiza con etanol/ácido, donde 2-3 colonias aisladas se transfirieren con un asa de siembra o punta de la pipeta al tornillo tubo de extracción y se mezclan en 300 µl de agua doblemente destilada. Se añade etanol absoluto (0,9 ml), el contenido del tubo se mezcla con cuidado, y los tubos se centrifugan a 13.000 g durante 2 min; se descarta el sobrenadante y el sedimento se seca al aire. Aproximadamente 10 µl de la pastilla se mezclan con 50 µl de ácido fórmico (70%), antes de la adición de un volumen equivalente de acetonitrilo. La mezcla se centrifuga a 13.000 g durante 2 min y 1 µl del sobrenadante se coloca sobre una placa diana MALDI de acero y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra se cubre con 1 µl de solución de matriz, que consiste en una solución saturada de α -ciano-4 ácido hidroxi-cinámico (HCCA) en 50 por ciento de acetonitrilo y 2,5 por ciento ácido trifluoroacético (concentración final: 10 mg HCCA/ml) y se seca al aire a temperatura ambiente (13, 20, 28).

El uso de esta técnica puede evidenciarse en diferentes estudios, por ejemplo, Bizzini *et al* (2010), compararon a MALDI-TOF MS con el método convencional fenotípico para la identificación de los aislados de rutina. Las colonias se analizaron por MALDI-TOF MS, por deposición directa sobre la placa diana o después de una etapa de extracción de ácido fórmico-acetonitrilo. Entre 1.371 aislados identificados por métodos convencionales, 1.278 (93,2%) fueron identificados a nivel de especie por MALDI-TOF MS y 73 (5,3%) se identificaron a nivel de género, mientras que en 20 (1,5%) no hubo identificación fiable. Los autores señalan que se requiere una etapa de extracción para obtener una identificación MALDI-TOF MS válida para el 25,6%

de las 1.278 cepas válidas. En conclusión, los resultados de esta investigación muestran que MALDI-TOF MS es una técnica rápida y fiable, que tiene el potencial de reemplazar la identificación fenotípica convencional para la mayoría de las cepas bacterianas aisladas de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica (20).

Panda *et al*, en el 2014, identificaron aislamientos bacterianos clínicos mediante perfiles de proteínas utilizando MALDI-TOF MS. Los aislamientos bacterianos recién cultivados fueron seleccionados de placas de cultivo. La identificación se hizo según la técnica de Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania, empleando el software MALDI Biotyper 1.1, para la identificación microbiana. Se llevó a cabo un análisis comparativo de 82 aislamientos bacterianos clínicos usando MALDI-TOF MS y técnicas convencionales. Entre los aislados clínicos, la precisión a nivel de especie para los aislamientos fue de 98,78%. Uno de los 82 aislados no concordaba con los ensayos convencionales dado que MALDI-TOF MS identificó un *Streptococcus pneumoniae* y por métodos convencionales se identificó como *Streptococcus viridans*. MALDI-TOF MS resultó ser un sistema preciso, rápido, rentable y robusto para la identificación de los aislamientos bacterianos clínicos (21).

Por otra parte, en lo que concierne al empleo de métodos moleculares para detectar los mecanismos de resistencia, éstos se desarrollan mediante diferentes estrategias: a) hibridación ADN-ADN con una sonda de ADN marcada con fluorescencia; la metodología consiste en la identificación de una secuencia específica de ADN (gen que codifica a una resistencia) mediante el reconocimiento de la secuencia homóloga en el ADN en varias muestras clínicas o bacterianas; b) amplificación por PCR de un gen específico; esta técnica amplía en forma exponencial un gen específico de interés (p. ej., β -lactamasas); c) polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP), que se basa en el análisis del patrón de restricción de los fragmentos de ADN generados por una enzima de restricción que previamente se amplificaron por PCR (6); esta prueba puede detectar mutaciones puntuales en el ADN que alteren el número de sitios de restricción de la enzima empleada; d) secuenciación nucleotídica de ADN, que consiste en la identificación de la secuencia de las cuatro bases que componen el ADN mediante una síntesis de ADN *in vitro* (técnica de Sanger); esta secuencia puede utilizarse para inferir la secuencia de aminoácidos

que componen a la proteína que codifica este ADN e identificar las posibles alteraciones (mutaciones) al compararse con el gen silvestre. En la actualidad se utilizan nucleótidos marcados con fluorescencia que permite una secuenciación de ADN automatizada y de alto rendimiento (29).

Con respecto a la proteómica, se ha utilizado la espectrometría de masa para identificar polimorfismos y genotipificación de diferentes proteínas en una sola muestra (30, 31). En cuanto al área de la bioinformática, se ha desarrollado una gran cantidad de bases de datos con información biomédica y asimismo se han realizado programas computacionales empleados para establecer las vías de evolución de los genes que codifican a las β -lactamasas de distribución mundial (30).

Chan *et al* (2015), proponen un protocolo para la detección de estafilococos resistentes a meticilina y vancomicina, el cual consiste en combinar el poder de discriminación de especies de MALDI-TOF MS y la capacidad de multiplex en PCR de tiempo real con análisis de la curva de fusión (PCR-MCA) en aislamientos clínicos y hemocultivos positivos. En primer lugar, MALDI-TOF MS se utilizó para la detección de aislados clínicos sospechosos o hemocultivos positivos. Si se identificaban especies de *Staphylococcus* o *Enterococcus*, la misma muestra se sometía a PCR-MCA para la detección de genes relacionados de resistencia/citotóxica a antibióticos, incluyendo genes en una reacción triple para *mecA*, *mecALGA251* y leucocidina Pantón-Valentine (PVL) de cultivos de estafilococos aislados de doble PCR del gen *mecA* / *mecALGA251* y los genes *nuc* para cultivos de sangre de estafilococos y los genes *vanA* y *vanB* en una reacción de dúplex en enterococos. El tiempo total de ensayo fue <2,5 h. Los resultados revelaron 100% de concordancia con las pruebas de sensibilidad a los antibióticos u otros métodos de referencia para todos los aislados de cultivo y cultivos de sangre de enterococos. El porcentaje de concordancia para estafilococos de hemocultivos fue del 97,5%. Este estudio concluye que el método evaluado fue rápido, económico, fiable y capaz de detectar genotipos *mecALGA251*, *vanB1* y *vanB2*, que no están incluidos en la mayoría de los ensayos comerciales. Se requiere el cribado a gran escala para probar aún más el rendimiento de este protocolo, sobre todo para los genotipos que se encuentran con poca frecuencia (32).

MALDI-TOF SM y Virus

Tradicionalmente, el método estándar de oro para la detección directa de los virus es el cultivo de células, aunque el uso de este método a menudo requiere varios días o semanas antes de que se puedan obtener los resultados. La microscopía electrónica y los métodos de detección directa de antígenos basado en inmunoensayo enzimático o inmunofluorescencia son ampliamente utilizados para la detección y / o identificación del virus, aunque algunas de estas técnicas son menos sensibles que el cultivo celular. Por último, las técnicas de amplificación génica basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionan una alternativa rápida y sensible para la detección y/o identificación de virus (33, 34).

La detección y/o identificación de virus tradicionalmente se basan en los métodos basados en el cultivo de células, microscopía electrónica y detección del antígeno o ácido nucleico. Estas técnicas son buenas, pero a menudo costosas y requieren mucho tiempo; Por otra parte, no siempre conducen a la identificación del virus a nivel de especies o del tipo. Calderaro *et al* en el 2014, en Italia estudiaron MALDI-TOF MS para identificar los poliovirus humanos e identificar biomarcadores específicos de la proteína viral en las células infectadas. Los resultados revelaron que dicha técnica es una herramienta eficaz y de bajo costo para la identificación de los tres serotipos de poliovirus. El método se aplicó en primer lugar a cepas de referencia Sabin, y luego a los aislados de diferentes muestras clínicas, y se comparó con el ensayo de neutralización (patrón de oro) (35).

Los poliovirus presentan diferentes proteínas de la cápside, que confieren la especificidad del receptor celular y antigenicidad. El poliovirus tipo 1 es el serotipo más común encontrado en la naturaleza; sin embargo, los tres serotipos son extremadamente infecciosos y peligrosos, siendo los agentes causantes de la poliomielitis. Una de las principales ventajas de este enfoque es la identificación de cepas de poliovirus mediante análisis MALDI-TOF MS ya que se puede obtener después a 5 días-procedimiento (a partir de la observación de un efecto citopático en el cultivo de la muestra), acortando considerablemente el tiempo necesario para llevar a cabo la prueba de neutralización (que requiere aproximadamente 20 días). Esto confirma la capacidad de la plataforma de MALDI-TOF MS de acortar significativamente los tiempos para los métodos de identificación convencionales en algunos casos y,

por otra parte, la reducción significativa de los costos de reactivos y la necesidad de personal con experiencia (35).

PCR y MALDI-TOF SM en parasitología

Durante las últimas décadas, el estudio a nivel molecular de los parásitos que afectan a los humanos o a sus cultivos y producciones animales ha sido uno de los frentes más activos en parasitología clínica y aplicada. De hecho, hoy en día se ha secuenciado ya el genoma completo de algunos parásitos de especial importancia socioeconómica, como el que causa la malaria humana (*Plasmodium falciparum*) (3). En este sentido, las técnicas para poder detectar y caracterizar el ADN de un patógeno continúan mejorando y desarrollándose. El procedimiento discriminatorio fundamental es la secuenciación del genoma (3). Las técnicas tales como el RFLP, el PCR-RFLP, el RAPD-PCR continuarán desempeñando un papel central en la identificación y discriminación de los aislamientos de la mayoría de los patógenos (4), sin embargo técnicas simples como la PCR convencional continúan demostrando su utilidad, sobre todo en países en desarrollo, donde acceder a equipos de última tecnología puede ser difícil.

La biología molecular, incluyendo técnicas de genotipaje diversas y sobre todo de secuenciación de ADN, ha conllevado una total revolución y la necesidad de revisar muchísimos de los conceptos e ideas sobre evolución de los diferentes grupos parásitos de lo que se sabía hasta hace poco. Merecen especial mención la gran utilidad de los diferentes y numerosos marcadores tanto del ADN ribosomal como del ADN mitocondrial, dadas las valiosísimas y muy útiles características de la multiplicidad repetitiva de los genes y especiadores como la evolución concertada de estos dos tipos de marcadores genéticos, que los convierten en idóneos para este tipo de estudios. La aplicabilidad de estas técnicas se muestra a diferentes niveles. Ya no únicamente para analizar la evolución de grupos de parásitos completos o de conjuntos de especies bien próximas y emparentadas, bien más o menos lejanas, sino también para el estudio de fenómenos microevolutivos locales (36), como sucede en fenómenos de hibridación entre especies de parásitos muy próximos detectables mediante haplotipaje combinado jugando con genes y especiadores diversos y análisis de microsátelites y de introgresión (37).

En cuanto a la técnica MALDI-TOF MS, hasta ahora se ha limitado a la obtención de datos del proteoma parasitario general, para la caracterización de biomarcadores específicos con el fin de discriminar entre especies de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Además de esto, Martiny *et al.* (2014), evaluaron su posible aplicación para diferenciar subtipos de *Blastocystis*. En relación a esto, una base de datos con señales de proteínas parasitarias fue construido para cinco subtipos de *Blastocystis*, y los espectros de referencia se compararon con los de 19 cultivos axénicos de ST1, ST2, ST3, ST4 y ST8 y nueve cultivos xenicos líquidos con ST3 y ST4. Las muestras de los cultivos axénicos se prepararon utilizando la extracción con ácido fórmico estándar. Los espectros de referencia revelaron cinco perfiles espectrales diferentes, y la biblioteca de base de datos permitió la discriminación entre todos los cultivos con índices de fiabilidad que van desde 2,038 hasta más de 2,8 cuando se realizó una extracción. El procedimiento de deposición directa como resultado una mayor variabilidad en la discriminación y la identificación directa de MALDI-TOF MS a partir de cultivos líquidos xenicos fue eficaz en 3 de 9 muestras. MALDI-TOF MS resultó ser una tecnología eficaz para discriminar eficazmente subtipos de *Blastocystis* en cultivos axénicos (38).

Cassagne *et al* (2014) en Francia, lograron identificar, a nivel de especie, los promastigotes de *Leishmania* de cultivo *in vitro*. Primero construyeron una base de datos de referencia de espectros incluyendo las principales especies que causan la leishmaniasis humana. El rendimiento de la base de datos de referencia en la identificación de promastigotes de *Leishmania* se probó en un panel de 69 aislados obtenidos de pacientes. Los autores identificaron correctamente 66 de las 69 cepas probadas a nivel de especie, con un registro (puntuación) de valores superiores a 2. Dos aislamientos de *Leishmania* produjeron patrones no interpretables por MALDI-TOF MS, debido a los bajos valores de registro (puntuación). Sólo una cepa de *Leishmania peruviana* se ha identificado erróneamente como las especies estrechamente relacionadas *Leishmania braziliensis*, con un registro (puntuación) de 2.399. MALDI-TOF MS es un enfoque prometedor, pues proporciona la identificación rápida y precisa de *Leishmania* a partir del cultivo *in vitro* a nivel de especie (39).

Por otra parte, Calderaro *et al* (2015), realizaron un estudio para la identificación y diferenciación de *E.*

histolytica y *E. dispar* por MALDI-TOF MS, con el fin de evaluar la aplicación de esta técnica en la práctica de diagnóstico de rutina. MALDI-TOF MS se aplicó a 3 cepas de amibas de referencia y 14 cepas aisladas de heces que habían sido diferenciadas por métodos moleculares. Los extractos de proteína a partir de cultivos de estas cepas en medio mínimo (para las cepas de referencia y cultivos monoxénicos para los aislamientos) se analizaron por MALDI-TOF MS y los espectros obtenidos se analizaron mediante el software estadístico. Cinco picos que discriminan entre cepas de referencia de *E. histolytica* y *E. dispar* fueron encontrados por el análisis del perfil de proteínas: 2 picos (8.246 y 8.303 Da) específicos para *E. histolytica* y 3 (4,714; 5,541; 8,207 Da) de *E. dispar*. Todos los aislados clínicos excepto uno mostraron los picos esperados discriminantes para las especies apropiadas. Este estudio muestra que MALDI-TOF MS puede ser utilizado para discriminar entre *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando cultivos *in vitro* xenicos y también podría tener potencial para la detección de estas especies en muestras clínicas (40).

Limitaciones de MALDI-TOF SM

Entre las limitaciones de MALDI-TOF SM se puede señalar que tanto el material, como todas las superficies requieren estar extremadamente limpias. Los contaminantes más frecuentes son queratina humana y BSA. La queratina proviene del polvo, pequeños pelos o pelusas y huellas de dedos. Un pequeño pelo contiene cantidades abrumadoras de queratina comparado con la cantidad de proteína de la muestra. Por otra parte, cada espectro de referencia de las bibliotecas se ha creado con especies microbianas individuales, lo cual limita el potencial de discriminación de la especie cuando se trata de cultivos polimicrobianos (19). Es decir, proporciona una idea general de las especies microbianas dominantes en una muestra de cultivo polimicrobiano, pero con información limitada sobre las especies microbianas residuales. Esto puede explicarse debido a que si las muestras tienen varios componentes, estos competirán por los protones en el proceso de ionización y encontraremos señales más altas de los componentes que están a mayor concentración, mientras que los de baja concentración darán señales débiles que pueden ser eliminadas en el procesamiento del espectro de masas.

Conclusión

En la actualidad, existe una necesidad crítica de desarrollar métodos precisos, específicos, de alto rendimiento y bajo costo para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, las pruebas de PCR han tenido una enorme proyección como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación biomédica, industrial y biológica. Por su parte, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos. Se evidencia en diferentes investigaciones, la comparación en cuanto a los porcentajes de identificaciones por MALDI-TOF MS e identificación convencional o con PCR, donde en algunos casos se observa que la espectrometría de masas es un método más confiable que los utilizados actualmente en el laboratorio para el mismo fin. De manera similar al comparar los costos, cada identificación cuesta en promedio ocho veces menos que la convencional. Una de las características más novedosas de la MALDI-TOF MS, es la obtención de mapas de concentración de analitos sobre cortes de tejido o distintos tipos de superficies orgánicas o inorgánicas. Esto permite describir la distribución espacial de un compuesto químico en una muestra sin apenas tratamiento previo (tejido, célula, material sintético), con una resolución de unas pocas decenas de micras. Por otra parte, esta técnica constituye una herramienta complementaria a las moleculares y en casos como el análisis de polimorfismos de secuencias en genes relacionados con resistencia bacteriana tiene excelentes resultados.

Referencias

1. Vinuesa-Burgos C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. Rev Electrón Vet 2009; 10(2). [citado junio 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617114013.pdf>
2. Lu Z, Chen Y, Jing X, Hu C. Diagnostic accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Biomarkers 2018;23(3):245-252. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1420822>
3. Adams VY, Bencomo HA, Rodríguez LR, Aquino RS, González DI. La biología molecular en el estudio de la inmunopatología. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2014;30(4):313-318. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubheminhem/rch-2014/rch144c.pdf>
4. Palomino-Camargo C, González-Munóz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev.

- Perú. Med. Exp. Salud Pública 2014;31(3):535-546. [citado junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020
5. Astorga MP. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 277-287.
 6. Farfán M. Biología Molecular aplicada al Diagnóstico Clínico. Rev Méd Clín Las Condes 2015;26(6):788-793. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.007>
 7. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad 2013;2(2):70-78. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
 8. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. Anal Bioanal Chem 2007;389(4):1017-1031. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>.
 9. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. Exp Rev Proteomics 2018;15:8:683-696. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>
 10. Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. Int J Mol Sci 2010;11(12):5040-5055. <https://doi.org/10.3390/ijms11125040>.
 11. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio 2018;22(1):35-45. <http://dx.doi.org/10.22354/in.v0i0.703>.
 12. Oviaño M, Rodríguez B, Caballero J, Muñoz J. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica 2019. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2019.
 13. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Rev chil infectol 2013;30(2):140-146. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200004>
 14. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem 2015;61(1):100-111. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>.
 15. Relloso MS, Nieves J, Taie SF, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. Rev Argent Microbiol 2015;7(2):103-107. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213039768004.pdf>
 16. March G, Eiros JM. Impacto de la Metodología MALDI-TOF en la identificación Clínica de agentes infecciosos. Electron J Biomed 2012;1:60-65. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://biomed.uninet.edu/2012/n3/march.pdf>
 17. Wolk DM, Clark AE. Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. Clin Lab Med 2018;38(3):471-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2018.05.008>.
 18. Sun X, Guo B. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-based mini-sequencing. Methods Mol Med 2006;128:225-230. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-159-8_15.
 19. Cao Y, Wang L, Ma P, Fan W, Gu B, Ju S. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2018;8(1):4131. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22642-w>.
 20. 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(5):1549-1554. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01794-09>.
 21. Panda A, Kurapati S, Samantaray JC, Srinivasan A, Khalil S. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. Indian J Med Res 2014;140(6):770-777. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365351/>
 22. Zárate MS, Romano V, Nieves J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. Rev Argent Microbiol 2014;46(2):98-102. [citado junio 2019]. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1015466>
 23. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. Curr Issues Mol Biol 2017;23:17-20. <http://dx.doi.org/10.21775/cimb.023.017>.
 24. Fernández-Álvarez C, Torres-Corral Y, Santos Y. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. J Proteomics 2018;170:59-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpro.2017.09.007>
 25. Clark CM, Costa MS, Sanchez LM, Murphy BT. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. PNAS 2018;115(19):4981-4986. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1801247115>
 26. Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier J, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF

- MS in clinical microbiology. *Expert Rev Proteomic* 2019;16(8):695-710. <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2019.1645603>
27. Kostrzewa M. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential. *Expert Rev Proteomic* 2018; 15(3): 193-202. <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2018.1438193>
 28. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública Méx* 2009;51 (Suppl 3): s439-s446. [citado junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009
 29. Van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, Dunne Jr. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Rev Proteomic* 2015;12(6):595-605. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1091731>.
 30. Sturenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, *et al.* Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of *in vitro*-generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):909-915. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.909-915.2006>
 31. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol* 2018;(9):1097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097>.
 32. Chan W, Chan T, Lai T, Fuk-Woo J Chan, Lai R, Lai K, Tang B. 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(2):441-447. <https://doi.org/10.1093/jac/dku411>.
 33. Usme-Ciro JA, Gómez-Castañeda AM, Gallego-Gómez JC. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. *Salud Uninorte* 2012;28(1):1-15. [Citado junio 2019] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v28n1/v28n1a02.pdf>
 34. Gómez-Camarasa C, Cobo F. Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in clinical virology. En: Cobo F, Editor. *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in clinical Microbiology*. 2018;167-180. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814451-0.00012-5>
 35. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep* 2014;4:6803. <https://doi.org/10.1038/srep06803>.
 36. Halada P, Hlavackova K, Dvorak V, Volf P. Identification of immature stages of phlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. *Insect Biochem Molec* 2018;93:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.12.005>
 37. Pérez-Tris J. La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. *Ecosistemas* 2009;18(1):52-59.
 38. Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, *et al.* Subtype determination of Blastocystis isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(4):529-536. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1980-z>.
 39. Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand A, *et al.* Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(6):551-557. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387>.
 40. Calderaro A, Piergianni M, Buttrini M, Montecchini S, Piccolo G, Gorrini C, *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0122448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122448>