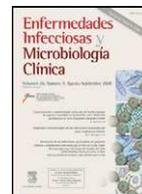




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

La proteómica, un nuevo reto para la microbiología clínica

Proteomics, a new challenge for clinical microbiology

Aida Pitarch, César Nombela y Concha Gil *

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

No cabe duda de que un diagnóstico temprano de la infección es decisivo para una correcta orientación terapéutica y un pronóstico favorable del paciente infectado. Sin embargo, en la práctica clínica diaria, los métodos convencionales de diagnóstico de las enfermedades infecciosas se enfrentan, en muchas ocasiones, a ciertas dificultades relacionadas con la falta de precisión (escasa sensibilidad y especificidad), lentitud y problemas técnicos (de estandarización, reproducibilidad, interpretación, etc.)^{1–5}. Estas limitaciones no sólo han propiciado el desarrollo de técnicas de diagnóstico más eficaces y automatizadas, sino que también han supuesto en la comunidad científica un desafío estimulante en la búsqueda de nuevos biomarcadores de infección.

Los avances producidos en los últimos años en las diferentes disciplinas biómicas (genómica, proteómica y metabolómica, entre otras), reforzados además por la bioinformática, ofrecen hoy por hoy una oportunidad sin precedentes para el descubrimiento de perfiles moleculares y biomarcadores de utilidad para el microbiólogo clínico. Estas tecnologías biómicas, que pretenden dar una visión en conjunto de lo que ocurre en un tipo celular, tejido u organismo abordando su objeto de estudio de una manera global^{6,7}, pueden previsiblemente cambiar, en un futuro no muy lejano, el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades infecciosas, especialmente en aquellos ámbitos donde las técnicas tradicionales han mostrado sus principales carencias. Cabe destacar que de todas ellas, la proteómica es quizás la metodología biómica que ha despertado en nuestros días mayores expectativas en el campo de la biomedicina y, en particular, en el de las enfermedades infecciosas⁸. Este interés especial se debe a que su objeto de estudio es el análisis sistemático y a gran escala del proteoma (el conjunto de todas las proteínas expresadas por el genoma de una célula, tejido u organismo) en un momento dado y en determinadas condiciones de tiempo y ambiente⁹. Estos productos génicos finales muestran un gran potencial como moléculas biomarcadoras de numerosas enfermedades^{8,10,11} ya que están implicados en la mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos de las células.

En la metodología proteómica suelen diferenciarse normalmente tres fases en las que se emplean diferentes herramientas para: la separación de proteínas (mediante electroforesis bidimensional o cromatografía multidimensional), la identificación de éstas (a través de la espectrometría de masas) y el análisis e interpretación de los datos obtenidos (mediante la bioinformática)¹². Como se destacarán a continuación, existen varias aplicaciones interesantes de esta tecnología biómica al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, algunas de las cuales se postulan como alternativas prometedoras a dicho diagnóstico de laboratorio rutinario en los próximos años.

Un ejemplo de ello es el artículo publicado en el presente número de la revista¹³, en el que se propone el uso de la espectrometría de masas con ionización por desorción con láser asistida por una matriz y con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, acrónimo del inglés *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*). Se realiza sobre aislados clínicos de bacterias grampositivas y gramnegativas de diversos orígenes como un método rápido, preciso y económico (si se excluye el coste derivado de la amortización del espectrómetro de masas) para la identificación directa de éstas, en la especie, a partir de su crecimiento en medios de cultivo habituales. La espectrometría de masas también ha resultado ser igualmente útil para la identificación rápida y fiable de bacterias y hongos patógenos directamente de un hemocultivo^{14–16}. Esta metodología, con potencial para remplazar y complementar las técnicas convencionales de identificación de microorganismos en el laboratorio de microbiología clínica, permite la instauración de un tratamiento clínico temprano orientado por sexo o especie, contribuyendo a reducir la morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados^{17,18}.

Otra modalidad de esta metodología proteómica es la espectrometría de masas con ionización por desorción con láser inducida en superficie y con analizador de tiempo de vuelo (SELDI-TOF, acrónimo del inglés *surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight*)^{19,20}. En ésta se realiza un fraccionamiento previo de la muestra basado en la captura selectiva de las proteínas (mediante anticuerpos, interacciones hidrofílicas, hidrofóbicas o de naturaleza iónica, etc.) sobre una superficie metálica de una matriz de baja densidad, en la que tendrá lugar posteriormente la ionización. Para ello se requiere una mínima cantidad de muestra para el análisis y es útil para el descubrimiento de biomarcadores y patrones de proteínas con potencial

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: conchagil@farm.ucm.es (C. Gil).

para diagnósticar la infección, predecir estados de la enfermedad infecciosa e informar sobre los procesos de ella^{20,21}. A modo de ejemplo, su aplicación al análisis proteómico del líquido amniótico de mujeres embarazadas, con parto prematuro o rotura temprana de membranas y con una amniocentesis que descarta cualquier infección intraamniótica, ha resultado ser eficaz para identificar sepsis neonatal de inicio temprano²².

Cabe señalar, igualmente, que las micromatrices (*microarrays* o *biochips*) de proteínas permiten el análisis e identificación simultánea de grandes paneles de biomarcadores de interés clínico en el campo de la biomedicina y en especial en el de las enfermedades infecciosas²³⁻²⁶. Dada la versatilidad y diversidad de los sistemas de micromatrices, en la actualidad existe una gran expectación acerca de sus múltiples posibilidades en el campo de la microbiología clínica. Así, por ejemplo, el uso de micromatrices con proteínas de agentes infecciosos en ensayos serológicos es un método rápido, sensible y simple para la identificación indirecta de la infección así como de los perfiles de reactividad de los anticuerpos séricos dirigidos frente a un amplio espectro de antígenos, muchos de los cuales tienen un gran potencial clínico y/o terapéutico^{23,24}.

Por otro lado, la caracterización del inmunoma (la parte del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario²⁷) de un agente infeccioso bajo una determinada condición fisiológica, patológica o farmacológica, también se puede realizar mediante el análisis del proteoma serológico (SERPA, acrónimo del inglés *serological proteome analysis*)^{11,28-30}. Al igual que las micromatrices de grupos de antígenos, esta tecnología también ofrece una oportunidad excepcional para obtener una visión global e integrada de la respuesta serológica frente al agente infeccioso y de las bases moleculares de la patogenicidad, así como para el descubrimiento de biomarcadores y perfiles moleculares con potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico para las enfermedades infecciosas. SERPA es una técnica inmunoproteómica que se basa en la combinación de la proteómica clásica con la serología³¹. En primer lugar, el proteoma o subproteoma del agente infeccioso de interés se separa en una matriz de poliacrilamida en función del punto isoeléctrico y peso molecular de sus proteínas constituyentes mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y después se transfiere a una membrana, sobre la que se aplican sueros de pacientes infectados y controles para detectar aquellas proteínas que son inmunogénicas, a través de la técnica de *western-blotting* o *immunoblotting*. Estas proteínas son posteriormente identificadas mediante espectrometría de masas y los diferentes perfiles bidimensionales de reactividad de los anticuerpos séricos frente a estas proteínas se comparan mediante análisis bioinformáticos manejando datos clínicos. La aproximación inmunoproteómica, en sus distintas variantes, ha proporcionado un número relativamente alto de posibles nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico, predicción o monitorización de múltiples enfermedades infecciosas, e incluso de dianas terapéuticas para el diseño de futuras inmunoterapias o vacunas frente a éstas^{28,31-34}.

Entre los desafíos futuros de la proteómica en el campo de la microbiología clínica se encuentran la validación de esta nueva generación de biomarcadores proteómicos en ensayos de prototipos adecuados³⁵⁻³⁸, uno de los principales cuellos de botella al que se enfrentan las disciplinas biómicas. No obstante, el microbiólogo clínico no debe quedarse indiferente ante los avances que se están produciendo en este campo, dado que suponen una oportunidad sin precedentes para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Financiación

Becas y ayudas financieras recibidas de la Cátedra Extraordinaria Merck, Sharp & Dohme (MSD) en Genómica y Proteómica

(dirigida por César Nombela), la Comunidad de Madrid (proyecto S-SAL-0246/2006 DEREMICROBIANA-CM), la Red Española para la Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI) del Ministerio de Salud y Consumo e Instituto de Salud Carlos III-FEDER (proyecto RD06/0008/1027), la Fundación Ramón Areces, la Comunidad de Madrid y Universidad Complutense (proyecto 920685) y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (proyecto IO-2006-01989).

Agradecimientos

Nuestra especial gratitud a A. Jiménez (del Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico de Salamanca) por proporcionarnos los especímenes séricos, a los pacientes que participaron en nuestros estudios y a M.D. Gutiérrez, M.L. Hernaiz, P. Ximénez-Embún y M. Martínez-Gomariz (de la Unidad de Proteómica, Universidad Complutense y Parque Científico de Madrid, un miembro del Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed) por su asistencia técnica.

Bibliografía

- Hall GS. Probe technology for the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:578-83.
- Price E, Pallett A, Gilbert RD, Williams C. Microbiological aspects of the UK National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) guidance on urinary tract infection in children. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:836-41.
- Cohen J. The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Med.* 2000;26:S51-6.
- Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005;43:65-84.
- Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, et al. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol.* 2002;51:1021-31.
- Kandpal R, Saviola B, Felton J. The era of 'omics unlimited. *Biotechniques.* 2009;46:351-5.
- Zhang W, Li F, Nie L. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology.* 2010;156:287-301.
- List EO, Berryman DE, Bower B, Sackmann-Sala L, Gosney E, et al. The use of proteomics to study infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets.* 2008;8:31-45.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology.* 1996;14:61-5.
- Buhimschi CS, Bhandari V, Han YW, Dulay AT, Baumbusch MA, et al. Using proteomics in perinatal and neonatal sepsis: hopes and challenges for the future. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:235-43.
- Seliger B, Kellner R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics.* 2002;2:1641-51.
- Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:39-63.
- Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz MC, et al. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010. doi:10.1016/j.eimc.2009.12.009.
- Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using MALDI-TOF mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect.* 2010 [En prensa].
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Guerra IP, García García MI, Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2010 [En prensa].
- Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *Plos One.* 2010;5:e8862.
- Bizzini A, Greub G. MALDI-TOF MS, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010 [En prensa].
- Leggieri N, Rida A, François P, Schrenzel J. Molecular diagnosis of bloodstream infections: planning to (physically) reach the bedside. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:311-9.
- De Bock M, De Seny D, Meuwis MA, Chapelle JP, Louis E, et al. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:906082.
- Hodgetts A, Levin M, Kroll JS, Langford PR. Biomarker discovery in infectious diseases using SELDI. *Future Microbiol.* 2007;2:35-49.
- Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, Rojas SA, Herbster, et al. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. *Lancet.* 2006;368:1012-21.

22. Buhimschi CS, Bhandari V, Hamar BD, Bahtiyar MO, Zhao G, Sfakianaki AK, et al. Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection and neonatal sepsis. *Plos Med.* 2007;4:e18.
23. Liang L, Leng D, Burk C, Nakajima-Sasaki R, Kayala MA, Atluri VL, et al. Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e673.
24. Mochon AB, Ye J, Kayala MA, Wingard JR, Clancy CJ, Nguyen MH, et al. Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000827.
25. Ceroni A, Sibani S, Baiker A, Pothineni VR, Bailer SM, et al. Systematic analysis of the IgG antibody immune response against varicella zoster virus (VZV) using a self-assembled protein microarray. *Mol Biosyst.* 2010;6:1604–10.
26. Cekaite L, Hovig E, Sioud M. Protein arrays: a versatile toolbox for target identification and monitoring of patient immune responses. *Methods Mol Biol.* 2007;360:335–48.
27. Wilson RA, Curwen RS, Braschi S, Hall SL, Coulson PS, Ashton PD. From genomes to vaccines via the proteome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:45–50.
28. Pitarch A, Abián J, Carrascal M, Sánchez M, Nombela C, et al. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* 2004;4:3084–106.
29. Desmetz C, Cortijo C, Mangé A, Solassol J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *J Proteomics.* 2009;72:982–8.
30. Tjalsma H, Schaeps RMJ, Swinkels DW. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2:167–80.
31. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Proteomic profiling of serological response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol.* 2009;470:369–411.
32. Bernardini G, Braconi D, Lusini P, Santucci A. *Helicobacter pylori*: immunoproteomics related to different pathologies. *Expert Rev Proteomics.* 2007;4:679–89.
33. Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:79–96.
34. Zhang A, Chen B, Mu X, Zhao Y, Zheng P, et al. Identification of three novel in vivo-induced expressed antigens during infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;295:17–22.
35. Schrohl AS, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, et al. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:378–87.
36. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic markers. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1:1221–42.
37. Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2:596–618.
38. Mischak H, Apweiler R, Banks RE, Conaway M, Coon J, Dominiczak A, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1:148–56.