

IDENTIFICACION DE LEVADURAS POR LA TECNICA MALDI-TOF: COMPARACION ENTRE DOS METODOS DE EXTRACCION DE PROTEINAS

Inmaculada Vidal, Bartolome Albert, María José Ferrer, Antonia Sánchez, Adelina Gimeno, Mariano Andreu, Alfredo Zorraquino, J. C. Rodríguez
Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital General Universitario de Alicante

INTRODUCCIÓN: La identificación rápida de las levaduras a nivel de especie puede tener gran importancia a la hora de instaurar tratamientos antifúngicos correctos, por lo que nosotros evaluamos la utilidad de la técnica rápida MALDI-TOF, basada en espectrometría de masas (MALDI Biotyper, versión 3,1 Brukers Daltonics) en este proceso. Comparamos dos protocolos de extracción de proteínas: el recomendado por el fabricante del equipo y una técnica rápida.

MATERIAL Y MÉTODO: Se recogieron 45 aislamientos consecutivos de levaduras aisladas en muestras clínicas de nuestro hospital y se realizó la extracción de proteínas de todos ellos por ambos métodos:

Método de referencia

- Mezclar 1-3 colonias con 300 µl agua destilada
- Añadir 900 µl etanol absoluto
- Centrifugar a 14.000 rpm 1 min
- Dejar secar el precipitado y resuspender en 25 µl ácido fórmico 70%
- Añadir 25 µl acetonitrilo
- Centrifugar a 14.000 rpm 1 min
- Depositar 1 µl del sobrenadante en la placa metálica
- Dejar secar
- Cubrir con 1 µl de matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4- hidroxicinámico en 50% acetonitrilo y 2.5% ácido trifluoroacético)

Método rápido

- Colocar 1 colonia en la placa metálica
- Cubrir con 1 µl de ácido fórmico 70%
- Dejar secar
- Cubrir con 1 µl de matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4- hidroxicinámico en 50% acetonitrilo y 2.5% ácido trifluoroacético)

La obtención de los espectros se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y para el análisis de los mismos se utilizó el software y la base de datos del sistema. Se utilizaron los siguientes criterios de identificación: score ≥2, identificación a nivel de especie; score entre 1.7 y 1.9, identificación a nivel de género; score ≤1.7, falta de identificación. Se consideró válida la identificación de género y especie con score comprendido entre 1.7 y 2 cuando el resultado fue el mismo con ambos métodos.

RESULTADOS: Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Especie	Nº aislamientos	Método de referencia			Método rápido			No identificado por metodo rapido
		Score			Score			
		<1.7	1.7 – 2	>2	<1.7	1.7 - 2	>2	
Candida albicans	19			19	4 (1)	14	1	
Candida parapsilosis	8			8		7	1	
Candida glabrata	6			6		4	1	1
Candida tropicalis	5			5		4	1	
Candida lusitaniae	2			2		2		
Candida guilliermondii	1			1		1		
Candida metapsilosis	1			1		1		
Candida orthopsilosis	1			1		1		
Cryptococcus neoformans	1			1		1		
Saccharomyces cerevisiae	1			1			1	

CONCLUSIONES: La aplicación de un método rápido de extracción de proteínas nos permite identificar el 97.8% de las especies de levaduras más frecuentemente aisladas en el laboratorio de Microbiología, con menor tiempo de procesamiento y menor coste de reactivo; esto permite poder utilizar el sistema en la práctica clínica habitual y obtener la identificación de estos microorganismos en pocos minutos por lo que este método puede sustituir a los métodos fenotípicos clásicos si se dispone de la infraestructura necesaria.