

Informe final publicable de proyecto

Estrategia proteómica ?shotgun? para el diagnóstico de infecciones bacterianas y la identificación de marcadores de resistencia a antibióticos: validación e implementación

Código de proyecto ANII: FSS_X_2022_1_173332

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2024

DURÁN MUÑOZ, María Del Rosario (Responsable Técnico - Científico)

RIVERA SOTO, Bernardina Inés (Co-Responsable Técnico-Científico)

COSTA CARVALHO, Paulo (Investigador)

PORTELA, María Magdalena (Investigador)

RODRÍGUEZ TAÑO, Azalia de la Caridad (Investigador)

SANTOS, Marlon (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\\

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\\

ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO \\\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\\

FUNDACIÓN OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ

Resumen del proyecto

Las infecciones bacterianas, y en particular aquellas causadas por cepas resistentes a los antibióticos, representan un problema para la salud. Para la identificación del microorganismo los laboratorios clínicos disponen de métodos de diagnóstico molecular que complementan los métodos clásicos. Entre ellos, la espectrometría de masa MALDI-TOF que permite el análisis proteómico de una célula entera, revolucionó la identificación de microorganismos. Sin embargo, no siempre permite una identificación confiable, y en general no aporta datos sobre resistencia a los antibióticos. De hecho, laboratorios nacionales constataron que no obtenían resultados confiables por MALDI para un número importante de aislamientos. Esto nos impulsó a desarrollar una metodología basada proteómica "shotgun" para identificar bacterias en aislamientos clínicos que demostró ser útil para asistir el diagnóstico en caso de bacterias no identificadas o con identificaciones presuntivas dudosas por métodos rutinarios. El método desarrollado constituyó el punto de partida esta propuesta. Durante la ejecución del presente proyecto generamos un protocolo optimizado y validado para la identificación de bacterias por proteómica "shotgun". Además, extendimos el alcance de la metodología previa mediante la incorporación de una base de datos que permite la detección de proteínas relacionadas a la resistencia a antibióticos. Generamos un kit para facilitar el procesamiento de la muestra y un programa que permite una fácil interpretación de los resultados. Este método está hoy disponible para asistir el diagnóstico en casos en los que los métodos utilizados por los laboratorios clínicos no ofrezcan identificaciones confiables. Finalmente, realizamos un análisis proteómico más profundo utilizando aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes y sensibles a la polimixina B. Para ello nos centramos en estrategias basadas en librerías espectrales y aprendizaje automático, los que nos permitió discriminar entre cepas resistentes y sensibles y reportar un gran número de espectros exclusivos de las cepas resistentes que representan posibles biomarcadores de resistencia.

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica

Palabras clave: Proteómica / Identificación de bacterias / Diagnóstico /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las infecciones causadas por bacterias son responsables de gran cantidad de enfermedades de importancia para la salud cuyo tratamiento se ve amenazado por la constante aparición de farmacoresistencia. La identificación de los agentes infecciosos, y la rápida detección del perfil de resistencia a antibióticos, es fundamental para un diagnóstico correcto y la selección de una terapia eficaz, puntos críticos para la recuperación del paciente.

Los métodos clásicos para la identificación de bacterias se basan en sus características morfológicas macro y microscópicas, y en una batería de ensayos bioquímicos. Estas aproximaciones son informativas pero laboriosas y conllevan retrasos el diagnóstico y tratamiento. Más recientemente, las técnicas de diagnóstico molecular permitieron avances sin precedentes en el diagnóstico de agentes infecciosos (1). En particular, el análisis del perfil proteómico de células enteras por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization/Time-of-Flight) revolucionó la identificación de microorganismos (2-4). En un flujo de trabajo típico de MALDI, las bacterias obtenidas de una colonia se depositan en una placa y se mezclan con una solución de matriz. La irradiación con láser del co-cristal formado provoca la desorción e ionización de proteínas bacterianas y genera un espectro de masa que constituye una "huella dactilar" que permite la identificación de la bacteria por comparación con bases de datos espectrales de referencia. Este método tiene grandes ventajas, incluyendo la rapidez, el bajo costo del análisis, la robustez y el requerimiento de un procesamiento mínimo de la muestra. Por todo esto, el MALDI-TOF se ha convertido en una herramienta insustituible para la identificación de microorganismos en laboratorios microbiológicos de todo el mundo. Sin embargo, esta metodología también presenta algunos inconvenientes importantes. Por un lado, se basa en la información contenida en un único espectro de masa, que incluye señales de un subconjunto de proteínas muy abundantes, de baja masa molecular y principalmente básicas (fundamentalmente proteínas ribosomales y "housekeeping"). Esto hace que sea difícil discriminar entre especies estrechamente relacionadas. Además, algunos taxones están sub-representados en las bases de datos comerciales disponibles. Todo esto lleva a que no siempre sea posible la identificación confiable de un aislamiento utilizando MALDI-TOF. Más aún, en la enorme mayoría de los casos el espectro de MALDI no proporciona información acerca de características clínicamente relevantes, como la resistencia a antibióticos o la virulencia. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevos métodos proteómicos con mayor potencial diagnóstico.

En la actualidad, la proteómica "shotgun" es utilizada rutinariamente en el ámbito de la investigación ya que permite la

identificación y cuantificación simultánea de miles de proteínas en muestras complejas como fluidos biológicos, tejidos o células en un único análisis (5,6). En la proteómica "shotgun" las mezclas de proteínas son digeridas con enzimas proteolíticas para generar péptidos de manera predecible. Estos péptidos se separan mediante nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa que detecta los iones y automáticamente los fragmenta. De esta manera se generan decenas/centenas de miles de espectros de fragmentación (MS/MS) que contienen información de secuencia peptídica. Los péptidos se identifican correlacionando sus patrones de fragmentación con los patrones teóricos de los péptidos generados al digerir "in silico" las proteínas presentes en bases de datos públicas del organismo en cuestión (5). De esta manera se pudo inferir la lista de proteínas presentes en la muestra. El análisis proteómico de bacterias mediante estrategias "shotgun" aporta datos relevantes respecto a la presencia de proteínas relacionadas a la virulencia o a la resistencia a antibióticos cuando el organismo es conocido (7). Pero además, los datos proteómicos "shotgun" contienen información taxonómica que permitiría la identificación de bacterias (basada, a diferencia de MALDI, en una enorme cantidad de espectros); e incluso la discriminación a nivel de subespecies (8). Sin embargo, en el caso del proteoma de un organismo desconocido habría que comparar los espectros MS/MS contra la enorme cantidad de proteomas bacterianos disponibles para lograr una identificación, lo que es inmanejable desde el punto de vista computacional (existen más de 200.000 proteomas bacterianos depositados en Uniprot). En el ámbito académico, la proteómica "shotgun" se ha utilizado para la identificación de bacterias dentro de grupos acotados y existen algunos métodos computacionales reportados que utilizan datos MS/MS y bases de datos amplias, pero que abarcan menos de 10% de la información disponible a partir de organismos secuenciados (9-14). Además del desafío computacional, otra serie de razones retrasaron la incorporación en la proteómica "shotgun" en la rutina del laboratorio clínico incluyendo: la necesidad de equipos sofisticados; la falta de robustez de la separación cromatográfica usando nano-HPLC; el tiempo de análisis y la necesidad de personal especializado. En los últimos años, la comunidad científica y el sector privado realizaron un esfuerzo considerable por impulsar la proteómica clínica. Se lograron importantes avances en la sensibilidad y robustez de los espectrómetros de masa (15), y se diseñaron sistemas de nano-cromatografía líquida más rápidos y fáciles de usar (16), acortando la brecha entre la proteómica "shotgun" y su aplicación en el laboratorio clínico.

Si bien la incorporación de los equipos MALDI-TOF en los laboratorios clínicos locales ha tenido un impacto muy positivo, estos grupos también constataron que una cantidad considerable de aislamientos no podían ser identificados de manera confiable por esta metodología, poniendo en evidencia la necesidad de estrategias proteómicas más potentes. Convencidos del potencial de la proteómica "shotgun" para la identificación de agentes infecciosos y de su madurez como técnica para ser incorporada a los laboratorios clínicos en un futuro muy próximo, decidimos incursionar en el desarrollo de protocolos y estrategias metodológicas que permitan su aplicación para la identificación de bacterias. Para ello conformamos un equipo multidisciplinario que reunió tanto laboratorios con experiencia en proteómica "shotgun" en el ámbito de la investigación como laboratorios con experiencia en diagnóstico. El trabajo conjunto nos permitió desarrollar una metodología proteómica "shotgun" para el análisis de aislamientos clínicos y las estrategias bioinformáticas asociadas para identificar el género y especie de las bacterias en cuestión. Esto implicó la generación de una base de datos contemplando todos los genomas secuenciados disponible que fuese manejable por los programas de búsquedas, así como la optimización de un protocolo experimental que nos permitió acortar los tiempos de análisis y recuperar el material de la placa de MALDI en los casos en que esto fuese necesario. Este desarrollo constituyó el punto de partida del presente proyecto donde nos propusimos validar la metodología para su futuro uso en diagnóstico clínico con el fin de complementar los métodos actualmente utilizados para la identificación de bacterias. Además, nos propusimos extender la metodología para proporcionar información acerca de la expresión de marcadores de resistencia a antibióticos en los aislamientos estudiados. Finalmente, para un grupo de bacterias resistentes de relevancia médica nos propusimos realizar un análisis proteómico más profundo con el fin de estudiar nuevos marcadores/mecanismos de resistencia.

Metodología/Diseño del estudio

El método a optimizar y validar se basa en la estrategia proteómica de tipo "shotgun". Un flujo de trabajo típico para identificación de bacterias por proteómica "shotgun" comprende la obtención de péptidos a partir de una colonia (o el material depositado en una placa de MALDI), la separación y detección de los péptidos por nano-HPLC acoplado a espectrometría de masas, y finalmente el análisis bioinformático de los datos por comparación con bases de datos específicamente diseñadas (Ver Figura1).

Durante la ejecución de este proyecto optimizamos cada una de estas etapas.

1. Optimización del protocolo para obtención de péptidos y su análisis por nano-HPLC-MS/MS

En esta etapa un objetivo fundamental fue obtener un procedimiento rápido y sencillo, que requiriera del menor equipamiento de laboratorio posible, de manera de facilitar la futura incorporación de esta metodología por parte de los laboratorios clínicos. En la etapa de obtención de péptidos ensayamos distintas concentraciones de ácidos orgánicos en las soluciones para lisar bacterias, y evaluamos el rendimiento obtenido usando colonias de cepas estándar y cuantificando los péptidos identificados luego del análisis por nano-HPLC MS/MS. De igual manera optimizamos los tiempos requeridos para la ruptura celular utilizando equipamiento básico de laboratorio. Finalmente desarrollamos un kit de preparación de la muestra diseñado específicamente para la obtención de péptidos de forma fácil y eficiente a partir de colonias en placas de agar o del material depositado en la placa de MALDI. Esto último resulta útil en los casos en que MALDI no proporciona identificaciones seguras. En la Figura 2 se muestran las diferentes etapas del análisis optimizado, indicando como se utiliza el kit desarrollado y los equipos requeridos. El protocolo para el nano-HPLC acoplado al espectrómetro de masas también fue optimizado acortando los gradientes todo lo posible sin perder información relevante para la identificación. En la Figura 2 se indica el tiempo involucrado en cada etapa; el protocolo global puede completarse en menos de 3 hrs.

2. Generación de un programa de búsqueda

Anteriormente habíamos generado bases de datos reducidas, manejables por los programas de búsquedas usuales, y que contenían información acerca de todas las bacterias secuencias disponibles al 2020. En el presente proyecto se actualizó la base de datos y se desarrolló un programa de muy fácil uso para obtener las identificaciones. El mismo fue desarrollado utilizando .NET C# e integrando SQLite para la gestión de datos. La base de datos emplea información obtenida de UniProt correspondiente a 11,645 genomas bacterianos asegurando una identificación precisa. El programa aplica la técnica de PSM (Peptide Spectrum Matching), comparando espectros peptídicos teóricos con espectros experimentales obtenidos por espectrometría de masas, permitiendo una identificación precisa de proteínas. Además, utiliza un sistema de filtrado FDR (False Discovery Rate) con una tasa del 1% a nivel de péptido, mejorando la precisión y confiabilidad de los resultados.

Los péptidos se mapean a proteínas, recuperando información sobre los géneros y especies de las bacterias. La identificación se realiza a través del score de identificación, obtenido mediante los valores de correlación entre los espectros teóricos y experimentales (PSM) de péptidos únicos para cada género y especie. Las puntuaciones de identificación de péptidos se normalizan en una escala de 0 a 100, facilitando una representación precisa y detallada de las identificaciones. Esto permite una identificación rápida a nivel de especie.

La interfaz del programa agiliza la navegación, y permite una fácil interpretación de los resultados por parte del personal de laboratorio clínico sin requerir una formación específica. Nuestro protocolo bioinformático permite la identificación de bacterias en aproximadamente 3 minutos. Esta eficiencia es vital para mejorar los flujos de trabajo y generar resultados en tiempos acordes a las necesidades del laboratorio clínico.

3. Detección de marcadores de resistencia a antibióticos

Con el fin de extender la información que se obtiene de este análisis incluimos en el programa anterior una base de datos conteniendo secuencias de proteínas relacionadas a la resistencia a antibióticos. Para la elaboración de la base de datos se utilizó información disponible en bases de datos públicas (NDARO con 7,135 proteínas) y se aplicaron filtros diseñados para la obtención de datos confiables.

4. Validación de la metodología para la identificación de bacterias

Para la validación del método, se utilizaron 7 cepas estándar (cepas ATCC) y 29 cepas clínicas, aislados obtenidos en el Hospital Maciel, Uruguay, que previamente fueron identificados por metodologías estándar o validadas. Las 7 cepas ATCC utilizadas como controles positivos fueron las siguientes:

- *Klebsiella oxytoca* 70324
- *Enterococcus faecalis* 29212
- *Escherichia coli* 35218
- *Staphylococcus aureus* 29213
- *Escherichia coli* 25922
- *Klebsiella pneumoniae* 700603
- *Streptococcus thermophilus* 19258

Por otra parte, con el fin de evidenciar la posible presencia de identificaciones incorrectas se utilizaron como controles negativos una línea celular derivada de riñón embrionario humano (HEK- 29) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Dado que la metodología a validar consiste en un método analítico cuantitativo utilizado para emitir resultados cualitativos, los

parámetros principales a determinar según la norma ISO 16140 son:

- Inclusividad / Exclusividad
- Límite de detección
- Robustez

Inclusividad/Exclusividad:

Mediante la inclusividad se pretendió demostrar la capacidad para detectar e identificar el organismo diana en una muestra problema. Del mismo modo la exclusividad nos permitió evidenciar la ausencia de interferencias en el método en una muestra problema.

Para esto se utilizaron controles positivos (muestras de bacterias previamente identificadas) y controles negativos (muestras provenientes de otros orígenes) a las que se aplicó el protocolo antes descrito para identificar bacterias por proteómica "shotgun".

Límite de detección (LOD):

Mediante este parámetro se busca definir el número mínimo de microorganismo que pueden ser detectados mediante esta técnica. Para esto se realiza inicialmente una dilución $\frac{1}{4}$ de la muestra problema y posteriores diluciones seriadas 1/10 para las cepas de referencia. Las muestras fueron analizadas utilizando el protocolo desarrollado para proteómica "shotgun", y al mismo tiempo utilizadas para un recuento en placa. Para poder determinar el límite de detección se tomaron aquellos recuentos en placa que según su dilución correspondiente fueron concomitantemente identificados por Espectrometría de Masa.

Robustez:

La robustez representa el grado de reproducibilidad de un procedimiento analítico sometido a pequeñas variaciones en la realización del ensayo con el objeto de conocer su estabilidad frente a ellas. En este sentido se realizaron 4 réplicas biológicas partiendo de 1 colonia en 10ul de Buffer de lisis para las distintas cepas. De cada una de estas a su vez fueron preparadas dos réplicas técnicas. Se consideró como parámetro posiblemente crítico para evaluar la robustez el tiempo de incubación con la enzima proteolítica (1h vs 3 h).

A su vez se calculó la Reproducibilidad Relativa de nuestro método para cada inyección realizada en el set de muestras. En este caso consideramos el número de péptidos identificados para cada inyección y cada replica biológica y/o técnica de cada cepa.

5. Análisis de los perfiles proteómicos de aislamientos clínicos mediante el uso de librerías espectrales y aprendizaje automático

En el proyecto nos propusimos a su vez, para un grupo reducido de bacterias, el uso de estrategias proteómicas asociadas al análisis de datos basado en aprendizaje automático, usando estrategias desarrolladas por el grupo de trabajo (17). En este caso nos centramos en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente y no resistente a la polimixina obtenidas a partir de aislamientos clínicos en hospitales brasileños. Utilizamos DiagnoMass (17) para analizar los datos proteómicos, lo que nos permitió agrupar espectros en grupos espectrales y obtener información que no está limitada al contenido de la base de datos de secuencias utilizada. Se usaron en este estudio 28 cepas de *Acinetobacter baumannii* (14 resistentes y 14 sensibles a la polimixina B) que fueron obtenidas por el "Laboratório Central do Estado do Paraná". Para el análisis se realizó la lisis bacteriana y 100 ug de proteínas de cada cepa se redujo utilizando DTT 10 mM durante 30 minutos a 60 °C, y luego se realizó la alquilación de residuos de Cys utilizando iodoacetamida (30 mM). Finalmente, las muestras fueron digeridas con tripsina a 37 °C, y los péptidos se sometieron a análisis por LC-MS/MS. Los datos proteómicos se analizaron utilizando herramientas clásicas basadas en base de datos de secuencias, así como utilizando DiagnoMass, una herramienta para agrupamiento espectral. Información detallada acerca de los detalles experimentales fueron publicados (18).

Resultados, análisis y discusión

1. Optimización y validación de la metodología

La ejecución del presente proyecto nos permitió desarrollar: un protocolo optimizado y un kit de procesamiento de muestras; un protocolo para la adquisición de datos mediante nanoHPLC-MS/MS; y un programa para el análisis de los mismos utilizando una base de datos creada por nosotros.

El contenido del kit y un resumen del protocolo generado se encuentra en la Figura 2; mientras que la Figura 3 muestra el procedimiento para realizar las identificaciones utilizando el programa desarrollado (Bacwizard) y un resultado típico del

mismo. Brevemente el archivo conteniendo todos los espectros de masas generados se carga en la página principal del programa y se “clickea” GO. En un lapso de tres minutos el programa compara todos los espectros experimentales con los obtenidos “in silico” a partir de las secuencias presentes en la base de datos que contienen información de todas las especies de bacterias con genoma secuenciado al 2023. El resultado es una lista de bacterias (Género y especie) donde se asigna un score de 100 a la identificación más probable dentro de la base de datos utilizada. En caso de que se detecte la presencia de proteínas relacionadas a la resistencia a antibióticos, esta información aparece en el cuadrante inferior en la página de resultados.

La metodología desarrollada permitió reducir los pasos y tiempos de procesamiento de muestras, y la facilitar la manipulación segura de bacterias patógenas disminuyendo riesgos para el personal del laboratorio.

Los parámetros evaluados durante la validación fueron inclusividad/exclusividad; límite de detección y robustez.

Con respecto a la Inclusividad/exclusividad, todas las muestras de bacterias utilizadas fueron correctamente identificadas, siendo en todos los casos el género y especie reportado por Bacwizard concordante con la identidad de la cepa estándar ATCC o la proporcionada por MALDI o secuenciación. En el caso de los controles negativos, no hubo identificación cruzada con ninguna bacteria presente en la base de datos.

El límite de detección determinado para el método proteómico shotgun fue de 3.5 UFC. Finalmente, en ensayo de robustez permitió concluir que el total de muestras analizadas (56 muestras) pudieron ser correctamente identificadas, independientemente de los cambios introducidos en el protocolo. Además, obtuvimos un 98% de reproducibilidad relativa entre inyecciones en cada juego de replicas biológicas y técnicas de cada cepa de referencia.

Globalmente generamos una estrategia que permite identificar bacterias a partir de colonias en un tiempo compatible con las necesidades del laboratorio clínico, y que es capaz de dar una solución en aquellos casos de difícil diagnóstico. Esta herramienta esta hoy disponible para ayudar el diagnóstico clínico, y ya hemos recibido solicitudes por parte de profesionales de la salud.

2. Análisis de los perfiles proteómicos de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes y sensibles a la polimixina B.

El conjunto completo de datos, obtenidos a partir de 14 cepas resistentes y 14 cepas sensibles a la polimixina B consiste en 3.884.700 espectros de masas en tándem. Para el análisis de los datos se utilizaron estrategias basadas en búsquedas en bases de datos de secuencia así como estrategias basadas en librerías espectrales y aprendizaje automático. El análisis de los datos generados utilizando la estrategia basada en bases de datos de secuencias nos permitió identificar 44.553 péptidos a partir de 928.831 espectros MS/MS, los cuales permitieron inferir la presencia de 3479 proteínas. Dentro de ellas, identificamos 151 proteínas fueron detectadas exclusivamente en las cepas resistentes, mientras que 241 proteínas detectadas en ambas condiciones se encontraron como estadísticamente sobre-representadas en las cepas resistentes a polimixina B. Este análisis nos aporta información acerca de los cambios proteómicos en *Acinetobacter baumannii* asociados a la resistencia a este antibiótico. Sin embargo, es claro a partir de este análisis, que la estrategia basada en búsqueda en bases de datos de secuencia deja gran parte de la información obtenida sin interpretar. Ya ha sido reportado que un porcentaje relativamente alto de los espectros de fragmentación MS/MS de los experimentos proteómicos no se puede asignar a ninguna secuencia en la base de datos (ya sea por la presencia de mutaciones puntuales, modificaciones postraduccionales no consideradas, o ausencia de información en las bases de datos) (19).

Utilizamos estrategias complementarias para interpretar los datos proteómicos “shotgun” que buscan aprovechar la información contenida en todos los espectros de fragmentación, aun cuando no puedan ser asignados a ninguna secuencia en las bases de datos. Para ello nos basamos en herramientas bioinformáticas desarrolladas por el equipo de trabajo (DiagnoMass), que se basan tanto en clasificación no supervisada como en la generación de librerías espectrales y aprendizaje automático (18). El análisis de componentes principales muestra que la estrategia basada en búsqueda en base de datos no permite una clara discriminación entre cepas resistentes y sensibles a la polimixina B. Sin embargo, cuando se utilizan todos los espectros en el análisis (independientemente de si se pueden asignar a una secuencia peptídica o no) se obtiene una separación clara de las dos condiciones (Figura 4A). Además, utilizando DiagnoMass, generamos un mapa de calor y un histograma, centrándonos en grupos de espectros encontrados en al menos cinco cepas de la misma condición biológica. Este análisis sugiere una correlación dentro de los perfiles proteómicos de las cepas resistentes y no resistentes. Como se indica en la Fig. 4B, DiagnoMass seleccionó 3550 y 1408 grupos de espectros exclusivos de las cepas resistentes y no resistentes, respectivamente. De estos, la búsqueda en bases de datos pudo identificar con confianza espectros de solo 1281 y 193 grupos, respectivamente. Una revisión manual detallada indica la presencia de numerosos espectros de masas de alta calidad, aún no identificados, que representan posibles biomarcadores de la resistencia a polimixina.

Globalmente este primer análisis, reportado como un “dataset” (18) nos permite corroborar el potencial de la proteómica “shotgun” para discriminar a nivel de subespecie, e identificar diferencias a nivel molecular entre cepas resistentes y sensibles a los antibióticos.

Conclusiones y recomendaciones

En el presente proyecto generamos un protocolo optimizado y validado para la identificación de bacterias a partir de aislamientos clínicos basados en proteómica "shotgun", así como para la detección de proteínas relacionadas a la resistencia a antibióticos. La misma está disponible para asistir el diagnóstico en casos en los que los métodos utilizados por los laboratorios clínicos no ofrezcan identificaciones certeras.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Beyond the identifiable proteome: Delving into the proteomics of polymyxin-resistant and non-resistant Acinetobacter baumannii from Brazilian hospitals	Lin AD, Fischer JSDG, Santos MDM, Camillo-Andrade AC, Kurt LU, Souza TACB, Lajas ABL, Rivera B, Portela M, Duran R, Mira MT, Pilonetto M, Carvalho PC.	doi: 10.1016/j.jjprot.2023.105012.	https://hdl.handle.net/20.500.12381/3555	Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* 2013 11(8):574-85.

2. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20(4):157-71

3. Seng P, Drancourt M, Gourié F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laserdesorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009 Aug 15;49(4):543-51.

4. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015;61(1):100-11.

5. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc MassSpectrom.* 1994; 5(11):976-89. 8.

6. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 2001;19(3):242-7.

7. Semanjski M, Macek B. "shotgun" proteomics of bacterial pathogens: advances, challenges and clinical implications. *Expert Rev Proteomics.* 2016;13(2):139-56.

8. Karlsson R, Gonzales-Siles L, Boulund F, Svensson-Stadler L, Skovbjerg S, Karlsson A, Davidson M, Hulth S, Kristiansson E, Moore ER. Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms--A prospectus. *Syst Appl Microbiol.* 2015;38(4):246-57.

9. Dworzanski JP, Deshpande SV, Chen R, Jabbour RE, Snyder AP, Wick CH, Li L. Mass spectrometry-based proteomics

combined with bioinformatic tools for bacterial classification. *J Proteome Res.* 2006;5(1):76-87.

10. Tracz DM, McCorrister SJ, Chong PM, Lee DM, Corbett CR, Westmacott GR. A simple "shotgun" proteomics method for rapid bacterial identification. *J Microbiol Methods.* 2013;94(1):54-7.

11. Lasch P, Schneider A, Blumenschein C, Doellinger J. Identification of Microorganisms by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and in Silico Peptide Mass Libraries. *Mol Cell Proteomics.* 2020;19(12):2125-2139.

12. Alves G, Wang G, Ogurtsov AY, Drake SK, Gucek M, Suffredini AF, Sacks DB, Yu YK. Identification of Microorganisms by High Resolution Tandem Mass Spectrometry with Accurate Statistical Significance. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016 Feb;27(2):194-210.

13. Boulund F, Karlsson R, Gonzales-Siles L, Johnning A, Karami N, Al-Bayati O, Åhrén C, Moore ERB, Kristiansson E. Typing and Characterization of Bacteria Using Bottom-up Tandem Mass Spectrometry Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(6):1052-1063.

14. Berendsen EM, Levin E, Braakman R, Prodan A, van Leeuwen HC, Paauw A. Untargeted accurate identification of highly pathogenic bacteria directly from blood culture flasks. *Int J Med Microbiol.* 2020 Jan;310(1):151376.

15. Dubuke LM, Chauhan S, Trusiak S, Chen EI. A robust mass spectrometer for precision medicine – the Orbitrap Exploris 240 mass spectrometer for large-scale plasma protein profiling. Application note 65952 Thermo Fisher Scientific Precision Medicine Science Center, Cambridge, MA (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-65952-orbitrap-exploris-240-mass-spectrometer-translational-an65952-en.pdf>).

16. Bache N, Geyer PE, Bekker-Jensen DB, Hoerning O, Falkenby L, Treit PV, Doll S, Paron I, Müller JB, Meier F, Olsen JV, Vorm O, Mann M. A Novel LC System Embeds Analytes in Pre-formed Gradients for Rapid, Ultra-robust Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(11):2284-2296.

17. Santos MDM, Camillo-Andrade AC, Lima DB, Souza TACB, Fischer JSDG, Valente RH, Gozzo FC, Barbosa VC, Batthyany C, Chamot-Rooke J, Duran R, Carvalho PC. DiagnoMass: A proteomics hub for pinpointing discriminative spectral clusters. *J Proteomics.* 2023 5;277:104853.

18. Lin AD, Fischer JSDG, Santos MDM, Camillo-Andrade AC, Kurt LU, Souza TACB, Lajas ABL, Rivera B, Portela M, Duran R, Mira MT, Pillonetto M, Carvalho PC. Beyond the identifiable proteome: Delving into the proteomics of polymyxin-resistant and non-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazilian hospitals. *J Proteomics.* 2023, 289:105012.

19. Griss J, Perez-Riverol Y, Lewis S, Tabb DL, Dianes JA, Del-Toro N, Rurik M, Walzer MW, Kohlbacher O, Hermjakob H, Wang R, Vizcaino JA. Recognizing millions of consistently unidentified spectra across hundreds of shotgun proteomics datasets. *Nat Methods.* 2016;13(8):651-656.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)