

La espectrometría de masas Maldi-Tof como técnica de rutina para la identificación de micobacterias típicas y atípicas en el laboratorio de microbiología clínica

Maldi-Tof mass spectrometry as a routine technique for identification of typical and atypical mycobacteria in the Laboratory of Clinical Microbiology

Raquel Camacho-Luque¹, Alejandro Peña-Monje¹, Natalia Montiel², Alejandro Barbancho², Federico García¹

¹Servicio de Microbiología Hospital Universitario San Cecilio de Granada

²Servicio de Microbiología Hospital Costa del Sol de Marbella

Resumen

Introducción y Objetivo: Del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies de micobacterias diferentes de crecimiento lento y rápido. Estos microorganismos producen una importante morbilidad en humanos, incluyendo infecciones de tipo pulmonar, en la piel y tejidos blandos y enfermedad diseminada siendo el diagnóstico rápido y preciso es de gran importancia.

Material y Métodos: La población de estudio de nuestro trabajo fueron 75 aislados de micobacterias procedentes de cultivo en medio sólido Lowenstein-Jensen. El diagnóstico fue realizado mediante técnicas moleculares de PCR e hibridación inversa: GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS. De forma paralela las cepas se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry).

Resultados: La concordancia global de resultados entre la identificación realizada mediante PCR y la tecnología MALDI-TOF fue del 97%, con un coeficiente kappa de correlación de 0.929 (correlación excelente entre 0.081-1.0).

Conclusiones: Nuestros resultados indican que es bastante factible incorporar MALDI-TOF MS para la identificación rutinaria de micobacterias en el flujo de trabajo del laboratorio de microbiología clínica.

Palabras clave: *Mycobacterias, Malditof MS, Lowenstein-Jensen*

Abstract

Introduction and aim: in the *Mycobacterium* genus have been described more than 120 species of *Mycobacteria* other than growth slow and fast. These microorganisms produce significant morbidity in humans, including type pulmonary infections, skin and soft tissues and disseminated disease being the rapid and precise is of great importance.

Material and methods: the study population of our work were 75 isolated *Mycobacteria* from cultivation in solid Lowenstein-Jensen medium. The diagnosis was made by molecular techniques of PCR and reverse hybridization: GenoType *Mycobacterium* CM and GenoType *Mycobacterium* AS. Parallel strains were identified by mass spectrometry MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry).

Results: The overall agreement of results between the identification made by PCR and MALDI-TOF technology was 97, with a coefficient of correlation of 0.929 kappa (excellent correlation between 0.081-1.0).

Conclusions: Our results indicate that it is quite feasible to incorporate MALDI-TOF MS for routine identification of *Mycobacteria* in the clinical microbiology laboratory workflow.

Keywords: *Mycobacteria, Malditof MS, Lowenstein-Jensen*

INTRODUCCIÓN

Del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies de micobacterias diferentes de crecimiento lento y rápido.

Se caracterizan por ser microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide) que no forman esporas ni tienen cápsula. Son bacterias ácido-alcohol resistente (BAAR) debido al alto contenido en lípidos que tienen en su pared celular.

Este hecho impide que penetren los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden ver en la tinción de Gram, y hace que para poder visualizarlas sean necesarios colorantes especiales (arilmetanos), pero que una vez teñidas no se decoloran con una mezcla de alcohol y ácido (1). Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidas de la luz solar, y son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (>65° C durante 30 minutos) las inactiva.

Mycobacterium tuberculosis, *M bovis*, *M africanum* son los agentes etiológicos de la tuberculosis en el hombre y forman el llamado “complejo tuberculosis”. *M leprae*, es el causante de la lepra y las micobacterias atípicas, son micobacterias distintas de las anteriores, algunas de las cuales, son capaces de producir enfermedades en el hombre (2). Estos microorganismos producen una importante morbilidad en humanos, incluyendo infecciones de tipo pulmonar, en la piel y tejidos blandos y enfermedad diseminada. El diagnóstico rápido y preciso de infecciones micobacterianas es de gran importancia debido al hecho de que un tratamiento antibiótico inapropiado puede conducir a la resistencia a los fármacos o la exposición innecesaria a toxicidad de los medicamentos. La identificación precisa en el laboratorio de microbiología es un reto dado que las pruebas bioquímicas son lentas e incapaces de identificar las especies menos comunes, las sondas moleculares disponibles identifican un número limitado de especies, y la secuenciación genómica es técnicamente compleja y de alto coste económico.

La espectrometría de masas MALDITOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry) es una potente herramienta para la identificación de bacterias y levaduras en el laboratorio clínico. Esta técnica permite la identificación de microorganismos mediante el análisis del perfil o espectro proteómico obtenido tras el procesamiento de la muestra permitiendo lograr una identificación rápida y precisa de todas las especies de micobacterias (3, 4). Los primeros avances en la identificación de micobacterias mediante la técnica MALDI-TOF datan aproximadamente del año 1996, cuando Claydon et al. (5) detectaron algunos espectros en una cepa de *M. smegmatis*. Posteriormente, en el año 2006, Pignone et al. (6) afirmaron que el MALDI-TOF puede servir como sistema de identificación para micobacterias. Desde entonces numerosas publicaciones (7, 8, 9) han tratado de evaluar la utilidad del MALDI-TOF en la identificación de micobacterias. Recientemente El khechine et al. (2011) (10) y Saleeb et al. (2011) (11) han aportado diversas formas de optimizar el procedimiento de extracción para la identificación de micobacterias. Todos los resultados de estos estudios se desarrollaron mediante la elaboración de su propia base de datos.

En este trabajo valoramos la utilidad de MALDITOF MS en el diagnóstico etiológico de infecciones (12, 13, 14) causadas por micobacterias dado que es un método relativamente simple, rápido, y asociado un menor coste de consumibles que la identificación microbológica tradicional (15, 16).

MATERIAL Y MÉTODOS

La población de estudio de nuestro trabajo fueron 75 aislados de micobacterias procedentes de cultivo en medio sólido Lowenstein-Jensen (incubación a 37°C en atmósfera aerobia, con un tiempo medio de 21 días con el objetivo de obtener una cantidad suficiente de colonias para su identificación). Todos los aislados pertenecen a muestras clínicas y todas las cepas fueron trabajadas siguiendo las condiciones de bioseguridad clase 3. Estas cepas fueron catalogadas como *Mycobacterium tuberculosis* complex (n=50), *Mycobacterium avium* (n=10) y otras 15 micobacterias atípicas (4 cepas de *Mycobacterium kansasii*, 3 cepas de *Mycobacterium chelonae*, 4 cepas de *Mycobacterium goodii*, 3 de *Mycobacterium fortuitum*, y una cepa de *Mycobacterium marinum*). El diagnóstico fue realizado mediante técnicas moleculares de PCR e hibridación inversa: GenoType Mycobacterium CM y GenoType Mycobacterium AS.

De forma paralela, las cepas fueron sometidas a un proceso de inactivación para su identificación mediante MALDITOF MS, si-

guiendo un protocolo que incluye un pretratamiento de las muestras para degradar la micobacteria y posterior extracción mediante acetonitrilo y ácido fórmico, obteniéndose un 1 µl del sobrenadante y depositándolo en la placa del espectrómetro junto a 1 µl de matriz.

*Protocolo:

1. Añadir 300 µl de agua (grado HPLC) en tubo tipo Eppendorf.
2. Transferir suficiente cantidad de micobacteria al tubo evitando coger medio, para obtener aproximadamente 105 CFU/mL.
3. Inactivación durante 30 minutos a 100°C (95°C en un baño seco).
4. Mezclar muy bien y añadir 900 µl Etanol 100%. Mezclar muy bien usando vortex.
5. Centrifugar a máxima velocidad (13.000 - 15.000 rpm) 2 min. Eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 500 µl agua y resuspender muy bien el sedimento.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos, eliminar el sobrenadante (utilizando puntas de pipeta).
8. Añadir 50 µl de agua y resuspender muy bien el sedimento.
9. Dejar enfriar la muestra y añadir 1200 µl (e.g. 2 x 600 µl) de alcohol puro previamente congelado (almacenar en congelador, -18°C / -20°C).
10. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante. Si fuera necesario centrifugar de nuevo y eliminar con cuidado el resto de etanol, utilizando puntas de pipeta.
11. Añadir Acetonitrilo puro (10 µl hasta 50 µl, dependiendo del tamaño del sedimento) y mezclar muy bien mediante vortex o con pipeta.
12. Añadir las bolitas de sílice (0.5 mm Zirconia / Silica beads, la cantidad será el equivalente a la punta de una espátula).
13. Agitar con vortex a máxima velocidad durante 1 minuto.
14. Añadir Ácido Fórmico 70% (mismo volumen que acetonitrilo) y mezclar con vortex.
15. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
16. Coger 1 µl del sobrenadante y depositarlo en la tarjeta MALDI. Dejar secar.
17. Añadir 1 µl de la solución de matriz y dejar secar completamente.

*Lectura de las muestras: El análisis de proteínas se lleva a cabo con el espectrómetro de masas MALDI Microflex LT (Bruker Daltonic) con el software FLEXControl (versión 3.0). Para identificar los espectros obtenidos en cada aislado clínico se utilizó la librería de micobacterias V 1.0 de Malditof Biotyper (173 MSPs).

El espectro es obtenido en modo positivo lineal (frecuencia del láser N2: 60 Hz, voltaje de la fuente de iones I: 20 KV, voltaje de la fuente de iones II: 16,7 KV; rango de masas del detector: 2000 – 20000 Da. La huella peptídica obtenida de cada microorganismo es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos del fabricante. De tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente, mediante el programa Maldi Biotyper 3.0, con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo. [14,15] 10 El software proporciona un score de fiabilidad de identificación del microorganismo. Las puntuaciones de 2.300 a 3.000 significan una alta probabilidad de identificación a nivel de especie. De 2.000 a 2.299, identificación segura a nivel de género y probable a nivel de especie. De 1.700 a 1.999, identificación probable de género. De menos de 1.699, identificación no fiable.

Para validar el procedimiento, en el primer pocillo de nuestra tarjeta metálica donde se iniciará la lectura de nuestro estudio, se añade 1 µl de control bacteriano standard (Escherichia coli DH5 extracto de proteína α, Bruker Daltonic ref. 255343) que es utilizado como control positivo. Se deja secar. Se añade 1 µl de matriz y se procede del mismo modo a las lecturas de las muestras de nuestro estudio. Para validar este análisis la identificación del control positivo tiene que ser E. coli con una puntuación ≥ 2.000 .

RESULTADOS

De los 50 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), 43 fueron identificados por MALDI-TOF MS como MTC obteniendo un score $>2,0$; 5 con un score 1.8-2.0 y 2 no fueron identificados por no detectarse picos por el sistema. Dentro de las micobacterias atípicas: 8 cepas *Mycobacterium avium* fueron identificadas por el espectrómetro de masas con un score superior a 2,0 y el resto con score 1.6-1.9; todos los aislados de *Mycobacterium fortuitum* fueron identificados con un score $>2,0$; de 4 cepas de *Mycobacterium kansasii*, 3 fueron identificadas correctamente con score 1.8-2.0 y 1 fue identificada como *Mycobacterium lentiflavum* con score de 1.6, siendo catalogada como error de identificación por parte de MALDI-TOF MS. De las 3 cepas de *Mycobacterium chelonae*, 2 fueron identificadas correctamente con un score de 1.7-2.0 y otra no fue identificada. Todas las cepas de *Mycobacterium gordonae* fueron identificadas correctamente con score 1.7-2.1, al igual que el caso de *Mycobacterium marinum*. La concordancia global de resultados entre la identificación realizada mediante PCR y la tecnología MALDI-TOF fue del 97%, con un coeficiente kappa de correlación de 0.929 (correlación excelente entre 0.081-1.0). De forma aislada, tanto el diagnóstico de micobacterias atípicas como de MTC presentaron un índice kappa de correlación en rango excelente, de 0.951 y 0.958 respectivamente.

DISCUSIÓN

La identificación de nuestros aislamientos de micobacterias patógenas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF demuestra muy buena correlación de resultados respecto a las técnicas moleculares "gold standard" en el diagnóstico de micobacterias. Esto sumado a la rapidez y sencillez en la obtención de resultados, que se obtuvieron rápidamente: el tiempo de respuesta de preparación de la muestra a los resultados fue de aproximadamente 50 min, una mejora significativa cuando se considera el tiempo necesario para la identificación de micobacterias mediante pruebas fenotípicas, sondas de genes, o secuenciación. Queremos señalar que el inóculo utilizado para la identificación de micobacterias debe ser mínimo de 10⁵ CFU/mL para obtener un buen espectro y la base de datos del software debe ser actualizada ya que es bien sabido que la cantidad de proteínas que se analizan no es la única limitación en el momento de llegar a una identificación adecuada; ésta también depende de la existencia en la base de datos utilizada de un determinado espectro de proteínas que sean coincidentes con las de la muestra. Nuestro trabajo describe un protocolo de extracción de proteína que es útil para todos los tipos de micobacterias, ya que presentan una envoltura resistente y por tanto difícil de degradar y obtener el perfil proteómico.

Nuestros resultados indican que es bastante factible incorporar MALDI-TOF MS para la identificación rutinaria de micobacterias en el flujo de trabajo del laboratorio de microbiología clínica. Con algunas excepciones señaladas anteriormente, las identificaciones eran exactas a nivel de género y de especie con un score menor al que propone el fabricante (Bruker Daltonics) para la identificación segura a nivel de género y a nivel de especie.

En resumen, creemos que el uso de MALDI-TOF MS podría considerarse como otra opción válida para la identificación rutinaria de colonias aisladas de especies de *Mycobacterium* con puntos de corte menos restrictivos que los del fabricante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev Sci Tech. 2001 Apr;20(1):325-37.
- Caminero Luna JA. Micobacterias atípicas. BSCP Can Ped. 2001; 25 - nº2.
- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios J. Micobacterias. Protocolo SEIMC; 2ªed Madrid(9ª):1-93.
- Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbone E, Guet-Revillet H, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010 Dec;48(12):4481-6.
- Claydon MA, Davey SN, Edward-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat. Biotechnol. 1996;14:1584-1586.
- Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2006;44:1963-1970.
- Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, et al. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. Proteomics. 2006 Dec;6(24):6416-25.
- Shitikov E, Ilna E, Chernousova L, Borovskaya A, Rukin I, Afanas'ev M, et al. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. Infect Genet Evol. 2012 Jun;12(4):838-45.
- Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux ME, Beretti JL, Lotz A, et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, Aspergillus spp. and positive blood cultures. Clin Microbiol Infect. 2012 Nov;18(11):1117-25.
- El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. PLoS One. 2011;6(9):e24720.
- Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2011 May;49(5):1790-4.
- March GA, Eiros JM. Impacto de la metodología MALDI-TOF en la identificación clínica de agentes infecciosos. Rev Electron J Biomed. 2012;1:60-65.
- Demirev PA, Ho YP, et al. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. Anal Chem. 1999; 71(14): 2732-2738. 22.
- Keys CJ, Dare DJ, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infect Genet Evol. 2004;4(3): 221-242
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009 Aug 15;49(4):543-51.
- Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst Appl Microbiol. 2011 Feb;34(1):2-11.