

Identificación de especies de micobacterias mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Identification of mycobacteria species through mass spectrometry (MALDI-TOF)

Samuel Contreras¹, David Rodríguez², Francisco Vera², María Elvira Balcells³, Luis Celis¹, Paulette Legarraga², Juan Carlos Román¹ y Patricia García²

¹Laboratorio de Microbiología, Servicio de Laboratorios Clínicos Red de Salud UC-CHRISTUS. Santiago, Chile.

²Departamento de Laboratorios Clínicos, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

³Departamento de Enfermedades Infecciosas del Adulto, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Financiamiento: Fondos del Departamento de Laboratorios Clínicos de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Conflicto de intereses: Ninguno

Recibido: 3 de mayo de 2019 / Aceptado: 19 de noviembre de 2019

Resumen

Introducción: Las enfermedades producidas por micobacterias son de gran importancia clínica y epidemiológica presentando el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBc) una morbi-mortalidad mayor que la producida por micobacterias no tuberculosas (MNTB). La identificación tradicional está basada en sus características fenotípicas mediante procesos laboriosos e incapaces en algunos casos de distinguir entre especies. Actualmente, la mayoría de las técnicas utilizadas se basan en métodos moleculares que tienen alta veracidad, pero son complejas y de alto costo. La espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por una matriz asociada a tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) se basa en la comparación del espectro proteico producido con respecto al de una base de datos de referencia. **Objetivo:** Evaluar el rendimiento de MALDI-TOF MS en la identificación de micobacterias comparado con métodos moleculares. **Material y Métodos:** Se analizaron 28 aislados de nueve especies distintas mediante MALDI-TOF MS. **Resultados:** Se identificó correctamente 78,5% de los aislados (22/28), concordante en 100% (9/9) de MNTB de crecimiento rápido, 60% (9/15) en las MNTB de crecimiento lento y 100% (4/4) de MTBc. Todas las especies no identificadas (6/6) pertenecen al complejo *M. avium/intracellulare*. **Conclusión:** MALDI-TOF MS es una metodología rápida, fácil y de bajo costo, con adecuada veracidad respecto a los métodos moleculares.

Palabras clave: micobacterias; espectrometría de masas; identificación bacteriana; MALDI-TOF MS.

Abstract

Background: Mycobacterial diseases are very important both clinically and epidemiologically. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBc) infections confer higher morbidity and mortality rate than non-tuberculous mycobacteria (NTM) infections. Traditional species identification techniques are based on phenotypic characteristics which take a long time by laborious processes and in occasions are no conclusive. Currently, most used techniques are based on molecular methods, which are accurate but are expensive and complex. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a simple, cheap and fast identification method based on comparing protein spectra with a reference database. **Aim:** To assess the performance of MALDI-TOF MS in the identification of MTBc and NTM, compared with molecular methods. **Methods:** For that purpose, 28 isolates of 9 different species were analyzed through MALDI-TOF MS. **Results:** 78.5% (22/28) of isolates were correctly identified, 100% (9/9) of rapidly growers NTM, 60% (9/15) of slow growing NTM and 100% (4/4) of MTBc. Every unidentified isolate (6/6) corresponded to *M. avium/intracellulare* complex. **Conclusion:** MALDI-TOF MS is fast, simple and cheaper than molecular methods and also has adequate accuracy.

Keywords: Mycobacteria; mass spectrometry; bacterial identification; MALDI-TOF MS.

Correspondencia a:

Patricia García Cañete
pgarciacan@uc.cl

Introducción

Las micobacterias son un grupo de microorganismos que causan un amplio espectro de enfermedades, tanto pulmonares como extra-pulmonares^{1,2}. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBc) corresponde a patógenos con una mayor morbi-mortalidad³. Las micobacterias no tuberculosas (MNT) ambientales, generalmente actúan como oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, provocando gran variedad de entidades clínicas como afecciones cutáneas, ganglionares y pulmonares cuya incidencia global ha incrementado^{4,5}. Sin embargo, existen MNT ambientales no relacionadas con enfermedades en humanos y que frecuentemente son contaminantes de muestra clínicas, por lo que es imperativo un método diagnóstico en la identificación de especies para conferir una significancia clínica a un aislado micobacteriano y, por lo tanto, otorgar un tratamiento y pronóstico adecuados.

La identificación tradicional de las micobacterias está basada en sus características bioquímicas y fenotípicas mediante procesos lentos, laboriosos, e incapaces en algunos casos, de distinguir entre especies. Actualmente, la mayoría de las técnicas usadas en la identificación de micobacterias están basadas en métodos moleculares (considerados como el estándar de oro) que tienen una gran veracidad, pero son de alto costo y generalmente están confinados a laboratorios de referencia.

La espectrometría de masas basada en *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) es una espectrometría de ionización suave que se basa en la comparación del espectro proteico producido por una muestra en particular, respecto al de una base de datos de referencia⁶ (Figura 1). MALDI-TOF ha sido utilizado en la identificación de bacterias y levaduras y se ha caracterizado por ser un método barato, rápido y simple que puede ser además implementado en laboratorios de microbiología general⁷⁻¹¹.

Objetivo

Evaluar el rendimiento de MALDI-TOF en la identificación de MTB y MNTB comparado con métodos moleculares.

Materiales y Métodos

Aislados estudiados

Se analizaron 28 aislados de 9 especies distintas (24 MNTB y 4 MTBc), complejo *M. tuberculosis* (n: 4), Complejo *M. avium/intracellulare* (n: 11), complejo *M. abscessus/chelonae* (n: 4), *M. fortuitum* (n: 2), *M. goodii* (n: 2), *M. mucogenicum* (n: 2), *M. neoaurum* (n: 1), *M. kansasii* (n: 1) y *M. terrae* (n: 1). La identificación fue confirmada mediante hibridación reversa con

sondas en tira por el Instituto de Salud Pública de Chile (19 aislados) y por el Colegio de Patólogos Americanos (CAP) (9 aislados).

Extracción de proteínas

Los aislados fueron obtenidos a partir de muestras clínicas o procedentes de control de calidad externo por parte del CAP y cultivadas en medio líquido (*Mycobacteria Growth Indicator Tube MGIT*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) o sólido (medio Lowenstein-Jensen, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) a 37°C. Las muestras fueron procesadas hasta su inactivación, en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2, que cuenta con un gabinete de bioseguridad clase 2B (con salida al exterior), con todo el equipamiento al interior del laboratorio, con exclusión de acceso. En el caso de los cultivos líquidos, con tiempo máximo de 48 horas después de que el equipo automatizado (BD Bactec MGIT, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) los clasificara como positivos, fue extraído 1,5 ml desde el fondo del tubo, volumen que se centrifugó a 14.000 x g por 2 min, reservándose el *pellet* resultante. Por otra parte, en los cultivos sólidos se trabajó directamente con una asada de 1 µL de colonia. La masa bacteriana obtenida tanto de cultivos líquidos como sólidos fue suspendida en 300 µl de agua grado cromatografía (*Merck*, Darmstadt, Germany) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y calentada a 100°C durante 30 min en termo-bloque con el fin de inactivar a los microorganismos¹². Posteriormente, se agregó 900 µl de etanol grado cromatografía al 100% (v/v) y se adicionaron entre 20 a 40 mg de esferas de zirconia/sílica 0,5 mm (*BioSpec Products Inc.*, OK, USA). Los tubos fueron agitados por 1 min en agitador mecánico, traspasándose el contenido por decantación a otro tubo de microcentrífuga evitando transferir las esferas. Inmediatamente, los tubos fueron centrifugados a 14.000 x g por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se centrifugaron nuevamente para eliminar todo el resto del líquido y se dejaron secar a temperatura ambiente al interior del gabinete de bioseguridad por 15 min. Posteriormente, el proceso de extracción de proteínas se realizó con reactivos preparados en el laboratorio. Dependiendo del tamaño, el *pellet* fue disuelto entre 10 y 30 µl de ácido fórmico al 70% (v/v) (*Merck*, Darmstadt, Germany) mediante un agitador mecánico por 20 segundos. Finalmente, se agregó el mismo volumen de acetonitrilo al 100% (v/v) (*Merck*, Darmstadt, Germany) homogenizándose mediante una corta agitación.

Adquisición y procesamiento del espectro MALDI-TOF

Los extractos proteicos fueron centrifugados a 14.000 x g por 2 min y el sobrenadante resultante fue cargado 1 µl por duplicado sobre una placa de incidencia del láser

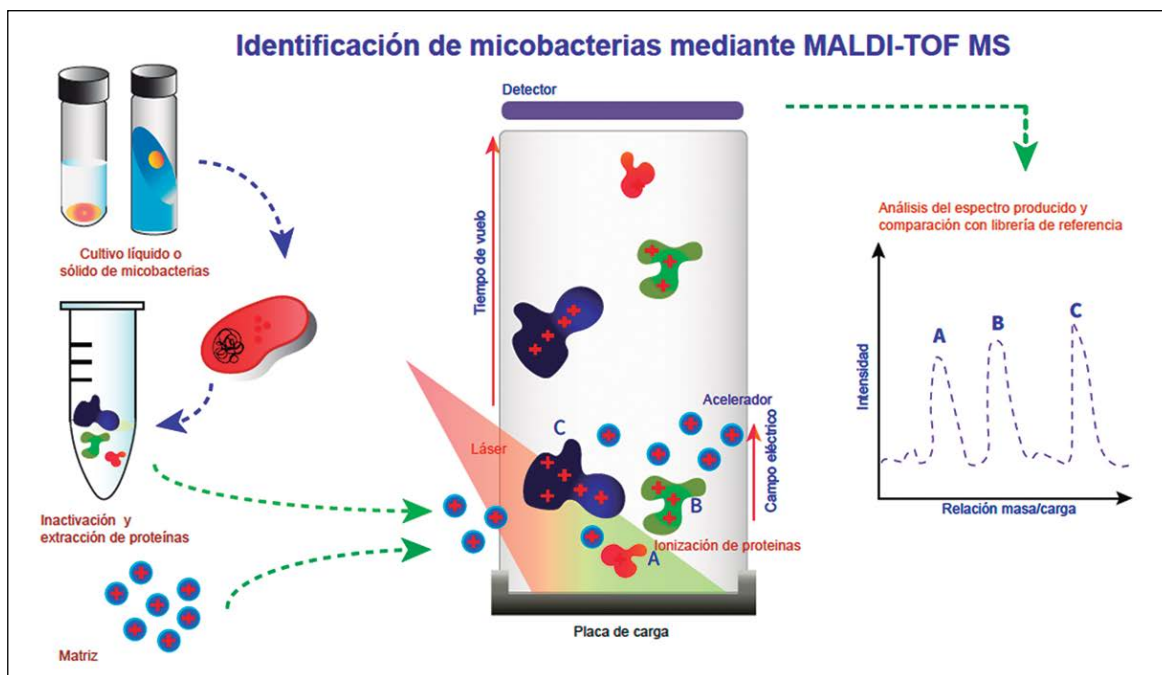


Figura 1. Resumen del proceso analítico para la identificación de micobacterias por MALDI-TOF MS.

Tabla 1. Resumen de resultados

Clasificación	Especie o complejo	Identificación
MNTB Crecimiento rápido	Complejo <i>M. abscessus/chelonae</i>	4/4 (100%) 9/9 (100%)
	Complejo <i>M. fortuitum</i>	2/2 (100%)
	<i>M. mucogenicum</i>	2/2 (100%)
	<i>M. neoaurum</i>	1/1 (100%)
	Crecimiento lento	Complejo <i>M. avium/intracellulare</i>
	<i>M. gordonae</i>	2/2 (100%)
	<i>M. kansasii</i>	1/1 (100%)
	Complejo <i>M. terrae</i>	1/1 (100%)
MTB	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	4/4 (100%)

Identificación global 22/28 78,5%.

MNTB: *Mycobacterium* no tuberculosis. MTB: *Mycobacterium tuberculosis*.

compuesta de acero inoxidable (*Microflex LT/SH benchtop* (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), dejándose secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó sobre cada extracto 1 µl de matriz ionizante, compuesta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). La adquisición del espectro fue hecha con un espectrómetro de masas *Microflex LT/SH benchtop* (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), mediante un láser incidente de nitrógeno de 60 Hz, utilizando un rango de lectura de relación masa/carga (m/z) entre 2,000 y 20,000 Da, con calibración previa mediante un estándar bacteriano (BTS) (Bruker Daltonik, Bremen,

Germany). El espectro resultante fue analizado con el programa *Biotyper 3* versión 3.1, utilizando la biblioteca para micobacterias (*Mycobacteria library 4.0*). Para una identificación a nivel de género y especie se consideró un score de correlación $\geq 1,8$ ^{13,14}.

Resultados

Utilizando el método de MALDI-TOF, se identificó correctamente a nivel de especie 78,5% de los aislados (22/28) (Tabla 1). La identificación fue concordante en 100% (9/9) de las especies de MNTB de crecimiento rápido (complejo *M. abscessus/chelonae* (4/4), *M. fortuitum* (2/2), *M. mucogenicum* (2/2) y *M. neoaurum* (1/1)). En las especies de MNTB de crecimiento lento se obtuvo una identificación correcta en 60% de los aislados (9/15) (complejo *M. avium/intracellulare* (5/11), *M. gordonae* (2/2), *M. kansasii* (1/1) y complejo *M. terrae* (1/1)). En el caso de MTBc, se identificó correctamente a 100% de los aislados (4/4). Las seis especies que no pudieron ser identificadas correspondieron al complejo *M. avium/intracellulare*. En los seis casos el score fue $< 1,4$, por lo que no correspondieron a identificaciones erróneas.

De las identificaciones a partir de cultivo sólido (n: 5), en 100% (5/5) se obtuvo un score $\geq 1,8$ y todas correspondieron a micobacterias de crecimiento rápido. En el caso de los cultivos líquidos se pudo identificar 74% (17/23) de los aislados (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados individuales de aislados de micobacterias analizadas por MALDI-TOF MS

	Identificación molecular	Identificación MALDI-TOF	Score	Nivel de identificación	Tipo de cultivo
1	Complejo <i>M. chelonae/abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	2.011	Especie	Sólido
2	Complejo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	2.213	Especie	Líquido
3	Complejo <i>M. chelonae/abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.947	Especie	Sólido
4	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	2.126	Especie	Líquido
5	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	2.153	Especie	Líquido
6	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1.963	Especie	Líquido
7	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. neoaurum</i>	1.885	Especie	Sólido
8	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	2.289	Especie	Líquido
9	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	2.006	Especie	Líquido
10	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	2.126	Especie	Sólido
11	Complejo <i>M. terrae</i>	Complejo <i>M. terrae</i>	2.282	Especie	Líquido
12	<i>M. intracellulare</i>	Grupo <i>M. chimaera/intracellulare</i>	1.852	Especie	Líquido
13	Complejo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	2.265	Especie	Líquido
14	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	2.189	Especie	Líquido
15	<i>M. avium</i>	No identifica	-	-	Líquido
16	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	1.996	Especie	Líquido
17	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1.956	Especie	Líquido
18	<i>M. intracellulare</i>	Grupo <i>M. chimaera/intracellulare</i>	2.036	Especie	Líquido
19	<i>M. intracellulare</i>	Grupo <i>M. chimaera/intracellulare</i>	1.841	Especie	Líquido
20	<i>M. avium</i>	No identifica	-	-	Líquido
21	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.144	Especie	Líquido
22	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	2.121	Especie	Sólido
23	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1.861	Especie	Líquido
24	<i>M. intracellulare</i>	No identifica	-	-	Líquido
25	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	2.015	Especie	Líquido
26	<i>M. avium</i>	No identifica	-	-	Líquido
27	<i>M. intracellulare</i>	No identifica	-	-	Líquido
28	<i>M. intracellulare</i>	No identifica	-	-	Líquido

Discusión

La diferenciación de especies micobacterianas estrechamente relacionadas es un desafío común. El uso de MALDI-TOF MS en laboratorios de microbiología clínica ha representado un gran avance en la identificación de bacterias y levaduras debido a que es un método rápido (aproximadamente 1 a 2 h en comparación con semanas de identificación fenotípica), exacto y simple^{15,16}, que puede ser implementado en laboratorios de microbiología general; además, el costo de la identificación de MALDI-TOF MS es significativamente menor en comparación con otros métodos, incluidos la secuenciación genómica o técnicas bioquímicas y genera menos desperdicios asimilables o de

riesgo biológico que otros métodos que utilizan muchos materiales desechables¹⁷.

En nuestro estudio, MALDI-TOF MS permitió una identificación correcta en 100% de las especies de micobacterias estudiadas, con excepción de *M. avium/intracellulare* donde la tasa de éxito fue de 45% a nivel de especie, sin resultados discordantes. El menor rendimiento de la metodología para la identificación de *M. avium/intracellulare* se podría explicar debido a que existen puntos críticos que afectan la calidad del espectro obtenido y, en consecuencia la identificación, como es la inactivación previa de los microorganismos con alta probabilidad de desnaturalización proteica, la baja biomasa obtenida para el análisis y la probable interferencia por proteínas proce-

dentos de los medios de cultivo en muestras obtenidas de medios líquidos, así como la falta de actualización de la base de datos de comparación. Estas razones, en conjunto, son aspectos que han sido considerados en el momento de establecer el puntaje de corte para asignar género y especie a las muestras analizadas que, a diferencia de la bacteriología general donde se recomienda un corte de 2 para una identificación nivel de especie, en el caso de micobacterias sea de 1,8¹⁸. En cuanto a limitaciones de este estudio, destaca que no hay evaluación de todas las especies de micobacterias y que las determinaciones no fueron realizadas en duplicado, lo que debe considerarse en el futuro; además no se repitieron las determinaciones con *score* < 1,8 dado que no se disponía de un segundo tubo de cultivo líquido positivo. Sin embargo, es necesario considerar que existen especies de MNTB estrechamente relacionados que históricamente se sabe poseen un espectro proteico cercano al límite de resolución de MALDI-

TOF MS como *M. abscessus*, *M. mucogenicum* y *M. phocaicum*, así como *M. chimaera* y *M. intracellulare*¹⁹, con lo que se puede explicar parcialmente la baja tasa de éxito de identificación de *M. avium/intracellulare*.

A pesar de que el costo inicial del equipo (espectrómetro de masas) es elevado, el gasto calculado en insumos por determinación (sin incluir costo de mano de obra y uso de otros equipos) es de aproximadamente US\$3, mientras que las técnicas moleculares pueden valer siete veces o más.

Es importante destacar que a pesar de no lograr el 100% de la identificación de los aislados analizados, MALDI-TOF MS no entregó resultados erróneos, por lo que se puede considerar como un método confiable de identificación. La simplicidad, rapidez y el bajo costo del método lo hacen recomendable para la identificación de micobacterias en un laboratorio de rutina que cuente con el equipo.

Referencias bibliográficas

- Matteelli A, Sulis G, Capone S, D'Ambrosio L, Migliori G B, Getahun H. Tuberculosis elimination and the challenge of latent tuberculosis. *Presse Med* 2017; 46, e13-e21. doi: 10.1016/j.lpm.2017.01.015.
- Nahid P, Menzies D. Update in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1266-70. doi: 10.1164/rccm.201203-0494UP.
- McBryde E S, Meehan M T, Doan T N, Ragonnet R, Marais B J, Guernier V, et al. The risk of global epidemic replacement with drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Int J Infect Dis* 2017; 56: 14-20. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.031.
- Griffith D E, Aksamit T R. Understanding nontuberculous mycobacterial lung disease: it's been a long time coming. 2016; *F1000Research*; 5: 2797. doi: 10.12688/f1000research.9272.1.
- van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 103-9. doi: 10.1055/s-0033-1333569.
- Fan W.-T, Qin T.-T, Bi R.-R, Kang H.-Q, Ma P, Gu B. Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36: 1005-12. doi: 10.1007/s10096-016-2879-2.
- Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications of MALDI-TOF technology in clinical microbiology. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2015; 63: 43-52. doi: 10.1016/j.patbio.2014.10.002.
- Seng P, Rolain J-M, Fournier P E, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 2010; 5: 1733-54. doi: 10.2217/fmb.10.127.
- Niitsuma K, Saito M, Koshiba S, Kaneko M. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry-using reference strains and clinical isolates of *Mycobacterium*. *Kekkaku* 2014; 89: 555-63. doi: 10.1128/JCM.01959-05.
- Şamlı A, İlki A. Comparison of MALDI-TOF MS, nucleic acid hybridization and the MPT64 immunochromatographic test for the identification of *M. tuberculosis* and nontuberculosis *Mycobacterium* species. *New Microbiol* 2016; 39: 259-63.
- Wattal C, Oberoi J K, Goel N, Raveendran R, Khanna S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36, 807-12. doi: 10.1007/s10096-016-2864-9.
- Chedore P, Th'ng C, Nolan DH, Churchwell GM, Sieffert DE, et al. Method for inactivating and fixing unstained smear preparations of *Mycobacterium tuberculosis* for improved laboratory safety. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4077-80. doi: 10.1128/JCM.40.11.4077-4080.2002.
- Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, Dauphin B, Carbonnelle 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; 48: 4481-6. doi: 10.1128/JCM.01397-10.
- Inactivation I O. Standard Operating Procedure *Mycobacteria Extraction (MycEX) Method MALDI Biotyper*. 3, 3-6 (2014).
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2015; 61, 100. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
- Drake R, Boggs S R, Drake S K. Pathogen identification using mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Mass Spectrom.* 2011; 46, 1223. doi: 10.1002/jms.2008.
- Balada-Llasat M, Kamnoj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2875. doi: 10.1002/jms.2008.
- van Eck K, Faro D, Wattenberg M, de Jong A, Kuipers S, van Ingen J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fails to identify nontuberculous mycobacteria from primary cultures of respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2016; 54, 1915. doi: 10.1128/JCM.00304-16.
- Saleeb P G, Drake S K, Murray P R, Zelazny A M. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017; 49: 790-1790-4 doi: 10.1128/JCM.02135-10