

Aplicación de la técnica MALDI-TOF en la identificación de micobacterias atípicas

Isabel Cristina López Mestanza

Máster en Ciencias de la Salud: Farmacología, Neurobiología y Nutrición



Universidad de Valladolid

Julio 2013

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS:.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS:.....	7
Cepas Bacterianas:.....	7
Condiciones de Crecimiento:	7
Protocolo Base:	7
Variante 1:	8
Variante 2:	9
Variante 3:	9
Lectura de las muestras:.....	9
Criterios de Validación de los resultados MALDI-TOF:	10
Análisis estadístico:	10
RESULTADOS:.....	11
DISCUSIÓN:.....	17
BIBLIOGRAFÍA	21

INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* comprende aproximadamente 100 especies heterogéneas de crecimiento rápido y lento. El número de infecciones causadas por micobacterias se ha incrementado en las últimas décadas [1]. Un número considerable de micobacterias ambientales son responsables de muchas infecciones oportunistas, las cuales son más frecuentes en el individuo inmunodeprimido, tales como: infecciones de piel, linfadenitis, enfermedad pulmonar y enfermedad diseminada. [2]. Los mecanismos de transmisión suelen darse a través de la vía respiratoria y digestiva o mediante inoculación directa en el caso de la piel. En algunos casos puede haber diseminación hematogena.

Actualmente las enfermedades producidas por micobacterias atípicas no son de declaración obligatoria, por lo que los datos sobre su incidencia o prevalencia sólo pueden considerarse como aproximados y en muchas ocasiones lejos de la realidad y estrechamente ligados a las posibilidades de aislamiento e identificación de los laboratorios locales. Sin embargo en los últimos 15 años ha pasado a ser una patología relativamente frecuente, sobre todo condicionada a la aparición de la epidemia de SIDA, lo que ha llevado un incremento paralelo en la investigación y conocimiento de éstas. Las micobacterias se encuentran asociadas también a otros factores de riesgo como el tabaquismo y enfermedades pulmonares subyacentes tales como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, silicosis, tuberculosis residual y bronquiectasias [3].

El tratamiento varía en función de la presentación clínica, la especie de micobacteria responsable y el estado inmunitario del enfermo. La resistencia *in vitro* a la mayoría de los fármacos antituberculosos de primera línea es una de las características más llamativas y el hecho que justificó, hasta hace poco tiempo, la necesidad de tratamientos agresivos con asociaciones de hasta cinco o seis fármacos durante largos períodos de tiempo; así como del uso de cirugía. Por todo ello un diagnóstico precoz es de gran utilidad en este campo. En España se han publicado amplias series donde las micobacterias atípicas constituyen el 14.5% del total de infecciones por micobacterias, siendo asociadas a enfermedad el 0.64% de todos los aislamientos. Dentro de las especies patógenas principales se encuentran *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, etc. [3]

Desde el punto de vista microbiológico, las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide) que no forman esporas ni tienen cápsula. En cambio poseen una pared celular gruesa con un elevado contenido de lípidos que supone el 60% del peso en seco de la bacteria; la cual consta de cuatro capas: la más interna está compuesta por péptidoglicano con moléculas de *N-acetilglucosamina* y ácido

N-glicolilmurámico, que le confiere rigidez y es la responsable de la forma de la bacteria. La segunda capa posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos grasos de cadena larga que forman la tercera capa y la capa más externa, se encuentra constituida por lípidos como el *cord factor* y por mucósidos. En conjunto esta composición de la pared confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad que es responsable de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos y su ácido alcohol resistencia ante determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos [4]

La identificación de las micobacterias mediante métodos fenotípicos convencionales tales como: velocidad y temperatura óptima de crecimiento, producción de pigmentos, morfología de la colonia y pruebas bioquímicas como reducción de nitrato y telurito, catalasa semicuantitativa, hidrólisis de Tween, ureasas, transformación del citrato férrico, test de la niacina, etc., han sido el estándar en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo este tipo de identificación tiene notables limitaciones, ya que numerosas especies no pueden diferenciarse y el crecimiento lento de algunos de estos microorganismos hace que los resultados se retrasen de dos a cuatro semanas tras el aislamiento inicial. Por ello, uno de los mayores retos de los laboratorios de Microbiología consiste en lograr una identificación rápida y precisa de todas las especies de micobacterias [4].

Se han desarrollado nuevas estrategias para optimizar la identificación de las micobacterias, como el análisis cromatográfico (cromatografía de capa fina, cromatografía de líquido – gas y HPLC) que se basan en el estudio de los lípidos. Estas técnicas han proporcionado una excelente vía de identificación y son técnicas rápidas, pero algunas veces son muy complejas y requieren una infraestructura muy cara. Las técnicas basadas en la hibridización del DNA son sensibles, rápidas y simples. Algunas están disponibles en kits comerciales que son capaces de identificar sólo un limitado número de micobacterias. Estas técnicas requieren una amplificación del DNA seguido de un paso de hibridización. El sistema basado en la secuenciación de los genes *hsp65*, *16s rRNA*, *sod* y *ropB*, permite la identificación de todas las micobacterias a nivel de especie pero está limitado a laboratorios especializados, siendo técnicas caras, lentas y que implican operadores cualificados. [5]

En la década de 1990s la identificación bacteriana ha sufrido avances importantes. Uno de ellos, quizá el más significativo por las ventajas que aporta, haya sido la introducción de la espectrometría de masas. Esta técnica, descrita en los años 1970s por John B. Fenn y Koichi Tanaka, lo que les valió el premio Nobel en el año 2002, se ha venido empleando tradicionalmente en el

análisis de proteínas, y en la última década del siglo XX se comienza a utilizar en la identificación bacteriana. En esencia consta de una ionización suave de la muestra y un estudio de los iones formados.

En este método las proteínas desconocidas son hidrolizadas en pequeños péptidos cuyas masas absolutas se determinan mediante un espectrómetro de masas. Este consta de una fuente de iones, donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso, en segundo lugar de un separador de masas o tubo de vuelo que separa los iones formados en función de su relación masa/carga (m/z) y finalmente de un detector de los iones previamente separados. Para conseguir una ionización, la muestra previamente depositada sobre la placa metálica que contiene los biopolímeros a identificar, se pone en disolución con una gran cantidad de una sustancia matriz que debe contener en su estructura anillos aromáticos. La matriz cumple dos roles fundamentales; primero expone las proteínas intracelulares y segundo, facilita la vaporización y la ionización de las proteínas, al evaporarse el disolvente a temperatura ambiente se produce una co-cristalización. La muestra se introduce en una cámara de alto vacío donde la superficie es expuesta a disparos de radiación láser de longitud de onda UV, con lo que las moléculas orgánicas de la matriz absorben una gran cantidad de energía por excitación de electrones produciéndose la sublimación del analito. En la fase gaseosa la estabilización de estas moléculas tiene lugar por adición de protones. En nuestro caso son mayoritariamente proteínas ribosomales de las bacterias generándose fragmentos de proteínas con carga positiva. Seguidamente mediante un electrodo situado a unos pocos milímetros en frente de la placa se crea un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas donde, los iones formados se identifican en función de su relación masa/carga. Para que se produzca una ionización eficiente de la muestra los pulsos del láser deben tener una energía entre 10^6 y 10^7 W/cm² y una duración de 1 a 5 ns. Cada muestra se expone a múltiples disparos a partir de los cuales se dispone de espectros, y, dependiendo de cómo esté calibrado el equipo, los valores de las masas de los iones formados en la técnica MALDI-TOF varían de 2000 a 20000 Da. Se consigue un único espectro, después de determinar la media de los 240 espectros analizados.

La huella de péptidos obtenida es única para cada microorganismo y es comparada con la huella de los microorganismos conocidos presentes en la base de datos; de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo. Las proteínas que conforman la huella peptídica son ribosomales, de membrana y de origen intracelular. El software del fabricante proporciona un listado de microorganismos como identificaciones más probables y una valoración numérica de las mismas en base a una puntuación. Teniendo en cuenta el grado de concordancia que existe entre los 10

microorganismos emitidos en cada muestra analizada, el mismo software también elabora un índice de consistencia que es un dato meramente informativo sobre la calidad de la identificación [6].

La aplicación de esta técnica ha sido de gran beneficio ya que permite la identificación de bacterias aerobias: cocos y bacilos tanto Gram positivos como Gram negativos, anaerobios, micobacterias y hongos. Esta técnica puede aplicarse tanto en muestras directas (sangre y orina) como en colonias crecidas [7].

Los primeros avances en la identificación de micobacterias mediante la técnica MALDI-TOF datan aproximadamente del año 1996, cuando *Claydon et al.* [8] detectaron algunos espectros en una cepa de *M. smegmatis*. Posteriormente, en el año 2006, *Pignone et al.* [9] afirmaron que el MALDI-TOF puede servir como sistema de identificación para micobacterias; para ello analizaron 37 cepas logrando identificar 36 de ellas. A partir de aquí numerosas publicaciones [5,10,11] han tratado de evaluar la utilidad del MALDI-TOF en la identificación de micobacterias. Recientemente *El khechine et al.* (2011) [12] y *Saleeb et al.* (2011) [13] 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.

El protocolo inicial propuesto por el fabricante (Bruker Daltonics) presenta limitaciones en cuanto a la identificación de micobacterias; ya que se basaba en lavados con agua, etanol y, posteriormente, con el uso de acetonitrilo y ácido fórmico. Además, poseía una base de datos limitada. Por ello en el año 2012 realiza una modificación de su protocolo original junto con una ampliación de su base de datos. De esta manera, la identificación de micobacterias y otros organismos ácido alcohol resistentes por MALDI-TOF presenta un cambio particular: los microorganismos deben ser inactivados antes del procesamiento por razones de seguridad personal, calentando la suspensión a 95 °C durante 30 minutos; debiendo usar también un adecuado sistema de lisis de la pared micobacteriana gracias a la agitación mecánica con perlas de vidrio en presencia de ácido fórmico y acetonitrilo. Con todos estos componentes y una buena cantidad de muestra podría asegurarse una apropiada identificación bacteriana en aproximadamente 90 minutos. Este procedimiento es más rápido que los días o semanas requeridos para la identificación fenotípica convencional. Otros grupos de estudio han ensayado protocolos de extracción más sencillos, algunos limitando el paso de inactivación [5,19] y otros analizando diversas formas de lisado con resultado satisfactorio [13].

OBJETIVOS:

La introducción de la identificación microbiana basada en el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, ha permitido mejoras importantes en la rutina de trabajo de microbiología clínica. Entre estas mejoras cabe destacar un ahorro significativo del tiempo necesario para llevar a cabo las identificaciones microbianas a partir de colonias crecidas o muestras directas.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Evaluar la aplicación de la técnica MALDI-TOF en la identificación de micobacterias atípicas.
2. Proponer un nuevo procedimiento para optimizar la identificación de micobacterias mediante la técnica MALDI-TOF.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Cepas Bacterianas:

En el estudio se incluyen un total de 42 cepas de micobacterias atípicas, pertenecientes al cepario del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Estas cepas corresponden a 8 especies diferentes: *M. gordonae* (16 cepas), *M. intracellulare* (8 cepas), *M. avium* (7 cepas), *M. fortuitum* (6 cepas), *M. xenopi* (2 cepas), *M. marinum* (1 cepa), *M. smegmatis* (1 cepa) y *M. kansasii* (1 cepa). Estas cepas identificadas mediante una técnica de PCR con el kit GEnoType Mycobacterium CM/AS (Common Mycobacteria and Additional species) (Hainlifescience GmbH - Germany®) se consideran nuestro *Gold Standard*. Las especies se resiembran en medio Lowestein Jensen (Bio-Rad, Hércules, CA - USA). Todas las cepas fueron trabajadas siguiendo las condiciones de bioseguridad clase 3.

Condiciones de Crecimiento:

Las cepas se incuban 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 mediante MALDI-TOF.

Las cepas se procesan según el protocolo del fabricante (protocolo base) y se realizan tres variantes del mismo.

Protocolo Base:

Se usa el protocolo de procesamiento del fabricante (Bruker Daltonics Germany®) para la identificación de micobacterias a partir de medio sólido, el cual consta de los siguientes pasos:

1. Extraer con un asa de 10 µl una cantidad considerable de micobacterias que se trasladan a un tubo de 1.5 ml, que debe contener 300 µl de agua de calidad HPLC (Panreac). Este paso se realiza en una cabina de bioseguridad.
2. Inactivar por calor durante 30 minutos a 95°C en un termobloque.
3. Agitar intensamente en vórtex y agregar 900 µl de etanol al 97% y agitar nuevamente en vórtex.
4. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta.

5. Agregar 500 μ l de agua, mezclar la solución y agitar intensamente en vórtex.
6. Centrifugar nuevamente a 14000 r.p.m. durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta.
7. Agregar 50 μ l de agua y agitar intensamente en vórtex, posteriormente agregar 1200 μ l de etanol al 97% previamente congelado a -20°C y mezclar con una pipeta.
8. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante. Dejar secar aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente.
9. Según la cantidad de sedimento incorporar de 10 μ l a 50 μ l de acetonitrilo (Fluka analytical Sigma-Aldrich). Agitar intensamente en vórtex y, posteriormente, agregar una cantidad aproximada de 100 mg a 200 mg de perlas de vidrio (1 mm dm Glass beads unwashed_Sigma) y agitar intensamente en vórtex durante 1 minuto. Agregar después ácido fórmico (Fluka analytical Sigma-Aldrich) al 70% en cantidad proporcional al anterior. Volver a agitar enérgicamente en vórtex y centrifugar durante 2 minutos.
10. Depositar 1 μ l de sobrenadante en cada área señalada de la tarjeta metálica. (MSP 96 target polished steel de 96 pocillos Bruker).
11. Secar a temperatura ambiente y después agregar 1 μ l de una solución de matriz (α -cyano-4 hydroxy cinnamic acid-Bruker Daltonics, Germany), dejar secar a temperatura ambiente y proceder a la lectura según las condiciones que se especificarán más adelante. El análisis de cada cepa se realizó por triplicado

De las cepas trabajadas en el protocolo base se seleccionan 11 cepas: 4 cepas de *M. gordonae*, 3 cepas de *M. intracellulare*, 2 cepas de *M. fortuitum*, 1 cepa de *M. xenopi* y 1 cepa de *M. smegmatis*; de las cuales, en 5 de ellas no fue posible su identificación por dicho protocolo. Con estas 11 cepas se procede de tres maneras diferentes:

Variante 1:

En esta variante, después de añadir 1 μ l de sobrenadante por triplicado en la tarjeta metálica (paso 10 del protocolo base), se procede a depositar 1 μ l de ácido fórmico al 100% sobre la muestra antes de añadir la solución de matriz. Tras este paso la muestra será analizada por MALDI-TOF.

Variante 2:

Tras el paso 9 del protocolo base, las cepas fueron puestas a congelación a -80°C durante un tiempo medio de 2 horas. Tras sacarlas del congelador se realiza una agitación intensa en vórtex durante 1 minuto, propiciado con esto la descongelación de las mismas, el incremento de la lisis de la pared y la liberación de proteínas intracelulares. Se centrifugan a 14000 r.p.m. y se deposita en la placa metálica (MSP 96 target polished steel de 96 pocillos Bruker) 1 µl de sobrenadante por triplicado, continuando posteriormente con el análisis.

Variante 3:

Finalmente en la última variante de este ensayo, se depositan por triplicado en la placa metálica (MSP 96 target polished steel de 96 pocillos Bruker) las muestras procesadas según el Protocolo 3, y se añade 1 µl de ácido fórmico al 100 % con el fin de incrementar aún más la extracción de proteínas y obtener una mayor puntuación en la identificación al final del proceso. Una vez seco se añade 1 µl de la solución de matriz, se deja secar nuevamente y se procede a la lectura de las mismas.

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 Test bacteriano standard (*Escherichia coli* DH5 extracto de proteína α, Bruker Daltonic ref. 255343) que será usado 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

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). Mycobacteria library 1.0 (bead method). 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. Para realizar la identificación microbiana la huella del tamaño de péptidos obtenida, que es única para 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]

El software proporciona una lista de microorganismos clasificados según una puntuación. 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 posible.

Criterios de Validación de los resultados MALDI-TOF:

Se estudian los diferentes valores de las puntuaciones de las muestras procesadas según el protocolo del fabricante (Protocolo Base) y se define como válido cuando coincidan a nivel de especie con la identificación proporcionada por el *gold standard*. De esta manera, se propone un nuevo criterio de validación

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 20.0, mediante el cual se efectuó un análisis de correlación intracase (CIC) con las puntuaciones obtenidas mediante el protocolo base y sus tres variantes.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos mediante el procesamiento de las muestras según el protocolo base se muestran en la Tabla 1.

Tabla1: Puntuaciones obtenidas con MALDI-TOF mediante la aplicación del protocolo base

Cepa	Microorganismos	Puntuaciones		
		1 ^{er} Spot	2 ^o Spot	3 ^{er} Spot
1	<i>M. avium</i>	0	0	1.89
2	<i>M. avium</i>	1.923	0	2.043
3	<i>M. avium</i>	1.762	0	1.903
4	<i>M. avium</i>	1.955	0	0
5	<i>M. avium</i>	1.941	0	0
6	<i>M. avium</i>	1.941	0	0
7	<i>M. avium</i>	1.724	1.841	0
8	<i>M. fortuitum</i>	1.715	1.945	1.934
9	<i>M. fortuitum</i>	1.801	1.827	1.79
10	<i>M. fortuitum</i>	1.902	1.903	1.904
11	<i>M. fortuitum</i>	1.801	1.827	1.79
12	<i>M. fortuitum</i>	0	1.996	0
13	<i>M. fortuitum</i>	1.834	1.905	1.869
14	<i>M. gordonae</i>	2.144	2.022	2.083
15	<i>M. gordonae</i>	1.855	1.924	0
16	<i>M. gordonae</i>	1.924	2.012	0
17	<i>M. gordonae</i>	2.051	2.156	0
18	<i>M. gordonae</i>	1.956	1.979	1.996
19	<i>M. gordonae</i>	1.902	1.903	1.904
20	<i>M. gordonae</i>	1.83	1.87	1.823
21	<i>M. gordonae</i>	1.83	1.87	1.823
22	<i>M. gordonae</i>	0	0	2.077
23	<i>M. gordonae</i>	1.908	1.877	0
24	<i>M. gordonae</i>	1.931	1.923	1.703
25	<i>M. gordonae</i>	0	1.845	0
26	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
27	<i>M. gordonae</i>	1.847	1.786	0
28	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
29	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
30	<i>M. intracellulare</i>	2.028	1.966	0
31	<i>M. intracellulare</i>	1.849	1.809	0
32	<i>M. intracellulare</i>	1.715	1.902	2.083
33	<i>M. intracellulare</i>	0	1.844	2.014
34	<i>M. intracellulare</i>	2.104	0	0
35	<i>M. intracellulare</i>	0	0	0
36	<i>M. intracellulare</i>	1.869	2.132	2.184
37	<i>M. intracellulare</i>	2.091	1.87	2.244
38	<i>M. xenopi</i>	1.801	1.876	1.837
39	<i>M. xenopi</i>	0	0	0
40	<i>M. smegmatis</i>	1.982	1.808	2.033
41	<i>M. kansasii</i>	1.931	2.048	1.997
42	<i>M. marinum</i>	2.056	1.983	0

De las 42 cepas procesadas mediante este protocolo, el 76.19% de ellas se identificaron con la lectura del primer spot. Al considerar la lectura de los dos primeros spots se incrementan las identificaciones a un 83.3% y con la lectura de los tres spots se identificaron el 88.10% de las cepas. No se identificaron tres cepas de *M. gordonae*, una cepa de *M. intracellulare* y una cepa de *M. xenopi* (Tabla 1). La mayor puntuación obtenida fue de 2.244 en una cepa de *M. intracellulare*. Mientras que la menor de las puntuaciones logradas fue de 1.703 en una cepa de *M. gordonae* (Tabla 1).

De las 42 cepas procesadas por el protocolo base, se eligieron 11 cepas donde se ensayaron las tres variantes de este protocolo. Cinco de estas 11 cepas no se identificaron con el protocolo base. Al evaluar la lectura del primer spot en el protocolo base se identificaron el 45.45% de las cepas. Con la lectura de los dos primeros spots se identificaron el 54.54% y con la lectura de los tres spots no se encontraron variaciones. La cepa que presentó mayor puntuación en uno de los tres spots realizados fue una cepa de *M. intracellulare* con 2.244 y la de menor puntuación fue una cepa de *M. gordonae* con 1.786 (Tabla 1).

Los resultados obtenidos mediante la variante 1 se muestran en la Tabla 2. De las 11 cepas ensayadas con esta variante el 27.27% fueron identificadas en la lectura del primer spot. Al considerar la lectura de los dos primeros spots se identificaron el 36.36% de las cepas. Con la lectura de los tres spots los porcentajes de identificación obtenidos no mejoraron. De las cepas identificadas, el microorganismo que presentó mejor puntuación fue *M. intracellulare* con 2.367. El microorganismo identificado con menor puntuación fue *M. smegmatis* con 1.617 (Tabla 2).

De las siete cepas no identificadas por esta variante en cinco de ellas la identificación tampoco fue posible mediante el protocolo base. Además otras dos cepas que sí se identificaron por este, no pudieron ser identificadas mediante esta variante (*M. gordonae* y *M. fortuitum*) (Tabla 2).

Tabla 2: Puntuaciones obtenidas con MALDI-TOF mediante el procesamiento con la variante 1

Cepas	Microorganismos	Puntuaciones		
		1 ^{er} Spot	2 ^o Spot	3 ^{er} Spot
39	<i>M. xenopi</i>	0	0	0
12	<i>M. fortuitum</i>	0	0	0
13	<i>M. fortuitum</i>	0	1.731	0
26	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
27	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
28	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
29	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
35	<i>M. intracellulare</i>	0	0	0
36	<i>M. intracellulare</i>	2.164	2.367	2.22
37	<i>M. intracellulare</i>	1.889	0	0
40	<i>M. smegmatis</i>	1.617	0	0

Los resultados obtenidos mediante la variante 2 se muestran en la Tabla 3. De las 11 cepas ensayadas en esta variante, el 72.72% de ellas se identificaron en la lectura del primer spot. Al considerar la lectura de los dos primeros spots se lograron identificar el 90.91%. Cuando se analizan los tres spots, la identificación alcanzada fue del 100% de las cepas. El microorganismo identificado con mejor puntuación fue *M. fortuitum* con 2.372. El de menor puntuación fue *M. gordonae* con 1.703 (Tabla 3).

Las cinco cepas que no se lograron identificar ni con el protocolo base ni con la variante 1 fueron identificadas mediante esta variante; al igual que las otras dos cepas que no se pudieron identificar mediante la variante 1 (Tabla 2)

Tabla 3: Puntuaciones obtenidas con MALDI-TOF mediante el procesamiento con la variante 2

Cepas	Microorganismos	Puntuaciones		
		1 ^{er} Spot	2 ^o Spot	3 ^{er} Spot
39	<i>M. xenopi</i>	0	1.835	0
12	<i>M. fortuitum</i>	2.111	2.172	2.056
13	<i>M. fortuitum</i>	2.333	2.372	2.256
26	<i>M. gordonae</i>	1.8	1.703	1.902
27	<i>M. gordonae</i>	1.937	1.872	0
28	<i>M. gordonae</i>	0	0	1.941
29	<i>M. gordonae</i>	1.798	1.781	1.811
35	<i>M. intracellulare</i>	1.801	1.729	0
36	<i>M. intracellulare</i>	1.931	2.159	2.153
37	<i>M. intracellulare</i>	1.922	2.236	2.36
40	<i>M. smegmatis</i>	0	2.02	2.155

Los resultados obtenidos en la variante 3 se muestran en la Tabla 4. De las 11 cepas ensayadas en esta variante, el 63.64% de ellas se identificaron con la lectura del primer spot. Al considerar la lectura de los dos primeros spots se lograron identificar el 72.73% de las cepas. Cuando se analizan los tres spots, la identificación obtenida no mejoró. El microorganismo que presentó mejor puntuación en uno de los tres spots fue *M. fortuitum* con 2.241. Y el de menor puntuación fue *M. smegmatis* con puntuación de 1.762 (Tabla 4).

De las cinco cepas que no se lograron identificar ni con el protocolo base ni con la variante 1, se identificaron dos cepas de *M. gordonae* mediante esta variante. Las otras dos cepas que la variante 1 no identificó, se identificaron con esta variante: *M. fortuitum* y *M. gordonae* (Tabla 4).

Tabla 4: Puntuaciones obtenidas con MALDI-TOF mediante el procesamiento con la variante 3

Cepas	Microorganismos	Puntuaciones		
		1 ^{er} Spot	2 ^o Spot	3 ^{er} Spot
39	<i>M. xenopi</i>	0	0	0
12	<i>M. fortuitum</i>	2.105	2.141	2.002
13	<i>M. fortuitum</i>	2.206	2.241	2.009
26	<i>M. gordonae</i>	0	0	0
27	<i>M. gordonae</i>	1.765	0	0
28	<i>M. gordonae</i>	0	1.852	2.093
29	<i>M. gordonae</i>	1.764	0	0
35	<i>M. intracellulare</i>	0	0	0
36	<i>M. intracellulare</i>	2.02	2.106	1.8
37	<i>M. intracellulare</i>	2.149	2.194	2.136
40	<i>M. smegmatis</i>	1.762	2.101	0

En la Tabla 5 se expresan las puntuaciones medias de las cepas procesadas según el protocolo base y sus tres variantes. De las cuatro cepas de *M. gordonae* procesadas mediante el protocolo base y sus tres variantes, una cepa se identificó mediante el protocolo base; ninguna cepa por la variante 1, todas las cepas por la variante 2 y en la variante 3 sólo se identificaron tres de ellas. De las tres cepas de *M. intracellulare*, dos de ellas se identificaron tanto por el protocolo base, como por las tres variantes, la cepa restante solo fue identificada por la variante 2. Las dos cepas de *M. fortuitum* fueron identificadas por el protocolo base; sólo una cepa por la variante 1 y las dos por la variante 2 y 3 respectivamente. La única cepa de *Micobacterium xenopi* fue identificada sólo por la variante 2 y la única cepa de *M. smegmatis*, se identificó tanto en el protocolo base como en todas las variantes (Tabla 5).

Tabla 5: Puntuaciones medias de las cepas procesadas con MALDI-TOF mediante el protocolo base y las tres variantes estudiadas.

Cepas	Microorganismos	Protocolo Base	Variante 1	Variante 2	Variante 3
39	<i>M. xenopi</i>	0	0	1.835	0
12	<i>M. fortuitum</i>	1.996	0	2.113	2.083
13	<i>M. fortuitum</i>	1.869	1.731	2.32	2.152
26	<i>M. gordonae</i>	0	0	1.802	0
27	<i>M. gordonae</i>	1.816	0	1.904	1.765
28	<i>M. gordonae</i>	0	0	1.941	1.973
29	<i>M. gordonae</i>	0	0	1.796	1.764
35	<i>M. intracellulare</i>	0	0	1.765	0
36	<i>M. intracellulare</i>	2.062	2.25	2.081	1.975
37	<i>M. intracellulare</i>	2.068	1.889	2.173	2.16
40	<i>M. smegmatis</i>	1.941	1.617	2.088	1.931

Al observar las puntuaciones obtenidas en las muestras procesadas tanto en el protocolo base como en sus tres variantes, hemos notado que todas las identificaciones son coincidentes con el *gold standard*.

Aplicando el coeficiente de correlación intraclase para todas las variables de nuestro estudio obtenemos $r=0.813$, con lo que se demuestra que nuestros datos presentan una buena concordancia con una $p<0.05$.

En la Tabla 6 se resumen los hallazgos del protocolo base y las tres variantes estudiadas.

Tabla 6: Resumen de las cepas procesadas mediante el protocolo base y las tres variantes estudiadas.

<i>Valoraciones</i>	Protocolo Base	Variante 1	Variante 2	Variante 3
% de identificaciones con la Lectura del 1 ^o Spot	45.45%	27.27%	72.72%	63.64%
% de identificaciones con los 2 primeros Spots	54.54%	36.36%	90.91%	72.73%
% de identificaciones con los 3 Spots	54.54%	36.36%	100%	72.73%
Número de cepas sin identificar	5	7	0	3
Mayor puntuación en 1 de los 3 Spots (Cepa)	2.244 (Cepa 36 <i>M. intracellulare</i>)	2.367 (Cepa 36 <i>M. intracellulare</i>)	2.372 (Cepa 13 <i>M. fortuitum</i>)	2.241 (Cepa 13 <i>M. fortuitum</i>)
Menor puntuación en 1 de los 3 Spots (Cepa)	1.786 (Cepa 15 <i>M. gordonae</i>)	1.617 (Cepa 40 <i>M. smegmatis</i>)	1.703 (Cepa 26 <i>M. gordonae</i>)	1.702 (Cepa 40 <i>M. smegmatis</i>)

DISCUSIÓN:

En la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF el criterio de validación que propone el fabricante es muy restrictivo; en este sólo se aceptan las identificaciones a nivel de especie si presentan una puntuación ≥ 2.000 . Diversos estudios [16,17] utilizan puntuaciones menores para realizar la identificación de sus cepas, y así obtener un mayor número de cepas identificadas. En cuanto a esto, *Debel et al.* [18] sostienen que el uso de estos criterios permitiría la identificación correcta de un 26% adicional de microorganismos identificados, con un 2% de errores a nivel de especie frente al 0.7% de errores de identificación mediante los criterios utilizados por el fabricante.

Hemos observado que si seguimos las puntuaciones propuestas por el fabricante, sólo identificaríamos 14 de las 37 cepas que se identificaron mediante el protocolo base; una de las cuatro cepas identificadas mediante la variante 1; cinco de las 11 cepas identificadas con la variante 2 y seis de las ocho cepas identificadas mediante la variante 3. Por el contrario, si analizamos las puntuaciones según lo descrito por *Debel et al.* [18] identificaríamos el 100% de las 37 cepas que presentaron puntuaciones ≥ 1.800 en la lectura de al menos un spot de los tres realizados mediante el protocolo base. Se identificarían dos de las cuatro cepas en la variante 1, 11 de las 11 cepas en la variante 2, y seis de las ocho cepas identificadas mediante la variante 3. En nuestro estudio con puntuaciones ≥ 1.600 se consiguen identificaciones coincidentes tanto en género como en especie con nuestro *gold standard*. Con esto constatamos que bajando las puntuaciones exigidas por el fabricante el porcentaje de cepas identificadas aumenta considerablemente sin errores en la identificación a nivel de especie.

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. A medida que la base de datos se amplía, mejora la capacidad de identificación. En nuestra experiencia, hemos trabajado con la base de datos que posee el equipo sin ninguna modificación. Tal vez por ello no podamos compararnos con los trabajos publicados en la literatura [5,9,12,13] en relación a la aplicabilidad del MALDI-TOF en la identificación de micobacterias; ya que todos ellos han creado su propia base de datos o, en su defecto, han ampliado la base de datos del fabricante. Nosotros no hemos modificado esta variable y en su lugar hemos modificado la técnica de procesamiento para optimizar la liberación de proteínas y obtener de esta manera mejores resultados. Esto es de gran utilidad puesto que la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica trabajan con la base de datos del fabricante.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo es proponer un nuevo procedimiento para optimizar la extracción de proteínas. De todas las cepas analizadas mediante el protocolo base y sus tres variantes, podemos decir que la congelación de la muestra extraída (variante 2) es la que mejores resultados ha proporcionado, identificando el 100% de las cepas ($p < 0.05$); mientras que con la adición final de ácido fórmico a la muestra extraída (variante 1) y la congelación de la muestra extraída con adición final de ácido fórmico (variante 3) sólo se logran identificar el 36.36% y el 72.73% de las cepas respectivamente. Con nuestros resultados respaldamos que la congelación es una técnica efectiva que contribuye a lisar la pared de la micobacteria y mejorar así el protocolo propuesto por el fabricante. La adición de ácido fórmico a la muestra extraída por si sólo es menos efectivo que el protocolo base, por lo que descartamos la variante 1 como procedimiento que optimice la extracción de proteínas en micobacterias. En cuanto a la variante 3 podemos decir que aumenta el porcentaje de identificación en comparación con el protocolo base y la variante 1, pero no logra superar a la variante 2 y además supone una mayor laboriosidad en su realización.

En relación al procesamiento de las muestras algunos estudios [9,19] consideran que la inactivación de las micobacterias no debe realizarse con calor, ya que desnaturaliza las proteínas y por tanto, dificulta la identificación por MALDI-TOF. Por el contrario, hay autores [12,13] que han demostrado que la inactivación con calor mejora el espectro obtenido mediante esta técnica. Al ser el laboratorio un área abierta, se deben minimizar los riesgos de exposición del personal a agentes infecciosos, y nosotros pensamos que la inactivación con calor debe realizarse antes de la manipulación de la muestra para garantizar así la seguridad del personal. *Hetticck et al.* [5] han demostrado que el proceso de extracción de proteínas con trifluoracético y acetonitrilo es suficiente para inactivar las micobacterias, pero nosotros pensamos que la inactivación se debe realizar de forma independiente antes de efectuar cualquier manipulación con estos microorganismos, porque la muestra es sometida a múltiples centrifugaciones con las que se pueden liberar aerosoles y, de una u otra forma, producir contaminaciones accidentales en el laboratorio.

Otros estudios [13,12] proponen el uso de micropistilos o sustancias detergentes para eliminar las agrupaciones que tienden a formar las micobacterias debido a que estas aglomeraciones dificultan la extracción de sus proteínas. Nosotros podemos afirmar que con el procedimiento de pipeteado y la agitación en vórtex se obtienen resultados adecuados, sin necesidad de usar los materiales ya mencionados, que ocasionarían un incremento en el tiempo y complejidad del procedimiento.

Salieb et al. [13] estudiaron 104 cepas de micobacterias. Por cada cepa se realizaron cuatro spots identificándose el 99% de ellas con la lectura del primer

spot pero utilizando su propia base de datos. En nuestro estudio siguiendo el protocolo base sólo identificamos el 45.45% de las cepas con la lectura del primer spot en las 11 muestras procesadas. En cambio cuando utilizamos la variante 2 identificamos el 72.72% de ellas. Los resultados de la variante 2 fueron superiores a los obtenidos mediante las variantes 1 y 3 tras la lectura del primer spot.

Con la lectura de los dos primeros spots los porcentajes de las identificaciones aumentaron en todas las variantes y también en el protocolo base. No obstante, la variante 2 volvió a ser la que obtuvo un mayor incremento con la identificación del 90.91% de las cepas analizadas. Si tenemos en cuenta la lectura de los tres spots es en la variante 2 donde únicamente aumentan los porcentajes de identificación de las cepas, llegando a la identificación del 100% de estas. Con esto demostramos que la congelación de la muestra extraída optimiza los porcentajes de identificación y que para ello es suficiente realizar tres spots por cada cepa aplicando la variante 2.

En relación con el inóculo utilizado para la identificación de micobacterias, numerosos estudios no describen la cuantificación del mismo [9,13,19]. En nuestro caso utilizamos el inóculo propuesto por el fabricante (10 µl de colonia). En nuestro estudio no hemos valorado la posibilidad de que menor cantidad de inóculo que el propuesto por el fabricante pueda dar una identificación adecuada. Sería interesante poder ensayar en nuestras variantes lo anteriormente expuesto. Si fuese posible lograr una identificación correcta a partir de un inóculo de menor cantidad en medio sólido, se obtendrían identificaciones en menor tiempo, ya que para obtener un cultivo adecuado en éste medio es necesario esperar hasta 21 días.

Para el aislamiento de micobacterias en muestras clínicas también se utilizan medios líquidos, los cuales se caracterizan por ser muy enriquecidos y por favorecer el crecimiento de un mayor número de especies de micobacterias de forma más rápida que en el medio sólido. En nuestro laboratorio utilizamos el medio líquido MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube- Becton Dickinson, EE.UU), y el sistema automatizado Bactec MGIT 960. Por lo tanto, creemos que la identificación de micobacterias a partir del MGIT sería muy importante al ser mucho menor el tiempo que se espera para obtener una cantidad adecuada de cultivo en comparación al requerido para el medio sólido. En un futuro podríamos encaminar nuestro estudio a la identificación de micobacterias a partir de este medio líquido y compararnos con los trabajos de *Aurelie lotz et al.* [19], quienes evalúan 82 cepas sembradas en medio líquido (MGIT), logrando identificar solamente el 77% de ellas con la lectura de cinco spots por cada cepa.

Una de las limitaciones del sistema MALDI-TOF es en algunos casos su incapacidad para identificar especies genéticamente relacionadas [13]. En la identificación de micobacterias se podrían presentar problemas al intentar diferenciar los siguientes pares de microorganismos: *M. abscessus* y *M. massiliense*; *M. mucogenicum* y *M. procaicum*; *M. chimaera* y *M. intracellulare*. Sin embargo en nuestra experiencia todas las cepas que hemos estudiado han presentado una identificación coincidente en género y especie con nuestro *gold standard*, incluso las cepas de *M. intracellulare*.

De manera general, podemos observar que en todos los trabajos referidos [5,9,12,13,19] existen variaciones en la obtención de microorganismos (cultivo en medio sólido o líquido), en el número de microorganismos analizados, en la inactivación de los mismos, en la extracción de proteínas, en el número de spots repetidos, en el tipo de matriz utilizada, en la creación de sus propias bases de datos o en la ampliación de las del fabricante, etc. Asimismo podemos decir que la literatura sobre este tema está en continuo cambio y ampliación. En el futuro se espera que todas estas variaciones sean simplificadas y que se pueda trabajar a partir de muestras directas como se hace con los hemocultivos y las orinas [20,21]. También se espera que las bases de datos se amplíen y se encuentren a disposición de todos los usuarios, limitándose además las técnicas de extracción.

Con todo esto hemos demostrado que con la aplicación de la técnica MALDI-TOF es posible lograr la identificación de micobacterias, de manera fiable, en el laboratorio de microbiología clínica. Proponemos aumentar en un paso el protocolo original del fabricante mediante la congelación de la muestra extraída, puesto que el uso del ácido fórmico no ha presentado buenos resultados en ninguna de sus variantes. La superioridad de la variante 2 no sólo se demuestra por un mayor porcentaje de identificación de las cepas analizadas, sino también por las puntuaciones más altas obtenidas mediante este procedimiento.

La congelación de las muestras (variante 2) junto con la disminución del nivel de exigencia del criterio de validación del fabricante y sin ninguna modificación en la base de datos, nos ha permitido obtener el 100% de las identificaciones satisfactorias de las cepas analizadas.

En conclusión, la optimización del procedimiento de extracción de proteínas a través de la congelación, permite la identificación de micobacterias con la base de datos proporcionada por Bruker Daltonics.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Caminero Luna JA. Micobacterias atípicas. *BSCP Can Ped.* 2001; 25 - nº2
3. Valdés F, Cid A. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.* 2004;95(6):331-57.
4. Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios J. Micobacterias. *Protocolo SEIMC;2ªed Madrid(9ª):1-93*
5. 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.
6. 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.
7. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev. Chil. Infectol.* 2012 Jun;29(3):263-272.
8. Claydon MA, Davey SN, Edward-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 1996;14:1584-1586.
9. 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.
10. Shitikov E, Ilina 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Demirev PA, Ho YP, et al. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999; 71(14): 2732-2738.

15. 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.
16. 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.
17. Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol.* 2011 Feb;34(1):2-11.
18. De Bel A, Wybo I, Vandoorlaer K, Rosseel P, Lauwers S, Piérard D. Acceptance criteria for identification results of Gram-negative rods by mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2011 May;60(Pt 5):684-6.
19. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, 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 Dec;48(12):4481-6.
20. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jul;17(7):1007-12.
21. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:4444-4447.