



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Identificación rápida de micobacterias no tuberculosas mediante técnicas proteómicas (MALDI-TOF)



Ramiro López Medrano^{a,*}, Isabel Burgos Asurmendi^b y Octavio Miguel Rivero Lezcano^c

^a Servicio de Microbiología. Complejo Asistencial Universitario de León, León, España

^b Servicio de Anestesiología y Reanimación. Complejo Asistencial Universitario de León, León, España

^c Unidad de Investigación. Complejo Asistencial Universitario de León, León, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de abril de 2021

Aceptado el 3 de junio de 2021

On-line el 12 de julio de 2021

Palabras clave:

MALDI-TOF

Identificación micobacterias no tuberculosas

Proteómica

Keywords:

MALDI-TOF

Nontuberculous mycobacteria identification

Proteomics

R E S U M E N

La identificación proteómica de micobacterias no tuberculosas (MNTs) mediante MALDI-TOF presenta una mayor complejidad debido a la especial composición de su pared celular, que complica la extracción de proteínas. Un total de 106 aislamientos pertenecientes a diferentes especies de MNTs procedentes de muestras clínicas del Complejo Asistencial Universitario de León recogidas durante los años 2019 y 2020 se han identificado por un método proteómico abreviado (MALDI-TOF Biotyper Bruker®) desarrollado en nuestro laboratorio. La identificación se ha comparado con la realizada en paralelo en el Centro de Referencia de Majadahonda. Se analizaron un total de 22 especies diferentes de MNTs obteniendo una concordancia del 91,5%. Las nueve discrepancias detectadas se dieron entre especies pertenecientes al mismo grupo taxonómico. En el 67,92% de las identificaciones el score fue superior a 1,8. En el tiempo de procesamiento se obtuvo un ahorro aproximado de 24 minutos con respecto al recomendado por el fabricante.

© 2021 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

A rapid proteomic system (MALDI-TOF) for nontuberculous-mycobacteria identification

A B S T R A C T

Proteomic techniques relying upon mass spectrometry (MALDI-TOF) applied to nontuberculous mycobacteria (NTM) identification, constitute a difficult goal. Cell wall structure features complicates the protein extraction procedure. A total of 106 isolates belonging to a variety of MNTs species isolated from clinical samples taken at the Complejo Asistencial Universitario de León for a two years period (2019-20) were identified following a simplified method (MALDI-TOF Biotyper Bruker®) developed in our laboratory. The resultant identification was compared to a parallel one ruled on the Centro de Referencia de Majadahonda. A total of 22 different MNTs species were tested, obtaining an agreement of 91,5%. Only 9 minor discrepancies between species belonging to the same taxonomic group of MNTs were detected. The score obtained in the 67.92% of the cases was higher than 1.8. A time-saving of 24 minutes compared to the manufacturer's proceeding was achieved.

© 2021 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Desde hace algunos años la identificación de las micobacterias no tuberculosas (MNTs) se fundamenta en métodos moleculares. El empleo de técnicas proteómicas como la espectrometría de masas (MALDI-TOF) se ha impuesto y ha revolucionado los laboratorios

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: ramirozlm@gmail.com, ramirozlm@yahoo.es (R. López Medrano).

de microbiología. Sin embargo, esta tecnología encuentra especiales dificultades en el campo de la micobacteriología. La especial complejidad de la pared celular micobacteriana y su complejo proteoma¹ convierte la extracción de las proteínas en una tarea nada fácil, en cualquier caso, menos eficiente que en el resto de las bacterias. Recientemente se han descrito hasta 35 proteínas diferentes en el ribosoma micobacteriano, muchas de ellas de mayor tamaño que sus equivalentes en *E. coli* y algunas de ellas específicas de micobacterias². Esta especificidad permite que mediante MALDI-TOF se puedan distinguir los perfiles proteómicos de *M. chimaera* y *M. intracellulare*, ambas especies del mismo grupo taxonómico³.

Otro problema sobreañadido es que las bases de datos (BD) de los sistemas MALDI comercialmente disponibles no disponen de un completo catálogo que cubra todas las especies de MNTs o que los aislamientos más habituales de nuestra área geográfica no estén suficientemente representados. Según muestra Alcaide et al. en su revisión colaborativa, al menos 17 especies raras de MNTs no se encontraban en la versión 4.0 de la BD de Bruker y al menos 12 en la siguiente versión 5.0⁴.

Los sistemas de extracción recomendados por el fabricante (Bruker®) son laboriosos y con resultados variables⁵. Por otra parte, en algunas publicaciones se pone de manifiesto que la identificación basada en espectrometría de masas es igual o superior a algunos sistemas comerciales de hibridación reversa como GenoType⁶. En nuestro laboratorio hemos tratado de simplificar el sistema de extracción de proteínas para tratar de acortar este tedioso proceso de extracción y preparación. Nuestro objetivo ha sido comparar la identificación de MNTs por el método proteómico abreviado (MALDI-TOF Biotyper Bruker®) con la identificación realizada en el Centro de Referencia.

Métodos

Se han recogido datos de 106 aislamientos pertenecientes a diferentes especies de MNTs procedentes de muestras clínicas del Complejo Asistencial Universitario de León durante los años 2019 y 2020. Para la identificación se partió de colonias de cultivos preferentemente jóvenes con buen crecimiento, aisladas en medio de Lowenstein-Jensen comercial y en agar Middlebrook 7H11 fresco (no comercial). Se resuspendieron en 1 mL de agua y se inactivaron en termobloque a 95 °C durante 20 minutos. Se centrifugaron, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron en 20 µL de etanol y vórtex. Tras una breve centrifugación se retiró el etanol y se dejó secar el pellet en un termobloque a 45 °C. A continuación se colocó directamente el pellet sobre el pocillo de la placa con ayuda de un palillo. Se prosiguió añadiendo 1 µL de ácido fórmico al 100% y una vez seco se añadió 1 o 2 µL (dependiendo del pellet) de matriz y se dejó secar. Por último, se procedió a la lectura automática por el método «standard» de MALDI Biotyper Bruker® y después en modo manual. Para la identificación se empleó la base de datos de micobacterias de Bruker (versiones v5.0 y v6.0). Paralelamente las mismas cepas se enviaron al Laboratorio de Micobacterias del Centro de Referencia CNM de Majadahonda, donde se realizó la identificación final por métodos moleculares (PRA HSP-65).

Resultados

Se identificaron un total de 22 especies diferentes de MNTs. De los 106 aislamientos de MNTs estudiados 17 se identificaron como *M. avium*, 15 *M. chimaera-intracellulare*, 14 *M. gordonae*, ocho *M. chelonae*, siete *M. lentiflavum*, siete *M. abscessus*, siete *M. paragordonae*, seis *M. mageritense*, cuatro *M. peregrinum*, cuatro *M.*

Tabla 1
Correlación entre la especie de MNT identificada por técnicas proteómicas (MALDI-TOF) y la identificación genómica por el Centro de Referencia (PRA HSP-65)

Especie de MNT N= 22	N= 106	<1.59	1.6-1.79	>1.80 (%)	Score medio MALDI	Nº discrepancias	ID Centro de Referencia
MNTs DE CRECIMIENTO LENTO		N=72			1.84		
<i>M. avium</i>	17	3	3	11 (64.7)	1,838	1	<i>M.intracellulare II</i>
<i>M. chimaera IC</i>	15	2	3	10 (66.6)	1,961	2	<i>M.intracellulare I</i>
<i>M. lentiflavum</i>	7	1	1	5 (71.4)	1,861	1	<i>M.interjectum</i>
<i>M. gordonae</i>	14	2		12 (85.7)	1,855		
<i>M. celatum</i>	2			2 (100)	2,210		
<i>M. paragordonae</i>	7	2	1	4 (57.1)	1,922	2	<i>M.gordonae III (los 2)</i>
<i>M. kumamotoense</i>	1			1 (100)	2,262		
<i>M. malmoense</i>	2	1		1 (50)	1,545		
<i>M. xenopi</i>	1	1			1,410		
<i>M. kansasii</i>	1			1 (100)	1,980		
<i>M. marinum</i>	1			1 (100)	2,090		
<i>M. paraffinicum</i>	1		1		1,600		
<i>M. vulneris</i>	1				1,408	1	<i>M.intracellulare II</i>
MNTs DE CRECIMIENTO RÁPIDO		N=34			1.94		
<i>M. chelonae</i>	8	1	3	4 (50)	1,743		
<i>M. abscessus</i>	7		2	5 (71.4)	1,905		
<i>M. mageritense</i>	6			6 (100)	2,198		
<i>M. peregrinum</i>	4		2	2 (50)	2,021		
<i>M. elephantis</i>	4			4 (100)	2,028		
<i>M. porcinum</i>	1			1 (100)	2,410		
<i>M. septicum</i>	1			1 (100)	1,877	1	<i>M.peregrinum III</i>
<i>M. salmoniphilum</i>	2		1	1 (50)	1,844	1	<i>M.chelonae I</i>
<i>M. holsaticum</i>	1	1	1		1,460		

MNTs: micobacterias no tuberculosas.

Tabla 2

Comparación de los tiempos de extracción y procesamiento de los aislamientos de micobacterias no tuberculosas (MNTs) según el método recomendado por el fabricante (MycEx Brucker® rev 3) y según el método abreviado

Proceso	Procedimiento abreviado (min.)	Procedimiento fabricante (min.)
Inactivación 90 °C	20	30
Centrifugación	5	5
Agua	-	2
Etanol absoluto	2	2
Centrifugación	2	4 (2x2)
Secado pellet	10	10
Acetonitrilo zirconia	-	4
Ácido fórmico	10*	4
Centrifugación	-	2
Poner muestra y secado	-*	10
Poner matriz y secado	10	10
Total tiempo	59 min.	83 min.

* Incluye colocación en pocillo.

elephantis, dos *M. celatum*, dos *M. salmoniphilum*, dos *M. malmoense* y un sólo aislamiento del resto de las especies, tal y como se indica en la tabla 1. Al comparar la identificación proteómica con la realizada en el Centro de Referencia, 98 de las 106 micobacterias se identificaron correctamente a nivel especie, lo que supone un porcentaje de concordancia del 91.5%. Las nueve discrepancias detectadas se han producido todas ellas en las pertenecientes al mismo grupo taxonómico: cuatro discrepancias entre las del grupo *M. avium-complex*, una entre las del grupo *M. fortuitum complex*, una entre las del grupo *M. chelonae* dos entre *M. gordonae* y *M. paragordonae* y una entre *M. lentiflavum* y *M. interjectum*. Con respecto al score obtenido en el sistema de identificación MALDI, en 72 de las 106 cepas estudiadas (67,92%) el score medio fue superior a 1,8, siendo ligeramente superior en las de rápido crecimiento (1,94) que en las de lento (1,84). Con respecto al método de extracción, el tiempo aproximado de procesamiento se redujo desde 83 minutos (procedimiento MycoEx de Brucker®) a 59 minutos con el procedimiento abreviado (tabla 2).

Discusión

La versión v5.0 de la librería de micobacterias del MALDI Biotyper contiene 912 espectros correspondientes a 159 especies de micobacterias, mientras que la versión v2.12 de la librería RUO de VITEK MS contiene 1.286 espectros que representan a las 45 especies de micobacterias más frecuentes en el ambiente clínico⁷. La última versión de MALDI Biotyper (v6.0) contiene 1.038 espectros correspondientes a 177 especies de micobacterias. A pesar del notable incremento en el número de especies y de aislamientos en la BD Brucker, cuando el número de cepas de una misma especie en la BD es pequeño, existe la posibilidad de que el software nos lleve al taxón más próximo con un score insuficiente. La gran variabilidad geográfica de las MNTs plantea problemas puntuales en la identificación de aquellas especies raras, pero con un predominio local.

El protocolo de extracción recomendado por Sociedad española de Microbiología y Enfermedades Infecciosas y en la mayoría de los casos^{3,6,7} incluye el empleo de acetonitrilo junto con bolas de zirconia. En algunas publicaciones se ha suprimido el paso de acetonitrilo, obteniendo scores similares⁸ por lo que hemos probado eliminando este paso y colocando el pellet directamente sobre el pocillo de la placa (no el sobrenadante) para después añadir la matriz (compuesta al 50% por acetonitrilo). En esta masa del pellet estarían buena parte de las proteínas ribosómicas, como ocurre con bacterias convencionales, lo que explicaría el score obtenido. Según se establece en algunas publicaciones

los protocolos de inactivación empleados para la extracción de ADN en *Mycobacterium tuberculosis*^{9,10}, proponen un tiempo de inactivación de 20 minutos a 95 °C, que aplicados a MNTs, suponen una reducción del tiempo global de procesamiento.

En la identificación de micobacterias se considera de alta confianza un score mayor o igual a 1,8. En nuestro caso el score final obtenido podría ser comparable al de otros autores¹¹ partiendo del pellet del medio líquido, salvando la disparidad en la proporción de especies estudiadas. En nuestra experiencia el empleo de colonias crecidas en medio Middlebrook 7H11 fresco (no comercial) aumenta el score y mejora las probabilidades de identificación con este sistema abreviado de extracción, evitando repetir el proceso, siendo especialmente notable en las de rápido crecimiento. Con cierta frecuencia se realizan identificaciones inesperadas de *M. chelonae* procedentes de abscesos que han seguido idéntico procesamiento que un *E. coli*, obteniendo scores superiores a 2. Esto sugiere que en las de rápido crecimiento podría bastar una extracción de proteínas convencional o al menos no tan exigente. En nuestra experiencia, cuando se parte de medios líquidos, los scores obtenidos con el método estándar o el abreviado son menores o no identifica a la primera, lo que prolonga el tiempo de procesamiento. La ventaja de partir de colonias aisladas en medios sólidos es evitar las posibles mezclas de colonias/especies en medios líquidos, sorteando perfiles proteómicos mixtos y erróneos, conducentes a falsas identificaciones. Para perfeccionar este sistema abreviado de extracción sería necesario procesar un mayor número de especies y de aislamientos de MNTs que contribuya a mejorar su rentabilidad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*. 1999;33:1103–17. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01549.x>.
- Kushwahaa AK, Bhushana S. Unique structural features of the *Mycobacterium* ribosome. *Prog Biophys Mol Biol*. 2020;152:15–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.12.001>.
- Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium* chimera from *Mycobacterium* intracellular by MALDI-TOF MS analysis. *J Med Microbiol*. 2017;66:670–7. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000469>.
- Alcaide F, Amlerov J, Bou G, Ceyssens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:599–603. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.012>.
- Procedimiento MicoEx de Brucker: rev. 3. Brucker Daltonics. 2020.
- Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castiñeiras G, González-Alba JM, Aguilera A, Galán JC, Pérez-del-Molino ML. Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the rpo gene with phylogenetic analysis as a reference method*. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019;37:160–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2018.04.012>.
- Oviano García M, Rodríguez Sánchez B, Caballero Pérez J, Muñoz Bellido JL. Aplicaciones de la Espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. 2019. SEIMC. 2019:20.
- Alcolea-Medina A, Cabezas Fernandez MT, Montiel N, Luzón García MP, Delamo Sevilla C, North N, et al. An improved simple method for the identification of *Mycobacteria* by MALDI-TOF MS. *Scientific Reports*. 2019;9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-56604-7>.
- Doig C, Seagar AL, Watt B, Forbes KJ. The efficacy of the heat killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Pathol*. 2002;55:778–9.
- Bemer-Melchior P, Drugeon HB. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis. *J Clin Microbiol*. 1999;2350–1.
- Fernández-Esgueva M, Fernández-Simona R, Monforte-Ciraca ML, López-Calleja AI, Fortuño B, Viñuelas-Bayon J. Use of MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) for identification of *Mycobacterium* species isolated directly from liquid medium. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021;39:241–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2020.05.011>.