

EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN PROTEICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

Struzka, Eduardo Adrián (1); Fernández Gil, Raúl (1); Prats Soler, Clara (2); Alcaide, Fernando (1)

(1) Servei de Microbiologia. Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. Departament de Patologia i Terapèutica Experimental. Universitat de Barcelona L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona

(2) Departament de Física i Enginyeria Nuclear. Escuela Superior de Agricultura de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. Castelldefels. Barcelona.

eduas22@hotmail.com

Resumen

La espectrometría de masas mediante el sistema MALDI-TOF ha demostrado ser una herramienta sensible, rápida y eficaz en la identificación de las bacterias convencionales. Las micobacterias, en cambio, necesitan un tratamiento previo. El objetivo de este estudio fue evaluar tres protocolos de extracción proteica para la identificación micobacteriana con el MALDI-TOF: el protocolo oficial de Bruker Daltonics (A) y dos protocolos propuestos (congelación "B" y congelación-centrifugación "C"). Se analizaron 66 cepas micobacterianas identificadas previamente con métodos fenotípicos, inmunocromatográficos y genotípicos. Los resultados de identificación de especie del MALDI-TOF se dan como: Fiable (IEF), Probable (IEP), No Fiable (INF) y Negativa (IN). Los mejores resultados se obtuvieron con el protocolo B, aumentando un 14% la IEF y un 28% la IEP respecto al protocolo oficial (A). En conclusión, en la identificación de las micobacterias mediante el MALDI-TOF, aún es necesario optimizar el protocolo de extracción de proteínas para obtener una rentabilidad aceptable.

Palabras Claves: MALDI-TOF, Identificación de Micobacterias, Espectrometría de masas

Abstract

Mass spectrometry by MALDI-TOF system has proven to be a sensitive, rapid and effective tool of identification of conventional bacteria. Mycobacteria, however, need pretreatment. The objective of this study was to evaluate three protein extraction protocols for mycobacterial identification with MALDI-TOF: Bruker Daltonics protocol (A) and two proposed protocols (freezing "B" and freeze-centrifuge "C"). We analyzed 66 mycobacterial strains previously identified by phenotypic, immunochromatographic and genotypic methods. The results of species identification of MALDI-TOF are given as: Reliable (IEF) Probable (IEP), Unreliable (INF) and Negative (IN). The best results were obtained with the B protocol, increasing the 14% of IEF and 28% of IEP with regard to the official protocol (A). In conclusion, in the mycobacterial identification by MALDI-TOF, you still need to optimize protein extraction protocol to obtain acceptable profitability.

Key Words: MALDI-TOF, Identification of Mycobacteria, Mass spectrometry

Introducción

Las micobacterias (orden *Actinomycetales*; familia *Mycobacteriaceae*; género *Mycobacterium*) constituyen un grupo variado de microorganismos causantes de importantes enfermedades infecciosas en el ser humano (tuberculosis, lepra y micobacteriosis). La identificación microbiológica convencional es lenta, laboriosa y poco discriminativa entre múltiples especies. Los métodos moleculares comerciales son los más utilizados, pero presentan ciertas limitaciones. Estos tienen un elevado coste y no identifican todas las especies descritas en la actualidad.

En los últimos años la espectrometría de masas me-

dante el sistema MALDI-TOF ha permitido obtener la identificación de las bacterias convencionales de una manera sensible, rápida y eficaz con el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias a través de la creación de un perfil proteico que es específico para cada especie. Su funcionamiento se basa en la incisión de un haz de iones sobre una muestra con una solución matriz que expone las proteínas y facilita su ionización. Este proceso se realiza en una cámara de vacío donde los iones viajan a través de un campo eléctrico y los clasifica según su relación masa/carga.

Las micobacterias presentan dificultad a la hora de ser

Struzka, Eduardo Adrián et al.
Evaluación de tres protocolos de extracción proteica...

identificadas con el sistema MALDI-TOF. Esto se explica fundamentalmente por la complejidad de su pared, compuesta por componentes lipídicos a concentraciones elevadas, siendo necesario realizar un tratamiento previo para lograr un perfil proteico adecuado (1,2). Aunque, hasta la actualidad existen algunos estudios que han evaluado la utilización del MALDI-TOF en la identificación micobacteriana, aún no se ha consensuado un protocolo idóneo de extracción proteica.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar tres protocolos diferentes de extracción proteica para la identificación de las diferentes especies del género *Mycobacterium* mediante el sistema MALDI-TOF.

Material y Métodos

Cepas, periodo y ámbito de estudio

Se analizaron 66 aislamientos clínicos de micobacterias (2005-2014): 28 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y 38 micobacterias no tuberculosas (MNT), de las cuales 17 fueron de crecimiento rápido (4 *Mycobacterium abscesus*, 2 *Mycobacterium chelonae*, 9 *Mycobacterium fortuitum* y 2 *Mycobacterium mucogenicum*) y 21 de crecimiento lento (1 *Mycobacterium arupense*, 1 *Mycobacterium avium*, 1 *Mycobacterium canariense*, 2 *Mycobacterium gastri*, 1 *Mycobacterium gordonae*, 8 *Mycobacterium intracellulare*, 3 *Mycobacterium kansasii*, 1 *Mycobacterium lentiflavum*, 1 *Mycobacterium madagascariense* y 2 *Mycobacterium xenopi*). El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Micobacterias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge. Las cepas fueron identificadas con métodos fenotípicos, inmunocromatográficos (detección del antígeno MPT64 para MTBC; SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid® test, Standard Diagnostics, Yongin, Korea) y genotípicos (PCR-hibridación reversa; GenoType® CM/AS/MTBC, HainLifescience, Nehren, Germany). Como método de referencia para las MNT se utilizó la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, cuando los resultados de identificación fueron discrepantes. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis complex* solo se identificó a nivel del complejo.

Tratamiento de los aislamientos

Los protocolos utilizados para la identificación de las micobacterias son tratamientos previos, que no son necesarios en otro tipo de bacterias convencionales. Se aplicaron tres protocolos correlativos de extracción proteica (A, B y C), partiendo de una misma cepa inactivada en un vial de 1,5ml con 300µl de agua HPLC. La inactivación se llevó a cabo en un termobloque durante 30min a 95°C, que es preciso para poder trabajar fuera de la zona de bioseguridad de nivel III. El protocolo A fue la versión oficial de Bruker Daltonics

(v.3.0) a cuyo extracto inactivado se le añadió 900µl de etanol y se centrifugó 2min a 14.000rpm. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento. A continuación, se añadieron perlas de sílice (0,5mm), para promover la ruptura de la pared celular, hasta la mitad del volumen del sedimento seco y se dispensó 20µl de acetonitrilo. Seguidamente se agitó durante 3min con el homogenizador MICKLE (Fig.1). Después se agregó 20µl de ácido fórmico al 70% (v/v) y se agitó 3min nuevamente con el MICKLE. Finalmente, se centrifugó 2min a 14.000rpm, utilizándose el sobrenadante para el análisis en el MALDI-TOF.

Los protocolos propuestos en el estudio (B y C) fueron correlativos. En el protocolo B se empleó el extracto obtenido anteriormente en el protocolo A y se congeló (-20°C) durante 1h. Posteriormente, se agitó durante 2min con el MICKLE, utilizándose la "mezcla" para el análisis en el MALDI-TOF. En el protocolo C se aprovechó la mezcla obtenida en el protocolo B y se centrifugó 2min a 14.000rpm, utilizándose el "sobrenadante" para el análisis posterior.

Tras los diversos protocolos de extracción proteica, se llevó a cabo el análisis en el MALDI-TOF mediante la mezcla de la misma cantidad (1µl) de cepa procesada y de solución matriz (α -Ciano-4-acido-hydroxycinnámico, 50% acetonitrilo, 47,5% agua específica para espectrometría y 2,5% trifluoroacético), al igual que en identificación de las bacterias convencionales. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Instrumentación, base de datos e interpretación de los resultados

El MALDI-TOF utilizado fue un Microflex LT (Fig.2) con los programas o software FlexControl (Fig.3) y el MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) con Mycobacteria Library 2.0 (que incluye 131 especies de micobacterias). La identificación se obtiene por una puntuación numérica o score, el cual es un valor logarítmico logrado al comparar el espectro proteico obtenido con la base de datos. Los resultados de identificación de especie los da en cuatro niveles de identificación como: Fiable (IEF; $score \geq 2$), Probable (IEP; $score 1,7-1,99$), No Fiable (INF; $score > 0$ y $< 1,7$) y Negativo (IN; $score 0$). Cuando los resultados de identificación del MALDI-TOF de MNT discreparon con los obtenidos con la identificación rutinaria (PCR-hibridación reversa) se procedió a la secuenciación parcial del 16S rRNA.

Resultados y Discusiones

De las 66 cepas procesadas con los 3 protocolos de extracción proteica mediante el espectrómetro de masas se observó (Tabla1) que, con el protocolo A el MALDI-TOF detectó proteínas en 21 (32%) cepas, mientras que con el protocolo B detectó 51 (77%) y con el protocolo C detectó 32 (48%).

Struzka, Eduardo Adrián et al.
Evaluación de tres protocolos de extracción proteica...

Tabla 1. Resultados de los 3 protocolos de extracción proteica con los diferentes niveles de identificación (MALDI BioTyper 3.1 Mycobactery Library 2.0).

Protocolo	Identificaciones				N total
	IN[0]	INF[>0-1.69]	IEP[1,7-1,9]	IEF[≥ 2]	
A	45 (68%)	14 (21%)	1 (2%)	6 (9%)	66
B	15 (23%)	16 (24%)	20 (30%)	15 (23%)	66
C	34 (52%)	14 (21%)	8 (12%)	10 (15%)	66

IN: Identificación negativa; INF: identificación no fiable; IEP: Identificación de especie probable; y IEF: identificación de especie fiable. Entre [] se expresa la puntuación numérica o score obtenido con el MALDI-TOF.

De esta forma, los protocolos propuestos en este estudio (B y C), que incluyen una posterior congelación, han aumentado el número de identificaciones obtenidas con el MALDI-TOF en gran parte debido al incremento en la detección de proteínas.

De los dos protocolos de extracción propuestos, el B ha demostrado ser el más eficaz en la identificación de especie fiable y probable debido a la elevada tasa de detección proteica. Así muestra un incremento en la identificación fiable de especie de un 14% respecto al protocolo A y de un 8% respecto al protocolo C. Y además, la identificación probable de especie aumentó un 28% y un 18% en comparación con los protocolos A y C, respectivamente.

En todos los casos, sin discriminar el protocolo de extracción proteica utilizado, las cepas de MTBC y las MNT de crecimiento lento fueron identificadas por el MALDI-TOF como identificaciones de especie fiables y probables correctas, sin presentar discrepancia alguna con los métodos de rutina. En cambio, entre las MNT de crecimiento rápido, 3 identificaciones del grupo *Mycobacterium fortuitum* con la espectrometría de masas (2 con IEF y 1 con IEP) discreparon con las obtenidas con los métodos rutinarios de identificación. Al realizar el método de referencia (secuenciación del 16SrRNA), en dos aislamientos el MALDI-TOF dio un resultado correcto (*Mycobacterium setense* y *Mycobacterium magaritense*) que correspondieron con los 2 IEF. Por lo tanto, con las puntuaciones o *scores* ≥ 2 (3), se obtuvo una especificidad del 100% en la identificación de especie, no así cuando los *scores* fueron inferiores.

A parte de los problemas de extracción proteica (4), otras posibles causas de los deficientes perfiles proteicos obtenidos (absorbancia de 400 aproximadamente), podrían ser: en primer lugar, que el parámetro establecido de 600 absorbancias fuera algo elevado para la identificación de las micobacterias; y en segundo lugar, que la concentración entre el analito y la matriz utilizada (1:1), así como la composición de la propia matriz, no sea la más adecuada para estas bacterias. Por otro lado, el insuficiente índice de identificación micobacteriana (a nivel de especie) obtenido con el MALDI-TOF, podría residir también en las limitaciones de la base de datos disponible de las diversas especies micobacterianas (5).



Figura 1. Homogenizador MICLEKE.



Figura 2. El MALDI-TOF Microflex LT (BrukerDaltonics) realizando una detección de proteínas.

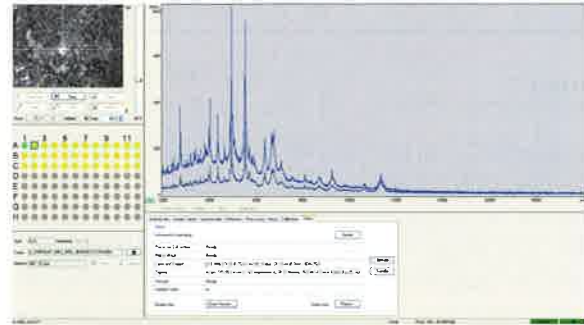


Figura 3. Imagen del programa FlexControl. En el lado izquierdo se observan los disparos del láser sobre la muestra, y en el derecho se observan los espectros. Los picos más elevados representan la muestra que está analizando y la inferior el espectro semejante de la base de datos.

Conclusión

En conclusión, el MALDI-TOF ha mostrado ser una técnica de identificación micobacteriana bastante específica, sencilla y económica, si bien requiere una optimización de los métodos de extracción proteica previos a su análisis proteómico que mejore su sensibilidad, así como una actualización y adecuación de la base de datos.

Agradecimientos

El presente artículo se ha basado en el trabajo final de grado de Ingeniería de Sistemas Biológicos de la Universitat Politècnica de Catalunya en el laboratorio de micobacterias del Hospital Universitario de Bellvitge.

Bibliografía

1. Saleeb P.G, Drake S.K, Murray P.R, and Zelazny A.M. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2011; 49(5): 1790-1794.
2. ElKhéchine 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).
3. Bessède E, Angla-gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Ménard A, Mégraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization BIOTYPER: experience in the routine of a University hospital. J. Clin. Microbiol. Infect. 2010; 17(4): 533-538.
4. Tudó G, Monté MR, Vergara A, López A, Hurtado JC, Ferrer-Navarro M, Vila J, Gonzalez-Martin J. Implementation of MALDI-TOF MS technology for the identification of clinical isolates of Mycobacterium spp. in mycobacterial diagnosis. J. Clin. Microbiol. 2015.
5. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the BrukerBiotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified proteins extraction protocols. J. Clin. Microbiol. 2014; 52(1): 130-138.