



INFORME BREVE

Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias

Mariela S. Zárate^{a,*}, Vanesa Romano^b, Jimena Nievas^a y Jorgelina Smayevsky^a

^a Laboratorio de Bacteriología, Micología y Parasitología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina

^b Laboratorio de Virología, Laboratorio de Bacteriología, Micología y Parasitología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina

Recibido el 12 de febrero de 2014; aceptado el 22 de mayo de 2014

PALABRAS CLAVE

MALDI-TOF MS;
Bacterias anaerobias;
Identificación

Resumen

El análisis de espectrometría de masas mediante la metodología hoy conocida como MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos en microbiología clínica. No obstante, los datos relativos a algunos grupos de microorganismos son todavía controvertidos. El objetivo del presente estudio fue determinar la utilidad del MALDI-TOF MS para la identificación de aislamientos clínicos de bacterias anaerobias. Se analizaron 106 aislamientos de bacterias anaerobias mediante MALDI-TOF MS y por pruebas bioquímicas convencionales. En aquellos casos en los que la identificación por metodología convencional no era aplicable o frente a una discordancia de resultados entre las metodologías citadas, se realizó la secuenciación del gen 16S del ARNr. El método convencional y el MALDI-TOF MS coincidieron a nivel de género y especie en un 95,3 % de los casos considerando la totalidad de los aislamientos estudiados. Al considerar solo el conjunto de los bacilos gram negativos, la coincidencia fue del 91,4 %; entre los bacilos gram positivos, fue del 100 %; los 8 aislados de cocos gram positivos estudiados coincidieron y también hubo coincidencia en el único coco gram negativo incluido. Los datos obtenidos en este estudio demuestran que el MALDI-TOF MS ofrece la posibilidad de llegar a una adecuada identificación de bacterias anaerobias.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: szarate@gmail.com (M.S. Zárate).

KEYWORDS

MALDI-TOF MS;
Anaerobic bacteria;
Identification

Utility of MALDI-TOF MS for the identification of anaerobic bacteria**Abstract**

The analysis by MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) has become a reference method for the identification of microorganisms in Clinical Microbiology. However, data on some groups of microorganisms are still controversial. The aim of this study is to determine the utility of MALDI-TOF MS for the identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. One-hundred and six anaerobic bacteria isolates were analyzed by MALDI-TOF MS and by conventional biochemical tests. In those cases where identification by conventional methodology was not applicable or in the face of discordance between sequencing methodologies, 16 S rRNA gene sequence analysis was performed. The conventional method and MALDI-TOF MS agreed at genus and species level by 95.3%. Concordance in gram-negative bacilli was 91.4% and 100% among gram-positive bacilli; there was also concordance both in the 8 isolates studied in gram-positive cocci and in the single gram-negative cocci included. The data obtained in this study demonstrate that MALDI-TOF MS offers the possibility of adequate identification of anaerobic bacteria.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* en español: desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo; MALDI-TOF MS, Bruker®) se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos en los servicios de microbiología clínica. Dicha metodología permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias; este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie¹. No obstante, los datos publicados en relación con ciertos grupos de microorganismos son todavía controvertidos⁸. El objetivo del presente estudio fue determinar la utilidad de la metodología de MALDI-TOF MS para la identificación de aislamientos clínicos de bacterias anaerobias.

Se analizaron 104 aislamientos clínicos de bacterias anaerobias: 58 bacilos gram negativos (BGN), 37 bacilos gram positivos (BGP), 8 cocos gram positivos (CGP), 1 coco gram negativo (CGN) y 2 cepas control ATCC (tabla 1).

Dichos aislados fueron cultivados en agar sangre Brucella (Britania, Argentina) suplementado con hemina (5 µg/ml) y vitamina K1 (1 µg/ml) e incubados en jarras de anaerobiosis por un período de 48 h.

Los aislados fueron identificados mediante MALDI-TOF MS y por pruebas bioquímicas convencionales según Murray *et al.*^{9,13,14,16}, también se emplearon sistemas miniaturizados API [sistema API 20 A, Rapid ID 32 A (bioMérieux®, Marcy, l'Étoile, Francia)].

En aquellos casos en los que la metodología convencional no permitió la identificación (dada su insuficiente capacidad de resolución en la identificación de algunas bacterias anaerobias), o frente a discordancia de resultados entre metodologías, se realizó la secuenciación del gen 16S ARNr.

La identificación mediante MALDI-TOF MS se realizó sobre una colonia aislada, que fue depositada por duplicado sobre una tarjeta de análisis (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, los

pocillos fueron cubiertos con 1 µl de matriz [solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA; Bruker Daltonics) en 50 % de acetonitrilo y 2,5 % de ácido trifluoroacético]. Se utilizó un equipo Microflex LT y un software FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics). Los parámetros fueron ajustados según recomendaciones del fabricante⁷.

Para la calibración del espectrómetro se utilizó un estándar consistente en el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas adicionales (BTS; Bruker Daltonics®). El BTS se utilizó también como control positivo para validar la corrida. Los espectros fueron analizados por el software MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) considerando el tiempo requerido por las proteínas para llegar al detector, lo que depende de la relación masa/carga de estas. El tiempo de lectura e interpretación aproximado es de 1 minuto por aislado. Los espectros obtenidos son posteriormente comparados con los que aporta la base de datos, lo cual permite la asignación de un puntaje. Los criterios de identificación señalados por el fabricante son los siguientes: puntaje (*score*) > 2,000 indica identificación a nivel de especie, puntaje entre 1,700 y 1,999 indica identificación confiable solo a nivel de género, mientras que valores < 1,700 no permiten identificación. Se consideraron válidos los resultados con *scores* ≥ 2.

En 10 aislados se realizó la extracción del ADN genómico bacteriano a partir de un cultivo puro utilizando el kit QIA-amp DNA Mini® (Qiagen); se amplificó una región de 500 pb del gen que codifica el ARNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon los cebadores 5'-TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3' y 5'-TACCGCGCT-GCTGGCAC-3'^{3,11}. Los productos de amplificación fueron visualizados tras su separación por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio, y luego cortados y purificados utilizando PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen®). En la secuenciación se emplearon los cebadores utilizados para la amplificación, el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing y el secuenciador automático ABI

Tabla 1 Identificación de bacterias anaerobias por metodología convencional, por MALDI-TOF MS y por secuenciación de 16S ARNr

Identificación convencional	MALDI-TOF MS	Identificación 16S ARNr
Bacilos gram negativos (total de aislamientos estudiados: 58)		
<i>Bacteroides fragilis</i> (33)	<i>Bacteroides fragilis</i> (33)	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (2)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (2)	
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	
<i>Bacteroides caccae</i> (1)	<i>Bacteroides caccae</i> (1)	
<i>Bacteroides ovatus</i> (1)	<i>Bacteroides ovatus</i> (1)	
<i>Bacteroides</i> sp. (1)	<i>Bacteroides intestinalis</i> (1)	<i>Bacteroides intestinalis</i> (1)
<i>Bacteroides nordii</i> (1)	<i>Bacteroides nordii</i> (1)	
<i>Prevotella bucae</i> (3)	<i>Prevotella bucae</i> (3)	
<i>Prevotella nigrescens</i> (3)	<i>Prevotella nigrescens</i> (3)	<i>Prevotella nigrescens</i> (1) ^a
<i>Prevotella denticola</i> (1)	<i>Prevotella denticola</i> (1)	
<i>Prevotella corporis</i> (1)	<i>Prevotella corporis</i> (1)	
<i>Prevotellae intermedia</i> (1)	<i>Prevotella intermedia</i> (1)	
<i>Prevotella pallens</i> (1)	<i>Prevotella pallens</i> (1)	
<i>Prevotella oris</i> (1)	<i>Prevotella oris</i> (1)	
<i>Fusobacterium varium</i> (2)	<i>Fusobacterium varium</i> (2)	
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (3)	NI	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (3)
<i>Porphyromonas uneonis</i> (2)	NI	<i>Porphyromonas uneonis</i> (2)
Bacilos gram positivos (total de aislamientos estudiados: 37)		
<i>Clostridium perfringens</i> (15)	<i>Clostridium perfringens</i> (15)	
<i>Clostridium difficile</i> (10)	<i>Clostridium difficile</i> (10)	
<i>Clostridium paraputrificum</i> (1)	<i>Clostridium paraputrificum</i> (1)	
<i>Clostridium sordellii</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> (1)	
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)	
<i>Propionibacterium acnes</i> (5)	<i>Propionibacterium acnes</i> (5)	
<i>Propionibacterium avidum</i> (1)	<i>Propionibacterium avidum</i> (1)	
<i>Actinomyces meyeri</i> (1)	<i>Actinomyces meyeri</i> (1)	
<i>Actinomyces</i> sp. (1)	<i>Actinomyces oris</i> (1)	<i>Actinomyces oris</i> (1)
Bacilo gram positivo (1)	<i>Alloscardovia omnicoles</i> (1)	<i>Alloscardovia omnicoles</i> (1)
Cocos gram positivos (total de aislamientos estudiados: 8)		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (4)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (4)	
<i>Finegoldia magna</i> (3)	<i>Finegoldia magna</i> (3)	
<i>Anaerococcus prevotti</i> (1)	<i>Anaerococcus prevotti</i> (1)	
Cocos gram negativos (total de aislamientos estudiados: 1)		
<i>Veillonella</i> sp. (1)	<i>Veillonella atypica</i> (1)	<i>Veillonella atypica</i> (1)
Cepas control ATCC		
<i>Bacteroides fragilis</i> 25285 (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> 25285 (1)	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 29741 (1)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 29741 (1)	

NI: No identificado (score < 1,7).

^aSe realiza la secuenciación, dada la baja resolución en la identificación bioquímica convencional.

PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando BLASTN con la base de datos 16S ribosomal RNA sequences [National Center for Biotechnology Information

(NCBI)] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados fueron interpretados según lo descrito en el documento CLSI MM18-A⁴.

El método convencional y el MALDI-TOF MS coincidieron a nivel de género y especie en un 95,3 % de los aislamientos

estudiados. El porcentaje de coincidencia fue de 91,4 % entre los BGN y de 100 % en el grupo de los BGP. También coincidieron en la identificación por ambos métodos los 8 CGP estudiados y el único CGN incluido (tabla 2). En todos los aislados se obtuvieron *scores* > 2.

Los 5 aislados no identificados por el sistema MALDI-TOF MS, que pertenecían al género *Porphyromonas* spp., no arrojaron espectros que coincidieran con los de la base de datos (*scores* < 1,7) tras aplicar el protocolo de extracción de proteínas según las recomendaciones del fabricante⁸. Por tal motivo, estos 5 aislamientos fueron posteriormente secuenciados. Tres de ellos fueron identificados como *Porphyromonas asaccharolytica* (KJ396273, KJ396274, KJ396275), los otros dos como *Porphyromonas uneonis* (KJ396271, KJ396272). También los aislados de *Alloscardovia omnicoles* (JK361505), *Actinomyces oris* (KJ361506), *Bacteroides intestinalis* (KJ411879), *Veillonella atypica* (KJ411878) y *Prevotella nigrescens* (KJ531955) fueron secuenciados, dada la dificultad que presentan estos géneros para su identificación con pruebas bioquímicas convencionales.

La identificación tradicional de bacterias anaerobias en el laboratorio de microbiología se basa en el uso de pruebas fenotípicas que generalmente requieren largos períodos de incubación. La espectrometría de masas utilizada en el campo de la microbiología básica no se había adaptado para su uso en el laboratorio clínico-microbiológico. Sin embargo, a partir del año 2008, publicaciones independientes comunican el uso de esta tecnología para la identificación de bacilos gram negativos aislados de pacientes^{5,14}. Desde entonces, numerosas publicaciones dan cuenta de su utilidad en el laboratorio clínico^{5,3}. En 2012, Vega-Castaño *et al.*¹⁵ publican el hallazgo de coincidencia en la identificación de bacterias anaerobias entre el método convencional y el MALDI-TOF MS a nivel de especie en el 60,9 % de los casos, y solo a nivel de género en el 20,3 %. De las 48 identificaciones discrepantes referidas por dichos autores, la secuenciación respaldó la identificación por MALDI-TOF MS a nivel de especie en 32 casos (66,7 %) y a nivel de género en 8 casos (16,7 %). Dicha secuenciación apoyó la identificación bioquímica a nivel de especie solamente en 2 casos (4,2 %), y a nivel de género, en 26 casos (54,2 %). En los 8 casos en los que el MALDI-TOF MS no permitió identificación alguna o cuando la identificación obtenida fue refutada a nivel de género por la secuenciación del ARNr 16S, la especie a la

que en realidad correspondía el microorganismo no se encontraba incorporada a la base de datos BioTyper II.

En nuestro país, Callejo *et al.*³ han comunicado la identificación de microorganismos anaerobios por MALDI-TOF MS y han establecido como metodología de referencia la secuenciación del gen 16S ARNr, con el que obtuvieron valores de coincidencia superiores al 80 %. Los porcentajes obtenidos en este estudio concuerdan con los publicados en la literatura científica, la que da cuenta de una tasa de identificación correcta de alrededor del 93 % con la metodología de MALDI TOF MS y del 100 %, con la secuenciación del 16S ARNr^{6,8,12} (tabla 1).

También observamos, al igual que otros autores, que la identificación por espectrometría de masas de gérmenes anaerobios es mejor que la identificación bioquímica convencional^{2,10,12,15}, dado que dicha metodología permite identificar a los microorganismos para los cuales no se dispone de pruebas bioquímicas convencionales y métodos miniaturizados.

Los aislados del género *Porphyromonas* spp. no pudieron ser identificados por la metodología de MALDI-TOF MS. Al igual que otros autores¹⁵, consideramos que se deberían reevaluar los espectros de estos gérmenes; asimismo, sería muy útil disponer de un mayor número de aislados en la base de datos actual.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran que la metodología de MALDI-TOF MS constituye un recurso valioso para la identificación de bacterias anaerobias aisladas de muestras clínicas y puede considerarse, sin duda, uno de los avances más importantes en el laboratorio de microbiología clínica.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Tabla 2 Desempeño comparativo de la metodología de MALDI-TOF MS frente a la metodología bioquímica convencional en la identificación de bacterias anaerobias de interés clínico comprendidas en distintos grupos

Grupo	Convencional/16S ARNr (n.º de aislamientos)	MALDI-TOF MS (n.º de aislamientos)	Porcentaje de coincidencia (%)
BGN ^a	58	53	91,4
BGP ^b	37	37	100,0
CGP ^c	8	8	100,0
CGN ^d	1	1	100,0
ATCC ^e	2	2	100,0
	106	101	95,3

^a Bacilos gram negativos; ^b bacilos gram positivos; ^c cocos gram positivos; ^d cocos gram negativos.

^e Incluye las cepas *B. fragilis* 25285 y *B. thetaiotaomicron* 29741.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Anhalt J, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975;47:219-25.
- 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. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17: 533-8.
- Callejo R, Rocca F, Martínez C, Aguerre L, Cipolla L, Prieto M. Desafío de la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF frente a bacterias anaerobias. XIII Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental, Resumen P-357. *Rev Argent Microbiol.* 2012;45 Supl 1:143.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. CLSI MM18 A. Wayne, PA, EE.UU.
- Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti J, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of non-fermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3361-7.
- Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz M, González-Buitrago J, Muñoz J. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:492-7.
- Fournier R, Wallet F, Grandbastien B, Dubreuil L, Courcol R, Neut C, Dessein R. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2012;18:294-7.
- 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 Chilena Infectol.* 2012;29:263-72.
- Könönen E, Wade W, Citron D. *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium* and other anaerobic gram-negative rods. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editores. *Manual of clinical microbiology.* 10.^a ed. Washington DC, ASM Press; 2011. p. 858-80.
- Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:796-802.
- Poggi H, Guzmán A M, García P, Lagos M. PCR universal o de amplio espectro: Un aporte a la detección de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev Med Chile.* 2009;137:1122-5.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, Rolain J, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49:543-51.
- Song Y, Finegold S. *Peptostreptococcus, Finegoldia, Anaerococcus, Peptoniphilus, Veillonella*, and other anaerobic cocci. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editores. *Manual of clinical microbiology.* 10.^a ed. Washington, DC. ASM Press; 2011. p. 803-16.
- Stevens D, Bryant A, Berger A, von Eichel-Streiber C. *Clostridium*. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editores, *Manual of clinical microbiology.* 10.^a ed. Washington, DC, ASM Press; 2011. p. 834-57.
- Vega-Castaño S, Ferreira L, González-Ávila M, Sánchez-Juanes F, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:597-601.
- Wade W, Könönen E. *Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive rods. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editores. *Manual of clinical microbiology.* 10.^a ed. Washington DC, ASM Press; 2011. p. 817-33.