



INFORME BREVE

Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales



Ivana Maldonado*, Dolores García Ramírez, Pablo Striebeck, Marcelo Lafage y Liliana Fernández Canigia

Laboratorio de Microbiología, Hospital Alemán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 7 de abril de 2016; aceptado el 6 de octubre de 2016

Disponible en Internet el 9 de febrero de 2017

PALABRAS CLAVE

Hongos miceliales;
Espectrometría
de masas;
*Matrix-assisted laser
desorption/ionization
time-of-flight mass
spectrometry*

KEYWORDS

Molds;
Mass spectrometry;
Matrix-assisted laser
desorption/ionization
time-of-flight mass
spectrometry

Resumen Se evaluaron 3 metodologías de extracción de proteínas para la identificación de hongos miceliales por MALDI-TOF MS en 44 aislados: la extracción con agua-ácido fórmico (E. agua), la extracción con zirconio-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico (E. zirconio) y la recomendada por el proveedor del equipo (E. tubo). Se compararon 2 bases de datos: Bruker (BK) y BK + *National Institutes of Health*. Los resultados obtenidos utilizando dichas bases fueron los siguientes (en el orden citado): identificación correcta (IC) a nivel de género, 10 y 16 con E. agua; 27 y 32 con E. zirconio y 18 y 23 con E. tubo; IC a nivel de especie, 5 y 7 con E. agua; 17 y 20 con E. zirconio y 11 y 14 con E. tubo; identificaciones no confiables, 18 y 12 con E. agua y 9 y 4, tanto con E. zirconio como con E. tubo; ausencia de pico, 16 con E. agua, 8 con E. zirconio y 17 con E. tubo. La extracción con zirconio mostró el mejor rendimiento ($p < 0,05$).

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

MALDI-TOF mass spectrometry: Evaluation of the preanalytical phase for identification of molds

Abstract In order to optimize the identification of molds with MALDI-TOF MS, three protein extraction-methodologies were evaluated against 44 isolates: water extraction (WE), zirconium extraction (ZE) and the provider's recommended method (PRM). Two data bases were compared, Bruker (BK) and Bruker + National Institutes of Health. Considering both databases, results were respectively as follows: correct identification (CI) at gender level, 10 and 16 by WE; 27 and 32 by ZE and 18 and 23 by PRM; CI at species level, 5 and 7 by WE; 17 and 20 by ZE

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ivanam27@gmail.com (I. Maldonado).

Con and 11 and 14 by PRM; non-reliable identification, 18 and 12 by WE; 9 and 4 by ZE and by PRM. No peaks were observed in 16 by WE, 8 by ZE and 17 by PRM. ZE showed the best performance ($p < 0.05$).

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Las infecciones fúngicas se han incrementado en los últimos años, especialmente las infecciones invasoras (IFI), que son una causa importante de morbimortalidad. Este aumento se debe a la mayor utilización de procedimientos diagnósticos invasivos y al creciente número de pacientes inmunodeprimidos¹³.

Los métodos de diagnóstico micológico tradicionales se basan en la identificación fenotípica o morfológica, que puede demorar de 24 a 48 h para las levaduras y hasta varias semanas en el caso de los hongos miceliales. A su vez, estos métodos son dependientes de la especie y de las condiciones de cultivo, son laboriosos y requieren de personal especializado^{7,11,14}.

Con el objetivo de mejorar el diagnóstico micológico se han desarrollado diferentes técnicas moleculares, las más utilizadas para la identificación de aislamientos se basan en el reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* [GCPSR])¹⁵. Estas técnicas requieren de una identificación presuntiva inicial, debido a la necesidad de secuenciar diferentes regiones de ADN blanco en función del agente fúngico sospechado (p. ej., región ITS, betatubulina, D1/D2, factor de elongación, calmodulina)^{4,8}. Estas metodologías, propuestas como *gold standard*, tienen la ventaja de identificar una amplia variedad de especies fúngicas; sin embargo, son más laboriosas y no pueden aplicarse a la práctica clínica diaria^{7,11}.

La espectrometría de masas conocida como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) se fundamenta en la obtención de un perfil proteico de un aislamiento, que es comparado con una base de datos; en estos casos, la identificación va a depender tanto de la calidad del espectro obtenido como del tamaño de la base de datos. Por sus características, la MALDI-TOF MS es una herramienta prometedora que podría mejorar la calidad de los resultados y disminuir los tiempos de respuesta^{7,11}. Esto contribuiría a instaurar precozmente el tratamiento apropiado, dado que la sensibilidad a los antifúngicos está íntimamente relacionada con el género y la especie.

La extracción de proteínas es un paso crítico para lograr espectros de buena calidad y, por consiguiente, una identificación correcta. Los hongos miceliales poseen una pared celular más robusta y rígida que las bacterias y levaduras, por lo que la preparación de la muestra requiere un proceso de extracción más agresivo. En la bibliografía se describen diferentes procedimientos de extracción (mecánicos y químicos) para mejorar la identificación de los hongos miceliales; sin embargo, los resultados no son

concluyentes^{3,5,7,10,11,14}. Otra condición necesaria para optimizar la identificación de hongos miceliales por MALDI-TOF MS es mejorar la cantidad y la variedad de los espectros en la base de datos provista por el proveedor^{7,10}.

Con el objetivo de evaluar el procedimiento más conveniente para la extracción de proteínas en el laboratorio de micología clínica, se seleccionaron 3 metodologías basadas en las publicaciones de Lau et al.¹⁰, Cassagne et al.³ y Gautier et al.⁷ y el procedimiento recomendado por el proveedor¹⁴, a saber: 1) extracción con agua-ácido fórmico; 2) extracción con zirconio-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico (E. zirconio)¹⁰, y 3) extracción en tubo con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico (la recomendada por el proveedor Bruker) para dermatofitos y otros hongos miceliales (*Guide Fungi Library MALDI Biotyper. Bruker Daltonics*, EE. UU., 2012). Se analizó, además, la eficiencia de identificación utilizando dos bases de datos, Bruker (BK) y BK con la adición de la base del *National Institutes of Health* (BK-NIH).

Se incluyeron 29 aislamientos de hongos filamentosos provenientes de un hospital de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 15 cepas provenientes de programas de control de calidad externos (CCE). Los hongos fueron identificados por sus características fenotípicas macro y micromorfológicas, siguiendo las claves del *Atlas of Clinical Fungi* de de Hoog et al.⁶. Se incluyeron 27 dermatofitos (11 *Trichophyton rubrum*, 3 *Trichophyton tonsurans*, 3 *Trichophyton mentagrophytes*, 5 *Microsporum canis*, 4 *Microsporum gypseum* y 1 *Epidermophyton floccosum*); 10 hongos hialinos y tabicados no dermatofitos (1 *Fusarium solani*, 4 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Aspergillus niger*, 1 *Pseudallescheria boydii*, 1 *Paecilomyces* spp., 1 *Scedosporium* spp. y 1 *Acremonium killiense*); 6 mucorales (1 *Mucor circinelloides*, 1 *Mucor* spp., 1 *Rhizopus oryzae*, 1 *Rhizopus* spp., 1 *Lichtheimia* spp. y 1 *Syncephalastrum* spp.) y 1 hongo dematiáceo (*Alternaria* spp.).

Los microorganismos fueron cultivados en agar Sabouraud glucosado (ASG) a 28 °C durante 5-7 días. Se consideró un desarrollo óptimo para la extracción de proteínas cuando la colonia en la placa de ASG alcanzó un diámetro aproximado de 5 mm.

Se evaluaron 3 métodos de extracción de proteínas:

- Extracción en agua-ácido fórmico (E. agua): se realizó una suspensión acuosa del hongo (1-4 Mc Farland) con agua calidad espectrometría (Sigma-Aldrich, Francia), se agitó durante 15 min, posteriormente se colocaron 2 μ l de la suspensión en un pocillo con 1 μ l de ácido fórmico

- (AF) 70% (Sigma-Aldrich, Francia) y 1 μ l de matriz alfa-ciano-4 hidroxí-ácido cinámico (HCCA) (Bruker Daltonics, Alemania).
- E. zirconio: se disgregó el hongo en 250 μ l de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) con 50 μ l de perlas de zirconio de 0,1 mm de diámetro (Cole-Palmer Instrument Co., Vernon Hills, EE. UU.), se agitó durante 15 min, se centrifugó a 13.000 rpm (2 min) y se descartó el sobrenadante. Se adicionó al *pellet* 50 μ l de AF al 70%, se agitó durante 5 min, luego se añadieron 50 μ l de acetonitrilo al 100% (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia). Se agitó nuevamente durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm (2 min); finalmente, se colocó en el pocillo 1 μ l del sobrenadante y 2 μ l de matriz HCCA¹⁰.
 - Extracción en tubo con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico, recomendada por el proveedor Bruker (E. tubo): se inoculó una porción del cultivo en caldo Sabouraud glucosado (Biokar Diagnostics, Francia) y se incubó durante 48 h en agitación con rotor. Se dejó reposar el caldo durante 10 min y se centrifugó un volumen de 1,5 ml del sedimento a 13.000 rpm (2 min). Se realizó un lavado con agua agitando durante 5 min, se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en 300 μ l de agua. La suspensión se agitó durante 5 min y se agregaron 900 μ l de etanol absoluto, luego se agitó otros 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm (2 min); se descartó todo el etanol y se dejó secar el *pellet* hasta evaporación total. El *pellet* se resuspendió en 50 μ l de AF al 70% y se agitó durante 10 min; posteriormente, se adicionó 50 μ l de acetonitrilo al 100% y se agitó 10 min más, luego se centrifugó a 13.000 rpm (2 min). Finalmente, se colocó en el pocillo 1 μ l del sobrenadante y 1 μ l de matriz HCCA (*Guide Fungi Library MALDI Biotyper. Bruker Daltonics, 2012, EE. UU.*).

Todos los aislamientos fueron procesados para extracción de proteínas por los 3 métodos propuestos.

Análisis por MALDI-TOF MS. Se realizó por duplicado en las placas recomendadas por el proveedor (MSP 96, Bruker Daltonics, Alemania). Se calibró siguiendo las instrucciones del fabricante con 1 μ l de estándar bacteriano (Bruker Daltonics, Alemania) y 1 μ l de matriz HCCA, por duplicado.

Lectura e interpretación de los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS. Los resultados se leyeron y analizaron por el sistema Bruker Microflex LT versión 3.1. (Bruker Daltonics, Alemania) utilizando la base de datos del proveedor Bruker (BK) (*MBT_DB_5627_MSP list, Filamentous Fungi Library 1.0, Bruker Daltonics*). Se realizó un segundo análisis incorporando la base de datos del NIH¹⁰ (BK-NIH).

La interpretación de los resultados se realizó sobre la base de los siguientes criterios: identificación aceptable a nivel de especie y género, cuando el *score* fue $\geq 1,6$. Los *scores* menores de 1,6 y mayores o iguales a 1,5 se consideraron como identificación aceptable solo a nivel de género, y *scores* < 1,5 se tomaron como identificación no confiable. Para establecer un género o especie diferente, se consideró necesaria una diferencia mínima de 10% entre el *score* superior y el más próximo.

Para el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta las siguientes definiciones:

- Identificación correcta solo a nivel de género (IC género): la identificación por MALDI-TOF MS coincidió con la identificación morfológica a nivel de género.
- Identificación correcta a nivel de especie (IC especie): la identificación por MALDI-TOF MS coincidió con la identificación morfológica a nivel de género y especie.
- Identificación incorrecta (No ID), identificación no confiable (*score* menor que 1,5).
- Sin pico: en la identificación por MALDI-TOF MS no se obtuvieron picos (*no peaks found*).

Métodos estadísticos: se aplicó el análisis de la varianza no paramétrico de Friedman mediante el programa estadístico InfoStat versión 2014 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>) y la prueba de concordancia kappa, utilizando el programa estadístico EpiDat 4.1 versión 2014 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de la Salud; Universidad CES, Colombia; <http://dxsp.sergas.es>) para comparar el desempeño de los diferentes métodos de extracción con las 2 bases de datos utilizadas.

El análisis con la base de datos de BK mostró los siguientes resultados: IC género en 22,72% (10/44) con E. agua, en 61,36% (27/44) con E. zirconio y en 40,90% (18/44) con E. tubo. Se consideraron para el análisis 36 de 44 hongos identificados a nivel de especie: IC especie en 13,89% (5/36) con E. agua, en 47,2% (17/36) con E. zirconio y en 30,56% (11/36) con E. tubo. No ID, en 40,91% (18/44) con E. agua, 20,45% (9/44) con E. zirconio y con E. tubo. No se obtuvieron picos en 36,36% (16) con E. agua, 18,18% (8) con E. zirconio y 38,64% (17) con E. tubo (*tabla 1* y *fig. 1A*).

En segunda instancia, se analizaron los espectros con una base de datos más extensa, BK-NIH, para evaluar el rendimiento del MALDI-TOF MS. Las principales diferencias se observaron con respecto a las IC a nivel de género, que se incrementaron al 72,72, el 52,27% y el 36,36% con la E. zirconio, E. tubo y E. agua, respectivamente. A su vez, las identificaciones no confiables se redujeron a 4 aislamientos (9%) con E. zirconio y E. tubo y a 12 (27,3%) con E. agua; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) (*tabla 2* y *fig. 1B*).

El método de E. zirconio mostró ser superior a las otras metodologías de extracción, tanto al comparar con la base de datos de BK (kappa 0,09; $p < 0,05$) como al hacerlo con la base de datos ampliada por el agregado de los espectros del NIH (kappa 0,08, $p < 0,05$) (*fig. 1*).

No se obtuvieron identificaciones incorrectas a nivel de género; no obstante, se obtuvieron identificaciones incorrectas a nivel de especie, correspondientes a *T. mentagrophytes* seguido de *T. tonsurans*. A su vez, un aislamiento de *A. killiense* fue identificado erróneamente como *Acremonium strictum*, probablemente porque esta especie no se encuentra en la base datos. Una cepa de *Scedosporium prolificans* CCE fue identificada con un *score* mayor que 1,6 con E. tubo; sin embargo, fue considerada solo IC a nivel de género porque hubo una diferencia menor del 10% con el siguiente *score*, que correspondió a *Scedosporium apiospermum*. Un resultado similar se observó con otra cepa CCE, *M. circinelloides*, que se confunde con *Mucor ramosissimus*, tanto en la E. zirconio como en la E. tubo (*tablas 1 y 2*).

Tabla 1 Análisis de los 44 aislamientos estudiados por el sistema Bruker Microflex con la base de datos BK

Género y especie (IM)	n	E. agua				E. zirconio				E. tubo			
		IC gén.	IC ^y esp.	No ID	Sin pico	IC gén.	IC ^y esp.	No ID	Sin pico	IC gén.	IC ^y esp.	No ID	Sin pico
<i>Microsporium canis</i>	5	2 ^a		2	1	1 ^b			4			1	4
<i>Microsporium gypseum</i>	4	2 ^c		2 ^d		4 ^e	3			3	3	1 ^f	
<i>Trichophyton rubrum</i>	11	4	4	5 ^g	2	8 ^h	6	2 ⁱ	1			2	9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3	1 ^j		2 ^k		2 ^l		1 ^m				1 ⁿ	2
<i>Trichopyton tonsurans</i>	3	1	1	1 ^o	1	2	2		1	2 ^p	1		1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1				1	1	1						1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4				4	3	3	1		4	4		
<i>Aspergillus niger</i>	1				1				1	1	1		
<i>Fusarium solani</i>	1				1				1	1	1		
<i>Paecilomyces</i> spp.	1				1			1 ^q		1			
<i>Pseudallescheria boydii</i>	1			1				1				1	
<i>Scedosporium prolificans</i>	1		1 ^r			1	1			1 ^s			
<i>Acremonium killiense</i>	1				1	1 ^t						1 ^u	
<i>Lichtheimia</i> spp.	1				1			1		1			
<i>Mucor circinelloides</i>	1			1		1 ^v				1 ^w			
<i>Mucor</i> spp.	1				1	1				1			
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1			1 ^x		1	1			1	1		
<i>Rhizopus</i> spp.	1			1				1				1	
<i>Syncephalastrum</i> spp.	1			1				1				1	
<i>Alternaria</i> spp.	1				1	1				1			
Total lectura BD BK	44	10	5	18	16	27	17	9	8	18	11	9	17

IM: identificación morfológica; E. agua: extracción en agua-ácido fórmico; E. zirconio: extracción con zirconio-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico; E. tubo: extracción en tubo con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico, recomendada por el proveedor; IC gén.: identificación correcta a nivel de género; IC esp.: identificación correcta a nivel de género y especie; No ID: identificación incorrecta; BD: base de datos.

- ^a Dos aislamientos *M. canis* con score menor que 1,6.
- ^b Un aislamiento *M. canis* con score menor que 1,6.
- ^c Dos aislamientos *M. gypseum* con score menor que 1,6.
- ^d Dos aislamientos *M. gypseum* con score menor que 1,5.
- ^e Un aislamiento *M. gypseum* con score menor que 1,6.
- ^f Un aislamiento *M. gypseum* con score menor que 1,5.
- ^g Dos aislamientos *T. rubrum* con score menor que 1,5.
- ^h Dos aislamientos *T. rubrum* con score menor que 1,6.
- ⁱ Un aislamiento *T. rubrum* con score menor que 1,5.
- ^j Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score mayor que 1,6.
- ^k Dos aislamientos *T. mentagrophytes* que dieron *T. tonsurans* con score menor que 1,5.
- ^l Dos aislamientos *T. mentagrophytes* que dieron *T. tonsurans* con score mayor que 1,6.
- ^m Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score menor que 1,5.
- ⁿ Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score menor que 1,5.
- ^o Un aislamiento *T. tonsurans* con score menor que 1,5.
- ^p Un aislamiento *T. tonsurans* que dio *T. interdigitale* con score mayor que 1,6.
- ^q Un aislamiento *Paecilomyces* spp. que dio *Paecilomyces variotti* con score menor que 1,5.
- ^r Un aislamiento *S. prolificans* que dio *S. prolificans* con score menor que 1,5.
- ^s Un aislamiento *S. prolificans* con score mayor que 1,6, pero una diferencia menor del 10% con el siguiente score, que fue *S. apiospermum*.
- ^t Un aislamiento *A. killiense* dio *A. strictum* con score mayor que 1,6.
- ^u Un aislamiento *A. killiense* dio *A. strictum* con score menor que 1,5.
- ^v Un aislamiento *M. circinelloides* que dio *M. ramosissimus* con score mayor que 1,6, pero con una diferencia menor del 10% con el siguiente score.
- ^w Un aislamiento *M. circinelloides* que dio *M. ramosissimus* con score mayor que 1,6, pero con una diferencia menor del 10% con el siguiente score.
- ^x Un aislamiento *R. arrhizus* que dio *R. arrhizus* con score menor que 1,5.
- ^y Se consideraron para el análisis 36 de 44 hongos identificados a nivel de especie.

Tabla 2 Análisis de los 44 aislamientos estudiados por el sistema Bruker Microflex con la base de datos BK-NIH

Género y especie (IM)	n	E. agua				E. zirconio				E. tubo			
		IC gén.	IC ^w esp.	No ID	Sin pico	IC gén.	IC esp.	No ID	Sin pico	IC gén.	IC esp.	No ID	Sin pico
<i>Microsporium canis</i>	5	2 ^a	1	2	1	1	1		4	1	1		4
<i>Microsporium gypseum</i>	4	3 ^b	1	1		4 ^c	3			4	4		
<i>Trichophyton rubrum</i>	11	4	4	5	2	9 ^d	7	1	1			2	9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3	2 ^e		1 ^f		1 ^g		2 ^h		1	1		2
<i>Trichophyton tonsurans</i>	3	2 ⁱ	1		1	2	2		1	2 ^j			1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1				1	1	1						1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4				4	4 ^k	3			4	4		
<i>Aspergillus niger</i>	1				1				1	1	1		
<i>Fusarium solani</i>	1				1				1	1	1		
<i>Paecilomyces</i> spp.	1				1	1				1			
<i>Pseudallescheria boydii</i>	1			1 ^l		1	1			1	1		
<i>Scedosporium prolificans</i>	1			1 ^m		1	1			1 ⁿ			
<i>Acremonium killiense</i>	1				1	1 ^o						1 ^p	
<i>Lichtheimia</i> spp.	1				1	1				1			
<i>Mucor circinelloides</i>	1	1 ^q				1 ^r				1 ^s			
<i>Mucor</i> spp.	1				1	1				1			
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	1 ^t				1	1			1	1		
<i>Rhizopus</i> spp.	1	1				1				1			
<i>Syncephalastrum</i> spp.	1			1				1 ^u				1 ^v	
<i>Alternaria</i> spp.	1				1	1				1			
Total lectura BD BK-NIH	44	16	7	12	16	32	20	4	8	23	14	4	17

IM: identificación morfológica; E. agua: extracción en agua-ácido fórmico; E. zirconio: extracción con zirconio-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico; E. tubo: extracción en tubo con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico, recomendada por el proveedor; IC gén.: identificación correcta a nivel de género; IC esp.: identificación correcta a nivel de género y especie; No ID: identificación incorrecta; BD: base de datos.

- ^a Un aislamiento *M. canis* con score menor que 1,6.
^b Dos aislamientos *M. gypseum* con score menor que 1,6.
^c Un aislamiento *M. gypseum* con score menor que 1,6.
^d Dos aislamientos *T. rubrum* con score menor que 1,6.
^e Un aislamiento *T. mentagrophytes* con score entre 1,5-1,6 y otro que dio *T. tonsurans* con score mayor que 1,6.
^f Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score menor que 1,5.
^g Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score mayor que 1,6.
^h Un aislamiento *T. mentagrophytes* que dio *T. tonsurans* con score menor que 1,5; y otro *T. mentagrophytes* que dio *T. mentagrophytes* con score menor que 1,5.
ⁱ Un aislamiento *T. tonsurans* que dio *T. interdigitale* con score mayor que 1,6.
^j Un aislamiento *T. tonsurans* que dio *T. interdigitale* con score mayor que 1,6 y otro que dio *T. rubrum* con score mayor que 1,6.
^k Un aislamiento *A. fumigatus* que dio *A. fumigatus* con score menor que 1,6.
^l Un aislamiento *P. boydii* que dio *Scedosporium apiospermum* (teleomorfo de *P. boydii*) con score menor que 1,5.
^m Un aislamiento *S. prolificans* que dio *S. prolificans* con score menor que 1,5.
ⁿ Un aislamiento *S. prolificans* con score mayor que 1,6 pero con una diferencia menor del 10% con el siguiente score, que fue *S. apiospermum*.
^o Un aislamiento *A. killiense* dio *A. strictum* con score mayor que 1,6.
^p Un aislamiento *A. killiense* dio *A. strictum* con score menor que 1,5.
^q Un aislamiento *M. circinelloides* que dio *M. circinelloides* con score menor que 1,6.
^r Un aislamiento *M. circinelloides* que dio *M. ramosissimus* con score mayor que 1,6, pero con una diferencia menor del 10% con el siguiente score.
^s Un aislamiento *Mucor circinelloides* que dio *M. ramosissimus* con score mayor que 1,6, pero con una diferencia menor del 10% con el siguiente score.
^t Un aislamiento *R. arrhizus* que dio *R. arrhizus* con score menor que 1,5.
^u Un aislamiento *Syncephalastrum* spp. que dio *Syncephalastrum* spp. con score menor que 1,5.
^v Un aislamiento *Syncephalastrum* spp. que dio *Syncephalastrum* spp. con score menor que 1,5.
^w Se consideraron para el análisis 36 de 44 hongos identificados a nivel de especie.

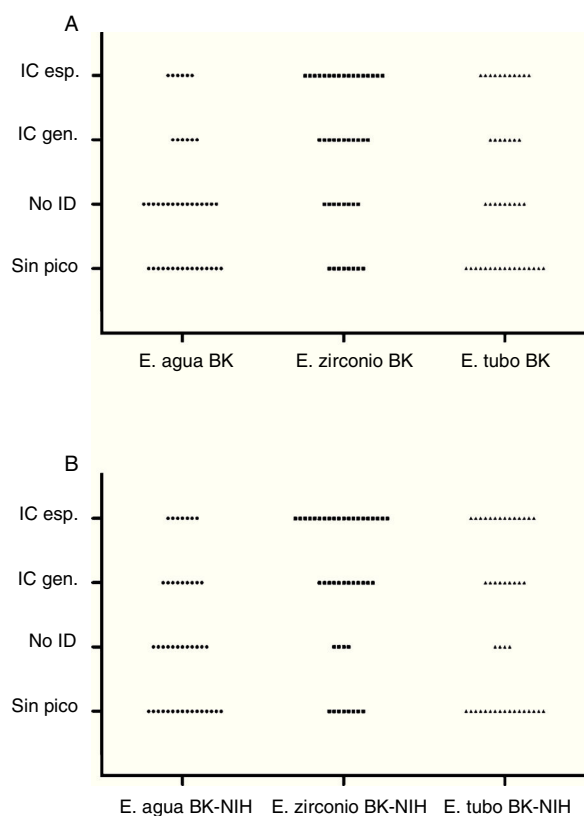


Figura 1 Distribución de los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS en función del método de extracción y la base de datos utilizada. Identificación correcta a nivel de especie (IC esp.), identificación correcta a nivel de género (IC gen.), sin identificación (No ID), extracción con agua (E. agua), extracción con zirconio (E. zirconio) y extracción en tubo (E. tubo). A) Análisis con la base de datos de BK. B) Análisis con la base de datos de BK + NIH.

Con respecto a los 3 géneros de dermatofitos y las especies más frecuentes implicadas en infecciones superficiales, las 2 metodologías con las que se obtuvieron los mejores rendimientos fueron E. agua y E. zirconio. Si bien son esperables mejores resultados con el método recomendado por el proveedor, la extracción en tubo mostró la menor eficiencia, ya que no se obtuvieron picos en el 39% de los aislamientos. Los errores de identificación correspondieron a las especies *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*. Esto podría deberse a que estas especies forman parte de un complejo⁹ que requiere cambios taxonómicos⁸. Recientemente, Guarro⁸ ha publicado que el complejo *Arthroderma vanbreuseghemii* (teleomorfo) está asociado a 3 anamorfos de distribución mundial, *T. tonsurans*, *Trichophyton equinum* y *Trichophyton interdigitale/mentagrophytes*^{8,12}. Esto confirma la similitud entre las especies de *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, y explica la dificultad en su diferenciación por los diferentes métodos de identificación.

Para el género *Trichophyton*, la metodología MALDI-TOF MS presenta dificultades para la identificación a nivel de especie. De hecho, el sistema emite una alerta con respecto a la limitación del método para diferenciar las

especies del género por estar estrechamente relacionadas (*T. equinum/interdigitale/mentagrophytes/rubrum/tonsurans/violaceum*). Por el contrario, para los géneros *Microsporum* y *Epidermophyton*, las especies son correctamente identificadas cuando se logra un espectro de buena calidad. Por lo anteriormente mencionado, es importante que las bases de datos para dermatofitos sean extensas, especialmente para el género *Trichophyton*, de tal manera de poder incluir la variabilidad intraespecie de este grupo de hongos^{9,12}. El agregado de la base de datos del NIH no mejoró la identificación porque aquella solo suma 12 espectros a los 63 que tiene la base de datos de BK para los dermatofitos.

Con respecto a los hongos causantes de hialohifomicosis y mucorales, la identificación con E. zirconio y E. tubo mostraron rendimientos similares, mientras que el método de E. agua no fue de utilidad para este grupo de hongos. El agregado de la base de datos de NIH permitió mejorar la identificación, especialmente con la metodología de E. zirconio.

La capacidad de la MALDI-TOF MS para la identificación de los hongos miceliales productores de IFI coincide con lo reportado por otros autores. Las especies de *Aspergillus* y *Fusarium* fueron identificadas correctamente, así como el complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y los diferentes géneros de los hongos mucorales. La excepción fue un aislamiento de *Syncephalastrum*, que con el agregado de la base de datos del NIH fue identificado con un score no confiable, ya que dicha base solo agrega dos espectros al único que aportaba la base de datos BK.

De Carolis et al.⁵ publicaron que la metodología MALDI-TOF MS es capaz de diferenciar entre especies de *Aspergillus* morfológicamente y filogenéticamente similares, indistinguibles por técnicas genotípicas. Asimismo, Balajee et al.¹ encontraron que el 24% de los aislamientos identificados por análisis morfológico como *A. fumigatus* correspondían a la especie *Aspergillus lentulus* por técnicas de secuenciación, los cuales también fueron clasificados correctamente por MALDI-TOF MS.

Más interesante aún es el gran poder de discriminación de MALDI-TOF MS de cepas pertenecientes a especies estrechamente relacionadas del complejo *F. solani*⁵. Las publicaciones que evalúan el rendimiento de MALDI-TOF MS para la identificación de mucorales demuestran la capacidad de discriminar aislamientos de este grupo tanto a nivel de género como de especies^{7,14}.

Los hongos dematiáceos están poco representados en las bases de datos; a su vez, está descrito en la literatura que se obtienen espectros de mala calidad debido a su pigmento. Estos pueden inhibir la ionización, lo cual lleva a una mala adquisición de los espectros de masas en MALDI-TOF MS, como lo describen Buskirk et al.². Sin embargo, en nuestro trabajo, el único aislamiento de *Alternaria* spp. pudo ser identificado correctamente tanto con la E. tubo como con la E. zirconio.

El promedio de los scores a nivel de género y de especie fue mayor utilizando la base extendida: 1,66; 1,97 y 2,15 para E. agua, E. zirconio y E. tubo, respectivamente, con las bases de BK-NIH ($p < 0,05$), frente a 1,64; 1,81 y 2,01 utilizando la base de datos de BK.

La interpretación recomendada por Bruker aplica criterios más estrictos que los utilizados en este trabajo, tanto para la identificación aceptable a nivel de género y especie como la identificación solo a nivel de género, *scores* $\geq 2,0$ y de 1,7 a 2,0, respectivamente, considerando puntajes inferiores a 1,7 como poco fiables¹⁵. Pero estos criterios de interpretación son muy exigentes para hongos miceliales, como se refleja en varias publicaciones^{3,5,7,10,14}. En este trabajo consideramos adecuado para aceptar una identificación como correcta a nivel de género un *score* $\geq 1,5$ y para especie un *score* $\geq 1,6$ en función de la correlación obtenida entre la identificación convencional y el MALDI-TOF MS.

Con el agregado de la base de datos del NIH, se observó un aumento estadísticamente significativo en los *scores* ($p < 0,05$), que implicó una disminución de las identificaciones no confiables. Esto nos permite hipotetizar que con un incremento de espectros en la base de datos podríamos llegar a obtener una diferencia significativa en cuanto a la identificación. Existen varias publicaciones que demuestran que se mejora el rendimiento de esta tecnología con el agregado de una base de datos *in house* y, mejor aún, si las bases incorporan datos provenientes de cepas de colecciones de cultivos de diferentes regiones geográficas, con el fin de reflejar la diversidad natural de las especies fúngicas⁵.

Finalmente, el método de E. zirconio mostró el mejor desempeño, independientemente de la base utilizada. Permitió el mayor número de identificaciones a nivel de género y de género-especie, y fue el que presentó la menor cantidad de espectros sin pico (18%) (fig. 1). Por este motivo, consideramos que este método es el más adecuado para la identificación de hongos miceliales. El rendimiento de la E. tubo fue mejor para algunos géneros, en particular para hongos con pigmento como *A. niger* y *F. solani*, pero no fue de utilidad para los dermatofitos. Debido a que este método es más laborioso y demanda más tiempo que la de E. zirconio, lo recomendamos como alternativa cuando no se obtienen picos o la identificación es no confiable para hongos productores de IFI. El método de E. agua, que es sencillo y económico, podría ser un procedimiento para utilizar solo en dermatofitos.

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.

Autoría

Ivana Maldonado y Dolores García Ramírez contribuyeron en forma igualitaria a este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

La Fundación Dr. Roberto B. Domecq contribuyó con los reactivos y el equipamiento necesario para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006;5:1705–12.
- Buskirk AD, Hettick JM, Chipinda I, Law BF, Siegel PD, Slaven JE, Green BJ, Beezhold DH. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal Biochem*. 2011;411:122–8.
- Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, Hendrickx M, Piarroux R. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011;6:e28425.
- Ciarlo DE, Lucke K, Imhof A, Bloemberg GV, Bottger EC. Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: A 5-year study. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2809–13.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:475–84.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht: The Netherlands; Reus: Universitat Rovira i Virgili; 2000, p. 1126.
- Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, L'Ollivier C, Hendrickx M, Piarroux R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:1366–71.
- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:33–9.
- L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M, Fourquet P, Coulibaly O, Piarroux R, Ranque S. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol*. 2013;51:713–20.
- Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51:828–34.
- Ling H, Yuan Z, Shen J, Wang Z, Xu Y. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: A meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2573–82.
- Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Graser Y. MALDI-TOF mass spectrometry — a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol*. 2013;51:17–24.

13. Peman J, Quindos G. Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31:213–8.
14. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Bottger EC, Hombach M. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2797–803.
15. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000;31:21–32.