

## Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF στη διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια

Αμαλία Τζανάτου<sup>1</sup>, Δημήτριος Παπαβέντσας<sup>2</sup>, Γεωργία Βρυώνη<sup>1</sup>, Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

<sup>2</sup>Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακα «Η Σωτηρία»

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203252>



## Περίληψη

Το γένος *Mycobacterium* περιλαμβάνει είδη όπως τα μέλη του παθογόνου συμπλέγματος ειδών *M. tuberculosis complex*, έναν παγκόσμιο σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς κι ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ειδών μη φυματιωδών μυκοβακτηριδίων, το 1/3 περίπου των οποίων έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις σημαντικής νοσηρότητας και θνητότητας. Επομένως η ταχεία κι ακριβής ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων είναι κρίσιμη στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων αυτών.

Η MALDI-TOF MS μεθοδολογία έχει εισαχθεί την τελευταία δεκαετία στην εργαστηριακή πρακτική για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Αξιοποιεί τα μοναδικά, σαν αποτυπώματα,

για το κάθε είδος πρωτεϊνικά φάσματα μαζών κι επιτυγχάνει ταχεία, εύκολη, αξιόπιστη κι οικονομικά αποδοτική αναγνώριση βακτηρίων, ζυμομυκήτων, και υφομυκήτων. Καθώς οι συμβατικές μέθοδοι ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων είναι χρονοβόρες, η MALDI-TOF MS προσφέρει μια νέα εναλλακτική προσέγγιση που μειώνει το χρόνο μέχρι το αποτέλεσμα.

Τα πρωτόκολλα αδρανισμού και προετοιμασίας του δείγματος των μυκοβακτηριδίων για τη MALDI-TOF MS ανάλυση των πρωτεϊνών τους έχουν περιγραφεί λεπτομερώς και χρησιμοποιούνται ευρέως στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Παράλληλα οι μελέτες αξιολόγησης της MALDI-TOF MS ως μεθόδου ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων έχουν διαπιστώσει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα. Η συνεχής αναβάθμιση των βάσεων δεδομένων με την ενσωμάτωση όλο και μεγαλύτερου αριθμού προφίλ φασμάτων μαζών από είδη *Mycobacterium*, αλλά και η ανάπτυξη ισχυρότερων λογισμικών για την ανάλυση με τη MALDI-TOF MS, είναι βασικοί επιδιωκόμενοι στόχοι. Μέσω αυτών πιστεύεται πως θα επιτυγχάνεται αξιόπιστη ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού ειδών *Mycobacterium*, αλλά και καλύτερη διάκριση μεταξύ των φυλογενετικά στενά συσχετιζόμενων ειδών, καθώς το τελευταίο αποτελεί και τον κύριο περιορισμό της μεθόδου. Η MALDI-TOF MS ανάλυση των επιφανειακών, ειδικών του κάθε είδους *Mycobacterium* λιπιδίων αποτελεί πεδίο έρευνας του οποίου οι εξελίξεις αναμένονται και υπόσχεται να συντομεύσει ακόμη περισσότερο το χρόνο ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων, ίσως και να κατορθώσει την τυποποίησή τους.

Οι προοπτικές που ανοίχτηκαν με την εισαγωγή της τεχνολογίας MALDI-TOF MS στη διαγνωστική των μυκοβακτηριδίων έχουν θεαματικό αντίκτυπο στην ταυτοποίηση κι ελπίζεται πως θα έχουν τον ανάλογο αντίκτυπο, τόσο στην τυποποίηση, όσο και στην ανίχνευση αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα.



### Λέξεις κλειδιά

Μυκοβακτηρίδια, MALDI-TOF MS, ταυτοποίηση, προετοιμασία δείγματος, βάσεις δεδομένων, μελλοντικές προοπτικές

### Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή,  
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Μικράς Ασίας 75, 11527 Αθήνα, Ελλάδα  
Email: ipapapar@med.uoa.gr

## 1. Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 180 είδη μυκοβακτηριδίων έχουν περιγραφεί. Τα πλέον γνωστά είναι το *Mycobacterium tuberculosis* (Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης) και πολύ συγγενικά του γενετικά είδη, μεταξύ των οποίων τα *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* (στέλεχος εμβολίου BCG), τα οποία

αναφέρονται ως σύμπλεγμα του Μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (*M. tuberculosis complex*, MTBC). Ακόμη στα γνωστά είδη που προκαλούν ανθρώπινες λοιμώξεις ανήκει και το *Mycobacterium leprae* (Μυκοβακτηρίδιο της λέπρας). Εκτός από τα παραπάνω, τα είδη των μυκοβακτηριδίων που απομένουν χαρακτηρίζονται με τον όρο μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια (Non-tuberculous mycobacteria - NTM) ή συνήθως και με τον χαρακτηρισμό άτυπα μυκοβακτηρίδια.<sup>1</sup>

Τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα MTBC προκαλούν φυματίωση, λοιμώδη νόσο που μεταδίδεται κυρίως αερογενώς από άτομο σε άτομο μέσω μικρών αιωρούμενων σωματιδίων. Η πιο συχνή μορφή της νόσου είναι η πνευμονική φυματίωση, ενώ εξωπνευμονικές εστίες λοιμώξεως δημιουργούνται συνηθέστερα με λεμφαγγειακή διασπορά ή κατ' επέκταση ιστού από γειτονική βλάβη. Τέτοιες είναι η φυματίωσης λεμφαδενίτιδα, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα, η φυματίωση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, του ουροποιητικού, του δέρματος, του περιτοναίου, των οστών.<sup>2</sup>

Τα NTM είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον σαπροφυτικοί κι ευκαιριακώς παθογόνοι μικροοργανισμοί κι απομονώνονται από μια ποικιλία πηγών όπως το έδαφος, η σκόνη, το νερό, τα μολυσμένα ζώα. Στον άνθρωπο μεταδίδονται από το περιβάλλον, η μετάδοση από άτομο σε άτομο παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια και μπορούν να προκαλέσουν τόσο πνευμονική όσο και εξωπνευμονική νόσο.<sup>3</sup> Έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις στους ανθρώπους που εκδηλώνονται ως πνευμονικές λοιμώξεις, δερματικές λοιμώξεις, λεμφαδενίτιδες στα παιδιά, όπως και γενικευμένες λοιμώξεις, ενώ εμφανίζονται στο μεγάλο ποσοστό τους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.<sup>4</sup> Αν και συνήθως τα μυκοβακτηρίδια αυτά θεωρούνται ήσσονος παθογένειας, προκαλώντας κυρίως ευκαιριακές λοιμώξεις, τα τελευταία χρόνια οι λοιμώξεις αυτές από τα NTM όχι μόνο έχουν αυξηθεί, αλλά οι εντοπίσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζουν συνεχώς μεγαλύτερη ποικιλία. Ακόμη ανοδικά σε αριθμό είναι και τα περιστατικά τέτοιου είδους λοιμώξεων σε ανοσοεπαρκή άτομα.<sup>1</sup> Ένα από τα χαρακτηριστικά και πρόσφατα παραδείγματα λοίμωξης από NTM είναι η αιτιολογική συσχέτιση λοιμώξεων μετά από καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με το *Mycobacterium chimaera*.

Παρόλο που οι μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις αντιμετωπίζονται στις μέρες μας με τη χρήση της κατάλληλης αντιφυματικής αγωγής, εξακολουθούν να αποτελούν ένα αξιοσημείωτο πρόβλημα δημόσιας υγείας που προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Για να επιτευχθεί ταχεία έναρξη στοχευμένης θεραπείας, ώστε να βελτιωθεί η έκβαση των ασθενών αλλά και να προληφθεί η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιφυματικά φάρμακα στελεχών, η ταχεία κι ακριβής διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια είναι καθοριστική.

## 2. Η μεθοδολογία MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των βακτηρίων

Οι διαθέσιμες εργαστηριακές τεχνικές ταυτοποίησης

μετά από θετική καλλιέργεια, όπως οι βιοχημικές αντιδράσεις, οι μοριακές τεχνικές πολλαπλασιασμού κάθε είδους (PCR, PCR με ανάστροφο υβριδισμό, κλπ.) καθώς και οι τεχνικές αλληλούχισης κάθε είδους (sequencing πολλαπλών γονιδίων, whole genome sequencing, κλπ.), παρότι παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα στην ταυτοποίηση των βακτηρίων εν γένει, μειονεκτούν για τα δεδομένα της καθημερινής ρουτίνας των σύγχρονων κλινικών εργαστηρίων. Έτσι οι βιοχημικές δοκιμασίες είναι χρονοβόρες και δεν εφαρμόζεται σε όλα τα είδη, η PCR είναι σχετικά ακριβή, ενώ όσον αφορά την αλληλούχιση απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και αρκετές ημέρες για την ανάλυση των δεδομένων και αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα το κόστος της είναι υψηλό.<sup>5</sup>

Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί στα μικροβιολογικά εργαστήρια ως ένας γρήγορος τρόπος ταυτοποίησης των βακτηρίων από τα καλλιεργήματά τους η ανάλυση με φασματομετρία μάζας του πρωτεϊνικού προφίλ των εξεταζόμενων κυττάρων. Το προφίλ που λαμβάνεται συγκρίνεται με μια βιβλιοθήκη φασμάτων μαζών πρωτεϊνών που έχει δημιουργηθεί προγενέστερα με φασματομετρία μάζας που εφαρμόστηκε σε αναγνωρισμένα στελέχη τα οποία ήταν ταυτοποιημένα με πρότυπες μεθόδους αναφοράς. Η φασματομετρία μάζας που χρησιμοποιείται στην μικροβιολογική πρακτική καλείται MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Θεωρείται μια σημαντική σε αξιοπιστία μέθοδος ταυτοποίησης των βακτηρίων, με ένα φάσμα αναγνωρισμών ειδών ανώτερο από κάθε άλλης μεθόδου ταυτοποίησης, εξαιρουμένου του Sequencing.<sup>6</sup> Το κύριο πλεονέκτημα της MALDI-TOF MS είναι ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για να ληφθεί το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης αλλά και το χαμηλό κόστος της εξέτασης ανά δείγμα.

## 3. Τεχνικά χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας MALDI-TOF MS

Η MALDI-TOF MS βασίζει τη λειτουργία της σε ένα φασματογράφο μάζας που αποτελείται από τρία λειτουργικά μέρη: 1) μία πηγή ιόντων, η οποία θα ιονίσει και θα μεταφέρει τα ιονισμένα μόρια του δείγματος στην αέρια φάση, 2) ένας αναλυτής μαζών που θα διαχωρίσει τα ιόντα ανάλογα με το πηλίκιο μάζα προς φορτίο τους ( $m/z$ ) και 3) μια συσκευή ανίχνευσης των διαχωρισμένων ιονισμένων μορίων. Στη MALDI-TOF MS προκαλείται «ήπιος» ιονισμός, γεγονός που επιτρέπει τον ακέραιο ιονισμό και την εξάτμιση μεγάλων, μη πτητικών βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες.

Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση του δείγματος του καλλιεργημένου μικροοργανισμού σε μια με-



ταλλική πλάκα ή πλάκα μιας χρήσης. Το δείγμα καλύπτεται με ειδικό διάλυμα που ονομάζεται matrix (μήτρα), το οποίο κρυσταλλοποιείται μαζί με το δείγμα. Μετά την κρυσταλλοποίηση του matrix και του μικροβιακού δείγματος, η πλάκα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας όπου δέχεται βολές σύντομων παλμών laser, συνήθεστερα από laser αζώτου. Το matrix απορροφάει ενέργεια από το laser γεγονός που προκαλεί εκρόφηση των βιομορίων του δείγματος τα οποία στη συνέχεια εξατμίζονται κι ιονίζονται στην αέρια φάση. Αυτά τα ιονισμένα μόρια αρχικά επιταχύνονται διαμέσου ενός ηλεκτροστατικού πεδίου και στη συνέχεια εκτινάσσονται διαμέσου ενός μεταλλικού σωλήνα ο οποίος υπόκειται σε κενό αέρος, ώστε να τον διατρέξουν μέχρι να φτάσουν σε έναν ανιχνευτή. Τα μικρότερα ιόντα κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα μέσα στο σωλήνα και φθάνουν συνεπώς ταχύτερα στον ανιχνευτή. Ο χρόνος πτήσης (Time-of-Flight, TOF) που απαιτείται για να φθάσουν στον ανιχνευτή εξαρτάται από τη μάζα κι από το φορτίο των ιόντων του βιοαναλύτη κι είναι ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας του ηλίκου  $m/z$ . Επομένως τα ιόντα των βιομορίων που ήταν μέρος του δείγματος κι έχουν διαφορετικό  $m/z$  διαχωρίζονται με την παραπάνω μέθοδο ανάλογα με το TOF τους και δημιουργείται έτσι ένα φάσμα μαζών το οποίο χαρακτηρίζεται

από το  $m/z$  στον άξονα των  $x$  και την ένταση των ιόντων, που είναι ο αριθμός των ιόντων συγκεκριμένου  $m/z$  που «χτυπούν» στον ανιχνευτή στον άξονα των  $y$ . Το φάσμα μαζών λοιπόν του αναλυόμενου δείγματος συνθέτουν κορυφές  $m/z$  διαφόρων εντάσεων που αποτελούν την υπογραφή του μικροοργανισμού στο αναλυόμενο δείγμα, καθότι είναι μοναδικό για το είδος του μικροοργανισμού (Εικόνα 1). Αυτό το φάσμα μαζών των βιομορίων, πρωτεϊνών κατά βάση, του εξεταζόμενου προς ταυτοποίηση μικροβίου συγκρίνεται με γνωστά φάσματα μαζών πρότυπα ταυτοποιημένων μικροοργανισμών τα οποία είναι ενσωματωμένα σε μια βάση δεδομένων του αναλυτή MALDI-TOF MS, ώστε αν ταιριάζει με κάποιο σε ικανοποιητική ομολογία, να γίνει κατ' αυτόν τον τρόπο η αναγνώρισή του σε επίπεδο γένους και είδους.

#### 4. Η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στα μυκοβακτηρίδια

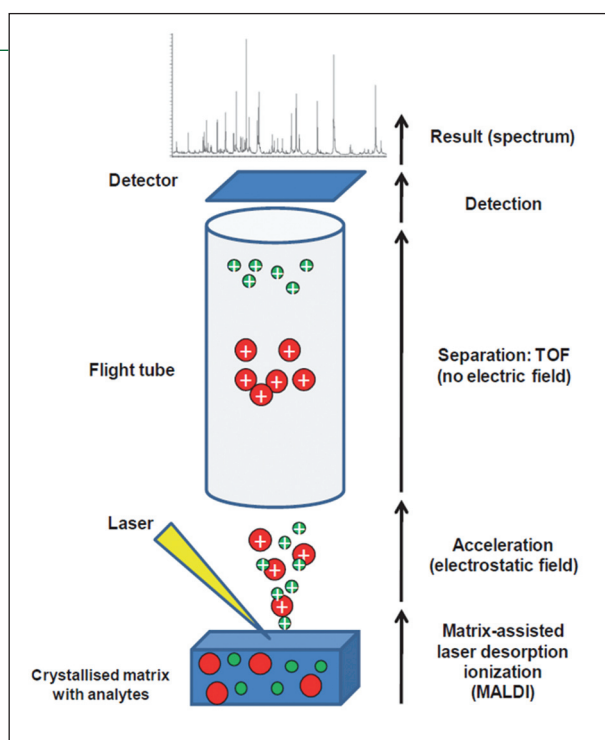
##### 4.1 Γενικά στοιχεία

Μια μέθοδος ταυτοποίησης σαν την MALDI-TOF MS, ήταν εύλογο να θεωρηθεί πως με τη χρήση της στην αναγνώριση των μυκοβακτηριδίων, θα προσέφερε νέες δυνατότητες για ταχύτερη και ακριβέστερη διά-

Εικόνα 1

Απεικόνιση της τεχνικής MALDI-TOF MS.

Πηγή: Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 2012;36:380-407.



γνωση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα σημαντικά αυτά παθογόνα μικρόβια. Η διάκριση μεταξύ μιας λοίμωξης από μυκοβακτηρίδια του MTBC και μιας από NTM είναι σημαντικό να γίνει όσο το δυνατόν συντομότερα και με ακρίβεια, λόγω της διαφορετικής αγωγής που πρέπει να λάβουν οι ασθενείς σε κάθε περίπτωση. Στις βασικές εργαστηριακές μεθόδους ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων από θετικό καλλιέργημα που έχουν χρησιμοποιηθεί ανήκουν οι συμβατικές φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι, όπως και χρωματογραφικές μέθοδοι. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) των μυκολικών οξέων των μυκοβακτηριδίων θεωρήθηκε και μέθοδος αναφοράς. Ωστόσο, έχουν εγκαταλειφθεί σήμερα ως κοπιώδεις και χρονοβόρες τεχνικές κι εκτελούνται μόνο σε εργαστήρια αναφοράς. Ακόμη η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος ανίχνευσης του αντιγόνου MPT64, η οποία εφαρμόζεται σε θετική για μυκοβακτηρίδια καλλιέργεια τόσο από υγρό όσο και από στερεό υλικό μέσο, είναι τεχνική που προσφέρει γρήγορη διάκριση των μυκοβακτηριδίων του MTBC από τα NTM, ωστόσο δεν παρέχει καμία επιπλέον ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους του εξεταζόμενου δείγματος. Από την άλλη πλευρά οι νεότερες μοριακές τεχνικές με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), έχουν φέρει σημαντική ελάττωση του απαιτούμενου χρόνου διάγνωσης. Οι δοκιμασίες μοριακής ανίχνευσης βασίζονται στην ενίσχυση ειδικών για τα μυκοβακτηρίδια γονιδιακών στόχων. Ευρύτατα χρησιμοποιούμενη είναι η μοριακή ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με μεθόδους αναστροφου υβριδισμού, γνωστές ως Line Probe Assays. Εφαρμόζονται σε καλλιέργηματα, όπου κατόπιν εκχύλισης του DNA των μυκοβακτηριδίων, ενισχύονται τμήματά του μέσω PCR με σεσημασμένους εκκινητές, και στη συνέχεια ακολουθεί υβριδισμός με ακίνητους, δεσμευμένους σε ταινίες νιτροκυτταρίνης ιχνηθέτες. Υπάρχουν διαθέσιμες εμπορικά διάφορες τέτοιες δοκιμασίες που δίνουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης των MTBC όσο και αρκετών NTM μυκοβακτηριδίων. Σε αυτό το υπάρχον πεδίο η τεχνολογία MALDI-TOF MS έρχεται να προσφέρει μια καινούρια εναλλακτική προσέγγιση στη διάγνωση αυτών των πάντα επίκαιρων λοιμώξεων. Με τα περιστατικά λοιμώξεων από NTM να αυξάνονται βαθμιαία παγκοσμίως, η ταχύτερη κι εγκυρότερη ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός τους από τα MTBC μυκοβακτηρίδια μπορεί να βελτιώσει την αντιμετώπιση των ασθενών εφαρμόζοντας ταχύτερα την κατάλληλη για το συγκεκριμένο είδος μυκοβακτηριδίου φαρμακευτική αγωγή.<sup>3</sup>

Η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων έρχεται ακόμη αντιμέτωπη με προκλήσεις, οι οποίες προκύπτουν εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξης της πλειοψηφίας των μυκοβακτηριδίων, του σχετικά χαμηλότερου αριθμού ριβοσωμι-

κών πρωτεϊνών που περιέχουν σε σύγκριση με άλλα μικρόβια, αλλά κατά κύριο λόγο εξαιτίας του κυτταρικού τους τοιχώματος το οποίο είναι παχύ, πυκνό και κηρώδες. Ακόμη για τη χρήση της μεθόδου απαιτείται, για τον ασφαλή χειρισμό τους, η αδρανοποίηση των δειγμάτων τα οποία είναι ύποπτα για MTBC και NTM μυκοβακτηρίδια, επομένως και δυνητικά υψηλώς μολυσματικά.<sup>4</sup>

#### 4.2 Αδρανοποίηση των μυκοβακτηριδίων για λόγους βιοασφάλειας

Ο χειρισμός κλινικών δειγμάτων που περιέχουν μυκοβακτηρίδια εγείρει θέματα βιοασφάλειας. Επειδή δεν είναι εύκολο να αποκλείσουμε ότι στο ίδιο δείγμα μπορεί να συνυπάρχουν μυκοβακτηρίδια τόσο του MTBC όσο και NTM, η σύσταση είναι να εξασφαλίζεται επίπεδο Βιοασφάλειας 3 (BSL 3) όταν το προσωπικό κλινικών εργαστηρίων χειρίζεται δείγματα με οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια. Για να χρησιμοποιηθούν αυτά τα δείγματα για περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων, όπως στην περίπτωση που θα επιχειρηθεί η εφαρμογή της MALDI-TOF MS τεχνολογίας, θα πρέπει αρχικά να αδρανοποιηθούν, ώστε με ασφάλεια να μεταφερθούν στο χαμηλότερο επίπεδο Βιοασφάλειας 2 (BSL 2) που εφαρμόζεται συνήθως στους υπόλοιπους χώρους του εργαστηρίου. Μέθοδοι που έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται είναι η αδρανοποίηση των μυκοβακτηριδίων με θέρμανση, ή και η επώαση μιας μικρής ποσότητας των βακτηρίων σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Θεωρούνται και οι δύο ασφαλείς τρόποι αδρανοποίησης τόσο των MTBC όσο και των NTM.<sup>7</sup>

Σε πρόσφατα δημοσιευμένη ερευνητική τους μελέτη οι Wang και συν. (2021) έθεσαν ως στόχο την αξιολόγηση της βιοασφάλειας που προσφέρουν διαφορετικά πρωτόκολλα για την αδρανοποίηση του *M. tuberculosis* με θέρμανση. Η ερευνά τους απέδειξε ότι στα στελέχη *M. tuberculosis* στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία αδρανοποίησης με θέρμανση σε ένα θερμικό μπλοκ είτε στους 80°C για 90 λεπτά, είτε στους 95°C για 30 λεπτά, παρουσίαζαν συνεχώς τα υψηλότερα σκορ στην ταυτοποίησή τους με την MALDI-TOF MS ανάλυση (log score >2,0) με το MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, 28359, Bremen, Germany). Τα αποτελέσματα της έρευνας ενίσχυσαν την παραδοχή ότι η διαδικασία αδρανοποίησης αυτή που ακολουθήσαν ήταν αποτελεσματική στην επίτευξη καλής βιοασφάλειας κατά τον χειρισμό των εξεταζόμενων στελεχών *M. tuberculosis*.<sup>8</sup>

#### 4.3 Μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων για MALDI-TOF MS ανάλυση

Έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία διάφορες καινοτόμες μέθοδοι προεργασίας του δείγματος, οι οποίες



έχουν ως τελικό προϊόν το εκχύλισμα των πρωτεϊνών των μυκοβακτηριδίων σε ικανοποιητικά επαρκή ποσότητα, το οποίο και χρησιμοποιείται για ανάλυση με MALDI-TOF MS. Η προετοιμασία του δείγματος μυκοβακτηριδίων που θα αναλυθεί γίνεται χρησιμοποιώντας βιομάζα από μυκοβακτηρίδια προερχόμενα από καλλιέργειες σε στερεά καλλιεργητικά μέσα. Είναι μάλιστα δυνατή και η χρήση μυκοβακτηριδιακών κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε υγρά καλλιεργητικά μέσα, όπως το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα BD BACTEC MGIT Automated Mycobacterial Detection System που βασίζεται στο σωληνάριο Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) που επωάζεται στον κλίβανο BACTEC MGIT 960 System (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ) και το οποίο βασίζεται στην αυτόματη ανίχνευση της κατανάλωσης O<sub>2</sub> με βάση την τεχνολογία ανίχνευσης φθορισμού. Η δυνατότητα να εφαρμόζεται η διεργασία για την εκχύλιση των πρωτεϊνών από το υλικό θετικών υγρών καλλιεργειών που επωάστηκαν σε αυτοματοποιημένα συστήματα με σκοπό την επακόλουθη ανάλυση του επεξεργασμένου δείγματος με MALDI-TOF MS επιταχύνει σε μεγάλο βαθμό την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών στελεχών, κι άρα τη διάγνωση.<sup>9</sup>

Οι Alcaide και συν. (2018) έχουν κάνει μια αξιολογή και περιεκτική δημοσίευση-ανασκόπησης των διαφορετικών διαθέσιμων μεθόδων επεξεργασίας των δειγμάτων μυκοβακτηριδίων για την επακόλουθη ανάλυσή τους με την MALDI-TOF MS τις οποίες χρησιμοποιούν τα κλινικά εργαστήρια επί του παρόντος.<sup>4</sup> Σύμφωνα με αυτήν, κύριος στόχος της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος είναι η σχάση του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων χρησιμοποιώντας χημικές και μηχανικές μεθόδους, και στη συνέχεια η εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας φορμικό οξύ και ακετονιτρίλιο. Η σχάση των μυκοβακτηριδιακών κυττάρων επιτυγχάνεται είτε με την εφαρμογή υπερήχων στο δείγμα, είτε με την ανάδευση του δείγματος μαζί με σφαιρίδια τα οποία εφαρμόζουν μηχανικές δυνάμεις στα κύτταρα, είτε με έντονη περιδίνηση του δείγματος παρουσία σφαιριδίων πυριτίου (Εικόνα 2). Το πρωτόκολλο επεξεργασίας που περιγράφουν οι συγγραφείς, ξεκινά με την απαλή επαναιώρηση 1 μl από τη μυκοβακτηριδιακή βιομάζα που λαμβάνεται από το καλλιεργητικό μέσο σε 300 μl απεσταγμένου νερού. Τα μυκοβακτηρίδια αδρανοποιούνται με θέρμανση σε ξηρό υδατόλουτρο στους 95°C για 30 λεπτά και κατόπιν προστίθεται αιθανόλη μέχρι τελικής συγκεντρώσεως 75%.

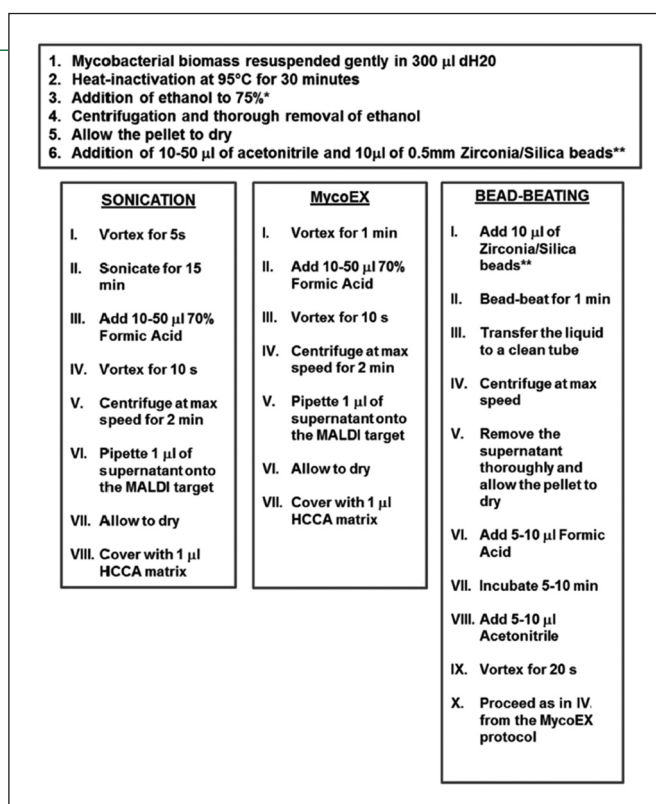
**Εικόνα 2**

Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επεξεργασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων για ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS.

\*Το πρωτόκολλο της θραύσης του δείγματος με σφαιρίδια συνεχίζει από αυτό το βήμα.

\*\*Τα σφαιρίδια ζirkονίου/πυριτίου μπορούν να αντικατασταθούν από γυάλινα σφαιρίδια.

Πηγή: Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, González-Álvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:599-603.



Το πρωτόκολλο υπερήχησης αποτελεί το πρώτο από τα τρία βασικά πρωτόκολλα που περιγράφουν οι Alcaide και συν. (2018). Σύμφωνα με αυτό, η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος των μυκοβακτηριδίων για την MALDI-TOF MS συνεχίζει με τη φυγοκέντρηση του δείγματος στις μέγιστες στροφές και με τη διεξοδική και πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης. Το βήμα της απομάκρυνσης της αιθανόλης είναι σημαντικό για να ληφθούν κατόπιν υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικά φάσματα μαζών. Το ίζημα με τη μορφή σφαιριδίου αφήνεται τότε να στεγνώσει καλά ώστε να εξατμιστεί κάθε ίχνος αιθανόλης. Εν συνεχεία προστίθενται ακετονιτρίλιο και 0,5mm σφαιρίδια ζirkονίου/πυριτίου ή γυάλινα σφαιρίδια, και το μείγμα περιδινίζεται για 5 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί ένα 15λεπτο στάδιο υπερήχησης μέσα σε ένα απλό υπερηχητικό υδατόλουτρο με μια μοναδική ένταση υπερήχησης. Έπειτα προστίθεται 70% φορμικό οξύ, και το δοκιμαστικό σωληνάριο στο οποίο γίνεται η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος περιδινίζεται ξανά για 10 δευτερόλεπτα και γίνεται μια τελευταία φυγοκέντρωσή του για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Στην συνέχεια, 1 μl από το υπερκείμενο, που αποτελεί το τελικώς λαμβανόμενο εκχύλισμα με τις μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες, τοποθετείται σε μια θέση της μεταλλικής μικροπλάκας του MALDI, αφήνεται να στεγνώσει καλά και καλύπτεται με 1 μl matrix α-κυανο-4-υδρόξυ-κινναμωμικό οξύ (HCCA). Μόλις στεγνώσει το δείγμα είναι έτοιμο να τοποθετηθεί στον MALDI-TOF MS αναλυτή.<sup>10</sup>

Το πρωτόκολλο ανάδευσης με σφαιρίδια είναι το δεύτερο πρωτόκολλο, όπου το δείγμα αναδεύεται με σφαιρίδια ώστε να επιτευχθεί καλύτερα η μηχανική ρήξη των μυκοβακτηριδιακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Στην πράξη, η αρχική διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος συνεχίζεται σε αυτή την περίπτωση με την προσθήκη 10 μl σφαιριδίων ζirkονίου/πυριτίου και τα βακτήρια αναδεύονται με αυτά για ένα λεπτό, χωρίς να έχει όμως αφαιρεθεί η αιθανόλη. Κατόπιν το υγρό εναιώρημα μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται στις μέγιστες στροφές. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο πλήρως, και το ίζημα υπό μορφή σφαιριδίου στεγνώσει, ακολουθούνται τα επόμενα βήματα εκχύλισης των πρωτεϊνών. Πρώτα προστίθεται φορμικό οξύ κι αφήνεται να επωαστεί για 5-10 λεπτά. Εν συνεχεία, προστίθεται και ακετονιτρίλιο. Το σωληνάριο περιδινίζεται για 20 δευτερόλεπτα κι ακολουθεί φυγοκέντρηση 2 λεπτών στη μέγιστη ταχύτητα. Το τελευταίο βήμα είναι κι εδώ η λήψη 1 μl από το υπερκείμενο και η ανάλυσή του με MALDI-TOF MS, αφού στεγνώσει και καλυφθεί με 1 μl από HCCA matrix επάνω στην μεταλλική πλάκα.<sup>11</sup>

Τέλος, το πρωτόκολλο MycoEX προέρχεται από τους κατασκευαστές του MALDI Biotyper της εταιρείας

Bruker Daltonics. Σύμφωνα με αυτό, ακολουθείται η αρχικά περιγραφόμενη διαδικασία με αφαίρεση της αιθανόλης και κατόπιν γίνεται προσθήκη ακετονιτρίλιου και σφαιριδίων ζirkονίου/πυριτίου, με επακόλουθη περιδίνιση διάρκειας ενός λεπτού του σωληναρίου προετοιμασίας του δείγματος. Παρομοίως με τα προηγούμενα πρωτόκολλα, προστίθεται φορμικό οξύ 70%, μετά ακολουθεί περιδίνιση 10 δευτερολέπτων και φυγοκέντρηση 2 λεπτών στη μέγιστη ταχύτητα. Τελικά 1 μl από το υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται και σε αυτή την περίπτωση με υπερκάλυψή του από 1 μl HCCA matrix, αφού έχει στεγνώσει, για να γίνει ανάλυση με την τεχνική MALDI-TOF MS.<sup>12</sup>

Αντίστοιχα η εταιρεία bioMérieux για το Vitek MS σύστημά της έχει αναφέρει παρόμοια διαδικασία προετοιμασίας δείγματος, με εναιώρηση του δείγματος των μυκοβακτηριδίων σε διάλυμα αιθανόλης που ακολουθείται από μηχανική ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος χρησιμοποιώντας σφαιρίδια πυριτίου. Τα ακόλουθα και στην παραπάνω διαδικασία βήματα για την εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι η προσθήκη φορμικού οξέος κι ακετονιτρίλιου.<sup>13,14</sup> Σημειώνεται τέλος ότι από τη στιγμή που το δείγμα θα αδρανοποιηθεί, οι χρόνοι που χρειάζονται για τις διαδικασίες της υπερήχησης, του χτυπήματος με τα σφαιρίδια και του πρωτοκόλλου MycoEX είναι αντίστοιχα 40, 45 και 30 λεπτά.<sup>4</sup>

## 5. Κριτήρια ερμηνείας για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS

Τα ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά των μυκοβακτηριδίων, όπως αναφέρθηκε, έχουν σταθεί ως μεγάλη πρόκληση για την τεχνική MALDI-TOF MS, κάτι που δε θα μπορούσε να μην αποτυπωθεί και στα ερμηνευτικά κριτήρια των τιμών για την ταυτοποίησή τους. Έτσι λοιπόν για το σύστημα MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) η τιμή log (score) που είναι παραδεκτή για ταυτοποίηση υψηλής αξιοπιστίας των μυκοβακτηριδίων έχει καθιερωθεί στο  $\geq 1.8$  αντί του  $\geq 2.0$  που χρησιμοποιείται για τα περισσότερα βακτηρίδια, και η τιμή όριο (cut-off) για τη χαμηλής αξιοπιστίας ταυτοποίηση είναι στο  $\geq 1.6$  αντί του  $\geq 1.7$ .<sup>15</sup> Για το δε Vitek MS σύστημα της bioMérieux το κατώφλι για την αξιόπιστη ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους έχει καθιερωθεί στο  $>90\%$  για τα μυκοβακτηρίδια, αν και τιμές score ανάμεσα στο 80% κι 90% γίνονται επίσης αποδεκτές σαν αξιόπιστες. Αποτελέσματα ταυτοποιήσεων ανάμεσα σε τιμές 60% κι 80% θεωρούνται ως χαμηλής εμπιστοσύνης και αξιοπιστίας και ίσως ανταποκρίνονται μόνο σε επίπεδο γένους. Ενώ αποτελέσματα με τιμή score κάτω από 60% δε θεωρούνται αξιόπιστα για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων.<sup>16</sup>



Αρκετές μελέτες έχουν συμφωνήσει επί του παρόντος ότι αυτά τα χαμηλότερα κατώφλια τιμών score για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με τη MALDI-TOF MS είναι πιο κατάλληλα για αυτούς τους μικροοργανισμούς, καθώς παρατήρησαν με αυτά αυξημένη συχνότητα ταυτοποίησής τους, επομένως είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά.<sup>4</sup> Μια αρκετά πρόσφατη δημοσίευση από τους Rodriguez-Temporal και συν. (2020) πρότεινε το κατώφλι για την υψηλής αξιοπιστίας ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων να τεθεί στο  $\geq 2.0$ . Ωστόσο, σημειώνει πως το εύρος τιμών score από 1.60 έως 1.99 ήταν έγκυρο για σχεδόν όλα τα είδη μυκοβακτηριδίων που ανέλυσαν οι ερευνητές, με εξαίρεση τα *Mycobacterium angelicum*, *Mycobacterium parascrofulaceum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum* και *Mycobacterium gastri*, τα οποία απαιτούσαν υψηλότερες τιμές score  $\geq 2.0$ .<sup>17</sup>

Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό πως δεν έχει ομόφωνα οριστεί ένα παγκοσμίως αποδεκτό κατώφλι τιμών που να ακολουθείται ανεξαιρέτως για την ερμηνεία της ταυτοποίησης των διαφόρων ειδών των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS. Αναμφίβολα, και άλλες τρέχουσες και μελλοντικές μελέτες θα βοηθήσουν στο να εκτιμηθούν καλύτερα τα κριτήρια ερμηνείας των τιμών score που λαμβάνονται σαν αποτελέσματα της MALDI-TOF MS ανάλυσης σε στελέχη μυκοβακτηριδίων. Με τον τρόπο αυτό θα επιτυγχάνεται η ακριβέστερη δυνατή ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών χρησιμοποιώντας κοινά κριτήρια ερμηνείας των τιμών score σε όλα τα κλινικά εργαστήρια.

## 6. Βάσεις δεδομένων φασμάτων μαζών μυκοβακτηριδιακών ειδών

Το θεμέλιο στο οποίο στηρίζεται η ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την διαδικασία MALDI-TOF MS είναι οι βάσεις δεδομένων (databases) που αποτελούν βιβλιοθήκες αποθήκευσης φασμάτων αναφοράς που ανήκουν σε γνωστά είδη. Η διαδικασία μέσω της οποίας θα γίνει η αναγνώριση του είδους μυκοβακτηριδίου του εξεταζόμενου δείγματος, περιλαμβάνει τη σύγκριση του φάσματος που θα αποκτηθεί μέσω της ανάλυσής του με τα διαθέσιμα φάσματα μυκοβακτηριδιακών ειδών της χρησιμοποιούμενης βάσης δεδομένων. Η σύγκριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση αλγορίθμου που εφαρμόζεται από το λογισμικό που βρίσκεται ενσωματωμένο στον αναλυτή MALDI-TOF MS. Είναι κατανοητό ότι όσο μεγαλύτερη σε εύρος είναι η εκπροσώπηση καλά αναγνωρισμένων φασμάτων μυκοβακτηριδιακών ειδών κλινικού ενδιαφέροντος στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιείται, τόσο

πιθανότερη είναι η αξιόπιστη ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού των εξεταζόμενων μυκοβακτηριδιακών στελεχών.

Οι κατασκευαστές των πιο διαδεδομένων συστημάτων MALDI-TOF MS φροντίζουν ώστε να επεκτείνονται συνεχώς οι βάσεις δεδομένων με καινούρια προφίλ φασμάτων αναφοράς, με σκοπό να καλύψουν τα είδη μικροοργανισμών με κλινική σημασία. Η προοδευτικά αυξανόμενη ποικιλία των πρότυπων φασμάτων μικροοργανισμών στις βάσεις δεδομένων έχει επιφέρει τα τελευταία χρόνια αύξηση του αριθμού των ταυτοποιήσεων στελεχών από κλινικά δείγματα σε επίπεδο είδους, ή έστω γένους, όπως διαπιστώνεται στη ρουτίνα των κλινικών εργαστηρίων που διαθέτουν αναλυτή MALDI-TOF MS.<sup>9</sup>

Αυτός ο προοδευτικά αυξανόμενος με το πέρασμα του χρόνου αριθμός φασμάτων αναφοράς, αντικατοπτρίστηκε και στις εμπορικά διαθέσιμες βάσεις δεδομένων των μυκοβακτηριδιακών φασμάτων. Στην πλατφόρμα της Bruker Daltonics η έκδοση 3.0 της βάσης δεδομένων (Mycobacteria db v3.0) περιελάμβανε 853 προφίλ πρωτεϊνικών φασμάτων από 149 διαφορετικά είδη μυκοβακτηριδίων το έτος 2015. Η έκδοση Mycobacteria Library v 5.0 που βγήκε διαθέσιμη στην αγορά το 2017 αντιπροσωπεύει μια σημαντική βελτίωση με ένα σύνολο 912 προφίλ φασμάτων προερχόμενων από 164 είδη μυκοβακτηριδίων. Η τελευταία βάση δεδομένων της Bruker Daltonics για το MALDI Biotyper είναι η Mycobacteria db v6.0, διαθέσιμη από το 2019, με συνολικά 1.038 φάσματα από 178 διαφορετικά είδη μυκοβακτηριδίων.<sup>14</sup>

## 7. Περιορισμοί της MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων

Οι περιορισμοί που ακόμη απαντώνται είναι η αδυναμία της MALDI-TOF MS τεχνολογίας να διακρίνει αποτελεσματικά βάσει των πρωτεϊνικών φασμάτων τους, είδη μυκοβακτηριδίων τα οποία έχουν πολύ στενή φυλογενετική συσχέτιση μεταξύ τους. Υπάρχουν στο γένος των μυκοβακτηριδίων ομάδες ειδών που παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομοιότητα. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και στα παραγόμενα από αυτά τα είδη φάσματα όταν αναλύονται με την MALDI-TOF MS. Τα φάσματα αυτά για τις αναλυτικές ικανότητες της μεθόδου θεωρούνται πανομοιότυπα. Επομένως κάτι τέτοιο δεν επιτρέπει την ορθή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.

Τα είδη τα οποία κατατάσσονται στο MTBC περιλαμβάνουν τα *M. tuberculosis*, *M. africanum*, και τα σχετιζόμενα με ζώα *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* και το *M. canettii*. Τα είδη αυτά του MTBC επιδεικνύουν πολύ υψηλό επίπεδο ομοιότητας. Έχει

βρεθεί με Sequencing ότι τα είδη αυτά μοιράζονται κατά 99% ίδιες αλληλουχίες στο γονιδίωμά τους. Η ταυτοποίηση αυτών των ειδών με την τεχνική της MALDI-TOF MS γίνεται ως μέλη του MTBC με υψηλή ευαισθησία κι ειδικότητα,<sup>19,20</sup> ενώ πιο ακριβής ταυτοποίησή τους στο επίπεδο του είδους δεν είναι για την ώρα εφικτή.<sup>21</sup>

Όσον αφορά τα NTM, στενά σχετιζόμενα γενετικά είδη τα οποία επίσης αδυνατεί να διαφοροποιήσει μεταξύ τους η MALDI-TOF MS τεχνική είναι τα είδη που απαρτίζουν το σύμπλεγμα του *Mycobacterium abscessus complex* (MABS). Μέλη του MABS είναι τα *M. abscessus subspecies abscessus*, *M. abscessus subspecies bolletii* και *M. abscessus subspecies massiliense*. Άλλο παράδειγμα είναι τα NTM μυκοβακτηρίδια *M. setense*, *M. peregrinum* και *M. porcinum* τα οποία δεν μπορεί να διακριθούν στην ταυτοποίησή τους αξιόπιστα το ένα από το άλλο, και λαμβάνεται με την MALDI-TOF MS λανθασμένη ταυτοποίηση ανάμεσα σε αυτά τα είδη. Γι' αυτό το αποτέλεσμα, και σε αυτήν την περίπτωση ευθύνεται η στενή φυλογενετική συσχέτιση των συγκεκριμένων ειδών τα οποία κι ομαδοποιούνται στο σύμπλεγμα *Mycobacterium fortuitum complex*. Άλλες περιπτώσεις που δηλώνουν την υψηλή γενετική ομοιότητα κάποιων ειδών NTM, η οποία και καθιστά ακόμη δυσχερή την ορθή ταυτοποίησή τους με την MALDI-TOF MS, είναι το *M. scrofulaceum* στενά σχετιζόμενο με το *M. parascrofulaceum* καθώς και το *M. kansasii* που κι αυτό μπορεί να ταυτοποιηθεί λανθασμένα όταν αναλυθεί με την MALDI-TOF MS ως *M. gastri* λόγω της ισχυρής τους φυλογενετικής συσχέτισης.<sup>17</sup>

Στο *Mycobacterium avium complex* (MAC) περιλαμβάνονται τα *M. avium*, *M. intracellulare* και *M. chimaera*. Είναι κι αυτά είδη NTM μυκοβακτηριδίων που εξαιτίας του υψηλού βαθμού γενετικής ομοιότητας που παρουσιάζουν παράγουν παρόμοια φάσματα που δυσχεραίνουν το διαχωρισμό τους με την MALDI-TOF MS ανάλυσης.<sup>22</sup> Αποτελούν λοιπόν, όπως και τα παραπάνω που αναφέρθηκαν, αλλά και όλα τα φυλογενετικώς στενά σχετιζόμενα μεταξύ τους μυκοβακτηριδιακά είδη, πεδίο έντονης ερευνητικής πρόκλησης, ώστε να κατορθωθεί με MALDI-TOF MS η ορθή κι αξιόπιστη ταυτοποίησή τους στο επίπεδο του είδους ή και υποείδους τους. Το *M. chimaera*, μέλος του MAC, έχει προξενήσει παγκόσμια ανησυχία για τη δημόσια υγεία, εξαιτίας των σοβαρών λοιμώξεων που διαπιστώθηκε ότι μπορεί να προκαλέσει, μετά από μια παρατεταμένη επιδημία λοιμώξεων με τον μικροοργανισμό αυτό οι οποίες εμφανίζονταν κατόπιν επεμβάσεων ανοικτής καρδιάς.<sup>23</sup> Οι λοιμώξεις από το *M. chimaera* χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη λανθάνουσα περίοδο μετά την καρδιοχειρουργική επέμβαση που φτάνει τα 1,5 έως 3,6 έτη. Οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης περιλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδα, ηπατίτιδα, νεφρίτιδα,

εγκεφαλίτιδα και χοριοαμφιβληστροειδίτιδα. Το συγκεκριμένο μυκοβακτηρίδιο ανιχνεύθηκε μέσω καλλιέργειών που πάρθηκαν από τα κυκλώματα νερού των μονάδων θέρμανσης/ψύξης των συσκευών που χρησιμοποιούνται στο δίκτυο της εξωσωματικής κυκλοφορίας για τη μηχανική υποστήριξη του κυκλοφορικού και του αναπνευστικού συστήματος κατά τη διάρκεια των καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων. Έτσι οι μολυσμένες με το *M. chimaera* αυτές συσκευές θεωρήθηκαν ο αιτιολογικός παράγοντας που προξένησε το παγκόσμιο αυτό κύμα επιδημίας, με περισσότερα από 100 περιστατικά παγκοσμίως.<sup>24</sup>

Κι είναι τόσο η ανησυχία για το *M. chimaera*, όσο και οι όλο και συχνότερες σοβαρές λοιμώξεις από NTM κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους αλλά και σε ανοσοεπαρκείς, που ώθησε την Αμερικανική Εταιρεία Θώρακος και την Εταιρεία Λοιμωδών Νοσημάτων της Αμερικής (ATS/IDSA) αλλά και τη Βρετανική Εταιρεία Θώρακος να προβούν σε σύσταση να παρέχεται αναφορά της ταυτοποίησης των NTM που απομονώνονται από κλινικά δείγματα ασθενών σε επίπεδο είδους, ώστε να μπορεί να τεκμηριωθεί η κλινική σημασία τους στη διάγνωση λοίμωξης.<sup>4,71,72</sup>

Η ανάλυση με την MALDI-TOF MS των μυκοβακτηριδιακών πρωτεϊνικών φασμάτων δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ του φάσματος που παράγει το *M. chimaera* και του φάσματος του *M. intracellulare*, με αποτέλεσμα και τα δύο αυτά διαφορετικά είδη να αναγνωρίζονται ως ομάδα *M. intracellulare/M. chimaera*.<sup>17</sup> Πρόσφατες προσπάθειες ωστόσο να βελτιωθούν οι δυνατότητες διάκρισης των πρωτεϊνικών φασμάτων των στενά συσχετιζόμενων γενετικά μυκοβακτηριδιακών ειδών, επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη και χρήση ισχυρότερων λογισμικών. Τα λογισμικά αυτά αναλύουν τα προφίλ των φασμάτων ανιχνεύοντας επιπλέον χαρακτηριστικές και ειδικές για το κάθε ξεχωριστό είδος μυκοβακτηριδίου κορυφές, με σκοπό να καταφέρουν να διαφοροποιούν μεταξύ τους φάσματα μαζών πολύ στενά συσχετιζόμενων μυκοβακτηριδιακών ειδών. Στην περίπτωση των *M. intracellulare* και *M. chimaera* η MALDI-TOF MS ανάλυση για την αναγνώριση διακριτών κορυφών φασμάτων ειδικών για το *M. intracellulare* και κορυφών ειδικών για το *M. chimaera* κατόρθωσε να πετύχει τη διαφοροποίηση στην ταυτοποίηση μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Σε πρόσφατη δημοσίευση των Pranada και συν. (2017) αναφέρεται ότι ένα νέο λογισμικό με ισχυρότερο αλγόριθμο, ο οποίος ανιχνεύει την παρουσία ειδικών για το είδος κορυφών των πρωτεϊνικών φασμάτων, ονομαζόμενο "the subtyping module" του MALDI Biotyper, έχει αναπτυχθεί και προσφέρει τη δυνατότητα της αυτόματης διάκρισης μεταξύ των ειδών *M. intracellulare* και *M. chimaera*.<sup>27</sup> Ακόμη βέβαια αυτή η νέα εφαρμογή δεν είναι διαθέσιμη σε όλα τα κλινικά μι-



κροβιολογικά εργαστήρια που χρησιμοποιούν την MALDI-TOF MS τεχνολογία, ενώ για την ώρα δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες αξιολόγησής της.<sup>28</sup>

## 8. MALDI-TOF MS ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των μυκοβακτηριδίων

Ένα πεδίο που τελευταία έχει αρχίσει να εξερευνάται κι εκφράζονται μεγάλες προσδοκίες ότι μπορεί να έχει τη δύναμη να ξεκλειδώσει νέες δυνατότητες στη διαγνωστική των μυκοβακτηριδίων είναι η μελέτη του λιπιδικού προφίλ φασμάτων μαζών για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την τεχνική MALDI-TOF MS. Κι αυτό εξαιτίας της μεγάλης αφθονίας λιπιδίων από τα οποία συντίθεται το κυτταρικό τους τοίχωμα. Αρκετές είναι οι ερευνητικές ομάδες που εργάζονται με κατεύθυνση να αποδείξουν πως η MALDI-TOF MS που προσεγγίζει τα λιπίδια ως αποτυπώματα των μικροοργανισμών, μπορεί να αποτελέσει τη μεγάλη ανατροπή στην ταχεία ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών, ακόμη κι αυτών που είναι φυλογενετικά στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, αλλά και να συντελέσει στον καθορισμό της ευαισθησίας ή αντοχής τους στα αντιφυματικά φάρμακα. Η συμβατική MALDI-TOF MS με βάση τα πρωτεϊνικά φάσματα μαζών των μυκοβακτηριδίων έχει τα μειονεκτήματα ότι απαιτεί εκτενή πρωτόκολλα προετοιμασίας του δείγματος, ενώ δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ τους και να ταυτοποιήσει σωστά κάποια είδη ή υποείδη που βρίσκονται στο ίδιο γένος ή σύμπλεγμα, όπως για παράδειγμα στο MTBC.

Στα μυκοβακτηρίδια έχουν αναγνωριστεί και περιγραφεί αρκετά λιπίδια ειδικά για το κάθε είδος. Τα μυκολικά οξέα είναι μοναδικά μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα τα οποία επιδεικνύουν υψηλή δομική ποικιλομορφία με διαφοροποιήσεις στο μήκος της αλυσίδας τους, στο επίπεδο της ακορεστότητας και της ύπαρξης χημικών ομάδων όπως οι κετόνες και τα μεθοξύλια. Αυτό το υψηλό επίπεδο ποικιλότητας εφοδιάζει τα μυκολικά οξέα με χαρακτηριστικά ειδικά του είδους του μυκοβακτηριδίου κι επομένως τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι προς ανάλυση με την MALDI-TOF MS τεχνική για ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.<sup>29,30,31</sup> Εκτός από τα μυκολικά οξέα κι άλλα λιπίδια έχει διαπιστωθεί ότι είναι ειδικά για συγκεκριμένα είδη μυκοβακτηριδίων. Για παράδειγμα τα σουλφογλυκολιπίδια 1 (SL-1) και οι πολυακυλοτρεχαλόζες (PATs) απαντώνται αποκλειστικά στο MTBC, ενώ άλλα λιπίδια όπως τα γλυκοπεπτιδολιπίδια της C-μυκοσίδης (GPLs) και οι πολυφυλλικές τρεχαλόζες (TPPs) παρουσιάζονται μόνο στα NTM.<sup>32,33</sup>

Μια πρωτοποριακή μέθοδος αναπτύχθηκε πρόσφατα από τους Larrouy-Maumus και Puzo (2015) η

οποία περιγράφει ως δυνατή την άμεση ανάλυση με MALDI-TOF MS των λιπιδίων σε άθικτα μικροβιακά κύτταρα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως πρόκειται για μια προσέγγιση που περιλαμβάνει μια γρήγορη κι απλή προετοιμασία του μικροβιακού δείγματος. Κατ' αυτήν δε χρειάζεται καμία χημική κατεργασία ούτε εκχύλιση του δείγματος πριν να εισαχθεί στο μηχάνημα της MALDI-TOF MS ανάλυσης. Η διαδικασία που ακολούθησαν περιγράφει αρχικά την αδρανοποίηση με θέρμανση των μυκοβακτηριδίων. Κατόπιν οι μικροοργανισμοί ξεπλένονται 3 φορές με διπλά απεσταγμένο νερό και τοποθετούνται στη μεταλλική πλάκα του αναλυτή MALDI-TOF MS, καλυπτόμενοι από ένα ειδικό matrix. Το ειδικό αυτό matrix αποτελείται από ένα μίγμα 9:1 διυδροξυβενζοϊκού οξέος και 2-υδροξυ-5-μεθοξυβενζοϊκού οξέος (super-DHB) διαλυμένο σε έναν μη πολικό διαλύτη.<sup>34,35</sup> Το super-DHB matrix επιλέχθηκε λόγω της ικανότητάς του να επιτρέπει την αποδοτική ανάλυση των λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων με την τεχνική MALDI-TOF MS.<sup>36</sup>

Αντιπροσωπευτική κι αξιολογημένη μελέτη της προσπάθειας που γίνεται να αξιοποιηθούν τα ειδικά για κάθε είδος μυκοβακτηριδίων εκφραζόμενα στην επιφάνειά τους λιπίδια ανιχνεύοντάς τα με την MALDI-TOF MS τεχνική, είναι αυτή των Gonzalo και συν. (2021). Στη μελέτη τους αξιολόγησαν την μεθοδολογία που είχε περιγραφεί από τους Larrouy-Maumus και Puzo, εφαρμόζοντας ανάλυση των λιπιδίων από ακέραια και αδρανοποιημένα με θέρμανση μυκοβακτηρίδια χρησιμοποιώντας την MALDI-TOF MS. Το δείγμα που χρησιμοποιήσαν ήταν 273 μυκοβακτηριδιακά στελέχη που προέρχονταν τόσο από το MTBC, όσο και από τα NTM. Το ειδικό matrix που χρησιμοποίησαν ήταν το super-DHB matrix διαλυμένο σε 9:1 χλωροφόρμιο και μεθανόλη, ενώ η καταγραφή των φασμάτων μαζών των λιπιδίων έγινε με τη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων όσο και με την αρνητικών ιόντων σε αναλυτή MALDI-TOF MS. Σκοπός της μελέτης ήταν να καθιερωθεί μια μεθοδολογία ώστε να διακρίνονται τα MTBC στελέχη από τα NTM και να ταυτοποιούνται τα NTM στελέχη. Όλα αυτά χρησιμοποιώντας τη βασιζόμενη σε λιπίδια ειδικά του είδους των μυκοβακτηριδίων MALDI-TOF MS ανάλυση σε ακέραια μυκοβακτηρίδια. Τα MTBC στελέχη της μελέτης υποβλήθηκαν σε Whole-Genome Sequencing (WGS) ως μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίησή τους, ενώ τα NTM που περιλήφθηκαν ήταν στελέχη αναφοράς, προερχόμενα από το δίκτυο εργαστηρίων αναφοράς του European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Τα δείγματα αναλύθηκαν στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών και αρνητικών ιόντων, η επεξεργασία των φασμάτων μαζών των λιπιδίων έγινε με το λογισμικό του αναλυτή, ενώ η αναγνώριση ως MTBC ή NTM έγινε τυφλά, μετά από οπτική ερμηνεία των φασμάτων μα-

ζών από τους ερευνητές, ακολουθώντας κριτήρια προηγούμενων δημοσιεύσεων.<sup>34</sup> Η ταυτοποίηση ενός στελέχους ως στελέχους του MTBC έγινε με την αναγνώριση των ειδικών γι' αυτό SL-1, με καλύτερη απόδοση στη λειτουργία ανίχνευσης αρνητικών ιόντων. Για την ομάδα των NTM στελεχών η ταυτοποίηση κατορθώθηκε καλύτερα στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων. Οι ερευνητές διαπίστωσαν πως ο ιονισμός των ειδικών λιπιδίων για κάθε NTM είδος επέφερε παραγωγή φασμάτων μαζών των λιπιδίων αυτών, τα οποία ήταν μοναδικά και καλά διακριτά μεταξύ τους, επιτρέποντας την ξεκάθαρη διάκριση και ταυτοποίηση των NTM στελεχών που αναλύθηκαν στη μελέτη. Στα συμπεράσματα της μελέτης τους οι ερευνητές σημειώνουν ότι η εν λόγω μέθοδος είναι γρήγορη, καθώς ολοκληρώνεται σε περίπου 10 λεπτά, και χρειάζεται σε αριθμό λιγότερα από 1.000 μυκοβακτηρίδια, γεγονός που την κάνει αρκετά ευαίσθητη κι εξαιρετικά χρήσιμη στο κλινικό εργαστήριο. Ακόμη, αυτή η μέθοδος πέτυχε στη μελέτη ακριβή ταυτοποίηση με 96.7% ευαισθησία και 91.7% ειδικότητα για τα στελέχη εκείνα τα οποία παρήγαγαν αναγνωρίσιμο φάσμα μαζών λιπιδίων. Τέτοια ποσοστά είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικός, καθιστώντας την MALDI-TOF MS τεχνική με τη χρήση των λιπιδίων έναν καινούριο ευκολότερο, ταχύτερο κι αξιόπιστο τρόπο ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων.<sup>37</sup>

Η ανάγκη για επιπλέον μελέτες είναι μεγάλη, καθώς επιβάλλεται σε αυτή τη φάση η ανάπτυξη εργαλείων βιοπληροφορικής για την ανάλυση των φασμάτων μαζών των λιπιδίων των μικροβίων που λαμβάνονται με την MALDI-TOF MS ανάλυση. Βάσεις δεδομένων με προφίλ φασμάτων μαζών λιπιδίων από γνωστά, με πρότυπη μέθοδο ταυτοποιημένα, μυκοβακτηριδιακά είδη θα πρέπει να δημιουργηθούν, που να είναι συγκρίσιμες σε μέγεθος με τις υπάρχουσες των πρωτεϊνικών προφίλ φασμάτων μαζών, ώστε να επιτυγχάνεται πιο ακριβής και πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση των υπό ανάλυση δειγμάτων μυκοβακτηριδίων.<sup>38</sup> Με πλούσιες κι ισχυρές βάσεις δεδομένων και με τελευταίας τεχνολογίας λογισμικά για την ανάλυση των λιπιδικών φασμάτων μαζών και τη σύγκρισή τους με εκείνα που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του αναλυτή, θα είμαστε σε θέση να ταυτοποιούμε τα μυκοβακτηριακά είδη ταχέως και λεπτομερώς με την MALDI-TOF MS τεχνική που στηρίζεται στα λιπίδιά τους.<sup>37</sup>

## 9. MALDI-TOF MS και τυποποίηση των μυκοβακτηριδίων

Η προσοχή των ερευνητών έχει στραφεί σε μεγάλο βαθμό προς την κατεύθυνση της αναγνώρισης, με την τεχνική MALDI-TOF MS, μυκοβακτηριδίων που σχετί-

ζονται πολύ στενά γενετικά μεταξύ τους κι αποτελούν υποείδη ή διαφορετικά στελέχη ίδιου είδους. Τέτοια παραδείγματα χάρη είναι το MTBC και το MABS. Η παραπάνω αναγνώριση, όπως έχουμε αναφέρει, δεν είναι εφικτή μέχρι τώρα, αν βασιστούμε μόνο στην ανάλυση των πρωτεϊνικών φασμάτων μαζών που προέρχονται από τα μυκοβακτηριδιακά είδη και υποείδη. Η τυποποίηση σε επίπεδο υποείδους ή στελέχους είναι χρήσιμη, όχι μόνο γιατί παρέχει την ακριβέστερη διάγνωση του παθογόνου μυκοβακτηριδίου που προκαλεί τη λοίμωξη, αλλά και γιατί μπορεί να καθοδηγήσει σε μερικές περιπτώσεις εγκαίρως την αντιβιοτική αγωγή προς την καλύτερη επιλογή, συνεπώς να πετύχει καλύτερη έκβαση της θεραπείας. Το τελευταίο υπογραμμίζεται εντόνως στην περίπτωση των υποειδών μυκοβακτηριδίων που ανήκουν στο MABS, η διαφοροδιάγνωση μεταξύ των οποίων είναι σημαντική, καθώς έχουν διαφορετική ευαισθησία στις μακρολίδες. Κι είναι αυτά τα μέλη του MABS που διάλεξαν οι Jia Khor και συν (2021) ώστε να επιχειρήσουν να τα ξεχωρίσουν, διαφοροποιώντας τα σε επίπεδο υποείδους, με τη χρήση της MALDI-TOF MS ανάλυσης των λιπιδίων τους.<sup>5</sup> Τα μυκοβακτηρίδια του MABS κατηγοριοποιούνται σε τρία υποείδη, τα οποία είναι το *M. abscessus* subsp. *abscessus*, το *M. abscessus* subsp. *bolletii* και το *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Από αυτά, το *M. abscessus* subsp. *massiliense* είναι ευαίσθητο στις μακρολίδες, ενώ τα *M. abscessus* subsp. *abscessus* και *M. abscessus* subsp. *bolletii* εμφανίζουν συχνά αντοχή σε αυτές. Έτσι η γρήγορη κι αξιόπιστη αναγνώριση των υποειδών αυτών θα ήταν καθοριστικής σημασίας για την κλινική πράξη. Οι ερευνητές στην παραπάνω μελέτη, χρησιμοποίησαν εννιά στελέχη αναφοράς μυκοβακτηριδιακών υποειδών του MABS, των οποίων τα λιπίδια επιφάνειάς τους ανέλυσαν με την MALDI-TOF MS τεχνική, όπως είχε περιγραφεί κι από τους Gonzalo και συν.<sup>37</sup> Το διαφορετικό που έκαναν είναι πως χρησιμοποίησαν αιθανόλη ως διαλύτη του super-DHB matrix αντί για χλωροφόρμιο και μεθανόλη, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα τοξικοί οργανικοί διαλύτες. Κάνοντας πολλαπλές δοκιμές στην ερευνά τους, βρήκαν ότι ο συνδυασμός του super-DHB matrix σε 25% αιθανόλη, η οποία είναι ένας οργανικός διαλύτης που υπάρχει σε όλα τα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια, με ένα εναιώρημα 2.0 της κλίμακας Mc Farland από άθικτα μυκοβακτηρίδια αδραντοποιημένα με θέρμανση στους 95°C για 30 λεπτά, παρείχε κατόπιν MALDI-TOF MS ανάλυσης τα καλύτερης ποιότητας λιπιδικά φάσματα μαζών των εξεταζόμενων στελεχών της μελέτης. Βελτιστοποιήσαν έτσι από τη μια πλευρά την ποσότητα της μυκοβακτηριδιακής βιομάζας που τοποθετείται στη μεταλλική πλάκα της MALDI-TOF MS. Ενώ από την άλλη ανακάλυψαν την καλύτερη συγκέντρωση της αι-



θανόλης στην οποία πρέπει να διαλυτοποιείται το super-DHB matrix ώστε να είναι αποτελεσματική η πάνω στην πλάκα εκχύλιση των επιφανειακών μυκοβακτηριδιακών λιπιδίων και η κρυσταλλοποίηση του δείγματος με το matrix. Εν συνεχεία ανέλυσαν τα δείγματα των γνωστών πρότυπων στελεχών υποειδών του MABS που είχαν προέλθει από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς (National Mycobacterium Reference-NMRS-South, United Kingdom) σε αναλυτή MALDI Biotyper Sirius της Bruker Daltonics στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων. Τα προφίλ φασμάτων μαζών λιπιδίων που έλαβαν ήταν υψηλής ποιότητας κι ευκρίνειας, σε βαθμό που επέτρεψαν να διακριθούν μεταξύ τους τα τρία υποείδη. Συγκεκριμένα, υπήρχαν εύκολα αναγνωρίσιμες διαφορές στις κορυφές των λιπιδιακών φασμάτων μαζών των τριών υποειδών μυκοβακτηριδίων του MABS. Όπως σημειώνουν οι ερευνητές, τα δεδομένα της μελέτης τους, παρόλο που αυτή συμπεριέλαβε μικρό αριθμό στελεχών (μόλις εννέα), υποδηλώνουν πως η MALDI-TOF MS ανάλυση των ειδικών μυκοβακτηριδιακών λιπιδίων κατέχει τη δυναμική να διακρίνει τα υποείδη μέσα στο σύμπλεγμα MABS.<sup>5</sup>

Το βέβαιο είναι πως κατόπιν αυτών των αποτελεσμάτων ανοίγει ο δρόμος για περισσότερες μελέτες της καινούριας αυτής προσέγγισης ταυτοποίησης των ειδών αλλά και των υποειδών μυκοβακτηριδίων. Αυτό δείχνει πως ενδεχομένως έχει γίνει ένα μεγάλο βήμα προς την επίτευξη μιας εξαιρετικά ταχείας αλλά κι αξιόπιστης μεθόδου βακτηριακής τυποποίησης των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS τεχνολογία αξιοποιώντας τα λιπίδιά τους. Μια τέτοια προοπτική θα ωθήσει σε μεγάλο βαθμό τόσο την ταχύτερη κι αποτελεσματικότερη διαγνωστική και θεραπευτική αντιμετώπιση των μυκοβακτηριδιακών λοιμώξεων, αλλά και την επιδημιολογική διερεύνηση και φυλογενετική ταξινόμηση των απομονούμενων στελεχών μυκοβακτηριδίων.

## 10. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Ο χρόνος που χρειάζεται για την αξιόπιστη ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών έχει μειωθεί θεα-

ματικά με την εφαρμογή της MALDI-TOF MS μεθοδολογίας. Η εδραίωση πρωτοκόλλων αδρανοποίησης και προετοιμασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων έχει καταστήσει την τεχνική ταυτοποίησής τους με την MALDI-TOF MS προσιτή στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Οι συνεχώς αναβαθμισμένες διαθέσιμες βάσεις δεδομένων με φάσματα μαζών αναφοράς, καθώς και τα όλο και μεγαλύτερης αναλυτικής διακριτικής ικανότητας λογισμικά προσέθεσαν μαζί με την ταχύτητα και την ανάλογη ακρίβεια στην ταυτοποίηση ολοένα και περισσότερων ειδών.

Τεράστιο βήμα προς την ακόμη ταχύτερη αναγνώριση των μυκοβακτηριδιακών ειδών θα είναι η άμεση εφαρμογή της MALDI-TOF MS ανάλυσης των επιφανειακών λιπιδίων σε δείγματα με άθικτα αδρανοποιημένα μυκοβακτηρίδια, χωρίς το στάδιο της προετοιμασίας πρωτεϊνικού τους εκχυλίσματος, κάτι που προωθείται επί του παρόντος με αρκετά επιτυχημένες μελέτες.

Ο επιτυχής διαχωρισμός στενά συσχετιζόμενων μυκοβακτηριδιακών ειδών αλλά και υποειδών, η επίτευξη του οποίου περιορίζεται για την ώρα από τις τρέχουσες δυνατότητες της τεχνικής, είναι ένα άλλο στοίχημα που έχουν βαλθεί να κερδίσουν οι ερευνητές και προς αυτή την κατεύθυνση διεξάγονται ελπιδοφόρες μελέτες.

Σίγουρα, με τις όλο και πιο ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων, με τα συνεχώς και πιο ισχυρά εργαλεία βιοπληροφορικής και με το συνδυασμό της MALDI-TOF MS ανάλυσης των πρωτεϊνών όσο και των λιπιδίων των μυκοβακτηριδίων, αναμένεται ακόμη πιο σημαντική προσφορά της πρωτοποριακής αυτής τεχνολογίας στη διάγνωση των μυκοβακτηριδιακών λοιμώξεων.

Περισσότερες μελέτες είναι βέβαιο πως θα σχεδιάζονται και θα εκτελούνται για την συνεχόμενη βελτίωση αυτής της απλής, γρήγορης, αξιόπιστης κι οικονομικής μεθόδου για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο είδους. Ταυτόχρονα το μέλλον, με βάσει τις ενδείξεις που έχουν οι ερευνητές, υπόσχεται πως θα εξελιχθεί η δυνατότητα της MALDI-TOF MS να παρέχει ταυτοποίηση ακόμα και στο επίπεδο υποείδους των μυκοβακτηριδίων.



## Summary

### Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in the diagnosis of mycobacterial infections

Amalia Tzanatou<sup>1</sup>, Dimitrios Papaventsis<sup>2</sup>, Georgia Vrioni<sup>1</sup>, Joseph Papaparaskevas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens

<sup>2</sup>National Reference Center for Mycobacteria, Microbiology Laboratory, "Sotiria" Chest Hospital

\*Corresponding author

The genus *Mycobacterium* includes species like the members of the pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* complex, a major global public health burden, and an ever-increasing number of nontuberculous mycobacterial species, of which approximately 1/3 have been associated with infections linked to substantial morbidity and mortality. Therefore, the rapid and accurate identification of mycobacteria is crucial for disease management.

MALDI-TOF MS technique was introduced for the identification of microorganisms as a common laboratory practice during the last decade. It utilizes the unique for each species, fingerprint-like, protein mass spectra and achieves rapid, easy, reliable and cost-effective identification of bacteria, yeasts, moulds and mycobacteria. As conventional methods for the identification of mycobacteria are time-consuming, MALDI-TOF MS offers a new alternative approach that reduces the turnaround time.

Protocols for inactivation and sample preparation of mycobacteria for MALDI-TOF MS proteins' analysis have been described in detail and are used in clinical microbiology laboratories. The continuous upgrading of databases through incorporation of an increasing number of mass spectral profiles of mycobacterial species, as well as the development of more powerful software for the analysis with MALDI-TOF MS, are future key goals. Through them, it is believed that a reliable identification of a greater number of mycobacterial species will be achieved and an improved distinction between phylogenetically closely related species could be accomplished, as the latter remains the main limitation of the method. Finally, MALDI-TOF MS analysis of surface lipids, specific to each mycobacterial species, is a field of research which developments are expected and promises to further shorten the identification time of mycobacteria, and perhaps even achieving their typing.

The prospects launched by the introduction of MALDI-TOF MS technology in the diagnosis of mycobacteria have had a spectacular impact on species identification and it is anticipated that they will have a similar impact on both typing and detection of antituberculosis drugs resistance.



#### Key words

*Mycobacteria, MALDI-TOF MS, identification, sample preparation, databases, future perspectives*



## Βιβλιογραφικές Αναφορές

- 1 Kostrzewa M, Nagy E, Schröttner P, Pranada AB. How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria—the rare and the unknown. Expert review of molecular diagnostics. 2019;19:667-682.
- 2 Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC. Nature reviews disease primers. *Tuberculosis*. 2016;2:16076.
- 3 Kalaiarasan E, Thangavelu K, Krishnapriya K, Muthuraj M, Jose M, Joseph NM. Diagnostic performance of real time PCR and MALDI-TOF in the detection of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Tuberculosis*. 2020;125:101988.
- 4 Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, González-Álvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:599-603.
- 5 Jia Khor M, Broda A, Kostrzewa M, Drobniewski F, Larrouy-Maumus G. An improved method for rapid detection of Mycobacterium abscessus complex based on species-specific lipid fingerprint by routine MALDI-TOF. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:715890.
- 6 Samper S, González-Martin J. Microbiological diagnosis of infections caused by the genus Mycobacterium. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English ed.)*. 2018;36:104-111.
- 7 Mediavilla-Gradolph MC, Toro-Peinado D, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez MD, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, Palop-Borrás B. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous Mycobacterium species isolated from clinical specimens. *BioMed Research International*. 2015 Oct;2015.
- 8 Wang CH, Putri DU, Lee JC, Liao CC, Tsao ST, Hsiao AL, Wu JH, Chen XW, Lee CH, Tsai IL. Biosafety and proteome profiles of different heat inactivation methods for *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology spectrum*. 2021;9:e00716-21.
- 9 Pranada AB, Schwarz G, Kostrzewa M. MALDI Biotyping for microorganism identification in clinical microbiology. *Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry*. 2016:197-225.
- 10 O'Connor JA, Lynch-Healy M, Corcoran D, O'Reilly B, O'Mahony J, Lucey B. Improved matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based identification of *Mycobacterium* spp. by use of a novel two-step cell disruption preparatory technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:495.
- 11 Ceysens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, Kostrzewa M, Hendrickx M, Mathys V. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55:624-634.
- 12 Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, Lopez Roa P, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53:2737-2740.
- 13 Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F, Raskine L, Cambau E, de Briel D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria from solid and liquid culture media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55:2045-2054.
- 14 Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;5:2875-2879.
- 15 Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A, Timke M, Kostrzewa M, Bouza E. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3. 0 for identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:1144-1147.
- 16 Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50:1313-1325.
- 17 Rodríguez-Temporal D, Rodríguez-Sánchez B, Alcaide F. Evaluation of MALDI biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58:100-128.
- 18 Song J, Yoon S, In Y, Kim D, Lee H, Yong D, Lee K. Substantial improvement in nontuberculous mycobacterial identification using ASTA MicroIDSys matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with an upgraded database. *Annals of Laboratory Medicine*. 2022;42:358-362.
- 19 Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of Mycobacterium species, Nocardia species, and other aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:376-384.

- 20 Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat PJ, Chatellier S, Durand G, Béni AM, Schrenzel J, Miller E. Identification of *Mycobacterium* spp. and *Nocardia* spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;86:277-283.
- 21 Van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of Laboratory Medicine*. 2017;37:475.
- 22 Lorente-Leal V, Liandris E, Bezos J, Pérez-Sancho M, Romero B, Juan LD. MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid screening alternative for non-tuberculous mycobacterial species identification in the veterinary laboratory. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022; 9: 827702.
- 23 Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, Rössle M, Falk V, Kuster SP, Böttger EC, Weber R. Prolonged outbreak of *Mycobacterium chimaera* infection after open-chest heart surgery. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61:67-75.
- 24 Kasperbauer SH, Daley CL. *Mycobacterium chimaera* infections related to the heater–cooler unit outbreak: a guide to diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68:1244-1250.
- 25 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of Nontuberculous Mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175:367-416.
- 26 Falkinham JO. Current epidemiologic trends of the nontuberculous mycobacteria (NTM). *Current Environmental Health Reports*. 2016;3:161-167.
- 27 Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66:670-677.
- 28 Epperson LE, Timke M, Hasan NA, Godo P, Durbin D, Helstrom NK, Shi G, Kostrzewa M, Strong M, Salfinger M. Evaluation of a novel MALDI biotyper algorithm to distinguish *Mycobacterium intracellulare* from *Mycobacterium chimaera*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3140.
- 29 Jackson M. The mycobacterial cell envelope—lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014; 4(10).
- 30 Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology*. 2014;21:67-85.
- 31 Song SH, Park KU, Lee JH, Kim EC, Kim JQ, Song J. Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *Journal of Microbiological Methods*. 2009; 77:165-177.
- 32 Layre E, Cala-De Paepé D, Larrouy-Maumus G, Vau-bourgeix J, Mundayoor S, Lindner B, Puzo G, Gille-ron M. Deciphering sulfoglycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Lipid Research*. 2011;52:1098-1110.
- 33 Burbaud S, Laval F, Lemassu A, Daffé M, Guilhot C, Chalut C. Trehalose polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chemical Biology*. 2016;23:278-289.
- 34 Larrouy-Maumus G, Puzo G. Mycobacterial envelope lipids fingerprint from direct MALDI-TOF MS analysis of intact bacilli. *Tuberculosis*. 2015;95:75-85.
- 35 Larrouy-Maumus G, Clements A, Filloux A, McCarthy RR, Mostowy S. Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;120:68-71.
- 36 Schiller J, Süß R, Fuchs B, Müller M, Petković M, Zschörnig O, Waschipky H. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *European Biophysics Journal*. 2007;36:517-527.
- 37 Gonzalo X, Broda A, Drobniowski F, Larrouy-Maumus G. Performance of lipid fingerprint-based MALDI-ToF for the diagnosis of mycobacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021; 27:912-e1.
- 38 Solntceva V, Kostrzewa M, Larrouy-Maumus G. Detection of species-specific lipids by routine MALDI TOF mass spectrometry to unlock the challenges of microbial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;10:621452.

