



Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en
Microbiología y Química Clínica

**Identificación de micobacterias ambientales aisladas en el
Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología del
Inciensa en el periodo 2016-2020, mediante espectrometría de
masas MALDI-TOF, identificadas previamente como
Mycobacterium sp.**

Estudiante

Elena Alvarado Salazar
B60346

Tutora

Sarah Jbara Chakhtoura

Lectores

Milena Brenes Calvo
Priscilla Rojas Rodríguez

Julio, 2023


Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:


Dra. Sarah Jbara Chakhtoura
Tutora


Dra. Milena Brenes Calvo
Lectora


Dra. Priscilla Rojas Rodríguez
Lectora


Dr. Jose Arturo Molina
Presidente del Tribunal


Dra. Carolina Chaves
Profesor designado

Dedicatorias y reconocimientos

Todo el trabajo realizado no hubiera sido posible sin la excepcional guía y acompañamiento de la doctora Sarah Jbara Chakhtoura, y la ayuda brindada por el personal del Centro Nacional de Referencia en Micobacteriología y del Centro Nacional de Referencia en Bacteriología.

Continuo agradeciendo a mi madre, padre y hermanas por apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida.

Índice general

Dedicatorias y reconocimientos	3
Índice general.....	4
Justificación.....	5
Hipótesis	5
Objetivos.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos	5
Resumen	7
Antecedentes	8
Generalidades.....	8
Diagnóstico	9
Espectrometría de masas MALDI-TOF	11
Metodología.....	14
1. Selección de muestras	14
2. Cultivo de micobacterias	15
3. Identificación de micobacterias con espectrometría de masas MALDI-TOF	16
A. Preparación de las cepas	16
B. Extracción de proteínas	16
C. Procesamiento en el equipo de MALDI-TOF	18
D. Interpretación de datos	18
Resultados	20
Discusión.....	27
Conclusiones.....	33
Referencias bibliográficas.....	34
Anexos.....	48

Justificación

La diferenciación entre las micobacterias ambientales (MNT) y el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, así como su identificación hasta especie, son importantes para el diagnóstico adecuado de las infecciones causadas por esas micobacterias, así como para su manejo, prevención y control. El diagnóstico de estas infecciones en Costa Rica es parte del quehacer del Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología (CNRM), del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa). La identificación de MNT se realiza por métodos moleculares basados en hibridación reversa de ADN, los cuales, además de ser costosos, solo permiten la identificación de un número limitado de especies. Efectivamente, en los últimos años, algunos aislamientos han sido reportados como *Mycobacterium* sp., sin poder determinar la especie. De esta manera, es una necesidad impostergable, implementar una nueva tecnología, que permita aumentar la capacidad diagnóstica del CNRM y la identificación hasta especie, de estos aislamientos.

Hipótesis

La espectrometría de masas basada en ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) permite la identificación hasta especie de aislamientos previamente caracterizados como *Mycobacterium* sp. en el CNRM.

Objetivos

Objetivo general

Realizar la identificación a especie de micobacterias ambientales aisladas en el CNRM en el periodo 2016-2020 identificadas previamente como *Mycobacterium* sp., utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.

Objetivos específicos

1. Optimizar la metodología de extracción de proteínas para espectrometría de masas MALDI-TOF, de cultivos de micobacterias, utilizando cepas de referencia de identificación conocida, y diferentes protocolos de extracción descritos en la literatura.

2. Identificar, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF aislamientos de micobacterias previamente identificadas en el CNRM mediante el método GenoType (MTBC, CM/AS, NTM-DR), y comparar el resultado entre ambas técnicas.
3. Realizar la identificación, a especie, de los aislamientos previamente identificados como *Mycobacterium* sp., durante el periodo 2016-2020 en el CNRM, utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.
4. Determinar si las especies identificadas en el objetivo 3 son de relevancia clínica.

Resumen

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) suelen ser microorganismos saprofiticos, que no tienden a causar enfermedad en personas inmunocompetentes. Sin embargo, los reportes de MNT asociados a cuadros clínicos han aumentado con los años, haciendo necesario su diagnóstico oportuno y su identificación, así como la correcta interpretación con los demás hallazgos microbiológicos, signos y síntomas, para poder definirlos como agente etiológico de un cuadro clínico. Para su identificación, los métodos moleculares se consideran el estándar de oro; sin embargo, los kits comerciales suelen permitir la identificación de un limitado espectro de especies. En contraste, la espectrometría de masas MALDI-TOF es un método rápido, costo efectivo y preciso para la identificación de especies de MNT. En Costa Rica, la identificación de MNT se realiza en el Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología (CNRM) del Inciensa. El objetivo de este trabajo fue realizar la identificación a especie de micobacterias ambientales aisladas en el CNRM en el periodo 2016-2020 identificadas previamente como *Mycobacterium* sp., utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.

Para ello, se probaron cinco diferentes protocolos de extracción de proteínas para espectrometría de masas MALDI-TOF de micobacterias, utilizando cepas de referencia. Asimismo, se identificó por espectrometría de masas MALDI-TOF aislamientos previamente caracterizados por el método molecular GenoType (MTBC, CM/AS, NTM-DR) con el fin de comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías. Posteriormente, se realizó la identificación a especie de aislamientos anteriormente identificados como *Mycobacterium* sp.

En general, la espectrometría de masas MALDI-TOF es una buena técnica para la identificación de MNT, de manera complementaria a los métodos moleculares. El mejor protocolo para la extracción de proteínas fue el protocolo 5, el cual permitió la identificación de manera exitosa de aislamientos cultivados en medio líquido. Las metodologías GenoType (MTBC, CM/AS, NTM-DR) y espectrometría de masas MALDI-TOF discreparon sobre todo al identificar especies o subespecies de un mismo complejo o grupo de MNT, de manera que se puede optar por una u otra tecnología, según el complejo o grupo del que se trate. Por último, se identificaron 10 nuevas especies del género *Mycobacterium* que no se habían identificado previamente en el país, las cuales se han asociado a diversos cuadros clínicos, según se describe en la literatura.

Antecedentes

Generalidades

Las micobacterias son bacterias del género *Mycobacterium*, de la familia Mycobacteriaceae, incluida en el filo Actinobacteria. Su morfología es bacilar y son ligeramente curvos o rectos. Una de las características más distintivas del género, es la composición de su pared celular, que está constituida por ácidos micólicos y ácidos grasos de cadena larga. El core de ácidos micólicos consiste en una cadena de alfa-alkil y un grupo beta-hidroxi (Bailo et al., 2022). De esta manera, las micobacterias son bacilos ácido resistentes, que resisten la decoloración con alcohol ácido al ser teñidos con tinciones, como Ziehl-Neelsen. Aunque son difíciles de teñir con la tinción de Gram, se consideran Gram positivas (Pereira et al., 2020). Asimismo, las micobacterias son organismos fastidiosos y requieren de medios de crecimiento especiales e incubaciones prolongadas con una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (CO₂) (Pennington et al., 2021).

El género *Mycobacterium* incluye tres grupos de importancia clínica: *M. tuberculosis* (agente causal de la tuberculosis), *M. leprae* (agente causal de la enfermedad de Hansen) y las MNT (Fernández-Esgueva et al., 2021). *M. tuberculosis* y *M. leprae* son patógenos obligados (Turenne, 2019), mientras que las MNT son oportunistas y saprofitas en su mayoría (Rocha, Felgueiras & Duarte, 2020). Las MNT afectan frecuentemente a personas con condiciones predisponentes como fibrosis quística, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inmunodeficiencias y personas con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Ahmed et al., 2020). Es necesario recalcar, que las MNT también pueden ocasionar enfermedad en personas inmunocompetentes (Sharma & Upadhyay, 2020).

La clasificación de Runyon permite agrupar las MNT según criterios fenotípicos como el crecimiento (lento o rápido), o la producción de pigmento (no cromógenas, escotocromógenas, fotocromógenas). Los grupos I, II y III de Runyon incluyen MNT de crecimiento lento y el grupo IV incluye MNT de crecimiento rápido (Koh, 2017). El grupo I corresponde a micobacterias fotocromógenas, es decir, producen pigmento en presencia de la luz, como *M. kansasii*, *M. marinum* o *M. simiae*. El grupo II contiene especies escotocromógenas, como *M. szulgai* o *M. gordonae*, las cuales, siempre producen

pigmento. Las micobacterias del grupo III, como *M. avium* o *M. ulcerans*, no producen pigmento, al igual que las del grupo IV, que incluye a *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* (Koh, 2017).

A diferencia de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, los mecanismos de transmisión de las MNT no están completamente elucidados. Las MNT pueden sobrevivir en el ambiente, por lo que se ha descrito que la transmisión puede ocurrir por contacto con fuentes ambientales, principalmente de agua contaminada. Además, la transmisión por contacto con una persona infectada, ya sea directa o indirectamente (Johansen, Herrmann & Kremer, 2020). Otras posibles fuentes de infección pueden ser los biofilms y fomites (Johansen, Herrmann & Kremer, 2020).

Las manifestaciones clínicas causadas por las diferentes especies dentro del grupo de MNT son muy similares y poco específicas. En general, se pueden dividir en cuatro tipos de síndromes clínicos: enfermedad pulmonar, infecciones en piel y tejidos blandos, enfermedad diseminada, y linfadenitis (Drummond & Kasperbauer, 2019).

A pesar del gran subdiagnóstico, la prevalencia de las infecciones ocasionadas por MNT ha aumentado en los últimos años, debido a la mejora en la expectativa de vida de los grupos de riesgo (Rocha, Felgueiras & Duarte, 2020). En Costa Rica, según datos del CNRM, durante el periodo 2020-2022 se detectaron 250 casos de MNT, de los cuales, el 56.8%, fue causado por *M. fortuitum* o *M. abscessus*. Además, el 41.2% de los casos, se presentó en adultos de 60 años o más.

Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones por MNT requiere de la correlación del síndrome clínico, la evaluación clínica y los hallazgos radiográficos, además de la confirmación microbiológica del agente etiológico. La identificación a nivel de especie es necesaria ya que el tratamiento depende de la especie causante de la infección (Pennington et al., 2021).

Existen MNT saprofitas que no están relacionadas a enfermedades en humanos y que son frecuentes contaminantes en muestras clínicas (Contreras et al., 2020). De esta manera,

un reto en el diagnóstico de las MNT es determinar si el aislamiento obtenido a partir de una muestra clínica representa una colonización, una enfermedad o inclusive contaminación de la muestra (Drummond & Kasperbauer, 2019). Se han establecido diferentes criterios para realizar un adecuado diagnóstico de las infecciones por MNT. Por ejemplo, puede ser necesario analizar diferentes muestras o muestras seriadas para confirmar o excluir el diagnóstico de una infección por MNT. Además, se debe considerar si la muestra proviene de un sitio estéril o no estéril, siendo este último, donde es más importante diferenciar entre colonización y enfermedad (Pennington et al., 2021).

Al contrario de *M. tuberculosis*, para las MNT no hay una técnica de identificación de especies adoptada ampliamente (Pennington et al., 2021). Para su aislamiento, se utilizan medios de cultivo convencionales como el caldo Middlebrook 7H9 y su versión comercial (Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) de la casa comercial Becton Dickinson), o bien, medios de cultivo sólidos, como Middlebrook 7H19 o Löwestein-Jensen (LJ), y agar sangre, para algunas especies, como *M. abscessus* o *M. fortuitum*.

Una vez que se ha obtenido un aislamiento, se pueden utilizar distintas metodologías para la identificación a nivel de especies (Pennington et al., 2021). Anteriormente, para la identificación se utilizaban métodos bioquímicos; sin embargo, eran lentos y laboriosos y sólo permitían identificar pocas especies. En las últimas décadas, se han desarrollado métodos moleculares, que son considerados el estándar de oro. Por ejemplo, la casa comercial Hain Lifescience ha desarrollado un método basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final e hibridación reversa de ADN, comercialmente llamado GenoType (MTBC, CM/AS o NTM-DR). En este método se extrae primero el ADN de la micobacteria a partir de un cultivo, luego se realiza una PCR múltiple, la cual es revelada en una hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa. El patrón de bandas obtenido es característico de cada especie. Esta tecnología permite identificar alrededor de 30 especies diferentes de micobacterias. Si bien es una técnica altamente sensible y específica, es muy costosa. En los últimos años, los métodos de identificación bacteriana basados en espectrometría de masas han comenzado a sustituir muchas metodologías bioquímicas y moleculares, al ser métodos sencillos, de bajo costo y rápidos (Contreras et al., 2020).

Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas basada en ionización desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) se basa en la comparación del espectro proteico, principalmente de proteínas ribosomales del aislamiento, contra una base de datos de referencia con perfiles determinados previamente. La identificación de MNT por esta tecnología tiene la ventaja de que es un método barato, rápido y simple (Contreras et al., 2020).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite medir la proporción de la masa y la carga de las muestras analizadas, con el propósito de identificar la cantidad y el tipo de compuestos químicos presentes (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017). En la espectrometría de masas MALDI-TOF, se utiliza una técnica de desorción-ionización suave utilizando una matriz que evita la fragmentación de las moléculas de la muestra durante este proceso. La tecnología de tiempo de vuelo consiste en forzar a los iones cargados a volar de una fuente a un detector, de manera que se identifica la sustancia, según el tiempo de vuelo hasta el detector de iones (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017).

Inicialmente, la matriz actúa separando el analito, ya que reduce las fuerzas intermoleculares por un fenómeno llamado aislamiento por matriz. Además, previene la formación de clusters de analito. Posteriormente, ocurre la irradiación de la muestra mediante un láser. En este punto, la matriz realiza su rol principal: absorbe la mayoría de la energía de los fotones, preservando al analito de la irradiación directa y permitiendo su ionización suave. La energía absorbida causa la excitación de la matriz, generando un cambio de fase de sólida a gas (sublimación), lo que ocasiona que la nube de gas se expanda en la cámara de vacío. La colisión entre las moléculas neutras del analito y los iones de la matriz dan como resultado la ionización del analito (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017). Todos los iones generados (iones tanto de la matriz como del analito) son acelerados hacia una zona de deriva. Al final de la trayectoria de vuelo, se ubica el detector de iones, que registra el tiempo de vuelo y la intensidad con la que llegan los iones individuales al detector. Los iones más pesados tardan más en llegar al detector, mientras que los iones más ligeros recorren la misma distancia en un periodo más corto (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017). A partir de los tiempos de vuelo se construye el espectro de masas del analito, también conocido como huella digital (Reeve

& Bachmann, 2019). Esta es la información que se compara con la librería de espectros para obtener la identificación del analito (Contreras et al., 2020).

En la práctica, la identificación de microorganismos bacterianos por espectrometría de masas MALDI-TOF es relativamente sencilla: a partir del cultivo puro del aislamiento, se deposita una pequeña parte en la placa de MALDI-TOF. Una vez que la muestra se seca, se agrega la matriz y se deja secar. Finalmente, la placa se carga en el espectrómetro de masas MALDI-TOF y se analiza mediante un software asociado, lo que permite una rápida identificación del organismo (Clark et al., 2013).

La casa comercial Bruker cuenta con la librería MALDI Biotyper (MBT), con un apartado para micobacterias que incluye 182 de las 201 especies conocidas en la actualidad (Bruker Daltonics, 2021). El análisis de los datos es realizado mediante el software MALDI Biotyper Compass (MBT Compass), que realiza la calibración de los espectros y la comparación de los perfiles de proteínas adquiridos con los perfiles contenidos en la base de datos (Bruker Daltonics, 2021). Este sistema cuenta con una escala numérica para la interpretación de los resultados, clasificándolos en diferentes categorías. Un score mayor o igual a 1.80 se considera una identificación de alta confianza; entre 1.60 y 1.79 se considera de baja confianza, y menor a 1.60 se considera no confiable (Rodríguez-Temporal, Rodríguez-Sánchez & Alcaide, 2020).

La espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de micobacterias, tiene limitaciones asociadas al propio microorganismo. Por ejemplo, el crecimiento lento, la baja cantidad de proteínas ribosomales, la presencia de una pared hidrofóbica gruesa (Kalaiarasan et al., 2020) y la relación estrecha entre diferentes especies de MNT (Pennington et al., 2021). Además, tiene la desventaja de que se requiere de un proceso de extracción de proteínas a partir del cultivo puro (Kalaiarasan et al., 2020) y la necesidad de la presencia previa del espectro en la librería del instrumento (Pennington et al., 2021).

Si no se logra identificar un microorganismo por MALDI-TOF se puede recurrir a la secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S. Sin embargo, algunas especies pueden no ser diferenciadas debido a que no hay una divergencia genómica suficiente que permita un diagnóstico preciso (Pennington et al., 2021). Además, se puede

realizar secuenciación del genoma completo, que permite identificar polimorfismos de un solo nucleótido y contribuye al diagnóstico de infecciones mixtas por MNT. Sin embargo, estas tecnologías no suelen estar disponibles en laboratorios clínicos de rutina (Dohál et al., 2021), ya que suelen ser costosas y requieren personal altamente calificado.

Metodología

1. Selección de muestras

Para la optimización de la extracción para el análisis por espectrometría de masas MALDI TOF, se utilizaron cepas de referencia que forman parte de la bacterioteca del CNRM (Tabla 1). Para la comparación de resultados con el método GenoType (Hain Lifescience, Alemania), se utilizaron aislamientos de micobacterias previamente identificados en el CNRM y conservados en la bacterioteca (Tabla 2). Para la identificación de aislamientos de micobacterias previamente identificados como *Mycobacterium* sp. durante el periodo 2016-2020 en el CNRM, se utilizaron aquellos que se encuentran conservados en la bacterioteca del CNRM. Se seleccionaron 36 aislamientos y se le asignó a cada uno un código inequívoco, desde CNRM-301 hasta CNRM-336.

Tabla 1. Cepas de referencia de micobacterias ambientales para la optimización de la extracción de proteínas para análisis con espectrometría de masas MALDI-TOF en el CNRM.

Código de la cepa	Identificación
ATCC15769	<i>Mycobacterium avium</i>
ATCC12478	<i>Mycobacterium kansasii</i>
ATCC6841	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
ATCC11758	<i>Mycobacterium phlei</i>
ATCC19981	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
ATCC25950	<i>Mycobacterium vaccae</i>
ATCC13950	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
ATCC25177	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra

Tabla 2. Aislamientos de micobacterias previamente identificados con el método molecular GenoType para ser analizados con espectrometría de masas MALDI-TOF en el CNRM.

Código	Identificación por GenoType
CNRM-201	<i>M. celatum</i>
CNRM-202	<i>M. intracellulare</i>
CNRM-203	<i>M. asiaticum</i>
CNRM-204	<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>
CNRM-205	<i>M. simiae</i>
CNRM-206	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>
CNRM-207	<i>M. szulgai</i>
CNRM-208	<i>M. mucogenicum</i>
CNRM-209	<i>M. fortuitum</i>
CNRM-210	<i>M. kansasii</i>
CNRM-211	<i>M. fortuitum</i>
CNRM-212	<i>M. chimaera</i>
CNRM-213	<i>M. gordonae</i>
CNRM-214	<i>M. tuberculosis</i>
CNRM-215	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>
CNRM-216	<i>M. genavense/M. triplex</i>
CNRM-217	<i>M. bovis</i> BCG

2. Cultivo de micobacterias

El cultivo de micobacterias se realizó según procedimientos propios del CNRM. Todos los aislamientos se encontraban conservados en ultracongelación (-80°C) y se cultivaron en medio líquido MGIT y en medio sólido LJ. Los tubos MGIT se incubaron en el equipo BACTEC MGIT 960 (37°C) hasta que el equipo indicara positividad. En este sistema, durante el crecimiento de los microorganismos, se consume el oxígeno del medio de cultivo y se libera un fluorocromo. Esto permite que se genere fluorescencia, la cual es detectada por el equipo. El nivel de fluorescencia corresponde a la cantidad de oxígeno consumida por los organismos inoculados y es proporcional a la cantidad de microorganismos presentes. Al llegar a cierto nivel de fluorescencia, el instrumento indica que el cultivo está positivo (Diriba et al., 2017). Los tubos LJ se incubaron a 37°C hasta observar crecimiento. Las especies de rápido crecimiento crecen entre (3 a 7) d, mientras que las de lento crecimiento pueden tardar de (10 a 14) d en medio líquido y de (2 a 6) semanas en medio sólido (Pathak, Hart & Lande, 2022).

3. Identificación de micobacterias con espectrometría de masas MALDI-TOF

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó en el equipo MALDI Biotyper (Bruker, Alemania). Para la preparación de la muestra y el procesamiento en el equipo, se siguieron las recomendaciones del fabricante (Bruker, Alemania) y otras recomendaciones de la literatura según Balada-Llasat, Kamboj & Pancholi (2013) y Alcaide et. al (2018). Para la optimización de la extracción para el análisis por espectrometría de masas MALDI TOF utilizando cepas de referencia, se probaron 5 protocolos de extracción diferentes, denominados Protocolo 1, Protocolo 2, Protocolo 3, Protocolo 4 y Protocolo 5.

A. Preparación de las cepas

Este paso se realizó para los protocolos 1 a 4. A partir de los cultivos positivos obtenidos en cultivo sólido (LJ), se realizó una suspensión en 2 mL de agua grado HPLC con perlas de vidrio, superior al estándar de McFarland 1,0. A partir de esta suspensión, se transfirieron 1,5 mL a un tubo de microcentrífuga.

A partir de los cultivos positivos obtenidos en cultivo líquido (MGIT), se transfirieron 1,5 mL del fondo del tubo a un tubo de microcentrífuga.

El tubo con 1,5 mL de cultivo se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm. Se descartó el sobrenadante completamente y se agregaron 300 µL de agua grado HPLC. Se realizó la inactivación térmica a (95 – 100) °C por 20 min.

B. Extracción de proteínas

- Protocolo 1 (MycoEx): el protocolo MycoEx es el método recomendado por Bruker para procesar las muestras de cultivo de micobacterias para la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, 2017). Se agregaron 900 µL de etanol absoluto a la muestra inactivada y se agitó en un vórtex por 30 s a 1 min. Se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente por al menos 5 min dentro de la cabina de bioseguridad. Se agregaron (20 a 30) µL de perlas de circonio/sílice y 25 µL de acetonitrilo y se agitó en un vórtex por 1 min. Posteriormente, se agregó 25 µL de ácido fórmico al 70% y se agitó en un vórtex por 15 s. Se centrifugó durante 2 min a 14 000 rpm. Se usó 1 µL del sobrenadante para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

- Protocolo 2 (MycoEx con sonicación): este protocolo se modificó a partir del Protocolo 1. Las únicas diferencias con el Protocolo 1 fueron que se utilizó etanol al 75% recién preparado a partir de etanol absoluto; y se realizó un paso de sonicación después de la adición de acetonitrilo y las perlas de circonio/sílice. La sonicación se llevó a cabo a 37 kHz durante 15 min.
- Protocolo 3 (Bead-Beating): se agregaron 900 μL de etanol al 70% recién preparado a partir de etanol absoluto. Se añadieron aproximadamente (20 a 30) μL de perlas de circonio/sílice. Luego, la muestra se agitó en vórtex durante 1 min, se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm y se descartó por completo el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente por al menos 5 min dentro de la cabina de bioseguridad. Se añadieron 25 μL de ácido fórmico al 70%. La muestra se agitó en un vórtex de 30 s a 1 min y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se añadieron 25 μL de acetonitrilo. La muestra se agitó en vórtex durante 20 s y se centrifugó durante 2 min a 14 000 rpm.
- Protocolo 4 (Bead-Beating con sonicación): la muestra se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm. Se descartó por completo el sobrenadante y se añadieron 500 μL de agua grado HPLC. La muestra se agitó en vórtex durante 30 s a 1 min y luego se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm. Se añadieron 1,2 mL de etanol al 70% recién preparado a partir de etanol absoluto. La muestra se agitó en vórtex durante 30 s a 1 min, se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm y se descartó por completo el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente por al menos 5 min dentro de la cabina de bioseguridad. Se añadieron 100 μL de ácido fórmico al 70% y 100 μL de perlas de circonio/sílice. La muestra se agitó en vórtex durante 20 min y se sonicó durante 15 min a 37 kHz. Finalmente, se agregaron 100 μL de acetonitrilo y la muestra se agitó en vórtex durante 5 min, luego se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm.
- Protocolo 5 (según Balada-Llasat, Kamboj & Pancholi (2013)): a partir de los cultivos positivos obtenidos en medio líquido (MGIT), se centrifugó el tubo MGIT a 4100 rpm por 15 min y se transfirieron entre (100 a 200) μL del sedimento del fondo del tubo a un tubo de microcentrífuga. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 300 μL de agua grado HPLC. A partir de cultivos positivos obtenidos en cultivo sólido (LJ), se recolectó el crecimiento en 300 μL

de agua grado HPLC hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar de McFarland 2,0 aproximadamente. Se agregó 900 μL de etanol absoluto. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500 μL de agua grado HPLC. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 2 min y se descartó el líquido residual. Se resuspendió el sedimento en 50 μL de agua grado HPLC y se realizó la inactivación térmica a 100 °C por 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente por 2 min. Se agregó 1,2 mL de etanol absoluto frío. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente por al menos 5 min dentro de la cabina de bioseguridad. El sedimento se resuspendió en (10 a 50) μL de acetonitrilo y se agregó (50 a 100) μL perlas de vidrio, según el tamaño del sedimento obtenido. Se agitó en vórtex por 1 min. Se agregó (10 a 50) μL de ácido fórmico al 70% (la misma cantidad que acetonitrilo) y se agitó en vórtex por 1 min. Se centrifugó durante 2 min a 13 000 rpm.

C. Procesamiento en el equipo de MALDI-TOF

A partir de cada extracto, se depositó 1 μL en la placa del MALDI-TOF por duplicado. Además, se agregó 1 μL del control BTS (Bacterial Test Standard) por duplicado. Se dejó secar dentro de la cabina de bioseguridad y se agregó 1 μL de matrix HCCA a todos los pocillos en la placa del MALDI-TOF y se dejó secar completamente. El montaje en el equipo se realizó según las indicaciones del fabricante.

D. Interpretación de datos

El análisis de los espectros fue realizado por el software MBT Compass, el cual compara el espectro obtenido con la base de datos de micobacterias (MBT Mycobacteria IVD Library) y despliega los 10 espectros más concordantes (“*matched patterns*”) con el obtenido. Además, a cada espectro concordante le asigna un puntaje o score. Para cada muestra, se revisó el score obtenido y se verificó si el resultado es de alto nivel de confianza o si la identificación es poco fiable, según los siguientes parámetros:

- Score entre 1,80 – 3,00: alto nivel de confianza
- Score entre 1,60 – 1,79: bajo nivel de confianza
- Score entre 0,00 – 1,59: identificación poco fiable

El resultado es confiable si al menos el primer *match* tiene un score superior a 1,80 (alto nivel de confianza) o entre 1,60 y 1,79 (bajo nivel de confianza). Se siguieron recomendaciones del Manual de interpretación de resultados de MALDI-TOF del Instituto Malbrán (Rocca et al., 2019), de otras publicaciones de la literatura y de la experiencia del CNRM. Si se obtiene más de 1 especie con un score de alto nivel de confianza, se deberá verificar que se cumpla un 10% de diferencia entre el score de la primera y el score de la segunda para validar el resultado.

Resultados

El protocolo de extracción de proteínas 1 (Tabla 3) permitió la identificación de 5 de las 8 cepas de referencia cultivadas en medio LJ y de 5 cultivadas en MGIT. *M. scrofulaceum* y *M. intracellulare* no se pudieron identificar, independientemente si fueron cultivadas en LJ o en MGIT.

En cuanto al protocolo 2 (Tabla 4), este permitió la identificación de las 8 cepas de referencia cultivadas en medio LJ, mientras que para las cepas cultivadas en medio MGIT, se identificaron 6.

El protocolo 3 (Tabla 5) permitió identificar 7 de las cepas de referencia cultivadas en medio LJ y 4 cepas cultivadas en MGIT.

Con el protocolo 4 (Tabla 6), se identificaron todas las cepas cultivadas en medio LJ y 7 cepas obtenidas en medio MGIT.

El protocolo 5 (Tabla 7) permitió la identificación de todas las cepas de referencia, obtenidas de ambos medios de cultivo, con scores de alto nivel de confianza en la mayoría de los casos.

Tabla 3. Identificación de cepas de referencia por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el protocolo 1 de extracción de proteínas.

Medio de cultivo	LJ		MGIT	
	1	2	1	2
<i>M. avium</i> ATCC 15769	1.50*	1.91	1.73	0.00*
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	1.85	2.18	2.05	2.16
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1.34*	1.57*	2.41	2.37
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	1.99	1.89	2.06	0.00*
<i>M. vaccae</i> ATCC 25950	2.15	2.17	0.00*	1.57*
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	1.30*	1.27*	1.41*	1.08*
<i>M. intracelullare</i> ATCC 13950	0.00*	1.19*	0.00*	0.00*
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	2.04	2.10	2.05	1.96

*Score menor a 1,59

Tabla 4. Identificación de cepas de referencia por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el protocolo 2 de extracción de proteínas.

Medio de cultivo	LJ		MGIT	
	1	2	1	2
<i>M. avium</i> ATCC 15769	1.90	1.85	1.29*	1.06*
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	2.06	1.78	2.10	2.17
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1.60	0.00*	2.29	2.21
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	1.78	1.90	1.96	2.18
<i>M. vaccae</i> ATCC 25950	2.06	2.07	2.04	1.67
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	1.73	1.70	0.00*	0.00*
<i>M. intracelullare</i> ATCC 13950	1.87	1.91	1.77	1.52*
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	2.22	2.10	1.68	1.28*

*Score menor a 1,59

Tabla 5. Identificación de cepas de referencia por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el protocolo 3 de extracción de proteínas.

Medio de cultivo	LJ		MGIT	
	1	2	1	2
<i>M. avium</i> ATCC 15769	1.86	1.78	0.00*	0.00*
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	1.83	1.44*	1.50*	1.34*
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1.55*	1.54*	2.14	1.74
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	2.04	1.79	1.82	2.12
<i>M. vaccae</i> ATCC 25950	2.17	1.91	2.07	2.07
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	2.12	1.75	1.59*	1.38*
<i>M. intracelullare</i> ATCC 13950	1.48*	1.88	1.11*	0.00*
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	1.92	1.48*	1.65	0.00*

*Score menor a 1,59

Tabla 6. Identificación de cepas de referencia por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el protocolo 4 de extracción de proteínas.

Medio de cultivo	LJ		MGIT	
	1	2	1	2
<i>M. avium</i> ATCC 15769	2.01	2.05	1.52*	1.18*
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	2.10	2.02	2.01	1.98
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1.99	1.93	2.26	2.19
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	2.03	2.20	1.82	2.12
<i>M. vaccae</i> ATCC 25950	1.80	1.77	2.32	2.21
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	1.93	2.02	1.56*	1.99
<i>M. intracelullare</i> ATCC 13950	1.91	1.88	1.81	1.58*
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	2.10	2.08	1.83	1.95

*Score menor a 1,59

Tabla 7. Identificación de cepas de referencia por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el protocolo 5 de extracción de proteínas.

Medio de cultivo	LJ		MGIT	
	1	2	1	2
<i>M. avium</i> ATCC 15769	2.06	1.96	1.74	1.91
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	2.24	2.09	2.37	2.30
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1.83	2.01	2.47	2.47
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	1.99	1.90	2.29	2.18
<i>M. vaccae</i> ATCC 25950	2.17	2.06	1.89	1.71
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	2.09	2.07	2.27	2.37
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	2.35	2.27	1.81	1.77
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	2.19	2.23	2.20	2.28

Tabla 8. Identificación de aislamientos de micobacterias previamente identificados con el método molecular GenoType mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Identificación por Genotype	Identificación por MALDI-TOF			
	Identificación	Medio	Réplica 1	Réplica 2
<i>M. celatum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	LJ	1,91	1,80
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> grupo	LJ	1,74	1,77
<i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i> grupo	LJ	1,93	1,91
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> complejo	LJ	2,26	2,34
<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. tuberculosis</i> complejo	LJ	2,11	1,96
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. abscessus</i>	LJ	2,16	1,98
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>	LJ	2,19	2,09
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	LJ	2,22	2,15
<i>M. simiae</i>	<i>M. sherrisii</i>	LJ	1,79	1,74
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i> / <i>M. phocaicum</i>	LJ	2,00	2,12
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	LJ	2,14	2,02
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	LJ	2,22	2,28
<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordonae</i>	LJ	2,03	2,08
<i>M. genavense</i> / <i>M. triplex</i>	<i>M. triplex</i>	LJ	1,92	1,74
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. asiaticum</i>	LJ	1,77	1,84
<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>	LJ	2,09	2,06
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	LJ	2,07	2,10

Los resultados obtenidos al identificar diversas especies mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y el método molecular GenoType son en general concordantes (Tabla 8). Se presentaron discordancias puntuales, tales como la identificación de *M. bovis* por el método molecular mientras que por espectrometría de masas el mismo aislamiento se identificó como *M. tuberculosis* complejo. Otro ejemplo es la identificación de un mismo aislamiento como *M. simiae* por el método molecular y como *M. sherrisii* por espectrometría de masas MALDI-TOF. Asimismo, *M. mageritense* fue identificado como tal por espectrometría de masas MALDI TOF, pero como *M. fortuitum* por el método molecular.

Tabla 9. Identificación a nivel de especie de las muestras previamente identificadas como *Mycobacterium* sp.

Especie identificada	Número de aislamientos identificados
<i>M. intracellulare</i> complejo*	6
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> *	6
<i>M. canariasense</i> / <i>M. cosmeticum</i>	3
<i>M. stomatepiae</i>	3
<i>M. arupense</i>	2
<i>M. kumamotonense</i>	2
<i>M. szulgai</i> *	2
<i>M. abscessus</i> *	1
<i>M. brumae</i>	1
<i>M. chelonae</i> *	1
<i>M. colombiense</i>	1
<i>M. europaeum</i>	1
<i>M. interjectum</i> *	1
<i>M. iranicum</i>	1
<i>M. marseillense</i>	1
<i>M. paraffinicum</i>	1
Total de aislamientos identificados	33

*Especie que se puede identificar con los kits de GenoType.

En cuanto a los aislamientos identificados previamente como *Mycobacterium* sp., las especies más frecuentes fueron el *M. intracellulare* complejo y *M. fortuitum* (Tabla 9), y ambas se hubieran podido identificar con método molecular GenoType. Por otro lado, para la identificación de todos los aislamientos, los scores obtenidos fueron en su mayoría

superiores a 1,80 (Tabla A1). De las especies previamente identificadas como *Mycobacterium* sp., se identificaron 10 nuevas especies de MNT. Según la búsqueda de literatura realizada, todas presentan alguna implicación clínica, que se resume en la tabla 10. Por otra parte, cabe destacar que 3 aislamientos resultaron ser contaminantes del género *Bradyrhizobium*, que se identificaron utilizando la librería “Standard” de MALDI Biotyper (Tabla A1).

Tabla 10. Relevancia clínica de las especies identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Especie identificada	Implicación clínica
<i>M. canariasense</i>	<i>M. canariasense</i> fue descrita en España, en un grupo de 17 pacientes con síndrome febril, que presentaban un catéter central. Dos de los casos resultaron fatales (Jiménez et al., 2004). Para esta especie, también se han reportado casos de bacteremia asociada al catéter (Paniz-Mondolfi et al., 2014), infección tras un procedimiento quirúrgico (Atallah et al., 2014), fractura con no unión séptica (Vicente et al., 2018), infección pulmonar (Sakhaee et al., 2019) y endocarditis (Hassan et al., 2022).
<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. cosmeticum</i> fue aislada inicialmente de una lesión subcutánea granulomatosa subdermal, ocasionada por un proceso invasivo cosmético (Cooksey et al., 2004). Además, se ha reportado esta bacteria como causante de infección de catéter, neumonía en un paciente inmunosuprimido (Aljishi, Jabr Alwazze & Kristjansson, 2021) e infección pulmonar en un paciente con síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) (Cooksey et al., 2007).
<i>M. stomatepiae</i>	<i>M. stomatepiae</i> fue descrito como patógeno humano por primera vez en el 2018, donde se estableció como la especie causante de una linfadenitis cervical supurativa tras inoculación dérmica, en una paciente de 18 meses inmunocompetente (Weston et al., 2018).
<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i> se ha implicado principalmente como causante de tenosinovitis (Tsai et al., 2008; Senda, Muro & Terada, 2011; Beam et al., 2014; Lee et al., 2014; Lopez, Miley & Taiwo, 2016). Además, se ha reportado como agente etiológico de otros cuadros como infección pulmonar en un paciente con un proceso maligno (Neonakis

	et al., 2010), infección pulmonar en personas VIH positivas (Heidarieh et al., 2013) y osteomielitis en una persona inmunocompetente (Legout et al., 2012).
<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. kumamotonense</i> se ha asociado a infecciones pulmonares (Masaki et al., 2006), linfadenitis en un paciente inmunocompetente (Hernández-Solis et al., 2019) y a linfadenopatía generalizada en un paciente VIH positivo (Rodríguez-Aranda et al., 2010).
<i>M. brumae</i>	<i>M. brumae</i> es una micobacteria no patógena (Renau-Mínguez et al., 2023), que, si bien se ha aislado de muestras de esputo, no se ha asociado a un proceso patológico (Luquin et al., 1993).
<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i> se ha asociado a bacteremia en pacientes VIH positivos (Murcia et al., 2006), linfadenopatía en pacientes pediátricos inmunocompetentes (Vuorenmaa et al., 2009; Esparcia et al., 2008), e infección pulmonar en un paciente inmunocompetente (Barreto et al., 2016).
<i>M. europaeum</i>	<i>M. europaeum</i> se ha reportado como agente etiológico de infección pulmonar en pacientes con VIH (Pourahmad et al., 2012) e inclusive en una persona inmunocompetente sin factores de riesgo (Fujiwara et al., 2021).
<i>M. iranicum</i>	<i>M. iranicum</i> es una especie recientemente descrita y su relevancia clínica todavía está en discusión, sin embargo, se han reportado esta micobacteria como agente etiológico de artritis séptica, tenosinovitis (Tan et al., 2017), infección pulmonar (Kalra & Rubinstein, 2022), peritonitis asociada a diálisis peritoneal (Inagaki et al., 2016) y bacteremia en un paciente inmunodeficiente (Grandjean-Lapierre, Toro & Drancourt, 2017).
<i>M. marseillense</i>	<i>M. marseillense</i> ha sido asociada como agente causal de tenosinovitis en pacientes inmunosupresos (Nomura et al., 2021; Hirase et al., 2021), infección pulmonar en pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes (Grottola et al., 2014; Rodriguez et al., 2019; Kim et al., 2014), infección cutánea asociada a punción por acupuntura (Sánchez-Cárdenas et al., 2020) y linfadenitis (Dimopoulou et al., 2021).

<i>M. paraffinicum</i>	<i>M. paraffinicum</i> se ha reportado causando infección pulmonar en población geriátrica (Chan et al., 2014; Rodrigues-Barretto et al., 2017) y linfadenitis (Tan & Perera, 2019).
------------------------	--

Discusión

El mejor protocolo de extracción para la identificación de MNT mediante espectrometría de masas MALDI-TOF fue el protocolo 5, basado en las recomendaciones de Balada-Llasat, Kamboj & Pancholi (2013). Entre los protocolos utilizados, las principales diferencias consistieron en la concentración de los cultivos en medio líquido por centrifugación, el uso de agitación con perlas o bead-beating, el tiempo de agitación en vórtex y el uso de la sonicación.

En estudios anteriores, se ha reportado que la extracción de proteínas a partir de medio líquido es muy limitada (Huang et al., 2018, Alcaide et al., 2018). Para evitar este inconveniente, se ha sugerido realizar una incubación extendida posterior a la positividad del cultivo, antes de realizar la extracción para MALDI-TOF (Alcaide et al., 2018). Asimismo, se recomienda realizar la extracción a partir de una alícuota del fondo del tubo, donde el medio se observa más turbio (Alcaide et al., 2018).

De hecho, los sistemas de cultivo líquido son más sensibles en comparación con el cultivo en medio sólido. Estos sistemas indican que el cultivo está positivo inclusive con una baja cantidad de crecimiento de microorganismos, que se traduce en una menor cantidad de biomasa. Al obtener una menor cantidad de biomasa, se limita la adquisición del espectro proteico, para ser leído por espectrometría de masas MALDI-TOF (Rodríguez-Temporal et al., 2018). En el protocolo 5, se centrifugó el tubo con el cultivo en medio MGIT y se tomó una alícuota del fondo, donde se concentraba una mayor cantidad de biomasa. Este paso de concentración previa solo se incluyó en el protocolo 5, con lo cual se podría considerar como un paso crítico para la extracción de proteínas de aislamientos cultivados en medios líquidos. Efectivamente, en los demás protocolos empleados, el desempeño de la extracción a partir de medio líquido fue más deficiente, lo cual pudo haberse mejorado si se hubiese realizado este paso de concentración previa.

Sumado a lo anterior, es importante considerar que los procesos de lavados también podrían causar pérdida de biomasa, y, por lo tanto, dificultar la identificación (Rodríguez-Temporal et al., 2018).

Por otro lado, los protocolos 3 y 4 se basan en bead-beating, ya que emplean tiempos de agitación prolongados con perlas. Se ha descrito que el bead-beating es un método mecánico de extracción de proteínas para la identificación proteómica de micobacterias, el cual permite una mayor recuperación y la obtención de proteínas más integra, comparado con el uso de sonicación (Rabodoarivelo et al., 2016). No obstante, con los resultados obtenidos no se puede afirmar que el uso de bead-beating sea realmente superior al uso de sonicación, pero probablemente la combinación de ambas metodologías pueda llevar a mejores resultados, tal como ocurre en el protocolo 4.

Aunque existen reportes de que el aumento del tiempo de disrupción mecánica mejora la extracción de proteínas (Rodríguez-Temporal, 2018), en el protocolo 5 los periodos de agitación en vórtex fueron menores al compararse con el protocolo 4 y en ambos casos se logró la identificación correcta de todas las cepas de referencia en medio sólido.

En cuanto al uso de sonicación, empleado en los protocolos 2 y 4, se ha reportado que este es un método limitado, ya que depende de diferentes factores como el tiempo de tratamiento y la viscosidad de la muestra (Jaki et al., 2006). Más importante, se ha visto que la sonicación causa mayor contaminación cruzada, al compararse con la metodología de bead-beating (Rabodoarivelo et al., 2016). En este caso, los protocolos empleados tuvieron un buen desempeño a partir de cultivos en medio sólido. Más bien, su principal desventaja corresponde a los tiempos prolongados de sonicación, que vuelven el método de extracción más largo y tedioso.

Por otra parte, se han descrito factores asociados a la extracción de proteínas que podrían causar variabilidad en los resultados y que se deberían tomar en cuenta, como el diámetro y el volumen de las perlas de circonio (Rabodoarivelo et al., 2016) y el correcto secado de la muestra (Alcaide et al., 2018). Sin embargo, en este estudio, se emplearon perlas de un mismo

diámetro y siempre se mantuvo una proporción adecuada de perlas en relación con otros reactivos utilizados.

El secado de la muestra es un paso importante para eliminar el etanol, ya que puede generar una interferencia en la obtención de espectros proteicos de alta calidad (Alcaide et al., 2018). En todos los protocolos, este factor se mantuvo como una constante, empleando el mismo tiempo de secado y en las mismas condiciones. La concentración del etanol utilizado varió ligeramente, pero no se observó una tendencia que pueda indicar que una concentración en específico sea mejor para la extracción.

Otros factores que podrían afectar los resultados, que son independientes del protocolo de extracción, son la edad del cultivo, la formación de grumos de cultivo y la duración de la fase lag en la curva del crecimiento (Lanigan et al., 2004). En este estudio, el tiempo entre la observación de crecimiento en medio sólido o bien, la obtención de un resultado positivo en el sistema de crecimiento líquido y la extracción de proteínas no fue estandarizado. Sin embargo, en todos los casos, se procuró realizar la extracción de proteínas a partir de cultivos frescos, para evitar las variaciones que se pudieran presentar relacionados a la edad del cultivo.

Por otro lado, cabe destacar que, de manera global, la identificación de especies mediante el método molecular GenoType y la espectrometría de masas MALDI-TOF es concordante, a pesar de discrepancias puntuales. Es importante recalcar que ambas metodologías tienen fundamentos diferentes: la espectrometría de masas MALDI-TOF se basa en la comparación de espectros proteicos contra una base de datos (Contreras et al., 2020), mientras que el GenoType se fundamenta en la amplificación de la región del ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica por una región particular del ARNr (Sardiñas-Aragón et al., 2019). Además, los resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF se ven influenciados por el número de espectros incluidos para cada especie y su representación en la base de datos (Rodríguez-Temporal et al., 2022). Cuando este número es bajo, existe la posibilidad de que el software identifique el aislamiento en el grupo o complejo más próximo (López-Medrano, Burgos-Asurmendi & Rivero-Lezcano, 2022).

En este sentido, las discrepancias presentadas se deben a la relación estrecha entre especies y subespecies de un mismo grupo o complejo (Rodríguez-Temporal et al., 2022). Para algunas especies, el método molecular permite discernir más entre especies de un mismo complejo, como es el caso de *M. tuberculosis* complejo, *M. abscessus* complejo y *M. intracellulare* complejo. Por ejemplo, *M. bovis* forma parte del *M. tuberculosis* complejo, y está estrechamente relacionada con las especies pertenecientes a este. En informes previos, se ha reportado que la espectrometría de masas MALDI-TOF no permite identificar las especies de este complejo, mientras que los métodos moleculares sí (O'Connor et al., 2020). De manera similar, las subespecies del complejo *M. abscessus* no se logran discriminar entre sí al usar espectrometría de masas MALDI-TOF, ya que están muy relacionadas filogenéticamente y no se logran diferenciar al secuenciar un único gen, por lo que se requiere el uso de secuenciación multilocus para lograr la identificación a nivel de subespecie, que es finalmente el fundamento de los métodos moleculares empleados (Saleeb et al., 2011). Asimismo, las especies pertenecientes al complejo *M. intracellulare* como *M. intracellulare* y *M. chlamydiae* solo difieren en un par de bases en la región 16S del ARNr, y para diferenciarlas se requiere la secuenciación del 23S de la región espaciadora interna transcrita (Saleeb et al., 2011).

La espectrometría de masas MALDI-TOF tampoco permite diferenciar entre las especies *M. mucogenicum* y *M. phocacium*, este es un set de micobacterias de rápido crecimiento, cercanamente emparentadas, que también requieren de secuenciación multilocus para ser diferenciadas (Saleeb et al., 2011).

Para otras especies, el MALDI-TOF es el método que permite una mayor discriminación. Efectivamente, la espectrometría de masas MALDI-TOF permite diferenciar algunas de las especies pertenecientes a *M. fortuitum* complejo (*M. farcinogenes*, *M. fortuitum* subsp *fortuitum*, *M. porcinum* y *M. senegalense*) o, relacionadas de manera estrecha a él (*M. peregrinum*, *M. mageritense*) (Riviere & Monteiro-Riviere, 2014), mientras que la técnica molecular los identifica a todos como *M. fortuitum* grupo. Asimismo, un aislamiento fue identificado como *M. triplex* por espectrometría de masas MALDI-TOF, mientras que por GenoType no se pudo discriminar entre las especies *M. genavense* y *M. triplex*. Estas especies

están estrechamente relacionadas entre sí (Roth et al., 1998) y los métodos moleculares no permiten su diferenciación.

Se presentó otro caso de un aislamiento identificado como *M. gordonae* por GenoType y *M. paragordonae* por espectrometría de masas MALDI-TOF. *M. paragordonae* es una especie descrita más recientemente y tiene un 99,0% de similitud al secuenciar el ADN con *M. gordonae* (Kim et al., 2014). De igual manera, un aislamiento fue identificado como *M. simiae* por GenoType y *M. sherrisii* por MALDI-TOF. *M. simiae* y *M. sherrisii* son especies estrechamente relacionadas, siendo esta última la que se describió más recientemente (Taján et al., 2013). Inclusive, se ha recomendado volver a identificar los aislamientos previamente designados como *M. simiae*, ya que antes de que *M. sherrisii* fuera descrita, estas especies se identificaban como *M. simiae* (Taján et al., 2013).

Otra discrepancia que se presentó que no sigue las tendencias antes descritas, fue la identificación de un mismo aislamiento como *M. celatum* por Genotype y *M. nonchromogenicum* por espectrometría de masas MALDI-TOF. *M. nonchromogenicum* forma parte del *M. terrae/M. nonchromogenicum* complejo, sin embargo *M. celatum* no forma parte de este, ni se encuentra relacionada con este complejo (Pennington et al., 2021). Más bien, se ha descrito que *M. celatum* se relaciona con especies como *M. xenopi* (Tortoli et al., 2017), de manera que esta disimilitud no se atribuye a la relación estrecha entre las especies. Por otro lado, la librería de micobacterias usada, la librería ML2.0, incluye espectros de *M. celatum* (Rodríguez-Temporal et al., 2017), por lo que se esperaría que, si verdaderamente se tratara de esta especie, se hubiera podido identificar por espectrometría de masas MALDI-TOF, o que se hubiera identificado como una especie relacionada a *M. celatum*. Por todo lo anterior, se presume que la identificación como *M. celatum* fue un error en la ejecución de la metodología GenoType, y que la correcta identificación de este aislamiento es *M. nonchromogenicum*.

En la identificación a nivel de especie mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de aislamientos identificados previamente como *Mycobacterium* sp. mediante GenoType se identificaron 6 aislamientos como complejo *M. intracellulare* y 6 aislamientos como *M.*

fortuitum subsp. fortuitum, además, se identificaron otros aislamientos como *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. interjectum*, sin embargo, estas especies se pudieron haber identificado mediante GenoType.

Entre los motivos por los cuales la identificación a nivel de especie de estos aislamientos mediante GenoType no fue exitosa, se encuentra la posibilidad de que estas cepas presenten mutaciones en las regiones genómicas para las cuales se diseñaron los primers de la prueba.

Por último, para la mayoría de las especies que no se habían identificado anteriormente en el país, se ha descrito alguna relevancia clínica en la literatura. Sin embargo, para establecer que una MNT está causando una infección, siempre se debe correlacionar los hallazgos de laboratorio con la sintomatología del paciente, la evaluación clínica, las características demográficas y epidemiológicas del paciente y los resultados microbiológicos de laboratorio (Pennington et al., 2021), considerando el tipo de muestra y el número de aislamientos previos de una misma especie (Drummond & Kasperbauer, 2019). Esto en el contexto de que usualmente las MNT no suelen causar infección y más bien la mayoría de los casos pueden ser contaminantes en el laboratorio (Contreras et al., 2020). Un posible estudio futuro que se podría realizar para estos mismos aislamientos es la correlación entre la especie aislada, los signos y síntomas referidos del paciente, el tipo de muestra del cual se aisló la micobacteria y las características demográficas y epidemiológicas del paciente.

Cabe destacar que este estudio tiene limitaciones, principalmente la falta de evaluación del tiempo de crecimiento de los cultivos utilizados, así como la comparación del costo de cada método en cuanto a su uso rutinario en el laboratorio.

Conclusiones

El mejor protocolo de extracción de proteínas para identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF fue el protocolo 5, el cual se basa en la concentración de los cultivos líquidos para obtener una mayor cantidad de biomasa que facilite la extracción de proteínas.

El desempeño la espectrometría de masas MALDI-TOF en comparación con tecnologías moleculares para la identificación de las MNT es adecuado y puede variar dependiendo del complejo o del grupo de especies. Se recomienda el uso complementario de ambas tecnologías.

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite la identificación correcta a especie de aislamientos previamente identificados como *Mycobacterium* sp. por métodos moleculares.

La mayoría de las nuevas especies identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF son de relevancia clínica, por lo tanto, es necesario contar con un método para su identificación en el país, así como determinar si son realmente agentes etiológicos de un cuadro clínico o contaminantes de la muestra.

Referencias bibliográficas

Ahmed, I., Tiberi, S., Farooqi, J., Jabeen, K., Yeboah-Manu, D., Migliori, G. B. & Hasan, R. (2020). Non-tuberculous mycobacterial infections-A neglected and emerging problem. *International Journal of Infectious Diseases*, 92(46). 46-50 10.1016/j.ijid.2020.02.022

Alcaide, F., Amlerova, J., Bou, G., Ceysens, P., Coll, P., Corcoran, D., Fangous, M., González-Álvarez, I., Gorton, R., Greub, G., Hery-Arnaud, G., Hrábak, J., Ingebretsen, A., Lucey, B., Marekovic, I., Mediavilla-Gradolph, F., Monté, M., O'Connor, J., O'Mahony, J., Oputa, O., O'Reilly, B., Orth-Höller, D., Oviaño, M., Palacios, J., Palop, B., Pranada, A., Quiroga, L., Rodrigues-Temporal, D., Ruiz-Serrano, M., Tudo, G., Van den Bossche, A., van Ingen, I. & Rodríguez-Sánchez, B. (2018). How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 24(6). 599-603. 10.1016/j.cmi.2017.11.012

Aljishi, A., Jabr Alwazzeah, M. & Kristjansson, M. (2021). Pneumonia due to *Mycobacterium cosmeticum* in a renal transplant recipient. *BMJ Case Reports*, 14(3). 1.4. 10.1136/bcr-2020-234800

Atallah, D., El Kassis, N., Araj, G., Nasr, M., Nasnas, R., Veziris, N. & Sarkis, D. (2014). Mycobacterial infection of breast prosthesis – a conservative treatment: a case report. *BCM Infectious Diseases*, 14(238). 1-4. 10.1186/1471-2334-14-238

Bailo, R., Radhakrishnan, A., Singh, A., Nakaya, M., Fujiwara, N. & Bhatt, A. (2022). The mycobacterial desaturase DesA2 is associated with mycolic acid biosynthesis. *Scientific reports*, 12. 1-10. 10.1038/s41598-022-10589-y

Barretto, A., Soares, J., Messias, L., Yamada, E., Lopes, M. & Fusco, A. (2016). A fatal case of pulmonary infection by *Mycobacterium colombiense* in Para State, Amazon Region, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(3). 344-346. 10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.011

Chan, A.; A., Kabbani, A., Staton, G. & Kraft, C. (2014). *Mycobacterium paraffinicum* causing symptomatic pulmonary infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4). 1281-1283. 10.1128/JCM.03107-13

Clark, A., Kaleta, E., Arora, A. & Wolk, D. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3). 547-603. 10.1128/CMR.00072-12

Contreras, S., Rodríguez, D., Vera, F., Balcells, M. E., Celis, L., Legarraga, P., Román, J. C. & García, P. (2020). Identificación de especies de micobacterias mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). *Revista chilena de infectología*, 37(3), 252-256. 10.4067/s0716-10182020000300252

Cooksey, R., de Waard, J., Yakrus, M., Toney S., Da Mata, O., Nowicki, S., Sohner, K., Koch, E., Petti, C., Morey, R. & Srinivasan, A. (2007). *Mycobacterium cosmeticum*, Ohio and Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8) . 1267-1269. 10.3201/eid1308.061261

Cooksey, R., de Waard, J., Yakrus, M., Rivera, I., Chopite, M., Toney, S., Morlock, G. & Butler, W. (2004). *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from cosmetic infection from a nail salon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54. 2385-2391. 10.1099/ijms.0.63238-0

Dimopoulou, D., Dimopoulou, A., Kontos, K., Fessatou, S., Proikas, K., Agniadis, E., Zavras, N., Attilakos, A. & Papaevangelou, V. (2021). *Mycobacterium marseillense lymphadenitis*: A newly identified strain in the pediatric population . *Infectious Diseases Now*, 51(8). 1-3. 10.1016/j.idnow.2021.03.008

Diriba, G., Kebede, A., Yaregal, Z., Getahun, M., Tadesse, M., Meaza, A., Zekarias, D., Moga, S., Dilebo, J., Gudena, K., Hassen, M. & Desta, K. (2017). Performance of Mycobacterium Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein–Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium*

tuberculosis at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 10(181). 10.1186/s13104-017-2497-9

Dohál, M., Porvazník, I., Solovic, I. & Mokry, J. (2021). Whole Genome Sequencing in the management of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections. *Microorganisms*, 9(11). 1-15. 10.3390/microorganisms9112237

Drummond, W. & Kasperbauer, S. (2019). Nontuberculous Mycobacteria epidemiology and the impact on pulmonary and cardiac disease. *Thoracic Surgery Clinics*, 29(1), 59-60. 10.1016/j.thorsurg.2018.09.006

Esparcia, O., Navarro, F., Quer, M. & Coll, P. (2008). Lymphadenopathy Caused by *Mycobacterium colombiense*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5). 1885-1887. 10.1128/JCM.01441-07

Fernández-Esgueva, M., Fernández-Simon, R., Monforte-Cirac, M. L., López-Calleja, A. I., Fortuño, B. & Viñuelas-Bayon, J. (2021). Use of MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics) for identification of *Mycobacterium* species isolated directly from liquid medium. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(5), 241. 100.1.011061/6j./eji.meicme.c2.202002.0.50.501.0211

Fujiwara, K., Furuuchi, K., Aono, A., Uesugi, F., Osawa, T., Shimoda, M., Takaki, A., Kurashima, A., Ohta, K., Mitarai, S. & Morimoto, K. (2021). *Mycobacterium europaeum* lung disease in an immunocompetent patient without underlying lung disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(1). 107-109. 10.1016/j.jiac.2020.09.012

Grandjean-Lapierre, S., Toro, A. & Drancourt, M. (2017). *Mycobacterium iranicum* bacteremia and hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report. *BMC Research Notes*, 10(1). 1-4. 10.1186/s13104-017-2684-8

Grottola, A., Roversi, P., Fabio, A., Antenora, F., Apice, M., Tagliazucchi, S. & Gennari, W. (2014). Pulmonary Disease Caused by *Mycobacterium marseillense*, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10). 1769-1770. 10.3201%2Fcid2010.140309

Hain Life Science. (2014). GenoType Mycobacterium CM ver1.0. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi7q82O7aX-AhXrm2oFHS9FBi4QFnoECA8QAAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.hain-lifescience.de%2Fen%2Fproducts%2Fmicrobiology%2Fmycobacteria%2Fntm%2Fgenotype-mycobacterium-cm.html&usg=AOvVaw0NSYlp_fsG1SefLXNMLiyu

Hassan, K., Kumar, P., Al Owaisi, R., Al Kindi, A., Al Azri, S., Adikaram, C., Al Balushi, Z., Khamis, F. & Al Busaidi, I. (2022). First case report of *Mycobacterium canariasense* native mitral valve endocarditis. *International Journal for Infectious Diseases*, 121. 66-68. 10.1016/j.ijid.2022.04.025

Heidarieh, P., Hashemi-Shahraki, A., Khosravi, A., Zaker-Boustanabad, S., Shojaei, H. & Feizabadi, M. (2013). *Mycobacterium arupense* infection in HIV-infected patients from Iran. *Journal of STDs & AIDS*, 24(6). 485-487. 10.1177/0956462412472818

Hernández-Solis, A., Gonzáles-Villa, M., Ramírez-Gonzáles, J., Colin-Muñoz, Y. & Cicero-Sabido, R. (2019). *Mycobacterium kumamotoense* in the cervical región in an immunocompetent patient, clinical case report in Mexico. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(12). 1165-1169. 10.3855/jidc.11935

Hirase, T., Le, J., Jack, R.; Siff, T. & Liberman, S. (2021). Extensor Tenosynovitis due to *Mycobacterium marseillense* Infection in a Renal Transplant Recipient. *Journal of the American Academy of Orthopedic Surgeons*, 5(1). 1-4. 10.5435/JAAOSGlobal-D-20-00047

Hosseini, S. & Martinez-Chapa, S. (2017). Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis: Applications in Bio-diagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery. Springer.

Inagaki, K., Huang, T., Lee, C., Tu, H. & Lee S. (2018) Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE* 13(2). 1-15. 10.1371/journal.pone.0192291

Mizutani, M., Nagahara, Y., Asano, M., Masamoto, D., Sawada, O., Aono, A., Chikamatsu, K. & Mitarai, S. (2016) Successful Treatment of Peritoneal Dialysis-related Peritonitis due to *Mycobacterium iranicum*. *Internal Medicine*, 55(14). 1929-1931. 10.2169/internalmedicine.55.5219

Jaki, B., Franzblau, S., Cho, S. & Pauli, G. (2006). Development of an extraction method for mycobacterial metabolome analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4). 1-12. 10.1016/j.jpba.2005.10.022.

Jiménez, S., Campos-Herrero, I., García, D., Luquin, M., Herrera, L. & García, M. (2004). *Mycobacterium canariasense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5). 1729-1734. 10.1099/ijs.0.02999-0

Johansen, M., Herrmann, J. & Kremer, L. (2020). Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(7). 10.1038/s41579-020-0331-1

Kalaiarasan, E., Thangavelu, K., Krishnapriya, K., Muthuraj, M., Jose, M. & Joseph, N. M. (2020). Diagnostic performance of real time PCR and MALDI-TOF in the detection of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Tuberculosis*, 125. 1-8. 10.1016/j.tube.2020.101988

Kalra, S. & Rubinstein, I. (2022). *Mycobacterium iranicum* pulmonary disease in an elderly patient with extensive usual interstitial pneumonia: Case report. *Clinical Case Reports*, 10(10). 1-3. 10.1002/ccr3.6329

Kim, B., Hong, S., Kook, Y. & Kim, B. (2014). *Mycobacterium paragordoniae* sp. nov., a novel slowly growing scoto-chromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(1). 1-25. 10.1099/ijms.0.051540-0

Kim, S.; Yoo, H.; Jeong, B.; Jeon, K.; Ha, Y.; Huh, H.; Ki, C.; Lee, N.; Shin, S. & Koh, W. (2014). First case of nontuberculous mycobacterial lung disease caused by *Mycobacterium marseillense* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(3). 1-3. 10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.019

Koh, W. (2017). Nontuberculous Mycobacteria - Overview. *Microbiology Spectrum*, 5(1). 1-7. 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016

Lanigan, M., Vaughan, J., Shiell, B., Beddome, G. & Michalski, W. (2004). Mycobacterial proteome extraction: comparison of disruption methods. *Proteomics*, 4(4). 194-1100. 10.1002/pmic.200300672

Lee, S., Hong, S., Park, S. & Kim, E. (2014). First Korean Case of *Mycobacterium arupense* tenosinovitis. *Annals of Laboratory Medicine*, 34(4). 321-324. 10.3343/alm.2014.34.4.321

Legout, L., Ettahar, N., Massongo, M., Veziris, N., Ajana, F., Beltrand, E. & Senneville, E. (2012). Osteomyelitis of the wrist caused by *Mycobacterium arupense* in a immunocompetent patient: a unique case. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(10). 761-762. 10.1016/j.ijid.2012.05.007

Li, Y., Zhang, W., Zhao, J., Lai, W., Zhao, Y., Li, Y. & Qu, J. (2022). *Mycobacterium paragordoniae* is an emerging pathogen in human pulmonary disease: clinical features, antimicrobial susceptibility testing and outcomes. *Emerging Microbes & Infections*, 11. 1973-1981. 10.1080/22221751.2022.2103453

Lopez, F., Miley, M. & Taiwo, B. (2016). *Mycobacterium arupense* as an Emerging Cause of Tenosynovitis. *Emerging Infectious Diseases*, 22(3). 559-561. 10.3201/eid2203.15174

López-Medrano, R., Burgos-Asurmendi, I. & Rivero-Lezcano, O. (2022). A rapid proteomic system (MALDI-TOF) for nontuberculous-mycobacteria identification. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 40(7). 385-387. 10.1016/j.eimc.2021.06.007

Luquin, M., Ausina, V., Vincent-Lévy-Frébault, V., Lanéelle, M., Belda, F., Garcí Abarceló, M., Prats, G. & Dafee, M. (1993). *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3). 405-413. 10.1099/00207713-43-3-405

Masaki, T., Ohkusu, K., Hata, H., Fujiwara, N., Iihara, H., Yamada-Noda, M., Nhung, P., Hayashi, M., Asano, Y., Kawamura, Y. & Ezaki, T. (2006). *Mycobacterium kumamotonense* sp. nov. Recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: novel slowly growing nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiology and Immunology*, 50(11). 889-897. 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03865.x

Mateo, L., Rufi, G., Nolla, J. & Alcaide, F. (2004). *Mycobacterium chelonae* tenosynovitis of the hand. *Seminars in Arthritis Rheumatism*, 34(3). 617-622. 10.1016/j.semarthrit.2004.06.002

Murcia, M., Tortoli, E., Menendez, C., Palenque, E. & Garcia, M. (2006). *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9). 2049-2054. 10.1099/ij.s.0.64190-0

Neonakis, I., Gitti, Z., Kontos, F., Bariataki, S., Petinaki, E., Baritaki, M., Liakou, V., Zerva, L. & Spandidos, A. (2010). *Mycobacterium arupense* pulmonary infection: antibiotic

resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. *Indian Journal of Clinical Microbiology*, 28(2). 173-176. 10.4103/0255-0857.62502

Nomura, Y., Okamoto, K., Ohama, Y., Higurashi, Y. & Moriya, K. (2021). Tenosynovitis caused by *Mycobacterium marseillense*, initially identified as *Mycobacterium avium* complex using AccuProbe and COBAS TaqMan. *BMC Infectious Diseases* 21(1092). 1-5. 10.1186/s12879-021-06770-9

O'Connor, J., Corcoran, G., O'Reilly, B., O'Mahony, J. & Lucey, B. (2020). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) for Investigation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Outbreaks: a Type Dream?. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(4). 1-3. 10.1128/jcm.02077-19

Ogawa, Y., Ito, S., Nakano, R., Kasahara, K., Kuwahara, M., Yano, H. & Mikasa, K. (2016). Surgical Site Infection due To *Mycobacterium mageritense* and Literature Review. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, 4(3). 1-2. 10.4172/2332-0877.1000283

Paniz-Mondolfi, A., Ladutko, L., Brown-Elliott, B., Vasireddy, R., Vasireddy, S., Wallace, R., Jakubiec, W., Brecher, S. & Campbell, S. (2014). First Report of *Mycobacterium canariasense* Catheter-Related Bacteremia in the Americas. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(52). 2265-2269. 10.1128/JCM.03103-13

Pathak, K., Hart, S. & Lande, L. (2022). Nontuberculous Mycobacteria Lung Disease (NTM-LD): Current Recommendations on Diagnosis, Treatment, and Patient Management. *International Journal of General Medicine*, 15. 7619-7629. 10.2147/IJGM.S272690

Pennington, K. M., Vu, A., Challener, D., Rivera, C., Shweta, F. N. U., Zeuli, J. D. & Temesgen, Z. (2021). Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous

mycobacterial disease. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 24. 1-16. 10.1016/j.jctube.2021.100244

Pereira, A. C., Ramos, B., Reis, A. C. & Cunha, M. V. (2020). Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. *Microorganisms*, 8(9). 1-49. 10.3390/microorganisms8091380

Pourahmad, F., Shojaei H, Heidarieh P, Khosravi A, Hashemi A. (2012). Report of two cases of *Mycobacterium europaeum* from Iran. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65(6). 539-541. 10.7883/yoken.65.539.

Rabodoarivelo, M., Aerts, M., Vandamme, P., Palomino, J., Rasolofo, V. & Martin, A. (2016). Optimizing of a protein extraction method for *Mycobacterium tuberculosis* proteome análisis using mass spectrometry. *Journal of Microbiology Methods*, 131(2016). 144-147. 10.1016/j.mimet.2016.10.021

Reeve, M. A. & Bachmann, D. (2019). MALDI-TOF MS protein fingerprinting of mixed simples. *Biology Methods and Protocols*, 4(1). 1-8. 10.1093/biomethods/bpz013

Renau-Mínguez, C., Herrero-Abadía, P., Ruiz-Rodríguez, P., Sentandreu, V., Torrents, E., Chiner-Oms, A., Torres-Puente, M., Comas, I., Julián, E. & Coscolla, M. (2023). Genomic analysis of *Mycobacterium brumae* sustains its nonpathogenic and immunogenic phenotype. *Frontiers in Microbiology*, 13. 1-19. 10.3389/fmicb.2022.982679

Riviere, E. & Monteiro-Riviere, N. (2014). Reference Module in Biomedical Research. Elsevier. 1-15. 10.1016/B978-0-12-801238-3.00137-9

Rocca, M., Prieto, M., Almuzara, M., Barberis, C. & Vay, C. (2019). Manual de Interpretación de Resultados de MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Instituto Malbrán.

Rocha, D., Felgueiras, O. & Duarte, R. (2020). Can environmental determinants explain Nontuberculous Mycobacteria geographic incidencia?. *Pulmonology*, 26(3), 145-150. 10.1016/j.pulmoe.2019.12.003

Rodrigues-Barretto, A., Colares-Monteiro, J., Lopes, M. & Fusco-da Costa, A. (2017). A case of pulmonary infection due to *Mycobacterium paraffinicum* from the Amazon Region. *ID Cases*, 10(2017). 1-3. 10.1016/j.idcr.2017.07.001

Rodriguez, W., Candelario, A., Otero-Dominguez, Y. & Torres-Palacios, J. (2019). A Not so Typical Atypical Mycobacterial Infection: Pulmonary Mycobacterial Infection with *Mycobacterium Marseillense*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1_meetingabstracts.a2030

Rodríguez-Aranda, A., Jiménez, M., Yubero, J., Chaves, F., Rubio-García, R., Palenque, E., García, M. & Menéndez, C. (2010). Misidentification of *Mycobacterium kumamotoense* as *M. tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(7). 1178-1180. 10.3201/eid1607.091913

Rodriguez-Temporal, D., Alcaide, F., Mareković, I., O'Connor, J., Gorton, R., van Ingen, J., Van den Bossche, A., Héry-Arnaud, G., Beauruelle, C., Orth-Höller, D., Palacios-Gutiérrez, J., Tudó, G., Bou, G., Ceyssens, P., Garrigó, M., González-Martin, J., Greub, G., Hrabak, J., Ingebretsen, A., Mediavilla-Gradolph, M., Oviaño, M., Palop, B., Pranada, A., Quiroga, L., Ruiz-Serrano, M & Rodríguez-Sánchez, B. (2022). Multicenter study on the reproducibility of MALDI-TOF MS for nontuberculous mycobacteria identification. *Scientific Reports*, 12(1237). 1-7. 10.1038/s41598-022-05315-7

Rodriguez-Temporal, D., Perez-Risco, D., Struzka, E., Mas, M. & Alcaide, F. (2017). Impact of updating the MALDI-TOF MS database on the identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Mass Spectrometry*, 52(9). 1-23. 10.1002/jms.3944

Rodriguez-Temporal, D., Perez-Risco, D., Struzka, E., Mas, M. & Alcaide, F. (2018). Evaluation of Two Protein Extraction Protocols Based on Freezing and Mechanical

Disruption for Identifying Nontuberculous Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from Liquid and Solid Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4). 1-8. 10.1128/JMC.015448-17.

Rodríguez-Temporal, D., Rodríguez-Sánchez, B. & Alcaide, F. (2020). Evaluation of MALDI Biotyper interpretation criteria for the accurate identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(10). 1-8. 10.1128/JCM.01103-20

Roth, A., Fischer, M., Hamid, M., Michalke, S., Ludwig, W. & Mauch, H. (1998). Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S 23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *American Society for Microbiology*, 36(1).139-147. 10.1128/jcm.36.1.139-147.1998

Saleeb, P., Drake, S., Murray, P. & Zelazny, A. (2011). Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5). 1790-1794. 10.1128/JCM.02135-10

Sakhaee, F., Vaziri, F., Bahramali, G., Taremian, K., Siadat, S. & Fateth, A. (2019). Pulmonary Infection Associated with *Mycobacterium canariasense* in suspected Tuberculosis Patient, Iran. *Emerging Infectious Diseases*, 25(10). 1984-1986. 10.3201/eid2510.190156.

Sánchez-Cárdenas, C., Zambrano, M., Martínez-Chavarria, L., Xicohtencatl-Cortes, J., Arenas, R. & Hernández-Castro, R. (2020). Cutaneous infection due to *Mycobacterium marseillense* acquired following acupuncture. *Acupuncture in Medicine*, 38(3). 1-2. 10.1177/0964528419883278

Sardiñas-Aragón, M., Mederos-Cuervo, L., García-León, G., Rosarys-Martínez, M., Lemus-Molina, D. & Díaz-Rodríguez, R. (2019). Rapid identification of nontuberculous mycobacteria in Cuba by the «GenoType *Mycobacterium* CM/AS» techniques. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 78(3). 290-295. 10.35366/NT193E

Senda, H., Muro, H. & Terada, S. (2011). Flexor tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense*. *Journal of Hand Surgery*, 36(1). 72-73. 10.1177/1753193410381825

Sharma, S. & Upadhyay, V. (2020). Epidemiology, diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian Journal of Medical Research*, 15(3). 185-226. 10.4103/ijmr.IJMR_902_20

Taján, J., Espasa, M., Sala, M., Navarro, M., Font, B., González-Martín, J. & Segura, F. (2013). Case Report: Disseminated Infection by *Mycobacterium sherrisii* and *Histoplasma capsulatum* in an African HIV-Infected Patient. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5). 914-917. 10.4269/ajtmh.12-0572

Tan, C. & Perera, R. (2019). A rare case of lymphadenitis and pulmonary disease caused by *Mycobacterium paraffinicum*. *Respirology Case Reports*, 7(4). 1-3. 10.1002/rcr2.414

Tan, E., Tande, A., Osmon, D. & Wilson, J. (2017). *Mycobacterium iranicum* septic arthritis and tenosynovitis. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 8. 16-18. 10.1016/j.jctube.2017.05.003

Tortoli, E., Fedrizzi, T., Meehan, C., Trovato, A., Grottola, A., Giacobazzi, E., Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., Frascaro, F., De Sanctis, V., Pecorari, M., Jousson, O., Segata, N. (2017) Cirillo, D. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infection, Genetics and Evolution*, 56. 1-21. 10.1016/j.meegid.2017.10.013

Tsai, T., Lai, C., Tsai, C., Chang, C., Hsiao, C. & Hsueh, P. (2008). Tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense* in a patient with diabetes mellitus. *Clinical Infectious Diseases*, 47(6). 861-863. 10.1086/591281.

Turenne, C. (2019). Nontuberculous mycobacteria: insights on taxonomy and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 72.159-168. 10.1016/j.meegid.2019.01.017

Vicente, M., Lung, M., Gulin, C., Tórtola, M. & Corona, P. (2018). Septic Nonunion Caused by *Mycobacterium canariasense*. *JBJS Case Connector*, 8(4). 1-5. 10.2106/JBJS.CC.18.00033

Vuorenmaa, K., Salah, I., Barlogis, V., Chambost, H. & Drancourt, M. (2009). *Mycobacterium colombiense* and Pseudotuberculous Lymphadenopathy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4). 619-620. 10.3201/eid1504.081436

Weston, J. Pandey, S., Matthews, E. & Bursle, E. (2018). First case report of human infection with *Mycobacterium stomatepiae*. *JMM Case Reports*, 5(5). 1-3. 10.1099/jmmcr.0.005146

Anexos

Tabla A1. Identificación a nivel de especie de las muestras previamente identificadas como *Mycobacterium* sp.

Código	Identificación por MALDI-TOF	Medio	Réplica		Librería
			1	2	
CNRM-301	<i>M. intracellulare complejo</i>	LJ	2.15	2.08	Mycobacteria
CNRM-302	<i>M. intracellulare complejo</i>	LJ	1.86	1.95	Mycobacteria
CNRM-303	<i>M. intracellulare complejo</i>	LJ	1.75	1.55*	Mycobacteria
CNRM-304	<i>M. europaeum</i>	MGIT	1.72	1.72	Mycobacteria
CNRM-305	<i>M. szulgai</i>	LJ	2.01	1.86	Mycobacteria
CNRM-306	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	MGIT	2.01	-	Standard
CNRM-307	<i>M. arupense</i>	MGIT	2.10	2.23	Mycobacteria
CNRM-308	<i>M. intracellulare complejo</i>	LJ	1.92	1.84	Mycobacteria
CNRM-309	<i>M. fortuitum</i>	LJ	2.00	1.98	Mycobacteria
CNRM-310	<i>M. szulgai</i>	LJ	1.86	1.83	Mycobacteria
CNRM-311	<i>M. iranicum</i>	LJ	2.20	2.20	Mycobacteria
CNRM-312	<i>M. colombiense</i>	LJ	1.60	1.87	Mycobacteria
CNRM-313	<i>M. fortuitum</i>	LJ	2.01	1.99	Mycobacteria
CNRM-314	<i>M. fortuitum</i>	LJ	1.96	2.04	Mycobacteria
CNRM-315	<i>M. canariasense / M. cosmeticum</i>	LJ	1.78	1.72	Mycobacteria
CNRM-316	<i>M. brumae</i>	LJ	1.80	1.51*	Mycobacteria
CNRM-317	<i>M. fortuitum</i>	LJ	1.98	1.93	Mycobacteria
CNRM-318	<i>M. abscessus</i>	LJ	1.83	1.73	Mycobacteria
CNRM-319	<i>M. intracellulare complejo</i>	LJ	1.86	1.89	Mycobacteria
CNRM-320	<i>M. arupense</i>	LJ	1.97	1.73	Mycobacteria
CNRM-321	<i>M. fortuitum</i>	MGIT	1.92	1.78	Mycobacteria
CNRM-322	<i>M. intracellulare complejo</i>	MGIT	1.60	1.60	Mycobacteria
CNRM-323	<i>M. marseillense</i>	MGIT	1.63	1.64	Mycobacteria
CNRM-324	<i>M. fortuitum</i>	LJ	1.72	1.88	Mycobacteria
CNRM-325	<i>M. stomatepiae</i>	MGIT	1.88	1.93	Mycobacteria
CNRM-326	<i>M. paraffinicum</i>	MGIT	1.79	1.63	Mycobacteria
CNRM-327	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	MGIT	1.74	-	Standard
CNRM-328	<i>M. interjectum</i>	MGIT	1.66	1.61	Mycobacteria
CNRM-329	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	MGIT	1.84	-	Standard
CNRM-330	<i>M. kumamotonense</i>	LJ	1.71	1.64	Mycobacteria
CNRM-331	<i>M. chelonae</i>	MGIT	1.95	1.63	Mycobacteria
CNRM-332	<i>M. canariasense / M. cosmeticum</i>	LJ	1.77	2.01	Mycobacteria
CNRM-333	<i>M. canariasense / M. cosmeticum</i>	LJ	1.99	1.92	Mycobacteria
CNRM-334	<i>M. stomatepiae</i>	MGIT	1.86	1.65	Mycobacteria
CNRM-335	<i>M. stomatepiae</i>	MGIT	1.67	1.66	Mycobacteria
CNRM-336	<i>M. kumamotonense</i>	LJ	2.01	2.01	Mycobacteria

*Score menor a 1,59