

“APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *SPOROTHRIX SPP.*”

Br. Lucía Correa, Br. María Barragan, Br. Valentina Alvarez, Br. Sofía Pimenta, Br. Romina Ferreira, Br. Guillermina Martinez.
Docente orientador: Dra. Elisa Cabeza. Co-orientador. Dra. Lucía Dalcín.
Instituto de Higiene - Facultad de Medicina UdelaR. 2023.

Introducción

La esporotricosis es una micosis por implantación que afecta piel, tejido celular subcutáneo y vasos y ganglios linfáticos. Es producida por diferentes especies de *Sporothrix spp.* Las especies que más frecuentemente generan micosis en el ser humano son *S. schenckii* (sensu stricto), *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. liurei*. En la actualidad el paradigma de esta micosis está en continua revisión dado que en la región se han reportado casos de esporotricosis por *S. brasiliensis* con características de enfermedad invasiva y comportamiento zoonótico. Por este motivo en la actualidad interesa saber cuales son las especies circulantes en nuestro país capaces de generar patología.

Para la identificación de género el cultivo sigue siendo el patrón oro sin embargo en la actualidad cada vez presenta menos sensibilidad para la identificación a nivel de especie. Es así que métodos como el PCR y MALDI-TOF se han vuelto indispensables para la caracterización a nivel de especie. El objetivo del presente trabajo fue implementar la espectrometría de masas en el diagnóstico de aislamientos de *Sporothrix spp.*

Objetivo general

Implementar la espectrometría de masas en el diagnóstico de aislamientos de *Sporothrix spp.*

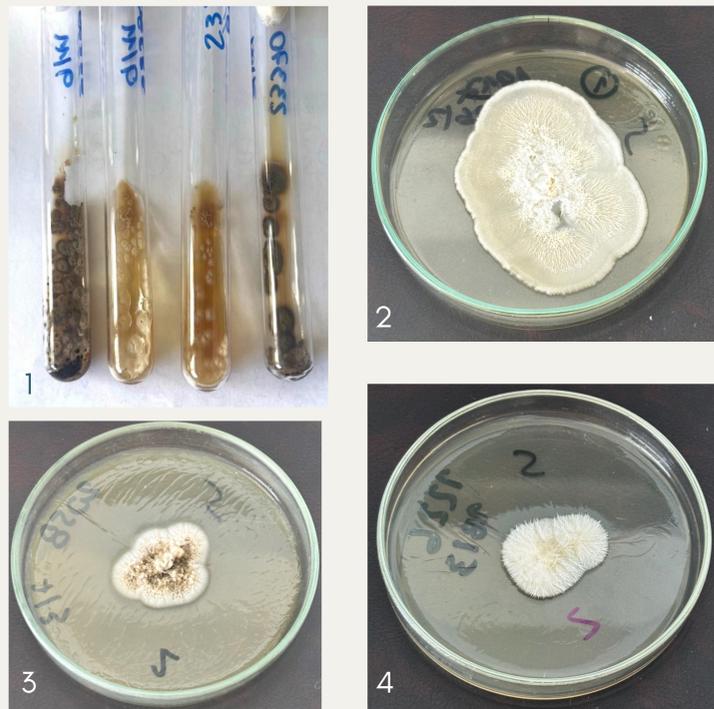


Fig 1 2 3 y 4 Colonias de *Sporothrix spp* agar Sabouraud

Materiales y métodos

Identificación mediante técnicas convencionales: Las cepas fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa en placas de Petri e incubadas a 28°C durante 14 días. Una vez obtenido el crecimiento de colonias macroscópicamente compatibles con *Sporothrix spp* se comprobó la pureza de las mismas mediante observación microscópica con lactofenol. Para estudiar las características microscópicas de la fase micelial, los aislamientos se cultivaron en portaobjetos (cultivo en lámina) con agar Sabouraud. Los mismos se incubaron a 28°C durante 14 a 21 días y posteriormente fueron examinados bajo un microscopio óptico. Se evaluarán las características de los filamentos y elementos de reproducción asexual del hongo, los conidios; evaluando forma, disposición y coloración de los mismos. Con éstas características utilizando claves identificatorias que utilizamos con cada cepa, las identificamos a nivel de género y de especie de acuerdo a las mismas.

Identificación por espectrometría de masas: Todas las cepas de *Sporothrix spp.* se identificaron por espectrometría de masas: MALDI-TOF. Para el procedimiento de extracción de proteínas utilizamos el protocolo publicado por Cassagne et al. Para el análisis de los espectros obtenidos utilizamos el software MALDI BiotyperTM 3.0 (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania).

Interpretación de resultados siguiendo los siguientes criterios: identificación aceptable a nivel de especie y género, cuando el score sea $\geq 1,7$. Los scores menores de 1,6 y mayores o iguales a 1,5 se considerarán como identificación aceptable solo a nivel de género, y scores $< 1,5$ se tomarán como identificación no confiable. Para establecer un género o especie diferente, se considerará necesaria una diferencia mínima de 10% entre el score superior y el más próximo.

Procesamiento de datos: realización de tablas con las distintas características y datos obtenidos de cada aislamiento.

Análisis de resultados: Análisis de los datos obtenidos mediante las distintas técnicas utilizadas en el proyecto, comparación con los datos obtenidos por otros autores y discusión al respecto. Utilizamos para comparar ambos resultados el test de correlación de kappa.

Resultados

Logramos poner a punto la espectrofotometría de masas para la identificación de *Sporothrix schenckii* a partir de cepas en fase filamentosa.

La totalidad de las cepas fueron analizadas por triplicado, durante cada lectura en el equipo MALDI- TOF. De las 13 cepas estudiadas, 7 se identificaron como *Sporothrix schenckii* y 1 fue identificada como *Lomentospora prolificans*. Obtuvimos una correlación a nivel de género moderada ($k=0,48$). La cepa identificada como *L. prolificans* se eliminó para el análisis posterior.

Respecto a la identificación mediante el equipo MALDI- TOF y la comparación con su base de datos las cepas identificadas *Sporothrix schenckii*, 4 presentaron un score $\geq 1,7$ por lo que son aceptables a nivel de género y especie, 3 cepas tuvieron un score entre 1,5 y 1,6, por lo cual se considera una identificación por este método como confiables a nivel de género. Para las 5 cepas restantes no se obtuvieron espectros que fueran capaces de permitir la identificación de las mismas.

Una vez obtenidos los espectros procedimos a analizarlos en la base de datos MSI y en la base de datos abierta MicrobeNet de CDC, disponible en <https://microbenet.cdc.gov/>.

Discusión

Los resultados obtenidos mediante la base de datos de MALDI TOF eran los esperados, dado que la base de datos de Bruker no tiene espectros compatibles con otras especies de *Sporothrix* no *schenckii* por lo cual dada la similitud de los espectros era esperable que la identificación de la totalidad fuese *S. schenckii* y que los scores resultaran bajos. Sin embargo, nuestro mayor interés era poder obtener los aspectos e identificarlos mediante las bases de datos mundiales como son MSI y MicrobeNet lo cual nos permitiría dilucidar efectivamente la especie en cuestión. Así mismo si bien no formó parte de nuestros objetivos con el presente trabajo enriquecemos la base de datos mundiales ampliando la cantidad de espectros compartidos con la comunidad científica mundial que investiga en *Sporothrix spp.* El enriquecimiento de las bases de datos a largo plazo permitirá una identificación cada vez más precisa de los aislamientos. Así mismo logramos obtener nuestros primeros espectros de *Sporothrix spp.* Esta valiosa información nos permitirá en posibles futuras investigaciones correlacionar los espectros con la identificación mediante biología molecular utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Específicamente mediante la secuencia de alguna región de ADN que permita discriminar entre especies.

Bibliografía

- De Carolis E, et al. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. *Pathogens*. 2022;11(3):1-12.
- Cassagne C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by Matrix-Assisted laser desorption ionization Time-Of-Flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011;6(12):1-9.
- Gómez-Velásquez JC, et al. Development and validation of an in-house library for filamentous fungi identification by maldi-tof ms in a clinical laboratory in medellin (Colombia). *Microorganisms*. 2020;8(9):1-13.

ID de Cepa	Resultado de ID MALDI TOF	Resultado MSI y MicrobeNet
1917	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,83)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot A Score 21,75)
2095	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,81)	<i>Sporothrix schenckii</i> Plot A (Score 28,76)
1994	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,51)	<i>Sporothrix schenckii</i> Plot C (Score 17,45)
23370	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,54)	<i>Sporothrix schenckii</i> Plot C (Score 17,4)
1963	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,77)	<i>Sporothrix brasiliensis</i> Plot C (Score 19,39)
2058	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 2,01)	<i>Sporothrix schenckii</i> Plot A (Score 22,00)
2100	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,58)	<i>Sporothrix brasiliensis</i> Plot B (Score 22,52)
138	<i>Lomentospora prolificans</i> (Score 2,35)	<i>Lomentospora prolificans</i> (Score 22,00)
28	Sin identificación	Sin identificación
1549	Sin identificación	Sin identificación
2052	Sin identificación	Sin identificación
1226	Sin identificación	Sin identificación
1820	Sin identificación	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> (Plot C Score 12,14)

Tabla 1. Identificación mediante MALDI TOF y comparación de resultados con base de datos MSI y MicrobeNet de CDC. ID: Identificación