



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Espectrometría de Masas MALDI-TOF aplicada a la identificación
rápida de bacterias: Análisis de la *Legionella Pneumophila***

Autor:

M^a Cristina Sanz Cuesta

Tutor/es:

Susana Blanco Rodríguez

Juan Carlos López Alonso

Gabriel Alberto March Roselló

AGRADECIMIENTOS

A la hora de finalizar este trabajo me gustaría agradecer la ayuda que he recibido durante este curso:

A mis tutores, Susana y Juan Carlos, por permitirme hacer este trabajo que sale de la zona de confort dónde suelen trabajar normalmente. Estoy segura de que durante este tiempo los tres hemos aprendido muchas cosas nuevas y muchas más aplicaciones para la química.

A Gabriel, por cederme un hueco en su laboratorio en la Facultad de Medicina y transmitirme el máximo posible de conocimientos sobre microbiología en este tiempo.

Al equipo del LTI de la Universidad, por cedernos el espacio para utilizar el equipo MALDI durante toda la experimentación.

Indicar que este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida de la Junta de Castilla y León a través del proyecto *“Identificación de Microorganismos de Interés Microbiológico y Alimentario mediante Desorción Láser y Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)”* VA334U14.

Sobre todo, agradecer a mi familia, mis padres en concreto, que han aguantado mis días de estrés y de locura cuando no paraba para ir de laboratorio en laboratorio y, por su puesto, por apoyarme incondicionalmente en todo este tiempo y en todo lo que decido hacer.

A mis amigos y compañeros de la Universidad, por acompañarme durante los años de carrera y hacerlo todo mucho más sencillo, bonito, llevadero y divertido.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. <u>RESUMEN</u>	3
2. <u>ABSTRACT</u>	3
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	5
4. <u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u>	16
5. <u>MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL</u>	17
5.1. <u>MATERIALES</u>	17
5.2. <u>REACTIVOS</u>	45
5.3. <u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</u>	47
6. <u>RESULTADOS</u>	54
7. <u>CONCLUSIONES</u>	66
8. <u>GLOSARIO</u>	67
9. <u>ANEXO I</u>	70
10. <u>ANEXO II</u>	75

1. RESUMEN

La espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) es una técnica de análisis químico que permite la identificación rápida y sencilla de un gran número de compuestos, tanto de baja como de elevada masa molecular. Esta técnica, además de a la Química, puede aplicarse al análisis clínico como herramienta para pruebas bioquímicas.

Un ejemplo de aplicación de la técnica MALDI es la identificación de microorganismos como la Legionella, bacteria de gran interés epidemiológico que se ha utilizado para la experimentación en este trabajo de fin de grado donde se han analizado 92 cepas de Legionella. Para su identificación, se han extraído sus proteínas mitocondriales y se han mezclado con una matriz estándar (α -ciano-4-hidroxicinámico - CHCA) para realizar la desorción e ionización suave, obtener el espectro de masas en el intervalo de 2000-20000 Da y proceder a su caracterización.

El análisis de los resultados obtenidos de los espectros MALDI-TOF-MS se ha podido realizar la identificación genotípica de las cepas investigadas.

2. ABSTRACT

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) is a chemical analysis technique that allows the rapid and easy identification of a large number of compounds, in a wide range of molecular masses. This technique can be applied, not only in the field of Chemistry, but also for the identification of microorganisms in clinical analysis as a tool for biochemical testing.

An example of application of the MALDI technique is the identification of microorganisms as Legionella, which is a bacterium of great epidemiological interest. This has been selected for the experimentation in this work, where 92 of its strains have been analyzed. Their identification has involved the extraction of their mitochondrial proteins which have been mixed with a standard matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic - CHCA) prior to perform desorption and soft ionization to obtain the mass spectrum in the 2000-20000 Da range and proceed to its characterization.

The analysis of the results obtained from the MALDI-TOF-MS spectra has proved to have a good performance for the genotypic identification of the strains investigated.

3. INTRODUCCIÓN

La identificación bioquímica en microbiología clínica consiste en el estudio de un conjunto de caracteres que se compara con los caracteres medios de un grupo biológico conocido, de forma que la identificación es tanto mejor cuanto mayor sea el número de caracteres estudiados. Para realizar un estudio bioquímico debe tenerse un cultivo puro ya que una contaminación alterará los resultados.¹ La identificación bioquímica de la mayoría de los microorganismos aislados en los laboratorios de Microbiología Clínica requiere un tiempo elevado (de hasta 48 horas) que en algunos casos puede ser de vital importancia.

La necesidad de disponer de una técnica de identificación rápida y sencilla para la identificación de microorganismos mediante pruebas bioquímicas en el ámbito de la medicina y la salud es cada vez más grande de forma que había que buscar una técnica que nos permita analizar muestras rápidamente para realizar la identificación de forma eficaz de microorganismos como bacterias.

La técnica de la espectrometría de masas con Desorción/Ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF/ Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) responde a esta necesidad, ya que permite llevar a cabo un análisis de las proteínas del microorganismo en estudio, obteniendo su identificación de forma rápida, sencilla y económica, necesitando únicamente unos minutos para ello.

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) fueron descritos por Stephens en 1946 y en 1948 Cameron y Eggers construyeron el primer espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con grandes limitaciones en su resolución. La incorporación de fuentes de impacto de electrones pulsados proporcionó un logro significativo a principios de los años 50.² Wiley y McLaren publicaron en 1955 el diseño de un espectrómetro de masas TOF lineal que más tarde se convirtió en el primer instrumento comercial. Desde finales de los años ochenta se ha renovado el interés por estos instrumentos. Las razones fueron el progreso en la electrónica

¹ Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. Irobiología, enzimología e inmunología. Módulo II. Unidad didáctica 55: Identificación bioquímica y tipado microbiológico. MAD-Eduforma

² *Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third Edition* Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant. Chapter 2, Mass Analysers

que simplificó el manejo del flujo de datos y el hecho de que el analizador TOF está bien adaptado a la naturaleza pulsada de la ionización por desorción láser.

El uso de la desorción láser junto con la espectrometría de masas data de los años 60, cuando comenzaron a realizarse los primeros experimentos en los que se empleaba un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF). Los primeros experimentos estudiaban fundamentalmente materiales como grafito³ o carbón⁴, para determinar las trazas de metales de los cuales se analizaba la composición elemental⁵ e isotópica⁶. Para ionizar las muestras vaporizadas se empleaba el impacto electrónico y para evitar la disminución de la resolución se aplicaban campos eléctricos pulsados en la extracción de iones. Esto era necesario ya que los pulsos láseres eran demasiado largos en aquel tiempo (del orden de microsegundos).

En los años 70 se introdujeron mejoras en los láseres, creándose los primeros láseres de pulsos más cortos, con valores de decenas de nanosegundos (Q-switched Nd:YAG). Estos láseres permitieron la utilización de métodos de extracción de campo eléctrico constante. En esta década aparecieron también las técnicas de ionización multifotónica (MPI), donde se emplea el láser como método de ionización. Además, se produjo la extensión de la espectrometría de masas con desorción láser para el estudio de moléculas orgánicas y biológicas mediante el empleo de la desorción directa de los iones moleculares. Los primeros experimentos en los que se empleó la desorción láser con ionización directa tuvieron lugar en 1970 analizándose sales orgánicas⁷ y en 1978 donde se obtuvieron iones moleculares para compuestos no volátiles de elevado peso molecular⁸, donde se emplearon láseres pulsados de CO₂ y de Nd:YAG en la región del infrarrojo. En dicha década se diseñan las primeras microsondas láser para análisis de superficies,⁹ instrumentos que fueron comercializados por Leybold-Heraeus como LAMMA 500 y LAMMA 1000 y se diseñaron específicamente para el análisis elemental (atómico) de muestras biológicas preparadas en película fina. Estos equipos evolucionaron

³ J. Berkowitz, W. A. Chupka, *J. Chem. Phys.*, 40, 2365 (1964); K. A. Lincoln *Anal. Chem.* 37, 541 (1965)

⁴ B. E. Knox, F.J. Vastola, *Laser Focus*, 3, 15 (1967); F.J. Vastola, A. J. Pirone, P. H. Giver, R. R. Dutcher, "Spectroscopy in fuels, Ed. R. A. Friedel, Plennun Press, New York, pp 29-36, 1970

⁵ N. C. Fenner, N. R. Daly, *J. Mater. Sci.* 3, 259, (1968)

⁶ F. J. Eloy, *Methodes Phy. Anal.* 5,161 (1968)

⁷ F.J. Vastola, R. O. Mumma, A.J. Pirone, *Org. Mass. Spectrom.* 3, 101 (1970)

⁸ M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, M. C. T. N de Brauw, *Anal. Chem.*, 50 985 (1978)

⁹F. Hillenkamp, E. Unsold, R. Kaufmann, R. Nische, *Nature*, 256, 119 (1975); R. Nische, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, E. Unsold, H. Vogt, R. Wechsung, *Isr. J. Chem.* 17, 181 (1978)

hacia las técnicas que hoy conocemos como MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) en la década de los 80.

La técnica MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Desorción/Ionización láser asistida por matriz) fue descrita por primera vez por Karas y Hillenkamp en 1985 en un artículo donde emplearon un láser pulsado de Nd:YAG a 266 nm para el análisis de Alanina y Triptófano, obteniendo una mayor efectividad en la producción en los iones moleculares en presencia de Triptófano en comparación del análisis de la Alanina pura.^{10, 11} Se desarrolló de manera simultánea en dos laboratorios en 1987. Por un lado, en el laboratorio de Koichi Tanaka, de la corporación Shimadzu Japan¹², usaron un láser pulsado de N₂ (337 nm) en la región del UV y un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo para registrar el espectro de masas de los iones moleculares de la Caboxipeptidasa A ($m/z=34529$ Da) disuelta en nanopartículas de cobalto en glicerol junto a una matriz de polvo metálico finamente dividido, y de multímeros de la enzima lisozima ($m/z=14307$ Da), hasta el pentámero de $m/z=71736$.¹³ Por otro lado, en el segundo laboratorio perteneciente a la Universidad de Muenster (Alemania), Karas y Hillenkamp usaron una matriz orgánica de ácido nicotínico que absorbe en el UV junto con la muestra y emplearon un láser de Nd:YAH cuadruplicado (266 nm) con el que se desorbían los iones intactos de proteínas disueltas en la matriz. Éste desarrollo es el que se asemeja más a la técnica como la conocemos ahora. El primer trabajo de Karas incluía la detección de albúmina de suero bobino en una microsonda láser comercial modificada aumentando el potencial de aceleración para poder incrementar la energía cinética de los iones en el tubo del tiempo de vuelo y poder registrar los iones más pesados.¹⁴ Tras estos resultados, Karas y Hillenkamp realizaron otros trabajos donde identificaron proteínas con pesos moleculares superiores a 100 kDa.¹⁵

¹⁰ Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal.Chem.* 1985, 57, p. 2935-2939

¹¹ U.C.Berkeley College of Chemistry. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Autor: Jonathan Melville. May 9, 2014

¹² <http://www.shimadzu.com/> (última visita 23/06/2017)

¹³ K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita "Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry", Eds.: H. Matsuda, X.-T. Liang; Bando Press, Osaka (1987) pp 185-188; K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2, 151 (1988).

¹⁴ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes*, 78, 53 (1987); M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 60, 2299 (1988)

¹⁵ M. Karas, A. Ingendoh, U. Barh, F. Hillenkamp, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 18, 841 (1989); M. Karas, U. Barh, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 92, 231 (1989)

Durante los siguientes años continuaron las mejoras en los sistemas de detección de tiempo de vuelo y se empezaron a explorar mejoras en el uso de láseres de pulsos más cortos, lo que implicaba mejoras en la resolución y en la eficiencia del proceso de ablación/Desorción-Ionización.¹⁶ Además, se comprobó que se podían usar longitudes de onda más largas y distintos tipos de láser en combinación con un variado conjunto de matrices. Un impulso de la técnica se dio con el descubrimiento de Beavis y Chait¹⁷, en el que los derivados del ácido cinámico se acoplaban muy bien con el láser de Nd-YAG o con los rayos UV del nitrógeno, incrementando la resolución en la masa y permitiendo la determinación de pesos moleculares de polipéptidos así como pesos moleculares pequeños del analito. Los derivados del ácido cinámico absorbían la radiación UV fuertemente y consecuentemente entraban en fase gas, produciendo iones moleculares sin fragmentación. Estos derivados siguen empleándose como matrices hoy en día y usando técnicas e instrumentación modernas, el límite de masas está en torno a los 350000 Da.¹¹ Por ejemplo, se ha usado el tercer armónico del láser de Nd:YAG en diferentes experimentos junto con ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido sinapínico como matrices.¹⁸ También se ha empleado radiación visible en disoluciones acuosas congeladas de péptidos y proteínas¹⁹, y radiación infrarroja para ácidos carboxílicos, glicerol y urea con buenos resultados.²⁰

Las técnicas de desorción laser en general, y las técnicas de desorción/ionización asistida por matriz en particular obtuvieron el reconocimiento como una herramienta fundamental por su aplicación a diferentes tipos de materiales y en diferentes campos de la química, biología y medicina. Tal fue ese reconocimiento que en 2002 se concede el premio Nobel de Química a Koichi Tanaka²¹ por sus contribuciones a la aplicación de la desorción laser a proteínas y materiales biológicos. En 2003 aparece por primera vez un número especial en la revista *Chemical Reviews*²² dedicado a esta técnica, sus fundamentos y los diferentes campos de

¹⁶ M R. Chevrier, R. J. Cotter, *Rapid Commun. M. Spectrom.* 5, 611 (1991)

¹⁷ R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3, 432 (1989). M. R. Chevrier, M. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*

¹⁸ R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3, 432 (1989). M. R. Chevrier, M. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*

¹⁹ R. W. Nelson, R M. Thomas, P. Williams, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 348 (1990)

²⁰ A. Overberg, M. Karas, U. Barh, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 293 (1990); A. Overberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5, 128 (1991)

²¹ https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-bio.html The Official Web Site of the Nobel Price (Última visita el 23/06/2017)

²² S. Georgiou and F. Hillenkamp, Eds., *Chem Rev.* 103 (2003)

aplicación (materiales químicos, películas moleculares y líquidos, polímeros y biopolímeros). En este mismo se puede resaltar una incipiente incursión en el campo de la medicina con su aplicación a tejidos biológicos que en la actualidad han dado lugar a las técnicas de imagen MALDI-IMS aplicadas a tejidos biológicos de diferente naturaleza.²³

Haciendo una breve referencia de las necesidades en medicina, cabe destacar que los primeros experimentos de detección de microorganismos con espectrometría de masas datan de 1975 en que se caracterizaron utilizando técnicas pirolíticas.²⁴ La conclusión más importante de este trabajo es que se producían espectros de masas únicos de extractos de bacterias de diferente género y de diferentes especies. El desarrollo de la técnica de desorción/ionización asistida por matriz, que permitía la detección por espectrometría de masas de biomarcadores, encontró también aplicación a la observación de microorganismos desde finales de la década de los 90.^{25, 26}

Desde entonces se ha demostrado que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica rápida, fiable y potente para la identificación de los microorganismos ya que ahorra tiempo en comparación con la identificación fenotípica mediante otras técnicas. Por ello, se han desarrollado instrumentos convencionales que empezaron a usarse de forma rutinaria en medicina hospitalaria. En la identificación microbiana se generan una serie de huellas digitales espectrales que forman un patrón de picos característicos de proteínas según el organismo analizado. Una vez adquiridos los espectros, los cuales constituyen la huella peptídica única para cada microorganismo, se comparan con los espectros de microorganismos conocidos

²³ J. L. Norris, R. N. Caprioli, *Chem. Rev.* 113,2039 (2013)

²⁴ J. P. Anhalt, C. Fenselau, *Identification of bacteria using mass spectrometry.* *Anal. Chem.* 47, 219–225 (1975)

²⁵ M. A. Claydon, S.N. Davey, V. Edwards-Jones, D. B. Gordon. *The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.* *Nat. Biotechnol.* 14 1584–1586 (1996); R. D. Holland, J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, J. O. Lay Jr., *Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry.* *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227–32 (1996); V. Edwards-Jones, M. A. Claydon, D. J. Evason, J. Walker, A. J. Fox, D. B. Gordon, *Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry,* *J. Med. Microbiol.* 49, 295–300 (2000); J. M. Hettick; M.L. Kashon, J. P. Simpson, P. D. Siegel PD G. H. Mazurek, Weissman, D. N., "Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 5769-5776 (2004); S. Rupf, K. Breitung, W. Schellenberger, K. Merte, S. Kneist, K. Eschrich. "Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 267–273 (2005).

²⁶ P. A. Demirev, Y. P. Ho, V. Ryzhov C. Fenselau, *Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches.* *Anal Chem* 1999; 71, 2732–2738.; B. L. Van Baar, *Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry,* *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24(2), 193.

presentes en una base de datos, de tal forma que el espectro o huella peptídica problema se puede asociar con el espectro más semejante, obteniendo así la información necesaria para la identificación del microorganismo.^{27, 28} En las condiciones de trabajo del equipo MALDI-TOF, las proteínas que forman la huella peptídica de cada microorganismo son las ribosomales debido a que se comportan como proteínas estructurales y a que mantienen una estructura muy estable a lo largo del tiempo.²⁹ Asimismo, cambiando las condiciones de trabajo del equipo, es posible crear bases de datos propias en las que las proteínas que conforman la huella peptídica sean, además de las ribosomales, otras como por ejemplo las de la membrana y las intracelulares. De este modo, es posible identificar microorganismos que no están incluidos en las bases de datos comerciales o realizar una identificación mucho más específica.^{30, 31}

Dentro de los microorganismos con interés clínico y epidemiológico, el sistema MALDI-TOF ha mostrado ser una herramienta útil para llevar a cabo la identificación de *Legionella pneumophila*. Yoshito Fujinami³², en un trabajo publicado en 2011, utilizó la técnica MALDI-TOF-MS como un método epidemiológico muy poderoso y que sirve para la identificación de bacterias. Para ello, realizó una comparación de resultados entre la técnica MALDI-TOF-MS y la PFGE (electroforesis en campo pulsante). Los resultados mostraron que las distintas cepas poseían diferentes patrones de fragmentos, los cuales pueden formar la huella peptídica que nos sirve para la identificación de cepas de bacterias de *Legionella* desconocidas.

²⁷ Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, and Fenselau C. 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* **71**: 2732-2738

²⁸ Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, *et al.* 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* **4**: 221-242

²⁹ Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, and Leopold PE. 2001. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**: 103-112

³⁰ Croxatto A, Prod'hom G, and Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* **36**: 380-407

³¹ Nuevos protocolos basados en espectrometría de masas y citometría de flujo para un diagnóstico microbiológico rápido. D. Gabriel Alberto March Roselló. Departamento de Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, y Medicina Legal y Forense. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina

³² Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Yoshito Fujinami, Hitomi S. Kikkawa, Yohei Kurosaki, Koichi Sakurada, Mineo Yoshino, Jiro Yasuda. National Research Institute of Police Science, 6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa 277-0822, Japan. *Microbiological Research* 166 (2011) 77-86

Un brote de legionelosis se define como la aparición de 2 o más casos relacionados epidemiológicamente.³³ De este modo, el objetivo de la caracterización epidemiológica de los brotes es establecer la relación clonal que existe entre los aislamientos bacterianos implicados. El estudio del serogrupo es un procedimiento que no permite la tipificación de las cepas; únicamente tiene relevancia en el diagnóstico. Para estudiar la relación clonal de las cepas hay que realizar un análisis más preciso. La tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) tiene una reconocida trayectoria como el “gold standard” para el tipificado de cepas bacterianas.³⁴ Sin embargo esta técnica presenta numerosos inconvenientes: el procedimiento experimental es complejo y los resultados obtenidos presentan una considerable variabilidad intra e inter-laboratorio. En general, la técnica de elección para el tipificado de *Legionella* es la Sequence-Based Typing (SBT). Esta técnica permite, además, la identificación certera de las cepas de *L. pneumophila* y está basada en el análisis por amplificación y posterior secuenciación de siete genes “housekeeping” o genes constitutivos no sometidos a presión selectiva.³⁵ Estos genes constitutivos son los que se expresan como resultado de la interacción entre la ARN-polimerasa y el promotor sin necesidad de regulación adicional y se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo.³⁶ Una vez se han obtenido estas secuencias se remiten a la European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). Tras un análisis estadístico, la EWGLI asigna un número que identifica a cada alelo, generándose un “perfil alélico” que consiste en una secuencia de 7 números. Finalmente, la comparación entre aislados se realiza mediante el simple análisis del número de alelos compartidos entre perfiles diferentes.

La técnica SBT es más reproducible y más robusta que la PFGE. Sin embargo, es una metodología costosa ya que hay que asumir los gastos de amplificación y secuenciación de los

³³ Ausina V CV, Cercenado E, Pelaz C. Procedimiento Microbiología 20. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Disponible en http://www.seimc.org/documentoscientificos.php?mn_MP=3&mn_MS=358. Consultado 01/04/2016

³⁴ Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233-9

³⁵ Sanchez-Buso L, Coscolla M, Pinto-Carbo M, Catalan V, Gonzalez-Candelas F. Genetic Characterization of *Legionella pneumophila* Isolated from a Common Watershed in Comunidad Valenciana, Spain. *PLoS one*. 2013;8(4):e61564

³⁶ https://es.wikipedia.org/wiki/Gen_constitutivo Wikipedia. (Última entrada 23/06/2017)

genes. Además requiere un tiempo considerable para la obtención de resultados ya que, una vez obtenidas las secuencias, es obligada la colaboración con la EWGLI. Con objeto de solventar las limitaciones de la PGFE y SBT en el estudio epidemiológico de cepas bacterianas, sería conveniente investigar la aplicación de otras técnicas más rápidas y que supongan un abaratamiento de costes. El sistema MALDI-TOF presenta una serie de ventajas para el tipado de bacterias: los costes de análisis son mínimos, en horas se pueden caracterizar varias cepas bacterianas y la interpretación de los datos se realiza mediante programas informáticos sencillos, permitiendo el intercambio rápido de datos entre los distintos laboratorios que cuentan con esta técnica. Sin embargo, antes de introducir el MALDI-TOF como herramienta para el tipado de bacterias, se debe demostrar que su utilidad es comparable a la del SBT.

La *Legionella pneumophila* es una bacteria ambiental Gram negativa, de un tamaño de 0'3-0'9 μm de ancho por 2-20 μm de largo, no están encapsuladas, son móviles por uno o más flagelos polares o laterales aunque pueden existir cepas inmóviles y son aeróbicas estrictas.³⁷ Una imagen de la *Legionella pneumophila* se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Imagen de *Legionella pneumophila*

La familia Legionaceae posee al menos 58 especies y más de 70 serogrupos, dentro de las cuales la *Legionella pneumophila* es la especie más relevante. Esta especie bacteriana

³⁷ Prevención y control de Legionella pneumophila. Lucía de la Fuente. MAPFRE SEGURIDAD –Nº 99 – Tercer Timestre 2005. Página 16.

comprende al menos 16 serogrupos, de los cuales el serogrupo 1 es el causante de casi el 80% de las infecciones.³⁸.

La legionella *L. pneumophila* está ampliamente distribuida en ambientes acuáticos tanto naturales como artificiales: ríos, lagos, tierra húmeda, lodos, cañerías, torres de refrigeración... Pudiendo sobrevivir en un amplio rango de condiciones. Se trata de una bacteria parasitaria intracelular que puede encontrarse en amebas y protozoos de agua dulce. En agua salada no han sido aislados. Es más probable encontrarla en medios artificiales que en medios naturales aunque es posible que las bacterias se encuentren en medios naturales y colonicen sistemas de abastecimiento de las ciudades y, por tanto, se incorporan a los sistemas artificiales de agua. Es una bacteria termotolerante, de manera que puede multiplicarse entre los 20°C y los 45°C, su desarrollo óptimo está entre los 35°C y los 38°C, puede sobrevivir entre los 40°C y los 60°C y muere por encima de los 70°C. Por debajo de los 20°C se mantiene latente, sin multiplicarse.³⁹

La legionelosis fue reconocida por primera vez en un brote epidémico de neumonía que tuvo lugar en 1976 en la convención de la Legión Americana de Filadelfia. Posteriormente, se identificó que el brote procedía de la especie *Legionella pneumophila*. Sin embargo, este no fue el primer brote de la bacteria ya que en 1957 en Austin, Minnesota se hospitalizaron empleados de una fábrica por una enfermedad respiratoria aguda de origen desconocido en ese momento.

Como enfermedad, la *Legionella pneumophila* suele presentar dos formas clínicas:

- La enfermedad del Legionario: La enfermedad suele manifestarse como una neumonía, aunque el espectro clínico puede variar desde una enfermedad leve o moderada hasta una enfermedad grave con fallo multiorgánico. La neumonía que causa es prácticamente indistinguible de otras neumonías y se caracteriza por un periodo de incubación que oscila entre 2 y 10 días.³⁸

³⁸ Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico y control de la Legionelosis. 2005. Coordinador: Carmen Pelaz Antolín. Autores: Vicente Ausina, Vicente Catalán, Emilia Cercenado, Carmen Pelaz Antolín

³⁹ *Legionella pneumophila*. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Databio. Fichas de agentes biológicos. DB-B-L.p-12

- La fiebre de Pontiac: Es una enfermedad autolimitada que da lugar a un cuadro clínico similar al de una gripe.³⁸

Para la salud pública, la *Legionella* tiene especial relevancia por ser una bacteria que periódicamente causa brotes epidémicos que trascienden a la prensa y generan alarma social. Ello es debido a que *Legionella* es capaz de crecer intracelularmente en protozoos y formar *biofilms*, características que le confieren resistencia a los desinfectantes, dificultando de esta manera su erradicación.⁴⁰ En España desde el año 2010 se han declarado un total de 184 brotes, afectando a más de 800 personas, con un total de 37 afectados. Estos datos han sido proporcionados por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III.

Aunque la *Legionella* es una bacteria ampliamente distribuida en ambientes acuáticos, su presencia en un sistema de agua no es suficiente para implicar a una cepa como agente causal de infección. La aparición de la enfermedad depende de una serie de requisitos encadenados que se ven favorecidos por una serie de factores. Estos factores se muestran en la Figura 2.³⁸

⁴⁰ Caracterización epidemiológica y estudio de la sensibilidad a los antibióticos de cepas ambientales de *Legionella pneumophila* aisladas en el entorno de Valladolid. Miguel Ángel Bratos Pérez

Transmisión de Legionella

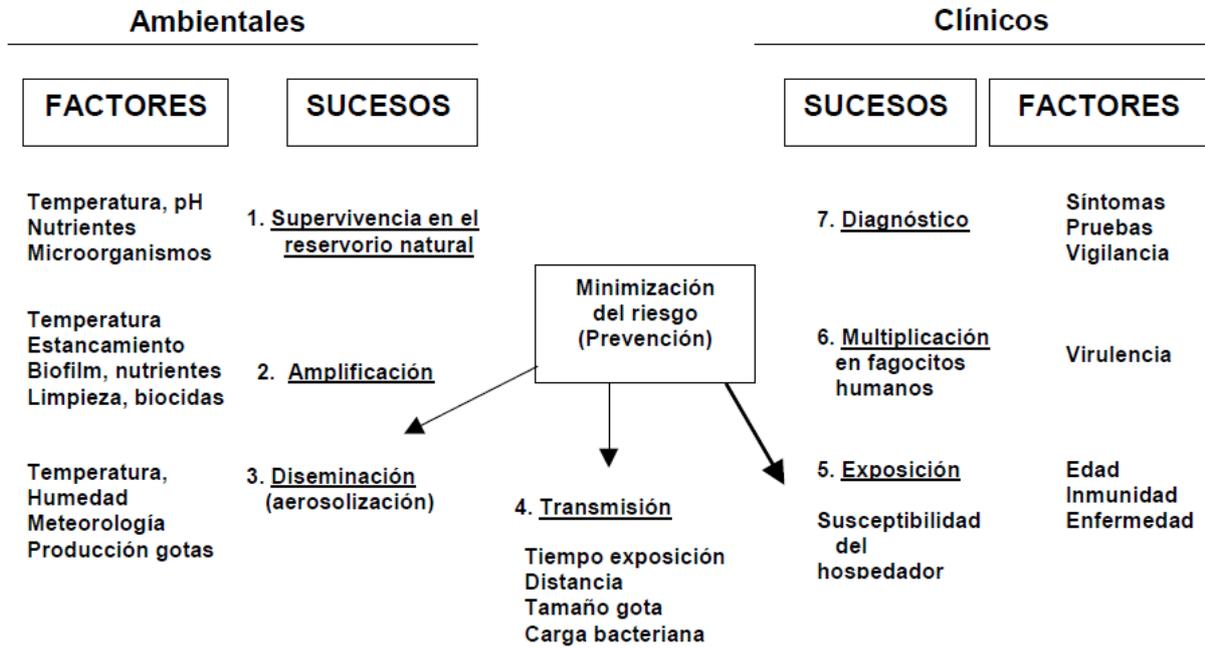


Figura 2. Requisitos y factores que intervienen en la transmisión de la Legionella

Sin embargo, no existe la transmisión persona a persona, sino que la infección de esta bacteria siempre se produce desde una instalación debido, generalmente, a la formación de aerosoles de suficiente tamaño que pueden ser inhalados por un individuo.

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El **objetivo** de este trabajo de fin de grado ha sido evaluar la técnica MALDI-TOF como herramienta para llevar a cabo el análisis epidemiológico rápido de *Legionella pneumophila*. Para esta evaluación se procesarán un total de 92 cepas caracterizadas genéticamente de las que se conoce el ST (código *Sequence Typing*) y por tanto su perfil genético.

El **plan de trabajo** ha sido el siguiente:

- Revivir las cepas de Legionella
- Realizar la extracción de las proteínas de la Legionella
- Preparar las muestras sobre la placa MALDI
- Registrar el espectro de masas MALDI-TOF
- Calibrar y analizar los espectros de masas
- Generar los espectros MSP (*Main Spectrum Profile*)
- Analizar estadísticamente los espectros MSP y obtener el dendrograma
- Comparar los resultados del dendrograma con los genotipos

5. MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL

Dentro de este apartado explicaremos los materiales y reactivos empleados durante la experimentación en el trabajo además de explicar todo el procedimiento experimental.

5.1. MATERIALES

Los materiales que se han empleado durante la realización de este trabajo fueron:

1. Micropipetas

De diferentes tamaños, los cuales son de 0,5 μ L a 10 μ L (micropipeta gris), de 10 μ L a 100 μ L (micropipeta amarilla) y de 100 μ L a 1000 μ L (micropipeta azul) y que pertenecen a la marca Eppendorf. Han sido utilizadas tanto para la preparación de reactivos como para la preparación y tratamiento de las muestras.

Las pipetas empleadas se muestran en la Figura 3.



Figura 3. Micropipetas empleadas en el trabajo. Pertenecen a la marca eppendorf

2. Puntas de plástico desechables

Las puntas a utilizar deben estar esterilizadas y para ello se emplea un autoclave, el cual se muestra posteriormente y se explican las condiciones de esterilización.

Las diferentes puntas empleadas en el trabajo se muestran en la Figura 4. El color de punta desechable azul se correspondería al tamaño de pipeta de 100 μ L a 1000 μ L, el color amarillo se corresponde al tamaño 10 μ L a 100 μ L y, por último, el tamaño blanco se corresponde con el tamaño de pipeta 1 μ L a 10 μ L.



Figura 4. Diferentes tamaños de puntas desechables empleadas durante el trabajo

3. Autoclave

Se utilizó para esterilizar las puntas. Para ello, las puntas se introducen en cajas como las que se muestran en la Figura 5 y se sellan con cinta adhesiva indicadora, la cual se muestra en la Figura 6. Esta cinta posee unas líneas que se tinte de color negro cuando se han esterilizado, las cuales nos proporcionan la seguridad de que esas puntas han sido esterilizadas.



Figura 5. Caja de puntas para esterilizar



Figura 6. Cintas adhesivas antes y después de la esterilización en el autoclave

Una vez preparadas las puntas se introdujeron dentro del autoclave mostrado en la Figura 7. Para poder esterilizar en el autoclave primero se echa agua en el fondo del autoclave hasta cubrir la base, asegurándonos que la llave situada en la parte lateral está situada en la posición de cierre. Tras esto, se introduce la cesta con las cajas selladas con la cinta dentro del autoclave y se cierra. Las puntas se dejaron dentro con las siguientes condiciones de esterilización: 15 minutos a 121°C. Durante la esterilización, tanto temperatura como presión aumentan de forma que una vez que pasan los 15 minutos de esterilización debemos esperar a que baje la presión y la temperatura para abrirlo. Para ayudar a bajar la presión giramos la válvula que se encuentra en la parte derecha a la posición de purga, lo cual permite que el agua salga.



Figura 7. Autoclave eléctrico para esterilización "MED 12", modelo de sobremesa de Stmartech biosciences junto con la cesta para la introducción de material esterilizable

4. Placas

En el trabajo con Legionella se emplearon placas de Agar BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) que se muestran en la Figura 8. Se tratan de placas de agar de carbón tamponado y extracto de levadura. Se emplean estas placas ya que es un agar específico para el cultivo de Legionella pneumophila y otras especies de Legionella.



Figura 8. Ejemplo de placa de Agar BCYE con crecimientos de Legionella

El BCYE es un medio de cultivo enriquecido para el aislamiento y cultivo de las especies de Legionella. El extracto de levadura suministra proteína y otros nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento. La L-cisteína (aminoácido esencial) y el pirofosfato férrico soluble (suplemento de hierro) se añaden para satisfacer los requisitos nutritivos de la Legionela. El α -cetoglutarato se emplea para estimular el crecimiento. El carbono activo añadido descompone el peróxido de hidrogeno que es un producto del metabolismo tóxico para la Legionela. Además, el carbono activo puede recoger el CO₂ y modificar la presión superficial. Finalmente, se añade el tampón ACES para mantener un pH adecuado para un crecimiento óptimo.⁴¹

La fórmula aproximada del contenido del Agar BCYE por cada litro de agua purificada se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Composición aproximada del contenido del Agar BCYE por litro de agua

Extracto de levadura	10 g
Clorhidrato de L-cisteína	0'4 g
Pirofosfato férrico	0'25 g
Tampón ACES	10 g
Carbón activo	2 g
A-cetoglutarato	1 g
Agar	15 g

Ninguna de las especies puede crecer en agar sangre pero todas crecen en BCYE agar (Buffered Charcoal Yeast Extract)

⁴¹ BBL BCYE Agar – Becton Dickson. L007349, Rev.07, Febrero 2007

5. Tubos de microcentrifuga

Para la preparación de los reactivos y para el proceso de extracción de proteínas se emplearon tubos de microcentrifuga de capacidad 1'5 mL, los cuales se muestran en la Figura 9.



Figura 9. Tubo de centrifuga Eppendorf Safe-Lock de 1'5 mL

6. Agitador Vortex

Se ha empleado un agitador vortex similar al que se muestra en la Figura 10 para poder preparar los reactivos y homogeneizar perfectamente las disoluciones de los tubos que contienen suspensiones bacterianas.



Figura 10. Agitador vortex

7. Microcentrifugadora

Se ha utilizado una microcentrifugadora como la que se muestra en la Figura 11 para realizar la sedimentación durante varios pasos de la extracción de proteínas de las diferentes cepas de Legionella.



Figura 11. Máquina centrifugadora

8. Congelador y Ultracongelador

En general se han mantenido algunos de los reactivos empleados en este trabajo a baja temperatura. Ciertas muestras como la matriz o el Bacterial Tests Standard (BTS) de Brucker hay que conservarlos en congelador -20°C . Se empleó el ultracongelador como el que se muestra en la Figura 12 para conservar la matriz preparada para los análisis y mantener las cepas a temperaturas entre -70°C y -80°C .



Figura 12. Ultracongelador

9. Asas

Para realizar los diferentes pases de las cepas de Legionella y para tomar la muestra para extraer las proteínas se emplearon asas desechables de un volumen de 10 μ L como las que se muestran en la Figura 13.

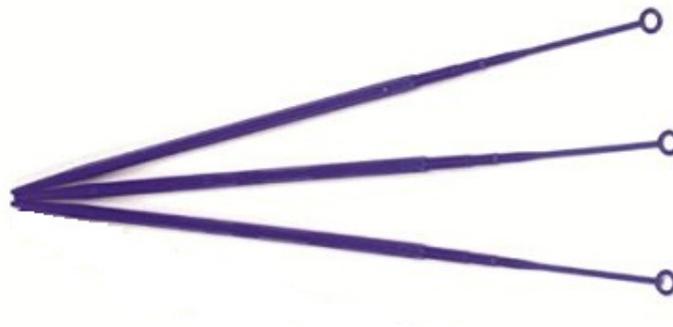


Figura 13. Asas desechables

10. Contenedor estanco

Debido a que generamos residuos de carácter biológico y que pueden suponer un peligro para la salud, se emplearon contenedores con cierre estanco y definitivo para su transporte mediante presión como el que se muestra en la Figura 14.



Figura 14. Cubo para residuos biológicos

11. Placa o tarjeta para el MALDI

Para introducir las muestras de las proteínas procedentes de las diferentes cepas de Legionella en el MALDI que van a ser analizadas y realizar la medida, se emplearon placas o tarjetas metálicas con pocillos circulares dispuestos en forma de matriz, teniendo cada tarjeta un total de 384 pocillos. La placa empleada en el análisis se muestra en la Figura 15.



Figura 15. Placa tarjeta MTP 384 polished steel de Bruker

12. MALDI-TOF-MS

En este trabajo de fin de grado el instrumento que se ha utilizado ha sido el MALDI-TOF Autoflex™ Speed, que se muestra en la Figura 16.



Figura 16. Imagen de un instrumento MALDI-TOF Autoflex Speed de Bruker Daltonics

Este equipo es un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MS-TOF), que emplea la técnica MALDI como método de ionización. Sirve para realizar el análisis de una gran variedad de moléculas, cubriendo un amplio intervalo de masas (desde 2 a 20000 Daltons). Desde el punto de vista analítico, tiene un amplio abanico de aplicaciones, los cuales están orientados a la química, bioquímica y análisis clínico. Estas aplicaciones incluyen:

- Investigación de proteínas
- Análisis de biomarcadores
- Análisis de elementos bioterapéuticos
- Desarrollo de bioensayos y distribución de metabolitos
- Histología molecular/MALDI imaging
- Análisis de polímeros
- Análisis de glicanos y glicoproteínas
- Identificación de microorganismos
- Secuenciación de proteínas intactas

En nuestro caso, hemos realizado una extracción química de las proteínas de la Legionella para poder realizar posteriormente el análisis de éstas mediante espectrometría MALDI-TOF y así explorar un nuevo método de identificación y diferenciación de las diferentes cepas a través del uso de esta técnica. La desorción MALDI genera una distribución característica de masa e intensidad de las proteínas principalmente ribosómicas. Debido a que este espectro de masas es específico de una especie para un gran número de microorganismos, representa una “huella molecular”. Los microorganismos desconocidos se pueden identificar comparando su “huella molecular” o “huella digital” con los miles de patrones que existen en la base de datos de referencia. De forma que mediante la técnica MALDI-TOF puede aprovecharse la expresión de las proteínas de cada microorganismo en la espectrometría de masas para realizar una identificación, de forma que al comparar los espectros obtenidos en la determinación con una biblioteca se puede llegar a la asignación del organismo.

Para una descripción sencilla de la técnica MALDI-TOF y del equipo AutoFlex Speed se pueden distinguir tres partes:

- 1) El sistema de ionización MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Desorción/Ionización láser asistida por matriz)
- 2) El dispositivo TOF (Time Of Flight-Tiempo de vuelo)
- 3) El sistema de detección de masas

Estas tres partes son descritas detalladamente a continuación:

12.1. Sistema de ionización MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)

La espectrometría de desorción/ionización por láser con ayuda de matriz es un método de ionización que permite obtener información exacta sobre las masas moleculares de diferentes compuestos. La ionización producida en esta técnica es suave, la cual permite ionizar las moléculas sin apenas romperlas.

Para producir la ionización, la muestra se mezcla en un primer paso con una matriz en exceso sobre una superficie metálica donde ambos co-cristalizan cuando el disolvente se evapora. La placa metálica utilizada en este trabajo dispone de 384 blancos circulares (pocillos) alineados en forma de matriz, como se muestra en la Figura 17, donde pueden depositarse diferentes muestras. Esta placa es insertada en la placa repulsora de la fuente de iones del TOF como se describe más adelante.

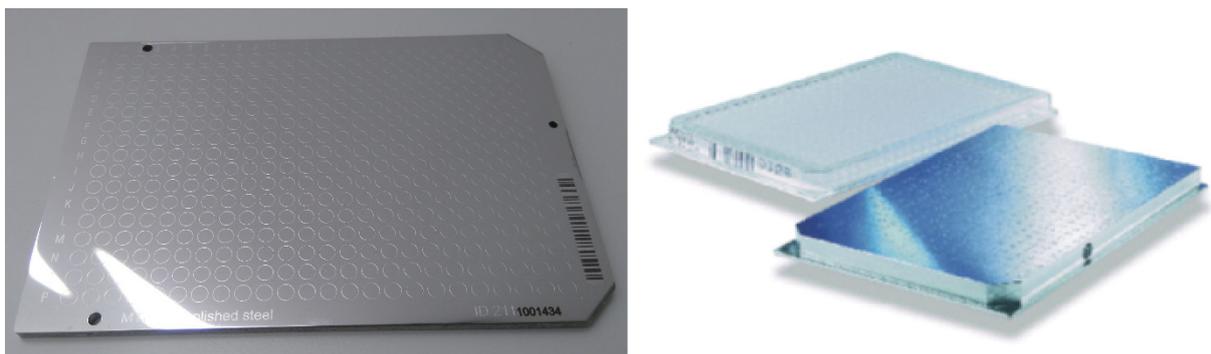


Figura 17. Placa o tarjeta metálica empleada en el MALDI-TOF

Cuando se introduce la placa dentro del MALDI es preciso hacer vacío como etapa previa al inicio de la operación. El sistema de vacío del instrumento consigue un vacío menor de 10^{-7} mbar en un breve espacio de tiempo, consiguiendo condiciones de ultra-alto vacío óptimas para trabajar en el equipo de tiempo de vuelo.

El primer evento en cada ciclo de medida es la generación de un pulso laser de potencia adecuada, que puede focalizarse en el depósito cristalino previamente seleccionado. Su incidencia sobre la muestra produce la desorción de la matriz junto con el analito. Además, la matriz absorbe energía, se ioniza y transfiere protones a la muestra, ionizándola.

La elección de la matriz en este punto es crítica para poder obtener un espectro de calidad al final del análisis. Los compuestos que forman la matriz deben ajustarse a un conjunto muy específico de criterios. Generalmente su masa es baja para poder asegurar que se volatilicen de forma fácil cuando incide el láser, aunque no deben ser tan volátiles como para evaporarse espontáneamente. Además, deben tener una elevada absorbanza y baja energía de ionización en la región en que opera el láser, en este caso la región UV, lo que normalmente indica la presencia de un sistema π conjugado cromóforo, ya que su propósito es absorber la radiación de forma más eficaz que las moléculas de analito para que la matriz pueda transferir su energía a la muestra. Las matrices son polares para ayudar a la formación de la mezcla matriz-analito, y a menudo son ácidos para poder actuar como fuente de protones para la ionización del analito.¹¹

Una de las estructuras básicas comunes para muchos de los tipos de matriz que existen es el ácido cinámico, el cual se muestra en la Figura 18. Este compuesto reúne todas las características necesarias para una matriz efectiva: Tamaño relativamente pequeño, sistema π conjugado, grupo funcional polar y poseer un protón ácido.

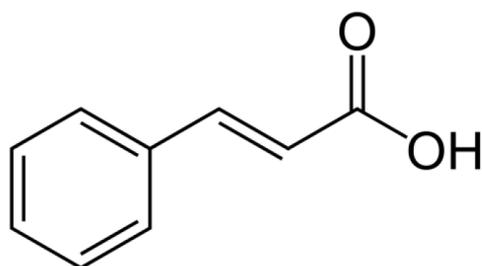


Figura 18. Ácido cinámico

Se pueden elegir compuestos específicos para aumentar la sensibilidad cuando tenemos algún tipo de analito en particular. Por ejemplo, el ácido gentístico es muy eficaz para detectar péptidos que contienen grupos de ácido borónico, mientras que el ácido picolínico lo es para los oligonucleótidos y el ácido sinápico lo es para péptidos cuyas masas son mayores a 10.000 Da. Las estructuras de estos ácidos se muestran en la Figura 19.

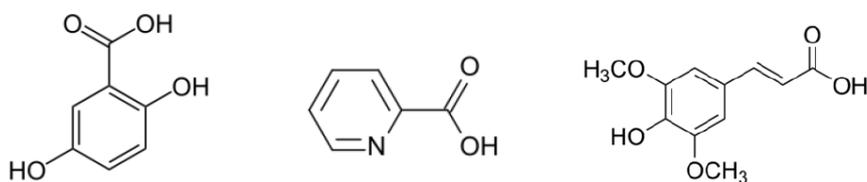
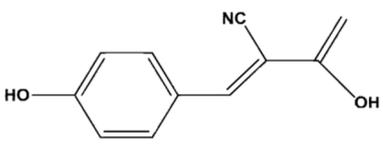
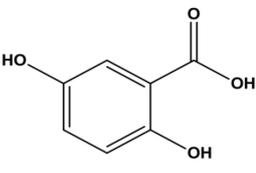
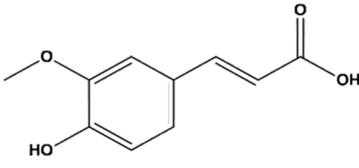
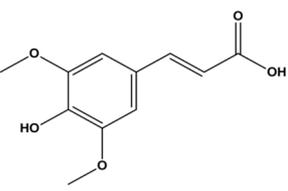


Figura 19. Ácidos gentístico, picolínico y sinápico

Algunas de las matrices más comúnmente utilizadas en la técnica MALDI se muestran en la Tabla 2, donde puede verse que la elección de la matriz condiciona la elección de la longitud de onda del láser. En nuestro trabajo hemos utilizado el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).

Tabla 2. Algunos tipos de matriz UV usados en MALDI

Matriz	Estructura	(M+H) ⁺ mono	Longitud de onda del láser	Tipos de muestra
Ácido α-ciano- hidroxicinámico (CHCA)		190.0504	337 355	Nucleótidos, péptidos, lípidos
Ácido 2,5- dihidrosibenzoico (ácido gentístico) (DHB)		155.0344	337 355	Oligosacáridos, nucleótidos, péptidos
Ácido 3-metoxi- 4- hidroxicinámico (Ácido ferúlico) (FA)		194.0579	266 337 355	Proteínas
Ácido trans-3,5- dimetoxi-4- hidroxicinámico (Ácido sinápico) (SA)		255.0763	266 337 355	Péptidos, proteínas, lípidos

Una vez generada la disolución matriz-analito llega el momento de dar pulsos láser focalizados al depósito cristalino que contiene al analito y la matriz. Generalmente, el láser que se emplea en la técnica MALDI opera en la región del UV. Existen varios tipos de láseres que pueden emplearse aunque los más comunes son el de nitrógeno, con una longitud de onda de 337 nm, y el de Nd-YAG de frecuencia triplicada, con una longitud de onda de 355 nm. El instrumento MALDI que hemos empleado en el experimento contiene un láser de este segundo tipo.

Bruker emplea la tecnología de láser SmartBeam II, la cual proporciona mejoras sustanciales en el rendimiento del equipo para la investigación. El SmartBeam combina la velocidad de un láser de estado sólido con la amplia gama de aplicaciones que poseen los láseres de nitrógeno⁴². Es decir, en el MALDI se emplea la conmutación entre un láser de N₂ y un láser de Nd:YAG. Para poder combinarlos, todos los pulsos láser se dirigen hacia la misma trayectoria para que se produzca el pulso sobre la muestra en la misma posición y mismo ángulo. Toda esta configuración se representa en la Figura 20. Como se puede observar, el haz pasa primero a través del atenuador (A) para ajustar la fluencia del láser al valor que se desea, seguido por el modulador (M), el cual moldea el perfil utilizando principios de interferencia. La lente L1 enfoca los patrones a un plano de imagen donde las estructuras exteriores de interferencia se cortan con un diafragma (O). En esta configuración, la forma final exacta del perfil depende en gran medida de los detalles del modulador (M), la posición exacta de la lente L1 y el ajuste axial exacto de toda la óptica láser. El plano de la imagen se sitúa sobre el objetivo con ayuda de la lente L2.⁴³

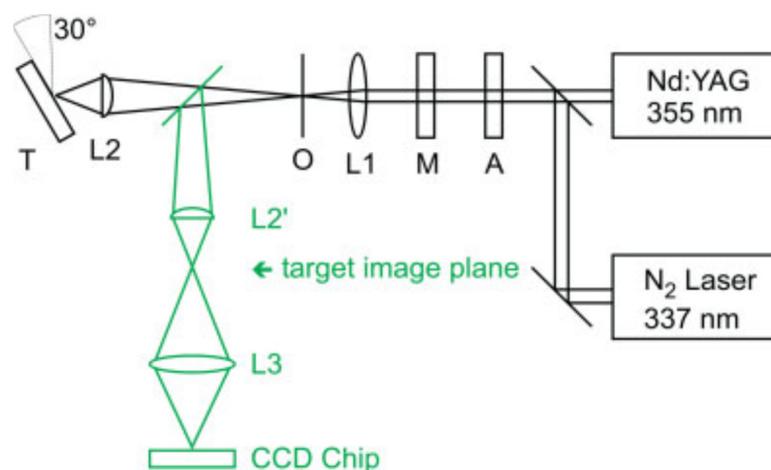


Figura 20. Configuración óptica para la modulación del perfil láser y para la conmutación entre Nd:YAG y Nitrógeno

⁴² Innovative smartbeam Laser Technology Enhances MALDI-TOF Based Proteomics Applications. Bruker Daltonics.

⁴³ Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. Armin Holle, Andreas Haase, Markus Kayser and Jens Höhndorf. Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY J. Mass Spectrom. 2006; 41: 705–716 Published online 22 May 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jms.1041

El equipo dispone de una cámara compuesta de un chip CCD y dos lentes L2' y L3 que permiten visualizar la muestra y la operación manual de selección del objetivo y zona de desorción.

Cuando el láser se dispara, se genera la desorción localizada de la matriz y del analito. Como el sistema opera en alto vacío, se genera una pluma de expansión de iones gaseosos que permiten la ionización de las moléculas de analito a través de un proceso de transferencia de protones. No se conoce con precisión el mecanismo exacto de la ablación, pero se cree que ocurre debido a la sublimación que se genera tras la excitación fotoquímica de las moléculas de la matriz o debido a un fuerte aumento de la presión causado por la rápida expansión de la red cristalina. Cuando se produce la ablación láser, se forma un ion de matriz del tipo $[M+H]^+$ aunque también puede producirse la formación de iones $[M+nH]^{n+}$. En la Figura 21 se muestra de manera esquemática el proceso de formación de iones en el MALDI previo a la entrada en el TOF.

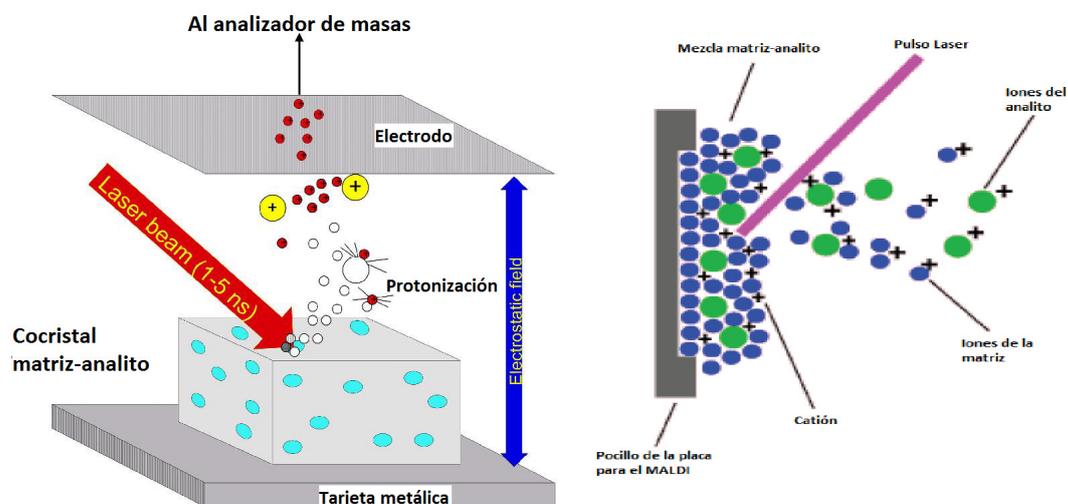


Figura 21. Mecanismo de ionización en MALDI

12.2. Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo TOF (Time of flight)

En la Figura 22 se muestra un esquema de un analizador TOF lineal simplificado. La desorción/ionización MALDI se produce en la región denominada fuente que describiremos

posteriormente en detalle. La generación de estos iones es el evento que marca el inicio de medida de tiempos. En ese instante tenemos una mezcla de iones procedentes de la muestra a analizar que deben ser separados de forma individual. Los iones generados en la fuente se aceleran mediante un campo eléctrico que se aplica mediante un sistema de electrodos. Una vez que cruzan la rejilla de extracción conectada a tierra, entran en una zona libre de campo eléctrico, el tubo de tiempo de vuelo donde se mueven a velocidad constante. Como todos los iones adquieren la misma energía cinética, el conjunto de iones caracterizados por una distribución de masas presentaran, en correspondencia, una distribución de velocidades semejante. Así, en el tubo de tiempo vuelo los iones se separan según sus velocidades antes de llegar al detector, el cual se sitúa en la parte final del tubo.

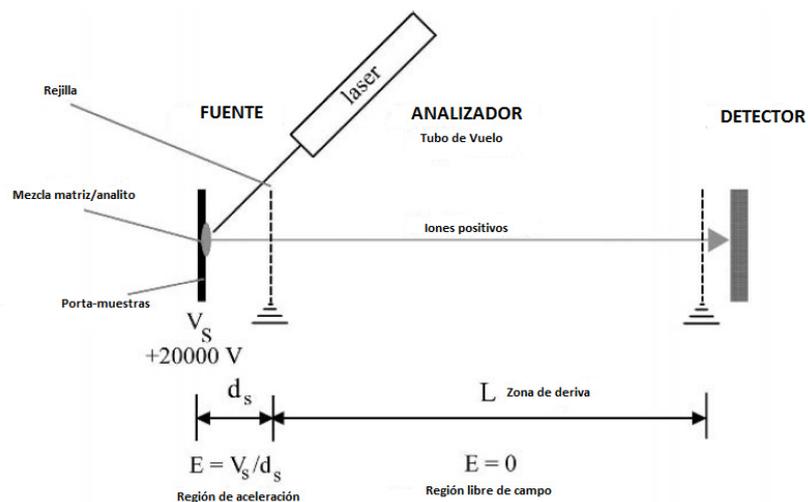


Figura 22. Esquema de un TOF lineal para el análisis de iones procedentes de un MALDI

Una partícula con carga q sometida a un campo eléctrico generado por una diferencia de potencial V aplicada entre dos electrodos, adquiere una energía potencial eléctrica que vendrá dada por la siguiente ecuación (1):

$$E = qV \quad (1)$$

Donde E es el valor de la energía, q es la carga y V es la diferencia de potencial aplicada.

El ion cargado es acelerado y esta energía potencial se convierte en energía cinética según muestra la ecuación (2):

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

Donde m es el valor de la masa y v es el valor de la velocidad final que adquiere el ion cuando sale de la región de la fuente. Podemos igualar ambas ecuaciones, obteniendo la ecuación (3):

$$qV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (3)$$

De donde podemos despejar el valor de la velocidad, obteniendo la siguiente expresión (4):

$$v = \sqrt{\frac{2qV}{m}} \quad (4)$$

Como se puede observar, el valor de la velocidad depende inversamente de la masa, de forma que aquellos iones que posean un mayor valor de la masa tendrán una velocidad menor y pasaran un tiempo mayor en el analizador.

El ion recorre la longitud del tubo del tiempo de vuelo y cuando llega al detector se mide el tiempo que tarda en recorrer el tubo. Por lo tanto, si suponemos que el tubo tiene una longitud L , podemos suponer que la relación entre la velocidad del ion y el tiempo es la siguiente (5):

$$v = \frac{L}{t} \quad (5)$$

Si combinamos ambas ecuaciones obtenidas para la velocidad, es decir, las ecuaciones (4) y (5), llegamos a la siguiente expresión para el tiempo (6):

$$t = \frac{L}{\sqrt{2V}} \sqrt{\frac{m}{q}} \quad (6)$$

Además, si queremos, podemos despejar de la ecuación el valor de m/q y obtener así la relación masa/carga en términos de su tiempo de vuelo (7):

$$\frac{m}{q} = \frac{2t^2V}{L^2} \quad (7)$$

Como la ionización que se produce en el MALDI es suave, generalmente se forman iones monopositivos, de forma que podemos simplificar la ecuación anterior obteniendo el valor de la masa para el ion dado, obteniendo la ecuación (8)¹¹:

$$m = \frac{2t^2V}{L^2} \quad (8)$$

Los analizadores de tiempo de vuelo no presentan limitaciones en la masa de los iones a separar, lo que permite el análisis de sustancias con un peso molecular muy elevado. Aun así, podemos realizar el cálculo de la resolución de masas para un TOF a través de la siguiente ecuación (9):

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (9)$$

Donde m es la masa del ion, t es el tiempo de vuelo e Δm y Δt son el ancho a la mitad del máximo de los picos de masa y tiempo, respectivamente⁴⁴.

En teoría, si todos los iones adquieren la misma energía cinética los iones más ligeros son más veloces y, por tanto, llegarán antes al detector. La separación por tiempo de vuelo es tal que la relación masa/carga de los iones es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo. Así, el TOF actuará como analizador de masas, separando los diferentes iones formados anteriormente mediante la técnica MALDI.

A pesar de que no hay limitaciones en la masa de los iones a separar, existen algunos factores que limitan la resolución del Tiempo de Vuelo. Los factores principales están relacionados con la etapa inicial de generación de iones en la región de la fuente y que condicionan su diseño. Estos factores son:

- Distribución temporal de formación de iones
- Distribución espacial de formación de iones
- Distribuciones de energía inicial (velocidad) de los iones

⁴⁴ Detection of microorganisms using MALDI and ion mobility mass spectrometry. Juaneka Monet Hayes, B.S. Florida A&M University, May 2013

Es decir, la resolución es función de estas tres distribuciones iniciales: temporal (Δt_0), espacial (Δs_0) y de energía cinética (ΔE_{c_0}); tal como se expresa en la siguiente ecuación (10):

$$f(\Delta t) \approx f(\text{espacial}), f(\text{energía}), f(\text{temporal}) \quad (10)$$

$$f(\Delta t) \approx f(\Delta t_0), f(\Delta s_0), f(\Delta E_{c_0})$$

La contribución de cada uno de los factores es esencialmente de naturaleza gaussiana y la varianza total en el Tiempo de Vuelo de los iones de igual masa puede aproximarse estadísticamente como se muestra en la ecuación (11):

$$\sigma_t^2 = (\partial t / \partial s_0)^2 \sigma_s^2 + (\partial t / \partial v_0)^2 \sigma_v^2 + \sigma_{t_0}^2 \quad (11)$$

Donde σ_t es la varianza total en el TOF, σ_s es la varianza espacial, σ_v es la varianza de la energía inicial (velocidad), σ_{t_0} es la varianza de la distribución temporal, s_0 es la posición inicial, t_0 es el tiempo inicial y v_0 es la velocidad inicial ².

La distribución temporal se produce porque hay iones que tienen la misma relación masa/carga que se forman en el mismo plano de la fuente pero se forman en diferentes momentos. Estos viajan a través de la región libre de campo con una diferencia constante en el espacio y el tiempo. Esto se representa en la Figura 24 (a).

La distribución espacial se produce porque hay iones que tienen la misma relación masa/carga que se forman simultáneamente y con la misma energía cinética inicial pero en lugares diferentes de la fuente como se muestra en la Figura 24 (b). La energía cinética adquirida por los iones es diferente en función de la posición en que se originaron y entran por tanto en la región del TOF con diferentes velocidades. No obstante todos los iones iguales se encuentran en un punto simultáneamente, el punto focal. En una fuente sencilla de dos placas, la distancia focal es fija y se sitúa a una distancia cercana a la fuente. La primera gran aportación al desarrollo de la técnica fue conseguir una fuente de iones que permitiera modificar a voluntad el punto de foco. Este desarrollo fue propuesto por Wiley y McLaren⁴⁵ en 1955 quienes introdujeron un diseño de tres placas repulsora/aceleradora/tierra, como se puede observar

⁴⁵ Wiley, W.C. and McLaren, J.B. (1955) Rev. Sci. Instrum., 16, 1150

en la Figura 23, que con las tensiones adecuadas⁴⁵ permite focalizar los iones en la posición exacta del detector para el caso de un TOF lineal.

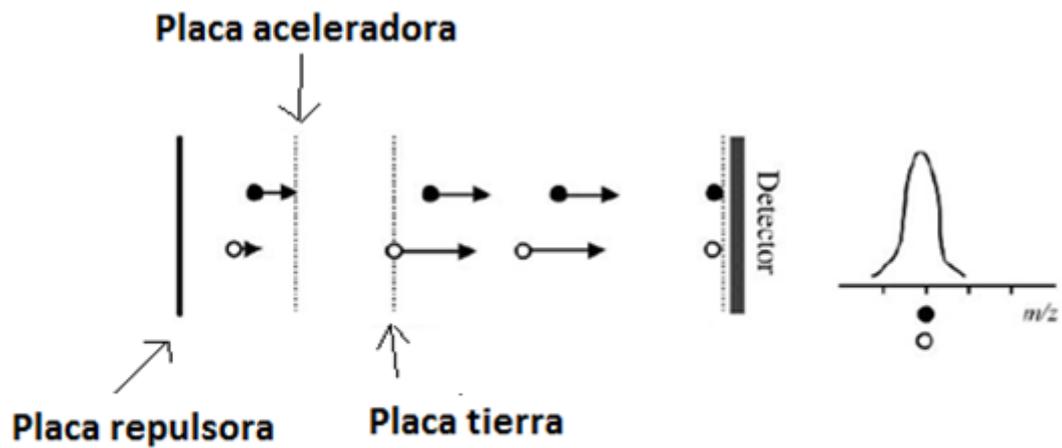


Figura 23. Representación del diseño de Wiley y McLaren del diseño de tres placas

Por último, los iones que tienen diferentes energías cinéticas iniciales tienen diferentes velocidades, de modo que llegarán al detector en momentos diferentes como se puede ver en la Figura 24 (c).⁴⁴

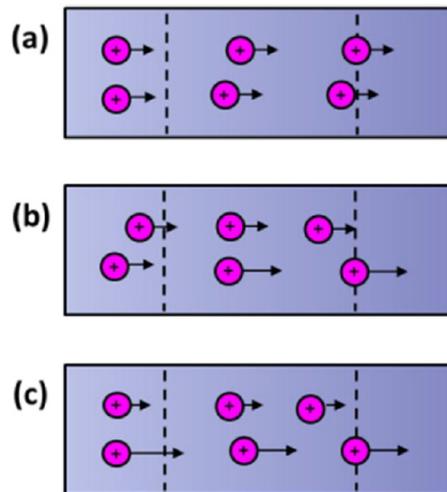


Figura 24. Factores que limitan la resolución. (a) Debido a la distribución temporal, (b) Debido a la distribución espacial, (c) Debido a la distribución de energías cinéticas iniciales

Como la resolución de masa es proporcional al tiempo de vuelo y la trayectoria de vuelo, una solución para aumentar la resolución del analizador es alargar la longitud del tubo de vuelo. Sin embargo, un tubo de vuelo demasiado largo disminuye el rendimiento de los analizadores TOF debido a la pérdida de iones por dispersión por colisiones con moléculas de gas o por dispersión angular del haz de iones. También es posible aumentar el tiempo de vuelo reduciendo la tensión de aceleración. Sin embargo, disminuir este voltaje reduce la sensibilidad. Por lo tanto, la única manera de tener alta resolución y alta sensibilidad es utilizar un tubo de vuelo largo con una longitud de 1 a 2 m para una mayor resolución y un voltaje de aceleración que se encuentre, al menos, entre 2-20 kV para mantener la sensibilidad alta.

Para eliminar la dependencia de la resolución con distribución inicial de energías y mejorar la precisión de la medida de masas se introdujeron mejoras al TOF como son la extracción pulsada retardada y el uso de un reflectrón.

- Extracción pulsada retardada

Para reducir la dispersión de energía cinética entre iones con la misma relación masa/carga cuando salen de la fuente de iones se puede introducir un retraso entre la formación de iones y la extracción en lugar de utilizar una extracción en continuo. Primero se deja que los iones se expandan hacia una región libre de campo y tras unos nanosegundos se aplica un impulso de tensión para sacar los iones fuera de la fuente.

Los iones formados en la fuente que usa el modo de extracción continua se extraen mediante la aplicación de una tensión continua. Los iones con la misma relación masa/carga pero que tienen energía cinética diferente alcanzan el detector en momentos ligeramente distintos, lo que provoca un ensanchamiento en el pico que se obtiene en el espectro. Esto se puede observar en la Figura 25.

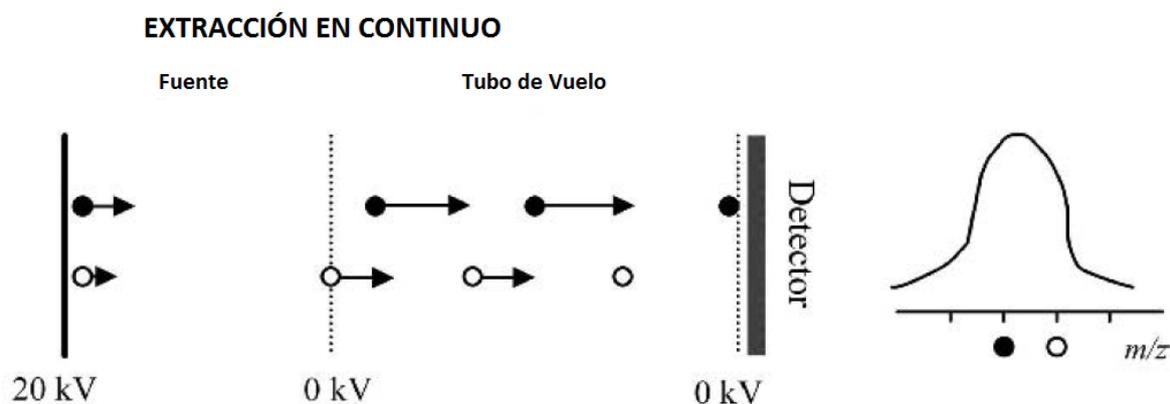


Figura 25. Esquema de la extracción en continuo en un TOF

Por otro lado, en el modo de extracción pulsada retardada los iones se pueden separar inicialmente en función de su energía cinética en la región libre de campo. Para iones con la misma relación masa/carga, aquellos que tengan mayor energía cinética se mueven más rápido hacia el detector. El pulso de extracción aplicado después de un cierto retraso transmite más energía a los iones que permanecieron durante más tiempo en la fuente, es

decir, los que poseen menor energía cinética. Esto provoca que los iones que en principio tenían menor cantidad de energía cinética ahora tengan más y se unan a los que inicialmente tenían más carga, llegando juntos al detector. Conseguimos así evitar el ensanchamiento del pico. Todo este proceso se muestra en la Figura 26.

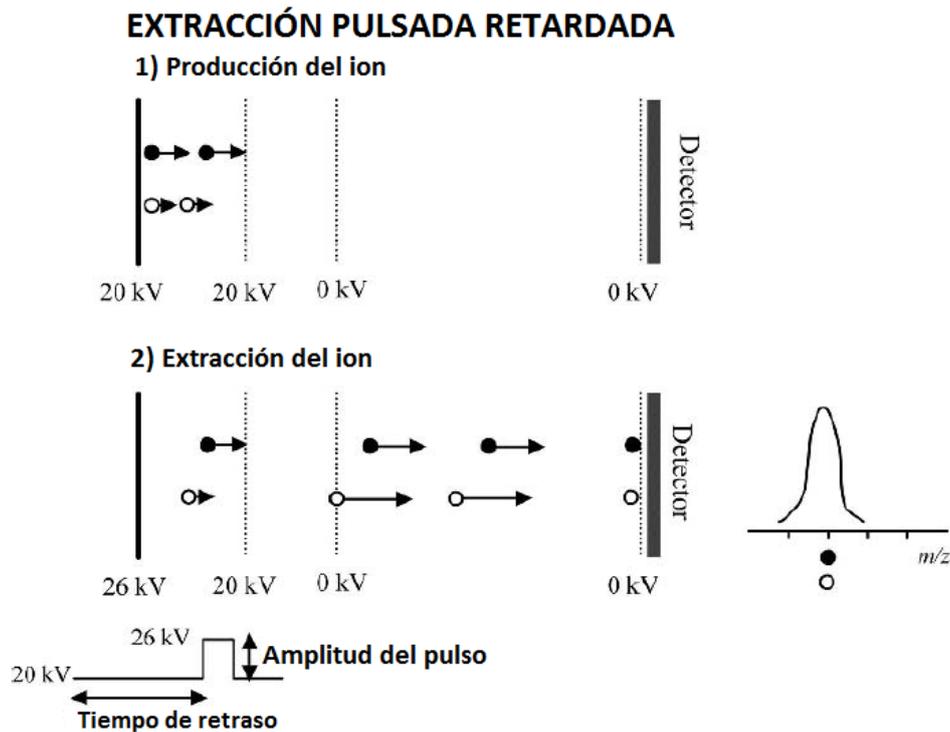


Figura 26. Esquema de la extracción pulsada retardada en un TOF

El enfoque de energía se puede lograr ajustando la amplitud del impulso y el retraso del tiempo entre la formación de iones y la extracción. Para obtener un enfoque óptimo, tanto el pulso como el retraso se pueden ajustar por separado. Debe tenerse en cuenta que la tensión y el retraso de impulsos óptimos dependen de la masa del ion. Se requieren voltajes de impulso más bajos o retrasos más cortos para enfocar iones de menor relación masa/carga. De forma general, para una relación masa/carga dada y una distribución de velocidad inicial, los impulsos de voltaje mayores requieren tiempos de retraso más cortos y viceversa.

Sin embargo, la extracción pulsada retardada posee limitaciones. Complica el procedimiento de calibración de masa ya que sólo se puede optimizar para una parte del rango de masas a la vez y es menos eficaz para grandes masas.

- Reflectrón

Otra forma de mejorar la resolución de masa es usar un reflector electrostático también llamado reflectrón. El reflectrón fue propuesto por primera vez por Mamyrin.⁴⁶

El reflectrón crea un campo de retraso que actúa como un espejo de iones desviándolos y enviándolos de nuevo a través del tubo de vuelo. El tipo más simple de reflectrón, se llama reflectrón de una sola etapa y consiste de forma general en una serie de electrodos de rejilla igualmente espaciados o en electrodos anulares conectados a través de una red resistiva de resistencias del mismo valor.

El reflectrón está situado tras la región libre de campo, justo en el lado opuesto a la fuente de iones de forma que el detector ahora se debe colocar en el lado de la fuente de iones para que se puedan detectar los iones tras reflejarse en el reflectrón.

A la hora de posicionar el detector hay dos métodos: Se puede colocar de manera coaxial con la dirección inicial del haz de iones o con el detector fuera del eje con respecto a la dirección inicial del haz de iones. En el primero, el detector tiene un orificio central para transmitir los iones que salen de la fuente. En el segundo, ajustar el reflectrón en un ángulo pequeño con respecto a los iones que dejan la fuente permite que el detector se coloque al lado de la fuente de iones. Esta segunda colocación es la más común.

La presencia del reflectrón corrige la dispersión de energía cinética de los iones dejado la fuente con la misma relación de masa/carga. Esto se muestra en la Figura 27. Los iones con mayor energía cinética y, por tanto, con mayor velocidad penetrarán más en el reflectrón que aquellos con menor energía cinética. Como consecuencia, los iones más rápidos pasarán más tiempo en el reflectrón y llegarán al detector al mismo tiempo que aquellos que tienen menor energía cinética pero tienen la misma relación masa/carga.

⁴⁶ Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Schmikk, D.V. and Zagulin, V.A. (1973) Sov. Phys. –JETP, 37, 4

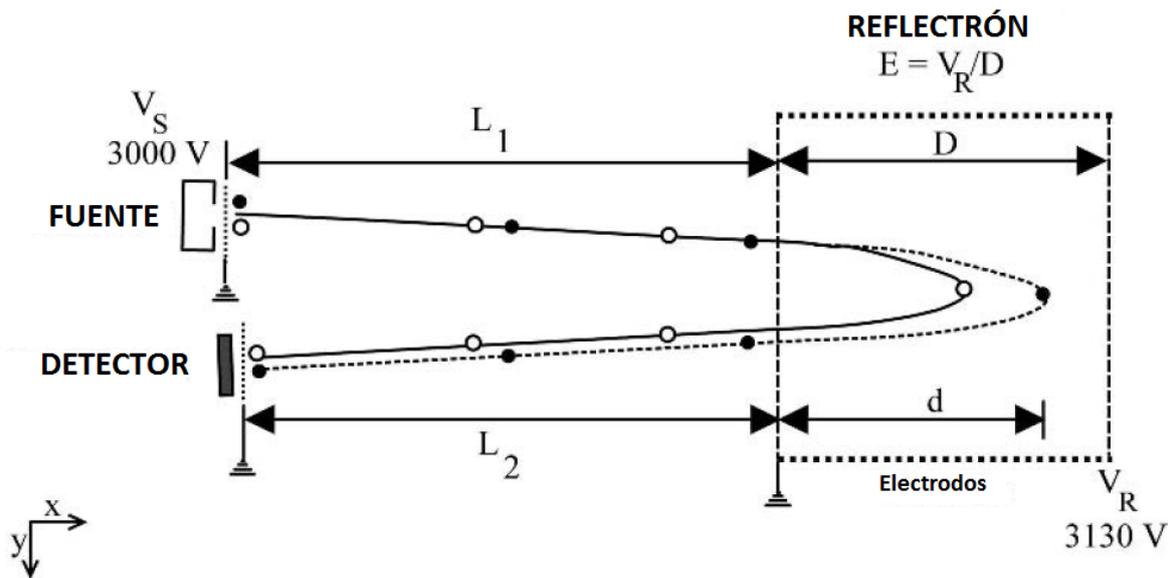


Figura 27. Esquema de un TOF con reflectrón y detector fuera del eje con respecto a la fuente de iones

Aunque el reflectrón aumenta la trayectoria del vuelo sin aumentar las dimensiones del TOF, no genera un aumento tan positivo en la resolución como lo hace la capacidad de corregir la dispersión de energía cinética inicial. Sin embargo, el reflectrón aumenta la resolución de la masa a expensas de la sensibilidad e introduce una limitación de rango de masa.

El rendimiento del reflectrón se puede mejorar usando un reflectrón de dos etapas. Este tipo de reflectrón sirve para reducir el tamaño y para mejorar la homogeneidad del campo eléctrico. En él, se utilizan dos campos eléctricos homogéneos sucesivos de diferente gradiente de potencial. La primera etapa se caracteriza por un intenso campo eléctrico responsable de la fuerte desaceleración de los iones, mientras que la segunda etapa se caracteriza por un campo más débil. Estos reflectrones de dos etapas tienen la ventaja de ser dispositivos más compactos debido a la fuerte desaceleración de los iones en la primera etapa, pero sufren de una transmisión inferior.

12.3. Detector de masas

El detector de masas está basado en un plato de microcanales que proporciona una señal de corriente eléctrica para cada paquete de iones que inciden sobre él. Esta señal es enviada a un registrador de transitorios que registra la llegada de cada señal frente al tiempo a partir del inicio de tiempos que se coordina con el pulso del láser. Finalmente, el espectrómetro de masas está controlado por un ordenador y un software de control que previo calibrado nos proporciona el espectro de masas de la muestra a analizar en la forma habitual (figura de un espectro de masas), es decir, un espectro con los diferentes iones que hay en la muestra y su abundancia.

La velocidad de análisis de los analizadores TOF es muy rápida y se puede obtener un espectro en un amplio rango de masas en microsegundos. Sin embargo, en la práctica para la mayoría de las aplicaciones, el débil número de iones detectados en cada espectro individual es insuficiente para proporcionar la precisión requerida de medición de masa o abundancia. En teoría es posible producir en poco tiempo varios miles de espectros de masas TOF sobre un rango de masas muy amplio. Por lo tanto, los espectros registrados son generalmente la adición de un número de espectros individuales.

Otra característica interesante del analizador TOF radica en su fácil calibración de masa con sólo dos puntos de referencia. Como en todos los espectrómetros de masas, el espectrómetro de masas TOF requiere una ecuación de calibración para relacionar y convertir la propiedad física que se mide a un valor de masa. Para el espectrómetro TOF, esta propiedad física es el tiempo de vuelo de los iones, siendo el origen de tiempos el evento de desorción láser.

El espectrómetro de masas permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos a través de la relación entre la masa y la carga. Obtendremos una representación bidimensional de la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

5.2. REACTIVOS

En cuanto a los reactivos empleados, son los siguientes:

1. Etanol al 70%

Preparamos con ayuda de la probeta al menos medio litro en una botella de cristal estéril.

Para la preparación de un litro empleamos:

- 700 mL de Etanol Absoluto
- 300 mL de agua

Este etanol es el empleado para la limpieza de la tarjeta o placa de pocillos que se introduce en el MALDI.

2. Trifluoroacético al 80% (TFA)

Se prepararon en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para preparar 1 mL se necesitan:

- 800 μ L de TFA, el cual debemos manejar con cuidado en la campana y usando guantes ya que es corrosivo.
- 200 μ L de agua de calidad HPLC.

Se agita en el vortex hasta que esté homogéneo. Se emplea para la limpieza de la placa y se puede conservar a temperatura ambiente durante un mes.

3. Ácido fórmico al 70%

Se prepara en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para realizar la preparación de 1 mL se emplean:

- 700 μ L de Ácido fórmico, el cual debemos manejar en campana y con guantes ya que es un reactivo corrosivo
- 300 μ L de Agua de calidad HPLC

Se juntan en el tubo y se agita en el vortex para garantizar la homogeneidad de la disolución.

Se emplea para la extracción de proteínas con etanol/ácido fórmico y se puede conservar durante un mes a temperatura ambiente.

4. Solvente orgánico

El solvente orgánico (OS) está constituido por un 2,5% de ácido trifluoroacético (TFA) y un 50% de Acetonitrilo (ACN).

Para preparar 1 mL de solvente orgánico (OS) en un tubo de eppendorf se añade:

- 470 μ L de agua de calidad para HPLC
- 500 μ L de Acetonitrilo
- 25 μ L de ácido trifluoroacético

Se agita todo en un vortex y se usa para reconstruir tanto la matriz como los viales de BTS.

En nuestro caso, se prepararon 5 mL de solvente orgánico para poder preparar la matriz con 4000 μ L de Solvente orgánico para la matriz. Por tanto, en nuestro caso se usaron las siguientes cantidades:

- 2375 μ L de agua de calidad para HPLC
- 2500 μ L de Acetonitrilo
- 125 μ L de ácido trifluoroacético

5. Solución de Matriz

La matriz está formada por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Por cada 250 μ L de solvente orgánico necesitamos 2'5 mg de matriz liofilizada. Para nuestro caso, se decidió utilizar 4000 μ L de solvente orgánico de forma que si realizamos una regla de tres se necesitan 40 mg de matriz. Esto se mezcla en un tubo esterilizado y se agita en un vortex durante 2-3 minutos para asegurar que la disolución sea completa, asegurándonos de que no quedaron cristales ni precipitados.

Una vez obtenida la solución matriz, se divide en alícuotas en diferentes tubos de microcentrífuga añadiendo en cada uno de ellos 120 μL de matriz. Posteriormente se conservaron en un congelador a -80°C .

Se hizo tal cantidad de matriz para que en todo momento los análisis se realizaran con la misma matriz y evitar variables que puedan cambiar los resultados.

6. Solución Bruker Bacterial Test Standard (BTS)

Es necesario preparar un patrón que se incluirá en las medidas del MALDI.

A un tubo de Bacterial Estándar, tubo comercial comprado a Bruker, el cual viene identificado por llevar un tapón amarillo, se añaden 50 μL de solvente orgánico y se pipetea con ayuda de una micropipeta arriba y abajo durante 20 veces. Con ello conseguimos realizar una mezcla del patrón y el solvente orgánico.

Tras esto, lo tapamos y dejamos reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez pasado este tiempo, se abre y se vuelve a pipetear arriba y abajo otras 20 veces.

Finalmente centrifugamos durante 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente.

Con esto podemos realizar alícuotas de 10 μL y lo conservamos congelándolo a -20°C .

5.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La parte experimental del trabajo se ha realizado en parte en los laboratorios de la facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, parte en el LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales) y en parte en la facultad de medicina de la Universidad de Valladolid donde se cuenta con un laboratorio de bioseguridad entre 3 ya que la manipulación de la Legionella debe realizarse de manera muy cuidadosa y con mucha precaución para evitar contagios. Este tipo de laboratorios cuenta con luz UV para eliminar los restos de microorganismos y evitar contagios. Además, se encuentran a presión negativa, para evitar que el aire salga del laboratorio.

El primer paso a realizar en el procedimiento experimental fue revivir a las diferentes cepas de Legionella ya que se encontraban congeladas a -80°C para conservarlas. Para la creación del cepario las bacterias se introdujeron dentro de unos tubos denominados crioviales, los cuales en su interior poseen unas perlas químicamente tratadas suspendidas en una solución conservante criogénica especial que contiene glicerol. El aspecto de los crioviales se muestra en la Figura 28.



Figura 28. Crioviales empleados en la congelación y conservación de las cepas de Legionella

Para poder revivir las cepas de Legionella, tomamos con ayuda de un asa de siembra una de las perlas o bolas del criovial y la depositamos sobre una placa de cultivo de Agar BCYE previamente rotulada con el número de la cepa de la Legionella. Posteriormente, se realizó la siembra arrastrando la perla por encima de la superficie siguiendo los trazos que se muestran en la Figura 29.

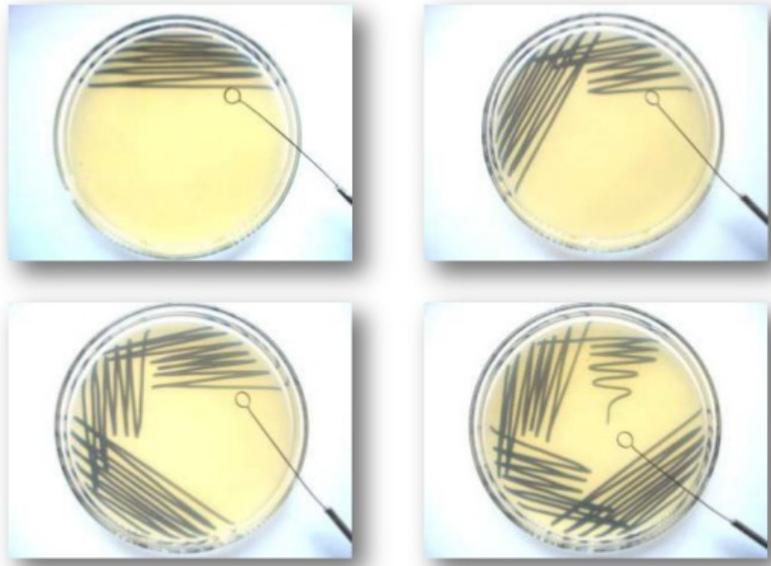


Figura 29. Esquema de la siembra de las placas de Agar BCYE

Esta placa se dejó en la incubadora o estufa en la que se mantuvo a unos 36°C durante 48 horas para fomentar el crecimiento del microorganismo.

Una vez pasado este tiempo, se realizó un pase a una nueva placa de Agar BCYE. Para ello, se tomó con el asa de siembra una pequeña cantidad de colonia aislada de Legionela y se realizó una nueva siembra en la nueva placa de la misma manera que se procedió en la anterior placa. Esta placa se conservó en la incubadora durante 24 horas.

Finalmente, se realizó un último pase procediendo de la misma forma que se conservó durante 48 horas.

Una vez pasado este tiempo, se procedió a realizar la extracción de proteínas. El motivo de realizar la extracción de proteínas es la obtención de espectros de mayor calidad en el MALDI-TOF y con menor ruido de fondo que si trabajásemos analizando las colonias directamente.

La extracción de proteínas se realizó mediante un método establecido y optimizado por Bruker. Este método es la extracción en Etanol/Ácido fórmico. Para ello, realizamos los siguientes pasos⁴⁷:

- En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se añadieron con ayuda de una micropipeta 300 µL de agua de calidad HPLC.
- Con de un asa de siembra de 1 µL se toma microorganismo de la placa de cultivo. Se debe tomar muestra por ambos lados del asa, saturándola por ambos lados.
- El asa lo introducimos en el tubo de microcentrífuga que contiene el agua y lo redispesendemos haciéndolo girar
- Una vez depositado, si observamos que la cantidad de microorganismo tomado es pequeña se vuelve a repetir el procedimiento con un asa de siembra nueva.
- Se tapa el tubo de microcentrífuga y se agita con ayuda del vortex para asegurarnos de tener una disolución homogénea.
- Añadimos 900 µL de etanol absoluto en el tubo de microcentrífuga y volvemos a agitar en el vortex hasta homogeneidad.
- Metemos el tubo de microcentrífuga dentro de la microcentrifugadora durante 2 minutos a 13000 rpm para que se produzca la sedimentación de las proteínas.
- Nos deshacemos del sobrenadante, decantándolo y dejando el tapón del tubo de microcentrífuga abierto para que se siga evaporando etanol.
- Para asegurarnos de que eliminamos por completo el excedente de etanol, volvemos a centrifugar el tubo de microcentrífuga durante 1 minuto a 13000 rpm y eliminamos el sobrenadante con una micropipeta de 200 µL.
- Se añaden 45 µL de Ácido fórmico al 70% y con ayuda de la pipeta resuspendemos el sedimento hasta tener una disolución.
- Para homogeneizarlo completamente, pasamos el tubo de microcentrífuga por el vortex durante unos segundos.
- Añadiremos ahora 45 µL de Acetonitrilo y lo agitamos en el vortex para homogeneizarlo de nuevo.

⁴⁷ Manual MALDI Biotyper 3.1. Bruker

- Se vuelve a meter el tubo de microcentrífuga en la microcentrifugadora y lo centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm.
- El sobrenadante que obtenemos contiene las proteínas de la cepa de Legionella, de forma que podemos proceder a depositar en los pocillos correspondientes de la placa de MALDI 1 μ L de solución.
- Finalmente lo dejamos secar y añadimos 1 μ L de matriz en los pocillos y dejamos secar.

Por cada cepa que se analizó en el MALDI, se depositaba la cepa en 9 pocillos de la placa. En el pocillo central se añadió además 1,2 μ L de BTS, por tanto ese pocillo contendría 1 μ L de las proteínas de la Legionella y el BTS.

Además, en un pocillo libre se depositaron 1,2 μ L de BTS para poder realizar la calibración del MALDI-TOF antes de comenzar con el análisis de las cepas.

Una vez introducida la placa en el MALDI iniciamos el programa FlexControl, de control del instrumento, y el primer paso a realizar fue la calibración mediante la medición del espectro del BTS. Seleccionamos el pocillo en el programa y aplicamos el método MBT_FC.par, que incorpora la tabla de masas del BTS, para realizar la calibración. Una vez establecido el método realizamos diferentes pulsos láser de forma manual en diferentes lugares del pocillo y sumamos los espectros hasta conseguir un espectro con una intensidad de al menos 10^4 . Podemos ir seleccionando diferentes zonas del pocillo ya que hay una cámara que nos permite ver el pocillo en la pantalla del ordenador y, por tanto, desplazarnos por él. Esto se puede observar en la Figura 30. Como se puede observar en la misma, podemos variar manualmente la intensidad del láser moviendo el regulador de la parte derecha.

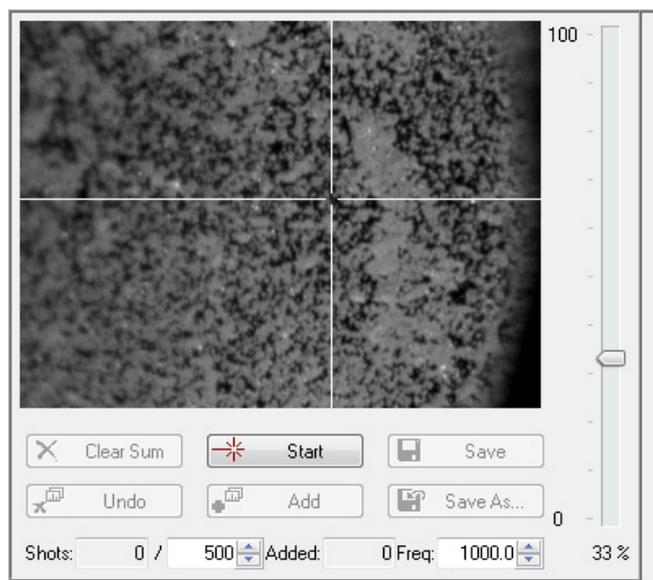


Figura 30. Imagen de uno de los pocillos de la placa metálica del MALDI

Tras esto, se asignaron automáticamente los picos y guardamos el método con la correspondiente calibración del equipo. Una vez finalizado, podemos comenzar con el análisis de las cepas.

Tras la calibración del MALDI-TOF se procedió a la lectura de los 9 spots depositados por cada cepa analizada de la siguiente forma:

- Los 8 spots que contienen a las proteínas de la Legionella son leídos 3 veces, de forma que se obtuvieron 24 espectros de cada cepa
- En el pocillo central, que contiene a las proteínas y al BTS, únicamente se lee una vez.

En los espectros de masas que obtenemos, tenemos una representación de la relación masa/carga frente a la intensidad. Un ejemplo del espectro de masas que se obtuvo se representa en la Figura 31. No se realiza únicamente un pulso láser por lectura, sino que se realizan varios pulsos láser de manera automática en una serie de puntos del pocillo hasta que se obtiene un espectro suma con una intensidad de al menos 10^4 . Por tanto, en el espectro de masas podremos ver el espectro del pulso en concreto (representado en azul en la Figura 31) y el espectro suma (representado en rojo en la Figura 31).

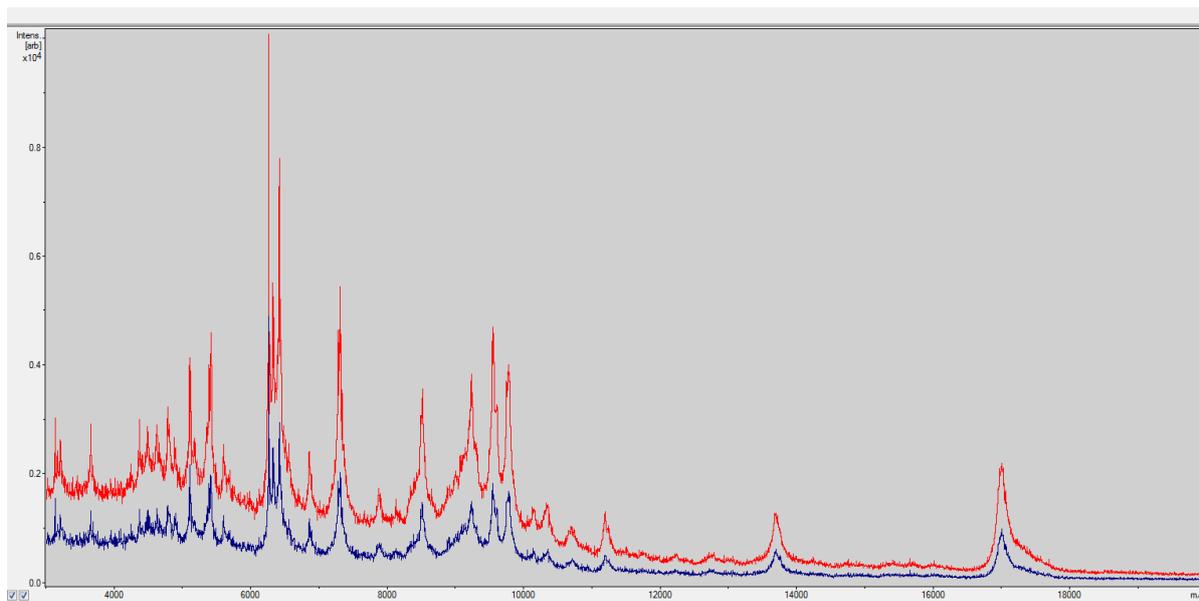


Figura 31. Ejemplo de espectro obtenido en el análisis de una cepa de Legionella, donde el espectro en azul representa el obtenido en ese pulso láser y el rojo representa el sumatorio de todos los espectros recogidos

Una vez completado el análisis se realizó la limpieza de la placa para poder utilizarla en el siguiente análisis. Para ello, realizamos una serie de pasos estipulados por Bruker, los cuales consistían en cubrir la placa con etanol al 70% y dejarlo durante 5 minutos. Tras esto, pusimos la placa metálica bajo el grifo y frotamos con un papel. De nuevo, volvíamos a cubrir la placa con etanol al 70% y lo dejamos otros 5 minutos. Después volvimos a limpiar con agua y papel como habíamos hecho antes. Una vez realizado esto, con una disolución de TFA al 80% añadimos sobre la placa 100 μ L por cepa analizada y se repartía cuidadosamente con un poco de papel. Esto se dejó durante 15 minutos y una vez pasado este tiempo se podía guardar la placa, quedando lista para un nuevo uso.

6. RESULTADOS

Durante este trabajo se ha realizado el análisis de 92 cepas diferentes de Legionella. En el Anexo II se muestra una tabla con las 92 cepas procesadas con sus genotipos. Para cada una de las cepas se ha seguido el procedimiento descrito con anterioridad.

El primer espectro que obtenemos siempre en cada proceso de medida es el del BTS, con el cual se realiza la calibración del espectrómetro de masas. El espectro de masas de este patrón posee una serie de picos característicos que se pueden observar en la Figura 32.

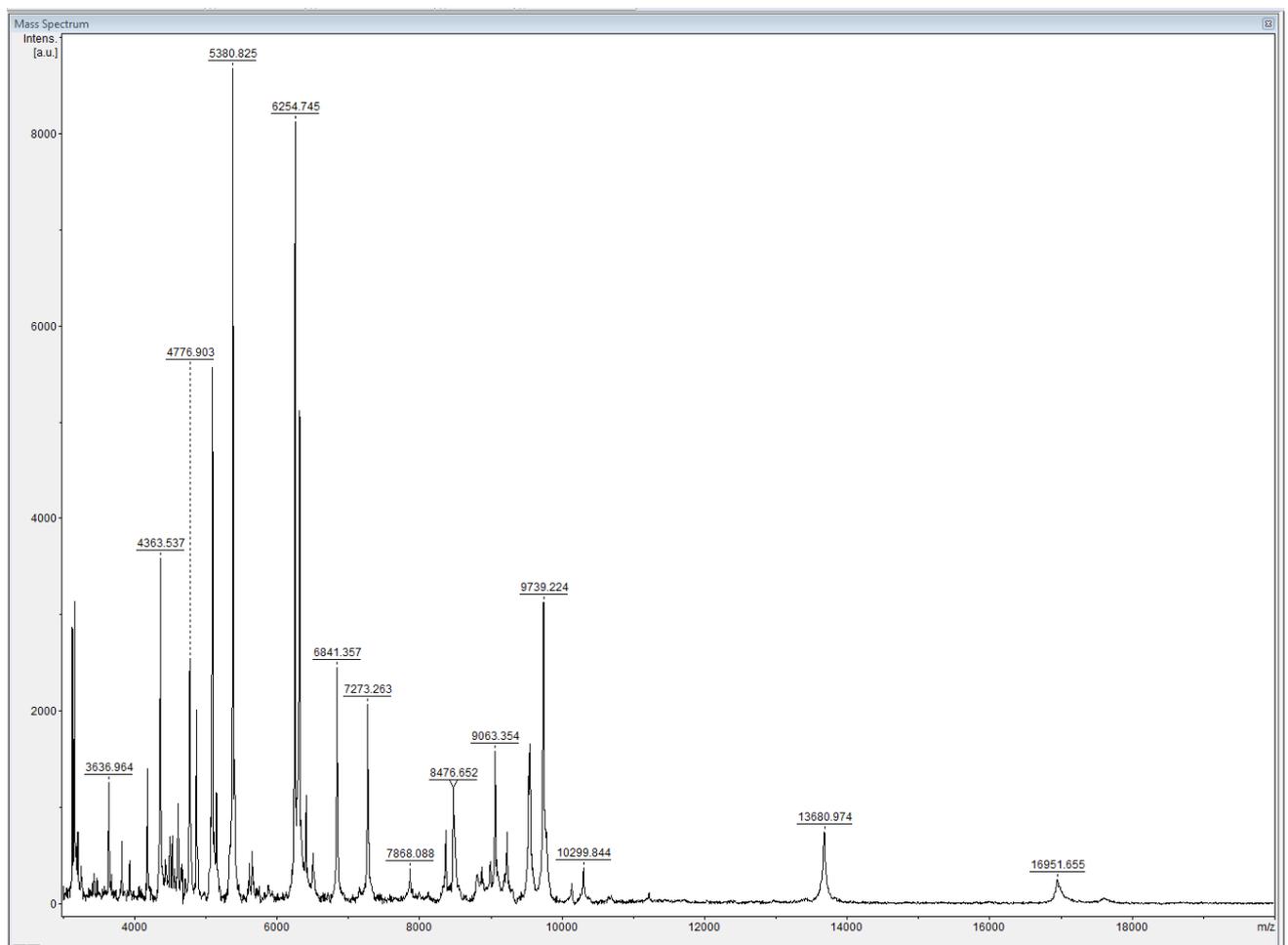


Figura 32. Espectro de BTS obtenido con el MALDI

Los 24 espectros de cada una de las cepas analizadas se obtuvieron siempre junto al de una muestra mezcla de las proteínas de la cepa y BTS. La medida de esta mezcla es necesaria para la calibración posterior de los 24 espectros de cada cepa como paso previo a la generación del perfil patrón de su espectro de masas en la región de 2000-20000 Da (Main Spectrum Profile –MSP). En la Figura 33 se representa una imagen del análisis de una cepa de Legionella y en la Figura 34 se observa el espectro del microorganismo junto con el BTS.

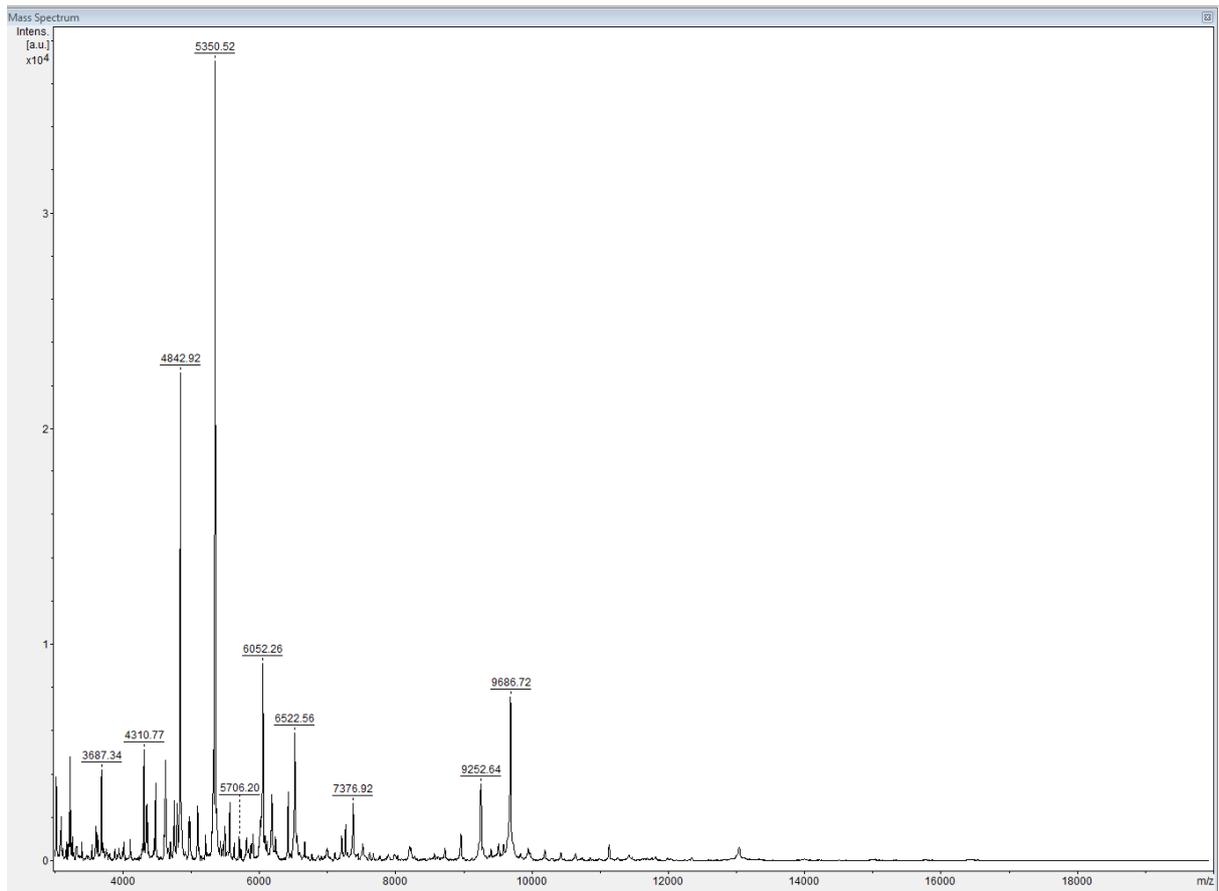


Figura 33. Espectro obtenido tras el análisis de una cepa de Legionella con el MALDI

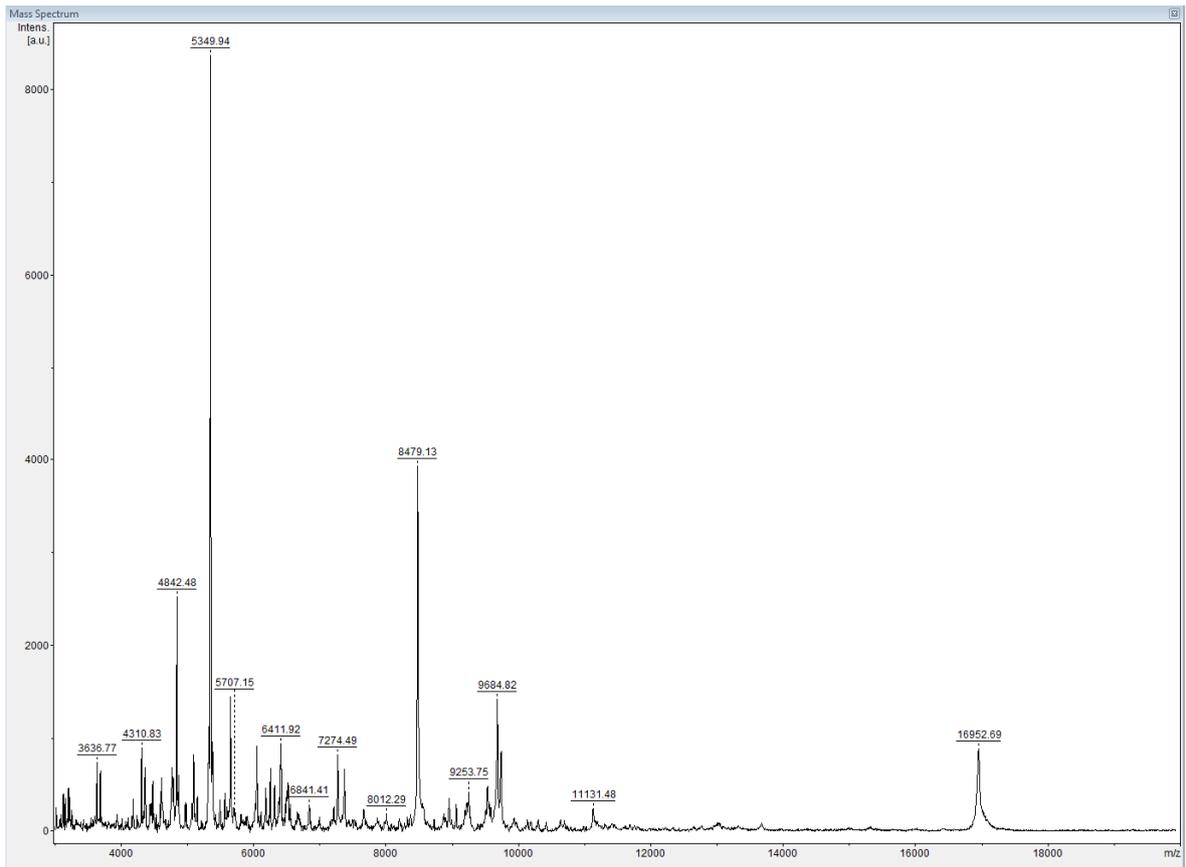


Figura 34. Espectro de la Legionella junto con el BTS

Como se puede observar, si comparamos la Figura 32 con la Figura 34 existen una serie de picos que pertenecen al BTS y una serie de picos que pertenecen exclusivamente al microorganismo, lo cual nos permite realizar la identificación de forma correcta.

La especificidad de la técnica MALDI-TOF para la identificación de los microorganismos radica en que estos poseen unas proteínas ribosomales características diferentes en cada cepa de especie, con masas entre 2000 y 20000 Da, que se registran en el espectro MALDI-TOF. Para poner de manifiesto esta especificidad, en las difuras 35 y 36 se muestran los espectros de masas de una *Escherichia Coli* (bacteria) y una *Torulapsora Delbrueckii* (Levadura), respectivamente.

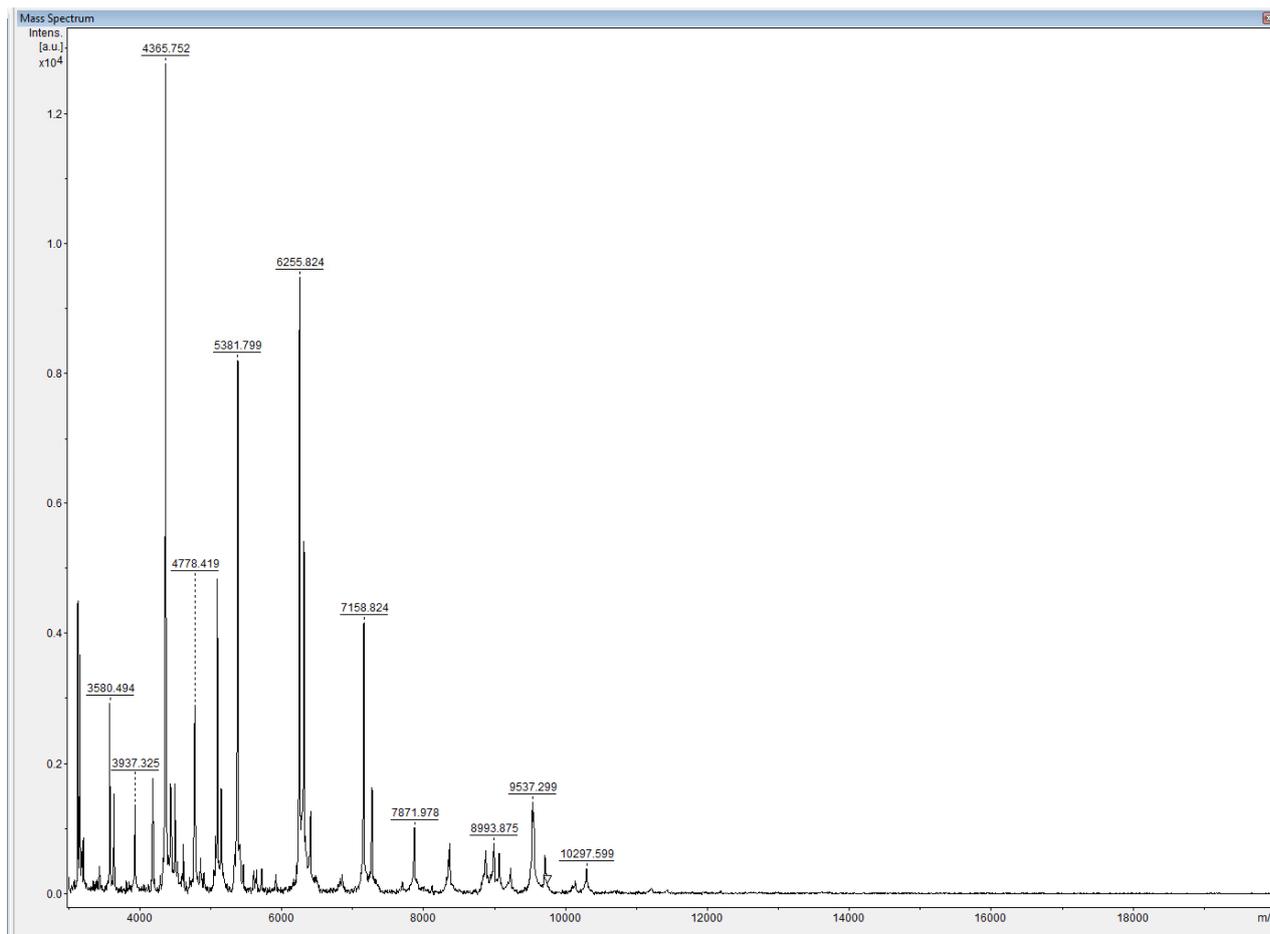


Figura 35. Espectro de Escherichia Coli obtenido con el MALDI

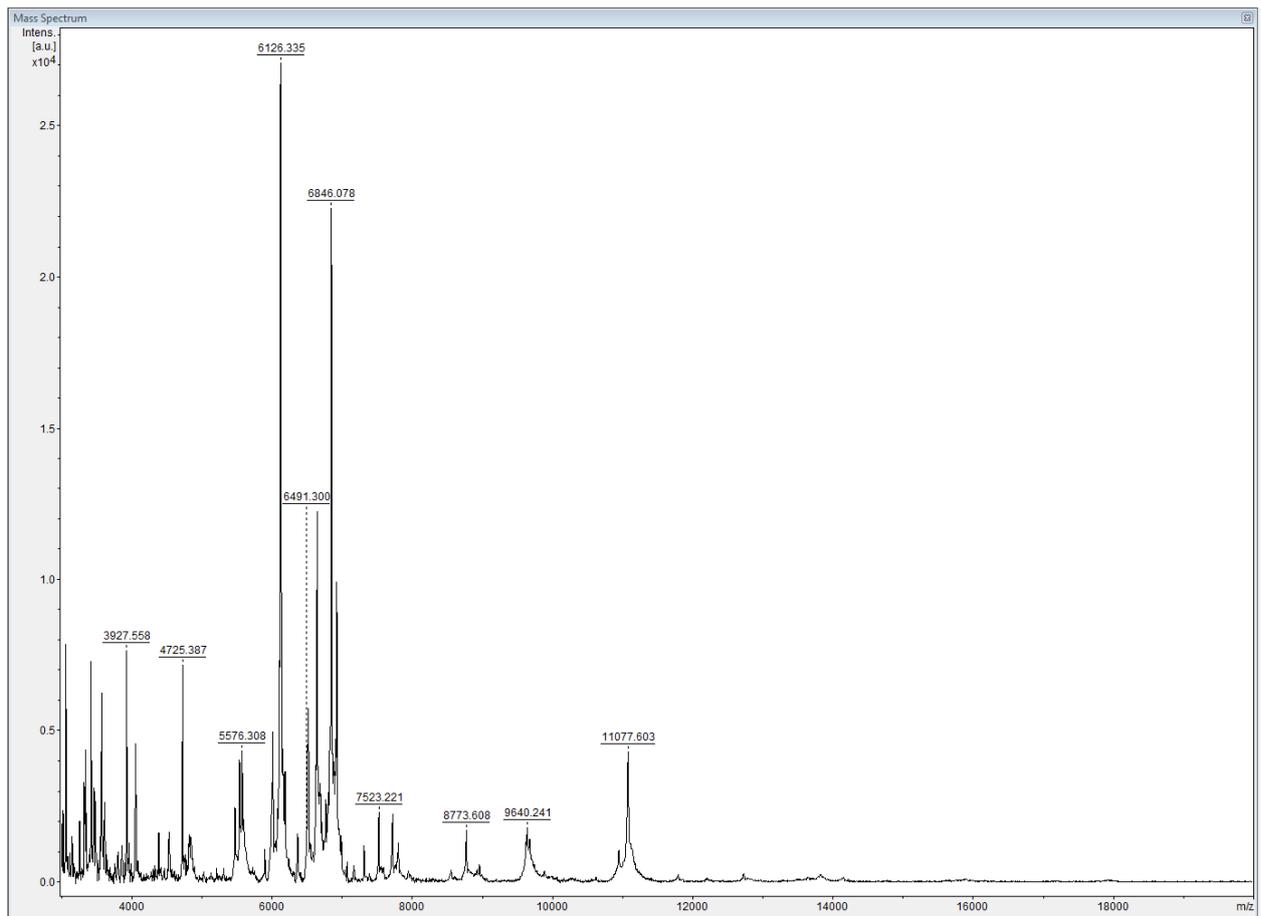


Figura 36. Espectro de Torulapsora Delbrueckii obtenido en MALDI

Como se puede observar, si comparamos las Figuras 33, 35 y 36; se obtienen espectros con aspectos muy diferentes y que constituyen una huella dactilar o molecular, lo cual nos permite la identificación de microorganismos diferentes a través de la técnica.

Una vez registrados los espectros MALDI-TOF de todas las cepas estudiadas es necesario procesarlos y analizarlos mediante el programa FlexAnalysis para posteriormente generar los espectros MSP, llegar a la creación de nuevas entradas en la base de datos de microorganismos y realizar un análisis del conjunto de espectros..

El primer paso en el procesamiento de los 24 espectros de cada cepa fue su recalibración. Para ello, se siguieron los siguientes pasos para cada una de las cepas de Legionella:

- Cargamos el espectro de una cepa de Legionella junto con el BTS y establecemos el método MBT_StandardFAMSMMethod con la librería de masas del BTS
- Suavizamos el espectro
- Extraemos la línea de base
- Buscamos el listado de relaciones masa/carga (m/z) donde identificamos el pico de masa del BTS que se corresponde con el valor 6255,4 Da
- Una vez encontrado procedemos a la recalibración de este espectro. Lo que sucede aquí es que desplazamos el espectro para que el pico correspondiente a 6255,4 Da tome éste valor
- Tras esto, cargamos los 24 espectros de la cepa de Legionella y el espectro de la cepa junto con el BTS. Suavizamos los espectros, extraemos la línea de base y buscamos un pico de masa común en todos los espectros que emplearemos para recalibrar. Desplazamos todos los espectros de Legionella para que los picos de masas detectados coincidan con el espectro (cepa+BTS) previamente calibrado en la etapa anterior
- Finalmente comprobamos que todos los espectros poseen una buena intensidad o si hay alguno que sea plano. En caso de encontrar alguno plano o con una intensidad muy mala, se eliminan. Tras la recalibración de cada cepa se seleccionan un mínimo de 20 espectros válidos que garanticen la fiabilidad de los datos

Una vez completado este proceso para todas las cepas de Legionella estudiadas pasaremos al siguiente paso que consiste en la generación del espectro MSP, la creación de una nueva entrada en la base de datos para cada cepa y la obtención final de un dendrograma.

Para crear una nueva entrada en la base de datos empleamos el programa Maldi Biotyper, donde abriremos los 24 espectros recalibrados de cada. El programa transforma las señales continuas de los espectros experimentales con un máximo de 200 picos cada uno en señales discretas, para obtener un único espectro de la cepa que posee un máximo de 70 picos. Un ejemplo de ello se puede observar en la Figura 37. Estos 70 picos son los más significativos de cada una de las cepas. Estas señales constituyen la matriz de puntos de datos de masa e intensidad base del espectro MSP (*Main Spectrum Profile*), de cada cepa, la huella dactilar de la misma que se usa en posteriores identificaciones.

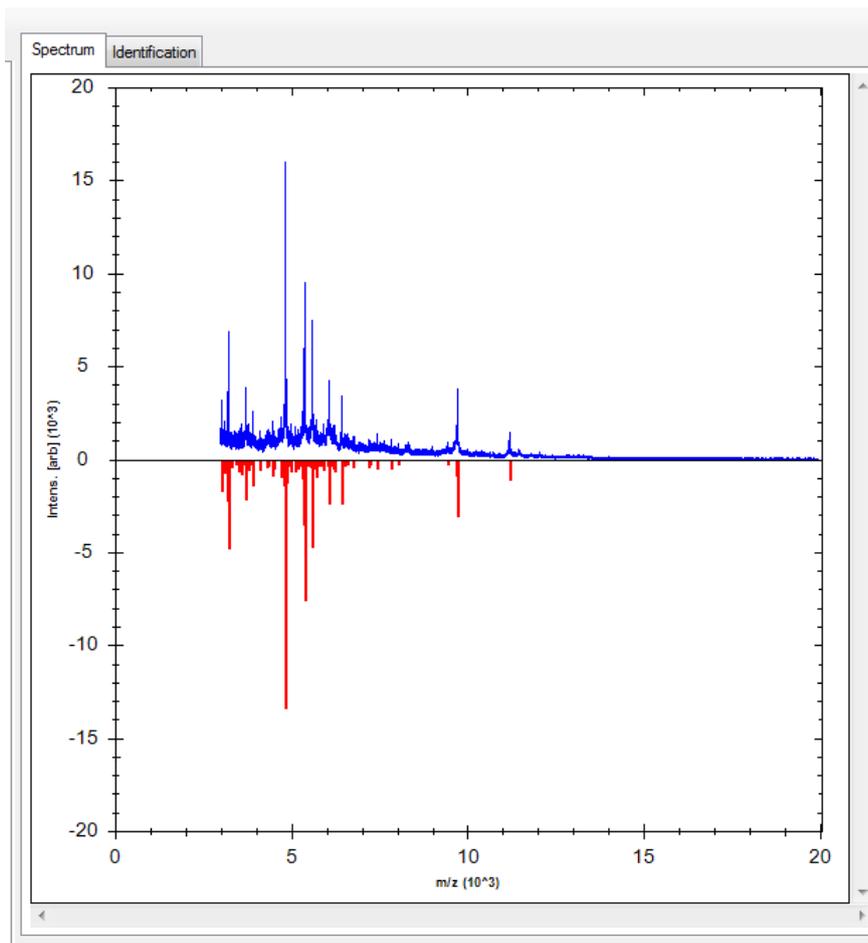


Figura 37. Ejemplo de transformación de señales continuas a señales discretas en el Maldi Biotyper

Cuando finalmente hemos obtenido señales discretas de todas las cepas estudiadas podemos crear un dendrograma a partir de los correspondientes espectros MSP.

La forma en la que el programa MALDI Biotyper llega al dendrograma se muestra en la Figura 38.⁴⁸

⁴⁸ Creación de nuevas entradas en la base de datos e investigación de relaciones entre microorganismos. Francisco Soria Melguizo S.A.

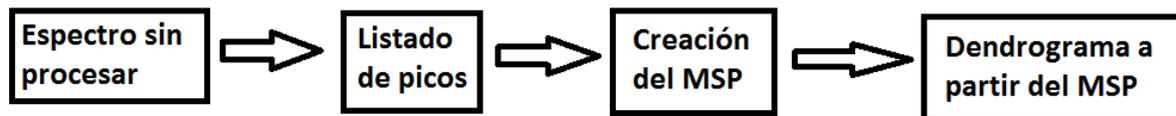


Figura 38. Proceso de creación del dendrograma a través del programa MALDI Biotyper

Un dendrograma es un tipo de representación gráfica o diagrama de árbol que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado. Este tipo de representación permite apreciar de forma clara las relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre grupos de datos. Observando las sucesivas subdivisiones podemos hacernos una idea sobre los criterios de agrupación o de la distancia entre los datos según las relaciones establecidas, por ejemplo.⁴⁹

En nuestro caso, el dendrograma corresponde a los estándares que tiene Bruker establecidos en el programa Maldi Biotyper. El dendrograma, que se muestra en el anexo. obtenido como resultado del análisis de las 92 cepas analizadas nos permite establecer el grado máximo de semejanza genotípica entre ellas.

En rasgos generales, a través del dendrograma podemos ver las semejanzas o diferencias entre los espectros de las diferentes cepas de Legionella estudiadas. Cuanto más grande sea la distancia del nivel, es decir, más largo sea el ramal del dendrograma, mayores diferencias poseen las cepas entre sí. Por el contrario, si se encuentran muy cerca en el nivel, podemos decir que son cepas muy similares

Para poder simplificar la visualización, se ha realizado una selección de 60 cepas para representarlo y así se pueda observar claramente cómo se distribuyen las diferentes cepas según el genotipo. Para ello, hemos creado un dendrograma que contiene 60 cepas, el cual se muestra en la Figura 39.

⁴⁹ <https://es.wikipedia.org/wiki/Dendrograma> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

A continuación se muestra la Tabla con las 60 cepas y el genotipo correspondiente para que su lectura pueda ser más clara:

Tabla 3. Listado de las 60 cepas representadas en el dendrograma junto con su genotipo

CEPA	GENOTIPO	CEPA	GENOTIPO
4369	1	6421	22
4322	22	6197-I	22
4766	22	6901	1
4550	1	1416	1
4457-I	22	1332	1
4456-I	22	7675	22
4767	22	653	22
3482	22	602	1
4860	1	1172	22
4998	22	5493-I	22
4996-I	22	5492	22
4769	22	7238	22
3289	1	5427	22
LEGIONELLA 111	36	5780	22
4802	1	290	22
4768	22	7555-I	22
3373	1	7262	22
2126	22	26	22
480295	578	325	1
496053	1106	242	1
490738	578	3481-I	22
489571	578	27	22
489154	578	291	22
481962	578	194	22
953-A	22	1839	22
266-C	22	5852	22
6107	22	1707	22
7999	22	1706	22
7125	1	1467	22
6726	22	1466	22

El número que posee cada genotipo (22, 1, 578...) representa el ST, con el que podemos caracterizar a la Legionella y obtener los siete números de los genes “housekeeping”.^{50 51}

El genotipo es la información genética que posee un organismo en particular contenida en el ADN. Se trata de la información que se encuentra dentro de los cromosomas y esta puede manifestarse o no en el individuo. Normalmente, el genoma de una especie incluye numerosas variaciones en muchos de sus genes. El genotipado se usa para determinar qué variaciones específicas existen en el individuo. El genotipo junto con factores ambientales que actúan sobre el ADN determina las características del organismo, es decir, su fenotipo. Esto puede definirse de otra forma diciendo que el genotipo es el conjunto de genes de un organismo mientras que el fenotipo es el conjunto de rasgos de un organismo.⁵²

Si nos fijamos en el dendrograma obtenido, podemos distinguir tres ramales diferenciados: El primero, representado en azul; el segundo, representado en negro; y el tercero, representado en rojo. Si observamos el segundo ramal, únicamente contiene la cepa LEGIONELLA 111. Esta cepa es una cepa de colección inglesa que no posee ningún vínculo con las cepas estudiadas. Se incluye en el estudio ya que actúa como referencia. El espectro de esta cepa se representa en la Figura 40. El dendrograma demuestra que los espectros de masas MSP pueden utilizarse para agrupar las diferentes cepas en función de las masas de las proteínas mitocondriales.

⁵⁰ <http://www.ewgli.org/> European Working Group for Legionella Infections (Última visita 23/06/2017)

⁵¹ http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php Legionella Pneumophila Sequence-Based typing (Última visita 23/06/2017)

⁵² <https://es.wikipedia.org/wiki/Genotipo> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

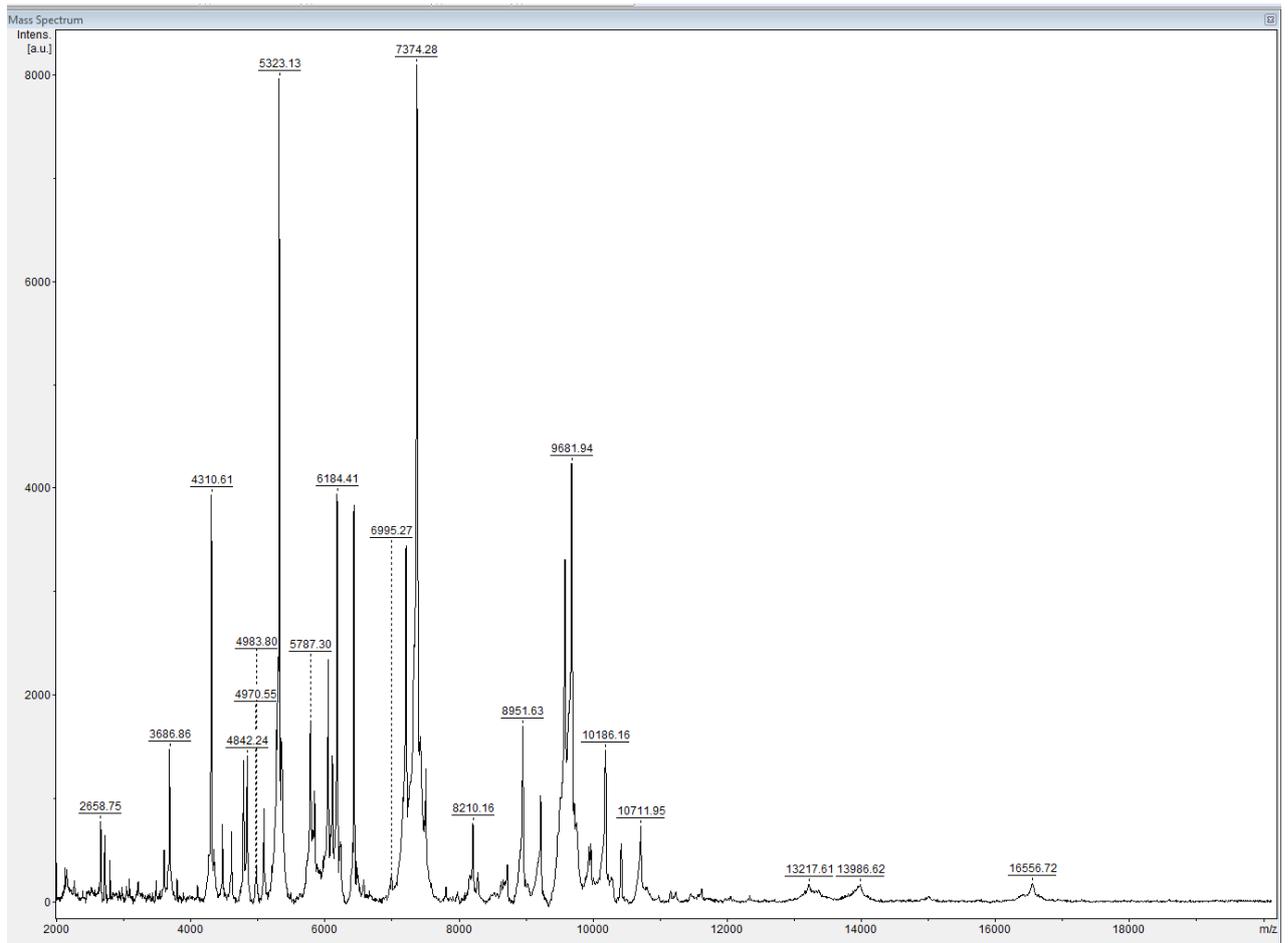


Figura 40. Espectro Legionella 111, cepa de referencia

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se ha comprobado que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica efectiva para la identificación de microorganismos a través de la extracción de sus proteínas mitocondriales
- ✓ La técnica MALDI-TOF-MS permite realizar la identificación de una cepa de Legionella en menos de 30 minutos a partir de un cultivo, tiempo que en muchos casos es crucial en el ámbito de la salud.
- ✓ Del análisis de los espectros de 92 cepas de Legionella de genotipo conocido se ha obtenido un dendrograma dónde se demuestra la capacidad de la técnica para caracterizar las similitudes y diferencias entre las cepas, de acuerdo con el hecho de que a pesar de ser la misma bacteria, poseen genes que las diferencian.
- ✓ Hemos comprobado que la cepa de colección inglesa LEGIONELLA 111 sale en el dendrograma totalmente diferenciada ya que no tiene ningún vínculo con el resto de cepas analizadas

8. GLOSARIO

- Alelo → Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que ocupan el mismo lugar en los cromosomas homólogos y cuya expresión determina las características del mismo rasgo de organización.⁵³
- BCYE Agar → Buffered Charcoal Yeast Extract Agar – Agar tamponado de extracto de levadura con carbón.
- Biofilm → También puede llamarse biopelícula o tapiz bacteriano. Es un ecosistema microbiano organizado, formado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.⁵⁴
- Biomarcador → También llamado marcador biológico. Es aquella sustancia usada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Son medidas en los niveles moleculares, bioquímicas o celulares, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante.⁵⁵
- BTS → Bacterial Test Standard – Test bactericida estándar.
- Cepa → En microbiología es una población de células de una sola especie descendientes de una única célula, generalmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De forma más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.⁵⁶
- CHCA → α -ciano-4-hidroxicinámico.
- Cultivo → En microbiología es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias. Se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. Se emplea como método fundamental para el estudio de microorganismos.⁵⁷

⁵³ <http://dle.rae.es/?id=1hhcUkk> Real Academia de la Lengua (Última visita 23/06/2017)

⁵⁴ <https://es.wikipedia.org/wiki/Biopel%C3%ADcula> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

⁵⁵ <https://es.wikipedia.org/wiki/Biomarcador> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

⁵⁶ <https://es.wikipedia.org/wiki/Cepa> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

⁵⁷ [https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_\(microbiolog%C3%ADa\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_(microbiolog%C3%ADa)) Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

- Dendrograma → Tipo de representación gráfica o diagrama de árbol que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado. Este tipo de representación permite apreciar de forma clara las relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre grupos de datos.⁴⁹
- EWGLI → European Working Group for Legionella Infections – Grupo de trabajo Europeo para las infecciones por Legionella.
- Fenotipo → Se trata de la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. Los rasgos genotípicos cuentan con rasgos tanto físicos como conductuales. Hay que destacar que el fenotipo no puede definirse exclusivamente como la “manifestación visible” del genotipo ya que a veces las características que se estudian no son visibles en el individuo. Un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.⁵⁸
- Genes “housekeeping” → Genes constitutivos. Son los que se expresan como resultado de la interacción entre la ARN-polimerasa y el promotor sin necesidad de regulación adicional y se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo.³⁶
- Genotipo → Información genética que posee un organismo en particular y que se presenta en forma de ADN. Se trata de la información que se encuentra dentro de los cromosomas y esta puede manifestarse o no en el individuo.⁵²
- MALDI → Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz.
- MALDI-IMS → MAtrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-imaging mass spectrometry.
- MPI → Multi Photon Ionization - Ionización multifotónica.
- MS → Mass Spectrometry - Espectrometría de Masas.
- MSP → Main Sprectrum Profile – Perfil del espectro principal.
- Pase → Consiste en tomar cultivo puro de un microorganismo y realizar con él una nueva siembra.
- Perfil alélico → Combinación específica y determinada de alelos. Se identifican por un número arbitrario asignado por su orden de descripción.⁵⁹

⁵⁸ <https://es.wikipedia.org/wiki/Fenotipo> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

⁵⁹ MLST (Multilocus sequence typing): Un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. Vlanca de las Rivas, Ángela Marcobal, Rosario Muñoz. Departamento de Microbiología, Instituto de Fermentaciones industriales, CSIC

- PFGE → Pulsed Field Gel Electrophoresis - Electroforesis en campo pulsante.
- Relación clonal → En epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión.
- SBT → Sequence-Based typing – Tipado/Escritura basada en secuencias.
- Serogrupo → Es un grupo serológicamente identificado por medio de un antisuero específico de microorganismos de la misma especie o del mismo género que tengan un patrón antigénico común específico del grupo.⁶⁰ Es un grupo de microorganismos que sólo difieren en su composición en términos de antígenos.⁶¹
- Serotipo → Tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia epidemiológica. Un serotipo determinado es una subpoblación de un microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones de la misma especie por medio de pruebas serológicas.⁶²
- Siembra → Se trata del mismo proceso que el cultivo.
- ST → Sequence Typing – Secuencia de tipado/escritura.
- Tampón ACES → Tampón de Ácido n-(2-acetamido)-2-aminosulfónico.
- TOF → Time Of Flight - Tiempo de Vuelo.

⁶⁰ <http://www.encyclopediadetareas.net/2016/02/definicion-de-serovariedad.html> Enciclopedia de tareas (Última visita 23/06/2017)

⁶¹ http://diccionario-internacional.com/definiciones/?spanish_word=serogroup Diccionario Internacional (Última visita 23/06/2017)

⁶² <https://es.wikipedia.org/wiki/Serotipo> Wikipedia (Última visita 23/06/2017)

9. ANEXO I

A continuación se muestra el dendrograma completo con las 92 cepas procesadas durante la experimentación.

10. ANEXO II

A continuación se representa en la Tabla 4 el nombre de las 92 cepas mostradas en el dendrograma del ANEXO I junto con su genotipo.

Tabla 4. Asignación genotípica a cada una de las cepas estudiadas

CEPA PROCESADA	GENOTIPO	CEPA PROCESADA	GENOTIPO
4766	22	1466	22
4550	1	2055	22
4457-I	22	2054	22
4456-I	22	1839	22
4369	1	1707	22
4322	22	1706	22
4767	22	6196	22
3482	22	5829	22
4996-I	22	5828-I	22
4860	1	1464	22
4998	22	490705	578
4769	22	489571	578
4768	22	489154	578
3289	1	481962	578
LEGIONELLA 111	36	1332	1
4802	1	1172	22
3373	1	7999	22
2126	22	953-A	22
496053	1106	266-C	22
490738	578	7125	1
480295	578	6726	22
2073	22	75	1086
5492	22	638	1086
5493-I	22	570	22
7238	22	6355	1
5427	22	6531	1
5780	22	1205-1a	1
290	22	88-1	22
3481-I	22	934	22
27	22	1170	22
325	1	7675	22
7555-I	22	HCU69231	146

7311	22	653	22
7262	22	602	1
26	22	1416	1
7422	1	6421	22
7157	22	6901	1
195	22	6197-I	22
5787	20	7454	22
5723-I	22	652	22
242	1	554	22
291	22	495	22
194	22	448	22
6107	22	1230-1a	22
5852	22	952-C	22
1467	22	445	22