

**Unidad de
PROTEÓMICA (PRT)****PERSONAL**

Laura Taveró Pérez

Raquel M^a González Carmona

Carlos Fuentes Almagro

Consuelo Gómez Díaz

CONTACTO Unidad PRT

Edf. Ramón y Cajal, Planta Baja.

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8984

E-Mail: proteomica@uco.esproteomica2@uco.es<http://www.uco.es/servicios/scai>**ADMINISTRACIÓN**Edf. Ramón y Cajal, Torre Este,
1^a Planta

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8080

E-Mail: scai@uco.es<http://www.uco.es/servicios/scai>

Identificación y clasificación de microorganismos mediante MALDI Biotyper

TÉCNICA

El sistema MALDI Biotyper es una técnica que permite la identificación y clasificación de microorganismos basada en el perfil de espectros de masas MALDI-TOF MS.

El sistema realiza un cálculo de similitud entre la "huella molecular" de un microorganismo desconocido (patrón de masas de las proteínas más abundantes, principalmente ribosomales, presentes en dicho microorganismo) y las "huellas moleculares" de cepas patrón caracterizadas y almacenadas en una base de datos de referencia.

EQUIPAMIENTO

La oferta de esta técnica en el SCAI es posible gracias a la reciente adquisición de un Espectrómetro de masas de altas prestaciones, con analizador por tiempo de vuelo (TOF, Time of Flight) y fuente de ionización MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).

Se trata de un equipo MALDI-TOF/TOF "ULTRAFLEXEXTREME" de BRUKER dotado con hardware y paquetes de software completos, entre ellos el software MALDI Biotyper Compass (MBT Compass) que permite la identificación y clasificación de microorganismos (Ilustración 1).



Ilustración 1.- Equipo MALDI-TOF/TOF "ULTRAFLEXEXTREME" de BRUKER adquirido recientemente por el SCAI.

PROCEDIMIENTO

Las condiciones de cultivo del microorganismo no tienen demasiado efecto en la identificación del mismo, aunque si la idea es comparar distintas cepas, es recomendable que crezcan en condiciones similares. Si es muy importante preparar la muestra cuando el crecimiento está en fase exponencial y no se aconseja almacenar el cultivo refrigerado por la pérdida de calidad de los espectros.

Existen tres métodos de preparación de muestra:

- **Transferencia directa:** consiste en colocar una pequeña extensión de material biológico (procedente de una colonia única) sobre la placa MALDI y, una vez seco, cubrirlo con matriz HCCA. Analizar por MALDI en el momento.
- **Transferencia directa con extracción:** igual que la anterior pero, antes de colocar la matriz, ponemos sobre la muestra ácido fórmico y dejamos secar (extracción parcial). Por último colocamos HCCA y a continuación analizamos por MALDI.
- **Método de extracción:** en este caso, la muestra se somete a un proceso de extracción con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. Este método tiene la ventaja de poder conservar las muestras congeladas en agua:etanol (1:3) durante varias semanas antes de terminar la extracción y la posterior colocación en la placa del MALDI. Es el recomendado para microorganismos con pared celular rígida y siempre que necesitemos espectros de muy alta calidad, por ejemplo para la creación de bases de datos de espectros MALDI.

Unidad de PROTEÓMICA (PRT)

PERSONAL

Laura Taveró Pérez

Raquel M^a González Carmona

Carlos Fuentes Almagro

Consuelo Gómez Díaz

CONTACTO Unidad PRT

Edf. Ramón y Cajal, Planta Baja.

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8984

E-Mail: proteomica@uco.es

proteomica2@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai>

ADMINISTRACIÓN

Edf. Ramón y Cajal, Torre Este,
1ª Planta

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8080

E-Mail: scai@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai>

Identificación y clasificación de microorganismos mediante MALDI Biotyper

Una vez preparadas, las muestras son analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. La alta abundancia de proteínas ribosomales microbianas, da como resultado un espectro de masas con un patrón característico incluso a nivel de especie y puede usarse como "huella molecular" para identificar el microorganismo (Ilustración 2).

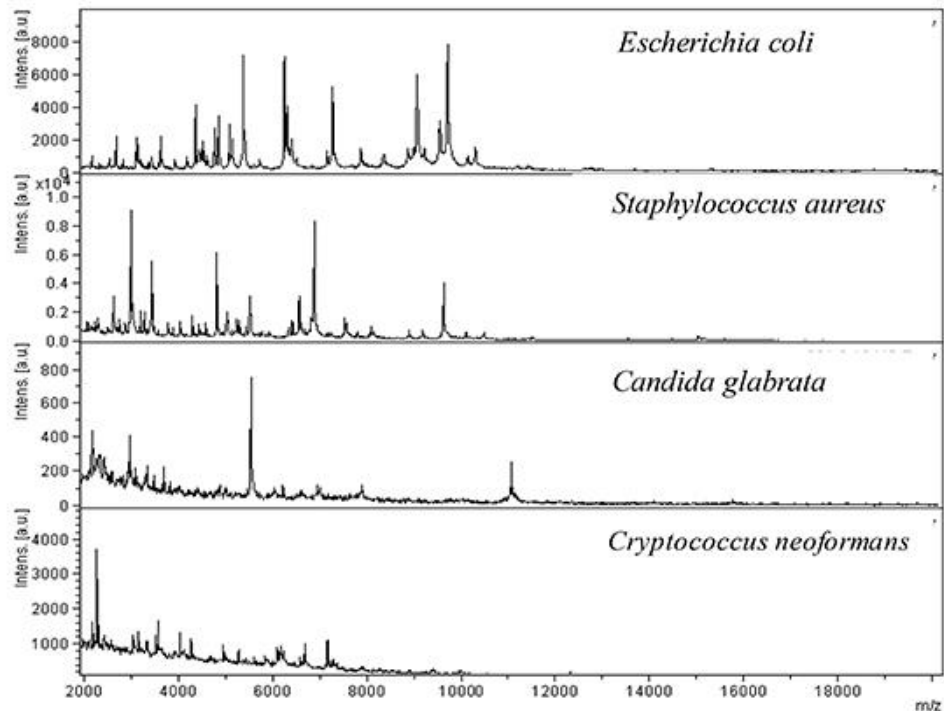


Ilustración 2. "Huella molecular" de diferentes microorganismos.

La adquisición de datos es controlada usando el software *MALDI Biotyper Compass (MBT Compass)*. Dicho software realiza la calibración de los espectros antes de la búsqueda y automatiza las medidas y la obtención de resultados de identificación mediante la comparación de los perfiles de proteínas adquiridos en el espectrómetro de masas con los perfiles contenidos en las bases de datos.

Actualmente se dispone de una base de datos de referencia *MBT Compass Library* con más de 7.000 cepas que incluye bacterias, levaduras, hongos filamentosos y micobacterias.

RESULTADOS

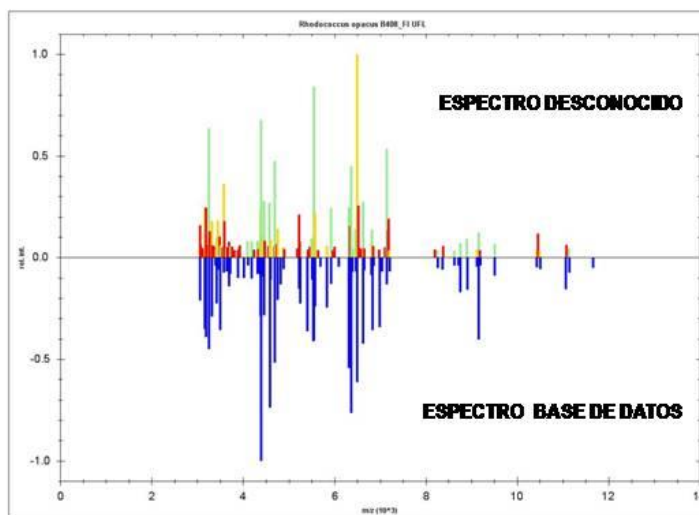
Los resultados de identificación se muestran mediante un código de colores (*rojo=no identificación, amarillo=identificación de género, verde=identificación de género y especie*) y un valor de coincidencia para visualizar si la identificación ha sido satisfactoria, en una escala de "0" a "3" donde "0" indica ninguna coincidencia y "3" una completa coincidencia entre el perfil medido y el correspondiente en la base de datos (Ilustración 3).

El software permite crear bases de datos propias a partir de espectros de MALDI para su posterior utilización y comparación con muestras desconocidas. Asimismo, incluye el módulo *MBT Explorer* que permite hacer estudios de "clustering" mediante análisis de componentes principales y calcular matrices de correlación y dendogramas para agrupar muestras según la similitud de sus espectros (Ilustración 4).

ÁREAS DE APLICACIÓN

Investigación en Microbiología, Biomedicina, Agroalimentación, Industria Farmacéutica, Control de Aguas, etc.

Software MALDI Biotyper/Comparación de espectros



IDENTIFICACIÓN

Mz	Detected Species	Log(S)
	Rhodococcus opacus B409 FI UFL	2.260
	Rhodococcus percolatus DSM 44240T DSM	2.180
	Rhodococcus opacus DSM 43250 DSM	2.150
	Rhodococcus opacus DSM 43252 DSM	2.140
	Rhodococcus opacus DSM 43251 DSM	2.140
	Rhodococcus opacus DSM 43205T DSM	2.130
	Rhodococcus imtechensis DSM 45091T DSM	2.130
	Rhodococcus wratislaviensis DSM 44107T DSM	2.000
	Rhodococcus iostii DSM 44719T DSM	1.840
	Rhodococcus koreensis DSM 44498T DSM	1.700

Ilustración 3. Identificación de microorganismos mediante el software MALDI Biotyper Compass (MBT Compass) de Bruker.

Unidad de PROTEÓMICA (PRT)

PERSONAL

Laura Taveró Pérez

Raquel M^a González Carmona

Carlos Fuentes Almagro

Consuelo Gómez Díaz

CONTACTO Unidad PRT

Edf. Ramón y Cajal, Planta Baja.

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8984

E-Mail: proteomica@uco.es

proteomica2@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai>

ADMINISTRACIÓN

Edf. Ramón y Cajal, Torre Este,
1ª Planta

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8080

E-Mail: scai@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai/>

FINANCIACIÓN

El equipo ha sido financiado por el proyecto UNCO15-CE-2885 concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad a través de las Ayudas a Infraestructuras y Equipamiento Científico-Técnico del Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, y cofinanciado con el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) en su convocatoria 2015 (Plan Estatal de I+D+I 2013-2016).

SCAI

SERVICIO CENTRAL
DE APOYO A
LA INVESTIGACIÓN

Unidad de
PROTEÓMICA (PRT)

PERSONAL

Laura Tavero Pérez

Raquel M^a González Carmona

Carlos Fuentes Almagro

Consuelo Gómez Díaz

CONTACTO Unidad PRT

Edf. Ramón y Cajal, Planta Baja.

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8984

E-Mail: proteomica@uco.es

proteomica2@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai>

ADMINISTRACIÓN

Edf. Ramón y Cajal, Torre Este,
1ª Planta

Campus de Rabanales

14014-Córdoba

Teléfono: 957 21 8080

E-Mail: scai@uco.es

<http://www.uco.es/servicios/scai/>

Identificación y clasificación de microorganismos mediante MALDI Biotyper

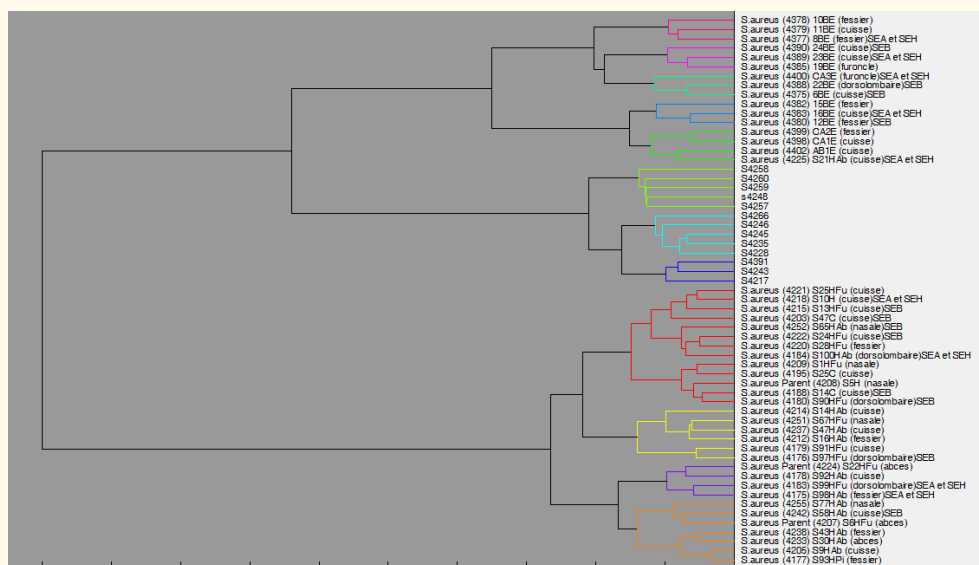


Ilustración 4. Dendrograma filogenético construido con el módulo MBT Explorer incluido en el software MBT Compass de Bruker.

REFERENCIAS

1. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-systems.html>
2. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-for-microbiological-research.html>
3. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-for-industrial-applications/features-benefits.html>
4. <https://www.bruker.com/applications/microbiology/food-beverage.html>
5. <https://www.bruker.com/applications/microbiology/pharmaceutical.html>
6. <https://www.bruker.com/applications/microbiology/water-testing.html>

