



OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF



Universidad de Cádiz

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Pacheco Enríquez, Inés; Peralta Tena, Lucía; Escobar Niño, Almudena; Fernández Acero, Francisco Javier

Laboratorio de Microbiología y Proteómica. Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO). Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Universidad de Cádiz; 11510 Puerto Real, España. ines.pachecoenriquez@alum.uca.es; lu.peralta@alum.uca.es; almudena.escobar@uca.es; franciscojavier.fernandez@gm.uca.es

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son importantes patógenos de plantas y responsables de numerosas enfermedades en los cultivos, como la podredumbre gris de la vid, causada por *Botrytis cinerea*. La identificación rápida y fiable de microorganismos, es importante para la vigilancia, prevención y control de enfermedades, especialmente aquellas causadas por hongos filamentosos. Los métodos establecidos para la identificación de microorganismos en microbiología clásica además de ser laboriosos requieren mucho tiempo [3].

La proteómica brinda un nuevo enfoque en el estudio de las proteínas que ha evolucionado en los últimos años gracias a la incorporación de nuevas tecnologías como métodos de separación de proteínas de alto rendimiento, espectrometría de masas (MS) y herramientas bioinformáticas, que han facilitado el análisis de un gran volumen de datos [4]. La creciente necesidad de minimizar el tiempo de diagnóstico microbiológico junto con la incursión de tecnologías alternativas relacionadas con la microbiología molecular y la proteómica han favorecido el desarrollo de técnicas de diagnóstico eficaces con un bajo coste y con resultados casi inmediatos [2].

Este estudio busca determinar la aplicabilidad de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (de desorción/ionización láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo) [1] para la identificación de microorganismos fúngicos en el ámbito agroalimentario, ofreciendo una identificación a nivel de especie de las diferentes cepas de hongos filamentosos extraídas de muestras agroalimentarias. Evaluando así, la aplicabilidad de este sistema para la identificación de microorganismos de interés para la industria agroalimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento Experimental

Preparación de Muestras

- Recogida de muestras de suelo de origen alimentario



- Disoluciones seriadas y siembra de muestras
- Aislamiento en cultivos "Sabouraud Dextrose Agar"



Las muestras empleadas en esta investigación pertenecen a diferentes tipos de muestras de suelo obtenidas del proyecto "Regenerando vida en suelos de viñedos gaditanos", el cual trabaja en el diseño y la implementación de una transición sostenible a una agricultura basada en la naturaleza, creando así, agroecosistemas que salvaguarden la biodiversidad, y los numerosos servicios que le pueden llegar a brindar a la humanidad.

El objetivo de este estudio se basa en la optimización del procedimiento de análisis en cada una de las estaciones para la identificación de microorganismos de interés para la industria agroalimentaria mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Tratamiento de Muestras

1. Recoger un círculo de 1-2 cm de diámetro con un hisopo humedecido en agua desionizada
2. Suspender el hisopo con la muestra en un tubo Eppendorf de 2ml con 900 µl de etanol al 70%
3. Mezclar bien con el Vortex
4. Centrifugar 2min 10000-14000 g
5. Descartar sobrenadante (etanol) con una pipeta sin disgregar el pellet
6. Adicionar 40 µl de Ácido Fórmico (AF) y 40 µl de Acetonitrilo (ACN) al 70%. Agitar con el Vortex hasta homogeneizar el pellet
4. Volver centrifugar 2min 10000-14000 g

Análisis y Caracterización de muestras utilizando Vitek MS®

- Introducimos cada muestra en un portaobjetos para MALDI (slide)
- Para facilitar el proceso usamos un "lápiz" con puntas de teflón desechables
- Dejar secar por completo y cristalizar la muestra con 1 µl de matriz MS-CHCA para su posterior ionización

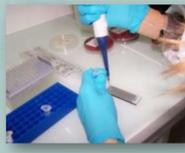
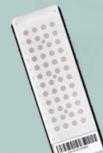


Figura 1: Slide modelo para Vitek MS® de Biomérieux.

Figura 2: Vitek MS® PICK ME de Biomérieux.

Figura 3: Cristalización de la muestra mediante la matriz MS-CHCA de Biomérieux.



Figura 3: Proceso de análisis de muestras mediante MALDI-TOF MS.

IDENTIFICACIONES

IVD (Base de datos cerrada)	
Número de organismo	Confianza
<i>Phizopus oryzae</i> complex	99.9
<i>Penicillium chrysogenum</i>	
<i>Aspergillus niger</i> complex	

RUO (Base de datos abierta)	
Confianza	Mensaje
	No hay picos suficientes
Confianza	Mensaje
	Sin identificación

Identificación

Identificación

SECUENCIACIÓN DE ADN

Variaciones del Protocolo Estándar

Con la finalidad de poner a prueba el equipo, y optimizar el proceso, se decidió realizar ciertas modificaciones sobre el protocolo estándar. Los cambios realizados para estudiar la utilidad del equipo con muestras agroalimentarias fueron:

- Pruebas de Siembra con Asa de Cultivo**
Según el fabricante indica, las muestras para analizar deben ser recogidas con un hisopo, pero se experimentó la recogida de muestras con un asa de cultivo, debido a su sencilla manipulación y mayor disponibilidad en un laboratorio.
- Variaciones en la cantidad de Biomasa**
Para la correcta ionización de la muestra, y el adecuado análisis de ésta, debe recogerse con el hisopo un círculo de 1-2cm. Se evaluó la veracidad de este hecho recolectando círculos de 1cm, 2cm y cantidad excesiva de biomasa.
- Cambio de Medio del Organismo Control**
Según el protocolo, el microorganismo control (*E.coli* ATCC® 8739TM) únicamente puede ser sembrado en Agar Sangre. Se decidió probar a sembrarlo en TSA y llevar a cabo el análisis de identificación de muestras para comprobar si el control puede ser sembrado en otro tipo de medio de cultivo.
- Modificación del Tiempo de Preparación de Muestras**
Se puso a prueba el tiempo que llevaban las muestras preparadas sobre el slide. Según el fabricante no es conveniente que lleven más de 72h preparadas.
- Modificación del Tiempo de Incubación de los Microorganismos**
Tal y como el protocolo indica, los cultivos frescos no deben llevar más de 48 horas preparados. Se comprobó si este hecho era de obligado cumplimiento sometiendo a prueba también el tiempo de incubación de los hongos filamentosos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Se ha corroborado la necesidad del uso del hisopo frente a un porcentaje de identificación obtenido con el asa de cultivo del 33,3%. Por lo que se demuestra que la cantidad de biomasa fúngica recogida con un asa de cultivo no es la óptima para la identificación del microorganismo.
- Se ha evidenciado tal y como el protocolo indicaba, que la cantidad óptima de biomasa fúngica recolectada en la preparación de muestras es de 1-2cm. Obteniendo en la excesiva e insuficiente recogida de muestras menos de un 20% de identificación.
- Se ha verificado que el cambio del medio de siembra del organismo control a TSA no es determinante en el proceso de identificación, ya que se obtuvo un porcentaje del 100% de identificación con un nivel de confianza del 99,9% de confianza, al igual que con Agar Sangre.
- Tras la incubación de las muestras durante más de 96 horas y su posterior comprobación de las condiciones óptimas de los cultivos, los organismos fueron identificados de forma satisfactoria. Por tanto, se puede afirmar que el tiempo de incubación de los hongos no es un factor determinante en el tratamiento de las mismas.
- Se ha demostrado que un cambio en el tiempo de preparación de muestras no afecta al proceso de identificación. Confirmando que hasta las 96h los microorganismos eran identificados correctamente.



Figura 5: Resultados obtenidos tras el análisis por el Software de Vitek MS®.

CONCLUSIONES

Las pruebas de este estudio han logrado un elevado nivel de identificación, consiguiendo un porcentaje total de identificación en IVD del 66,7%, y aumentando éste al 77,8% en RUO. Se ha demostrado así, la gran aplicabilidad del equipo Vitek MS® en la caracterización de hongos filamentosos de ámbito agroalimentario.

Ofreciendo así un sistema de identificación rápida de diferentes tipos de microorganismos con un alto nivel de confianza y que ofrece, además, la oportunidad de crear una base de datos más amplia en la que puedan integrarse una gran variedad de organismos que sean de interés para diferentes ámbitos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto "Regenerando Vida en Suelos de Viñedos Gaditanos" (REF. GO2020-09), por el Proyecto de Investigación "UCApeptide" (REF. PR2022-048) del Plan propio de estímulo y apoyo a la Investigación y Transferencia y por el proyecto "Equipo avanzado para la caracterización agroalimentaria y microbiológica" (REF. EQC2019-005670-P).



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F. González-Buitrago, J.M. y Muñoz-Bellido, J.L. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.) 35, n.º 5 (1 de mayo de 2017): 303-13.
- [2] Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M. y Malorny, B. Applied and Environmental Microbiology 74, n.º 24 (diciembre de 2008): 7767-78.
- [3] Cantón, R., y Gómez G. y de la Pedrosa, E. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.) 35, n.º 10 (1 de diciembre de 2017): 659-66.
- [4] Quero, S., Párraga-Niño, N., García-Núñez, M. y Sabriá, M. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 34, n.º 4 (1 de abril de 2016): 253-60.