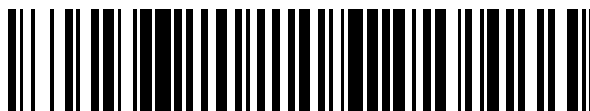


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 285**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2018** **E 18167884 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3404417**

54 Título: **Preparación de células biológicas sobre soportes de muestras para espectrometría de masas para una ionización por desorción**

30 Prioridad:

15.05.2017 DE 102017110476

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.01.2021

73 Titular/es:

**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)
Fahrenheitstrasse 4
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

**SPARBIER, KATRIN y
WEGEMANN, BEATRIX**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 802 285 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de células biológicas sobre soportes de muestras para espectrometría de masas para una ionización por desorción

La invención se refiere a la preparación de proteínas a partir de células biológicas sobre soportes de muestras para espectrometría de masas para el análisis mediante espectrometría de masas con respecto a propiedades celulares tales como la clasificación taxonómica (identidad), la resistencia a antibióticos, el comportamiento frente a medicamentos u otras sustancias activas, y otras. Las células pueden ser microorganismos procariotas o eucariotas o células eucariotas procedentes de tejidos; en particular, se pueden haber cultivado sobre placas de soporte de muestras en medios de cultivo para poder determinar ciertas propiedades celulares a partir del crecimiento bajo ciertas influencias, por ejemplo, en presencia de ciertas sustancias.

En la invención se propone descomponer las células sobre los soportes de muestras para espectrometría de masas, no al añadir una solución matriz para una ionización posterior por medio de una desorción con láser asistida por matriz (MALDI), sino en una etapa de tratamiento distinta mediante el uso de ácidos y/o disolventes (orgánicos). Las proteínas pesadas liberadas de las células se adhieren sorprendentemente al soporte de muestras, de modo que se pueden lavar ahí directamente con solución tampón para eliminar sales y otros contaminantes solubles sin perder esencialmente con el lavado las proteínas para el análisis.

Estado de la técnica

En el documento de solicitud de patente PCT/DE2016/100561 (K. Becker y E. Idelevich: "Aufbereitung lebendiger, mikrobieller Proben und Mikroorganismen für anschließende massenspektrometrische Messung und Auswertung") se describe en detalle cómo se pueden incubar microbios sobre placas de soporte de muestras para espectrometría de masas en soluciones nutritivas, por ejemplo, con y sin la adición de antibióticos, para determinar si existe una resistencia o no mediante la observación de un crecimiento continuado.

El procedimiento descrito en el documento presenta un método novedoso para un análisis muy rápido y simple basado en la MS, de propiedades especiales de las células biológicas; por ejemplo, con respecto a la respuesta de las células frente a antibióticos o medicamentos, o con respecto a una caracterización adicional de las células biológicas. La descripción se refiere en particular al procedimiento de procesamiento y preparación de muestras, así como a algoritmos para la evaluación de datos.

Un aspecto preferido del documento citado se refiere a un procedimiento para procesar muestras microbianas vivas para una medición posterior mediante espectrometría de masas, que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un soporte plano para muestras que comprende varias posiciones para aplicar las muestras (los llamados "spots" o puntos); (b) aplicar al menos una muestra microbiana viva en una gota de medio nutriente sobre al menos uno de los puntos de muestra; (c) colocar el soporte de muestras en una cámara de incubación con una atmósfera definida durante un período de tiempo predeterminado para permitir que los microorganismos crezcan y se multipliquen; (d) eliminar el líquido residual de la gota de medio nutriente después del período de tiempo predeterminado para mostrar un depósito de microorganismos en el punto de muestra; (e) preparar el punto de muestra para una ionización por desorción; (f) transferir el soporte de muestras a una fuente de iones de desorción de un espectrómetro de masas, generar iones desde el punto de muestra preparado y registrar al menos un espectro de masas asociado; y (g) comparar el espectro de masas registrado con un conjunto de datos de referencia para determinar al menos una propiedad de la muestra microbiana.

Ese procedimiento se puede emplear, por ejemplo, para determinar el crecimiento de las células microbianas en presencia de diversos antibióticos: un crecimiento continuado muestra que las células microbianas son resistentes o susceptibles frente al antibiótico utilizado.

El procedimiento muestra a veces dificultades. Por ejemplo, la separación de los microbios del líquido residual utilizando los procedimientos mencionados, como la aspiración a través de una pipeta o un papel secante, puede no tener éxito si los microbios flotan en la superficie del líquido, como es el caso por ejemplo en la Salmonella y otros flagelados, porque entonces hay un alto riesgo de succionar también los microbios. Sin embargo, un secado de la solución nutritiva con el fin de unir las células a la superficie del soporte de muestras y prepararlas a continuación, deja aparte las sales y otros componentes de la solución nutritiva que tienen una influencia perjudicial sobre la ionización mediante desorción con láser asistida por matriz y reducen significativamente la sensibilidad hacia muchas proteínas. Las muestras de microbios secas frecuentemente tampoco se pueden lavar, ya que los microbios de muchos tipos no se adhieren con suficiente firmeza a la superficie del soporte de muestras después de secar la solución nutritiva.

En general, las células biológicas se tienen que descomponer para medir sus componentes, especialmente sus proteínas, para liberar las proteínas para su posterior ionización. En este contexto, "descomponer" significa destruir las paredes celulares y la ruptura de los complejos de proteínas dentro de la célula para que las proteínas puedan salir de la célula.

Para esta descomposición se recomiendan dos procedimientos: (1) una descomposición "externa" mediante

centrifugación de los microbios lavados usando ácidos en un recipiente especial, centrifugando adicionalmente y transfiriendo el material sobrenadante con las proteínas de las células al soporte de muestras para espectrometría de masas, y (2) descomponer las células colocadas sobre el soporte de muestras mediante la adición de una solución de sustancia matriz, es decir, un ácido orgánico en un disolvente orgánico, que permite la descomposición de la mayoría de los microbios. La solución matriz prepara simultáneamente la muestra para la ionización posterior mediante una desorción con láser asistida por matriz (MALDI). En los procedimientos para la identificación de microbios, la descomposición externa proporciona un mayor porcentaje de identificaciones inequívocas, pero lleva mucho más tiempo debido a la centrifugación múltiple y aumenta la carga de trabajo.

En el artículo científico "Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry" (N. Matsuda et al., J. Clin. Microbiology, 50, 3862-3866, 2012), además de los dos procedimientos mencionados, se investiga una descomposición de los microbios sobre la placa de soporte de muestras con ácido fórmico al 70%, con resultados igual de favorables que los de una descomposición externa, pero requiriendo mucho menos tiempo y esfuerzo.

En la publicación "Evaluation of a Short, On-Plate Formic Acid Extraction Method for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Identification of Clinically Relevant Yeast Isolates" (R. L. Gorton et al., J. Clin. Microbiology 52, 1253-1255, 2014), también se investiga una descomposición de las células sobre la placa de soporte de muestras, sin embargo, se trata en ese caso de células de levadura y el éxito de la identificación es considerablemente menor que con la descomposición externa.

En estas dos publicaciones, el secado se lleva a cabo sobre la placa de soporte directamente, después de la descomposición y se prepara para la ionización mediante MALDI utilizando una solución matriz. En particular, las sales u otros contaminantes solubles no se eliminan: las células biológicas aplicadas estaban obviamente lo suficientemente purificadas para la preparación de MALDI.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad de un procedimiento que permita que las células contaminadas con sales y otros contaminantes solubles se preparen sobre un soporte de muestras para espectrometría de masas, por ejemplo, después de una incubación en una gota de nutriente directamente sobre el soporte de muestras, de tal manera que la sensibilidad de la ionización por desorción (por ejemplo, mediante MALDI) se conserve casi sin restricciones.

Breve descripción de la invención

En la invención se propone ahora que las células biológicas sobre el punto de muestra de un soporte para muestras de espectrometría de masas no se descompongan mediante la adición de una solución matriz, sino en una etapa de tratamiento distinta usando ácidos y/o disolventes (orgánicos) sin matriz. Las proteínas celulares liberadas por medio de esta descomposición se adhieren sorprendentemente bien a la superficie del soporte de muestras y se pueden lavar con tampón de lavado, por ejemplo, agua pura, para eliminar sales, detergentes, materiales tamponadores y otros contaminantes solubles que pueden proceder de las etapas de tratamiento anteriores.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de proteínas a partir de muestras de células biológicas no purificadas (por ejemplo, microorganismos) sobre un soporte de muestras para una determinación mediante espectrometría de masas de las propiedades celulares, por ejemplo, la clasificación taxonómica o el comportamiento de resistencia de los microorganismos frente a una sustancia antimicrobiana, que comprende las etapas:

- proporcionar las células biológicas sobre un punto de muestra del soporte de muestras que tiene una superficie hidrófila, por ejemplo, una placa de acero inoxidable o una placa recubierta con material cerámico, o una placa con anclajes hidrófilos en un entorno hidrófobo ("AnchorChip™"),
- descomponer las células usando disolventes volátiles desnaturalizantes y/o ácidos (orgánicos) sobre el punto de muestra, de modo que las proteínas celulares se desprendan de los complejos, salgan de las células descompuestas y se unan por adherencia al punto de muestra,
- lavar las proteínas celulares sobre el punto de muestra con solución tampón (en reposo), por ejemplo, aplicando unos pocos microlitros de una solución acuosa (en particular agua desionizada pura) sobre el punto de muestra, dejándola allí durante un período de tiempo predeterminado y luego retirándola, en donde las sales y otros componentes solubles se disuelven y se eliminan con la solución tampón, y
- preparar las proteínas celulares lavadas para una posterior ionización por desorción, por ejemplo, mediante la adición de una solución matriz y cristalización en la misma sobre el punto de muestra para una posterior ionización por desorción con láser asistida por matriz.

En diversas realizaciones, proporcionar las células biológicas puede comprender cultivar los microorganismos en líquido nutriente sobre el punto de muestra del soporte de muestras para espectrometría de masas. Alternativamente, los microorganismos también se pueden cultivar en un recipiente para cultivo externo con una

transferencia posterior de los microorganismos cultivados (sin purificar) sobre el punto de muestra del soporte de muestras.

Si las células biológicas presentan microorganismos, estos se pueden cultivar sobre diferentes puntos de muestra del soporte de muestras en líquido nutriente, con y sin la adición de una sustancia antimicrobiana, y se puede determinar el comportamiento de resistencia frente a la sustancia antimicrobiana a través de un crecimiento continuado en presencia de esa sustancia.

En diversas realizaciones, el crecimiento en presencia de la sustancia antimicrobiana se puede determinar mediante una comparación con una sustancia de referencia añadida de forma dosificada; véanse en particular los documentos EP 2 806 275 B1 y WO 2014/187517 A1.

Las propiedades celulares, en particular de los microorganismos, se determinan preferiblemente basándose en señales proteicas por espectrometría de masas en el intervalo de masa superior a m/z 3000, en particular entre aproximadamente m/z 3000 y m/z 15.000.

Una variante preferida de un procedimiento para la determinación de resistencias frente a antibióticos/agentes antifúngicos de acuerdo con los principios de la invención, puede incluir, por ejemplo, las siguientes etapas:

- (1) colocar las células en medios de cultivo con y sin antibióticos/agentes antifúngicos sobre diferentes puntos de muestra en el soporte de muestras,
- (2) incubar durante un periodo de tiempo dependiente de la especie y los antibióticos en una cámara que crea condiciones constantes (especialmente de humedad y temperatura),
- (3) permitir que se sequen las muestras sobre los puntos de muestra a temperatura elevada,
- (4) añadir 1 microlitro de ácido fórmico al 70% en agua para descomponer las células y permitir que las proteínas difundan al exterior,
- (5) permitir que las células descompuestas se sequen sobre los puntos de muestra a temperatura elevada,
- (6) añadir 3 microlitros de H_2O sobre los puntos de muestra, dejar actuar durante poco tiempo (~3 minutos) y aspirar (ya sea con una pipeta o un dispositivo especial para eliminar líquidos de los puntos de muestra),
- (7) permitir que la humedad residual se seque sobre los puntos de muestra,
- (8) pipetear la solución matriz (si es necesario con un patrón interno) sobre los puntos de muestra y dejarla secar,
- (9) medir los perfiles proteicos con un espectrómetro de masas, por ejemplo, un espectrómetro de masas MALDI con tiempo de vuelo.

En la etapa (3), la temperatura puede estar, por ejemplo, entre 30° y 60° Celsius, o incluso mayor en casos límite. En la etapa (4), también se pueden usar otros disolventes volátiles desnaturizantes, por ejemplo, 50% de acetona en agua o 50% de acetonitrilo, 2,5% de ácido trifluoroacético y 47,5% de agua en agua.

El procedimiento propuesto en esta memoria con un método de lavado directamente sobre el soporte de muestras tarda unos minutos más que uno sin, pero muestra claras ventajas: las proteínas pesadas liberadas desde la célula permanecen, de forma sorprendente, relativamente sujetas sobre la superficie del soporte de muestras durante la etapa de lavado, lo que las hace, en gran medida, insolubles; solo las sales y otros componentes solubles, por ejemplo, procedentes del medio de cultivo, se solubilizan y se eliminan con el tampón de lavado. Esto funciona de manera sorprendente tanto sobre placas de soporte de muestras de acero inoxidable pulido, como sobre las conocidas dianas de anclaje ("Anchor-Chip™") y sobre las "dianas biológicas" nuevas en el mercado a base de material cerámico. Por el contrario, si se sigue el procedimiento presentado como preferido en el documento de solicitud de patente PCT/DE2016/100561, de aspirar el material sobrenadante del cultivo de un punto de muestra, en lugar de permitir que se seque, existe el riesgo de que se pierdan especies microbianas que tienen poca o ninguna adhesión a la superficie del soporte de muestras. A modo de ejemplo, se pueden mencionar en este caso algunas especies de Salmonella que flotan como flagelados en la superficie del líquido y, por lo tanto, se pueden aspirar fácilmente.

Unas mediciones comparativas muestran que los espectros obtenidos mediante el lavado sobre el soporte de muestras tienen una calidad significativamente mejor en comparación con espectros de las muestras sin lavar, ya que la proporción de sales que interfieren en la ionización (en particular en el método MALDI) se reduce en gran medida a través de la etapa de lavado.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere en particular a un procedimiento para la preparación de proteínas a partir de muestras de células biológicas (por ejemplo, microorganismos) para una determinación mediante espectrometría de masas de las propiedades celulares, por ejemplo, la clasificación taxonómica o el

comportamiento de resistencia de los microorganismos frente a una sustancia antimicrobiana, que comprende las etapas:

- 5
 - cultivar las células biológicas en un líquido nutritivo directamente sobre un punto de muestra de un soporte de muestras para espectrometría de masas que tiene una superficie hidrófila. p. ej., una placa de acero inoxidable o una placa recubierta con material cerámico, o una placa con anclajes hidrófilos en un entorno hidrófobo ("AnchorChip™"),
 - descomponer las células cultivadas sobre el punto de muestra usando disolventes volátiles desnaturalizantes y/o ácidos (orgánicos) de modo que las proteínas celulares se liberan de los complejos, salen de las células descompuestas y se unen por adherencia al punto de muestra,
- 10
 - lavar las proteínas celulares sobre el punto de muestra con una solución tampón (en reposo), por ejemplo, aplicando unos pocos microlitros de una solución acuosa (en particular agua desionizada pura) sobre el punto de muestra, dejándola allí durante un período de tiempo predeterminado y luego retirándola, en donde las sales y otros componentes solubles se disuelven y se eliminan con la solución tampón, y
- 15
 - preparar las proteínas celulares lavadas sobre el punto de muestra para una posterior ionización por desorción, por ejemplo, mediante la adición de una solución matriz y cristalización en la misma sobre el punto de muestra para una posterior ionización mediante desorción con láser asistida por matriz.

En particular, el agua desionizada, pura o ligeramente acidificada, ha mostrado ser adecuada como tampón de lavado para los procedimientos descritos en esta descripción.

Breve descripción de las Figuras

- 20 La Figura 1 muestra las etapas de un procedimiento que sirve para determinar la resistencia de los microorganismos.

La Figura 2 ilustra los espectros de masas de una cepa bacteriana sensible a los antibióticos (*E. coli*) y una cepa bacteriana resistente a los antibióticos (*Klebsiella pneumoniae*) después de un cultivo en ausencia y presencia de un antibiótico, que se adquirieron después de llevar a cabo un procedimiento descrito en la Figura 1. El espectro B muestra solo la señal de una sustancia de referencia.

La Figura 3 muestra un procedimiento simple para una identificación taxonómica de microorganismos contaminados utilizando una etapa de lavado de acuerdo con los principios de la invención.

La Figura 4 muestra un espectro de masas del líquido nutritivo puro, que se había tratado y lavado de acuerdo con el método de la invención empleando el lavado de las proteínas celulares unidas por adherencia de acuerdo con la Figura 1. Aunque el líquido nutritivo contiene péptidos, el espectro de masas está limpio y contiene más de 4000 unidades de masa atómica (Dalton), solo las señales de los iones de carga simple (1+), de carga doble (2+) y de carga triple (3+) de la sustancia de referencia añadida de forma dosificada.

Descripción detallada

Las células procedentes de un material biológico, tales como microorganismos o células de un tejido, que se colocan sobre las placas de soporte de muestras, generalmente se descomponen al añadir una solución con sustancia matriz para una posterior ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI) en un disolvente orgánico. Las sustancias matriz son esencialmente ácidos orgánicos que, junto con el disolvente orgánico, destruyen las paredes celulares, disuelven los complejos de proteínas, por ejemplo, los ribosomas, dentro de las células y permiten que las proteínas migren fuera de la célula. Las proteínas ribosómicas son particularmente adecuadas para la identificación taxonómica de microorganismos. Cuando las muestras se secan, el material de la matriz cristaliza y las proteínas se incorporan en los cristales. A continuación se pueden vaporizar en un espectrómetro de masas mediante bombardeo con láser e ionizarse por protonación. En caso de que todavía haya líquido nutritivo o partes del líquido de la descomposición que se adhiera a las células, el proceso de protonación se altera gravemente por las sales, otros materiales tamponadores, detergentes y otros contaminantes solubles de esos líquidos. Las propias células también pueden contener sales liberadas durante la descomposición, que a su vez pueden interferir con el proceso de ionización.

Dado que las sales y otros contaminantes en las muestras sobre las placas de soporte de muestras, interfieren fuertemente, en particular en una posterior ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI), en la invención se propone que las células que se encuentran sobre el soporte de muestras para espectrometría de masas, no se descompongan simplemente añadiendo una solución matriz, sino que la descomposición de las células se lleve a cabo primero en una etapa de tratamiento distinta, usando ácidos y/o disolventes (orgánicos) sin sustancias matriz. Aunque las proteínas por sí mismas muestran solo una ligera adhesión a las superficies metálicas, las proteínas liberadas a través de esta descomposición se adhieren sorprendentemente bien a la superficie de los soportes de muestras habituales y se pueden lavar cuidadosamente con una solución tampón (por ejemplo, una solución acuosa) especialmente para eliminar las sales. Esto funciona de manera sorprendente tanto

en placas de soporte de muestras a base de acero inoxidable pulido, como en las conocidas placas de anclaje, disponibles comercialmente ("AnchorChip™"), que contienen puntos de muestra hidrófilos ("spots") en un entorno hidrófobo, y en las "dianas biológicas" que ahora se encuentran en el mercado, a base de material cerámico recubierto. Aparentemente, las proteínas de las células se desnaturalizan con los líquidos de la descomposición hasta tal punto, que muestran suficientes sitios de adhesión reactivos, con los cuales se adhieren.

Ya se conoce el lavado de los péptidos de una digestión unidos por adherencia a superficies, pero principalmente sobre superficies preparadas de manera muy especial. En el trabajo "Paraffin-waxcoated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support for high-throughput identification of proteins by peptide mass fingerprinting" (N. S. Tannu et al., *Analytical Biochemistry* 327 (2004) 222-232), se compara el lavado de péptidos obtenidos mediante una digestión trípica de proteínas en puntas de pipeta ZipTip_{C18}, con el lavado sobre diferentes superficies de soporte de muestras, en donde el lavado sobre placas de anclaje ya se muestra como practicable, pero las placas con recubrimientos de cera de parafina brindan resultados aún mejores. Cabe señalar que en ese caso, los analitos de interés en el trabajo de N. S. Tannu et al., son péptidos digeridos con tripsina y por lo tanto extremadamente desnaturalizados, esencialmente en el intervalo de masa por debajo de m/z 3000 Dalton, mientras que la presente invención se dirige como analitos de interés, a proteínas celulares no digeridas, en el intervalo de masa de aproximadamente 3000 a 20.000 Dalton, procedentes de células biológicas descompuestas, cuyo comportamiento adhesivo no se puede comparar con el de los productos de la digestión. De acuerdo con la opinión predominante hasta ahora, las proteínas sanas y sin desnaturalizar muestran solo una ligera adhesión a superficies extrañas; la idea de que las proteínas pesadas procedentes de una descomposición celular se adhieran hasta con una firmeza relativa a las placas soporte de muestras, era por ello completamente inesperada.

En el trabajo "Non-specific, on-probe cleanup methods for MALDI-MS samples" (Y. Xu et al., *Mass-Spectrometric Reviews*, 2003, 22, 429-440), las placas de soporte de muestras se proporcionan con películas a base de polímeros comerciales, capas delgadas de material matriz, capas monomoleculares autoensambladas y capas de polímero ultrafinas y se examinan para determinar su idoneidad para lavar proteínas adsorbidas sobre las mismas. En algunas de las superficies, se detectó la formación de puentes de hidrógeno de las proteínas, lo que permitía el lavado. No se examinaron placas de soporte de muestras sin recubrimiento.

Además, el trabajo "Compressed matrix thin film (CMTF)-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis" (L. Huang et al., *Analytica Chimica Acta* 786 (2013) 85-94), describe el lavado de proteínas que se unen por adherencia sobre una película delgada de sustancia matriz comprimida para ese fin. Curiosamente, las pruebas realizadas por el solicitante con un lavado sobre capas delgadas de matriz han mostrado que una adición adicional posterior de solución matriz era absolutamente necesaria para obtener espectros de masas significativos, aunque los espectros de masas solo mostraban una calidad escasa.

También en el documento de la descripción WO 2004/072616 (PCT/US2004/003890; J. W. Finch y J. C. Gebler; "A SAMPLE PREPARATION PLATE FOR MASS SPECTROMETRY") se menciona un lavado de proteínas inmovilizadas, pero sobre una placa con una preparación especial a base de huecos para recibir las muestras, que no es adecuada para usar como soporte de muestras en espectrometría de masas, y no sobre un soporte de muestras para espectrometría de masas, tal y como se usa para insertar muestras especialmente preparadas para una ionización por desorción en una fuente de iones.

Una primera realización particularmente preferida de un procedimiento de acuerdo con los principios de la invención, que sirve para determinar la resistencia de microorganismos, puede comprender, por ejemplo, las etapas mostradas en la Figura 1:

(1) las células se aplican sobre diferentes puntos de muestra de una placa de soporte de muestras junto con medios de cultivo (solución nutritiva) con y sin diferentes antibióticos/agentes antifúngicos en una o también diferentes concentraciones,

(2) a continuación, sigue una incubación durante un tiempo predeterminado en una cámara, que crea condiciones constantes, particularmente con respecto a la humedad y la temperatura, para ello, el tiempo puede depender de las especies y de los antibióticos,

(3) las muestras se secan sobre los puntos de muestra a temperaturas entre 30° y 60° Celsius,

(4) se añade 1 microlitro de una solución de ácido fórmico al 70% en agua para descomponer las células y desnaturalizar las proteínas celulares,

(5) se permite que los puntos de muestra se sequen a temperatura elevada,

(6) se añaden 3 microlitros de agua sobre los puntos de muestra, se deja actuar durante un corto periodo de tiempo (aproximadamente 3 minutos) y se aspira, ya sea con una pipeta o un dispositivo especial para eliminar líquidos de los puntos de muestra,

(7) se permite que se seque la humedad residual sobre los puntos de muestra,

(8) se pipetea la solución matriz (si es necesario con un patrón interno) sobre los puntos de muestra y se deja secar,

(9) se miden los perfiles de proteínas con un espectrómetro de masas, en particular un espectrómetro de masas MALDI con tiempo de vuelo,

- 5 (10) en caso de crecimiento a pesar de cierta concentración de un antibiótico, existe una resistencia frente a ese antibiótico con esa concentración; un crecimiento en soluciones nutritivas empleando diferentes concentraciones del antibiótico permite determinar la concentración mínima inhibidora.

10 En ese ejemplo, el procedimiento de lavado empleando agua pura desionizada consiste en disolver los componentes hidrosolubles en agua en reposo y eliminar esos componentes que son perjudiciales para el proceso de ionización, al eliminar el agua. El procedimiento de lavado se puede repetir si es necesario. Se debe evitar un lavado intenso con agua en movimiento, ya que puede provocar pérdidas en caso de algunas proteínas celulares.

15 La Figura 2 muestra espectros de masas de una cepa bacteriana sensible a los antibióticos (*E. coli*) y una cepa bacteriana resistente a los antibióticos (*Klebsiella pneumoniae*), en donde cada una se cultivó una vez añadiendo antibiótico y una vez sin añadirlos, y se procesaron de acuerdo con un procedimiento de la Figura 1. Los gráficos individuales indican de arriba a abajo:

A: Cepa de *E. coli* sensible en medio Mueller-Hinton (un medio nutriente) sin antibiótico;

B: Cepa de *E. coli* sensible en medio Mueller-Hinton con antibiótico (aquí solo aparecen señales de masas de la sustancia de referencia añadida de forma dosificada);

C: Cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a meropenem en medio Mueller-Hinton sin antibiótico; y

20 D: Cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a meropenem en medio Mueller-Hinton con antibiótico.

A partir de las diferentes señales de masas proteicas en el intervalo de masa por encima de m/z 3000 en todos los espectros en los que se detecta crecimiento, es evidente que la etapa de lavado directamente sobre el soporte de muestra después de la descomposición no agota significativamente la cantidad de proteínas descompuestas de las bacterias desde el soporte de muestras. Por lo tanto, el procedimiento es muy adecuado para la preparación de muestras de células biológicas directamente sobre el soporte de muestras para una posterior ionización por desorción y análisis mediante espectrometría de masas, por ejemplo, para determinar la resistencia como una propiedad de la célula.

25 Del mismo modo, células eucariotas degeneradas, como por ejemplo las células cancerosas, también se pueden analizar para determinar la resistencia frente a medicamentos. Los hongos unicelulares, también eucariotas, se pueden identificar como otros microorganismos al menos hasta el nivel taxonómico de especie y someter a ensayo su resistencia a los antibióticos (en este caso: agentes antifúngicos). Sin embargo, también se pueden examinar los hongos formadores de micelio mediante espectrometría de masas. En el documento de patente US 8.980.577 B2 (T. Mayer, 2012) se indica un procedimiento para la clasificación taxonómica de hongos formadores de micelio, que consiste en cultivar hifas frescas bajo un movimiento fuerte. Cada vez que se adhieren a las superficies esto conduce a una remodelación metabólica, que cambia los espectros de masas. De esta manera, se pueden lograr identificaciones inequívocas en comparación con los espectros de referencia. El procesamiento de esos hongos formadores de micelio a partir del cultivo líquido está asociado con varias etapas del proceso que requieren mucho tiempo, como, por ejemplo, centrifugaciones. Según el procedimiento descrito en esta memoria, los hongos se pueden aplicar directamente desde el cultivo líquido sobre los puntos de muestra de la placa de soporte de muestras y preparar para la identificación mediante espectrometría de masas. Por otro lado, para examinar la resistencia frente a agentes antifúngicos, las células fúngicas pueden crecer sobre los puntos de muestra de las placas de soporte de muestras en medios de cultivo con y sin agentes antifúngicos. Una remodelación metabólica no tiene ningún papel decisivo en la determinación del crecimiento en presencia de agentes antifúngicos.

30 La solución nutritiva para el cultivo de las células biológicas sobre el soporte de muestras generalmente consiste en extracto de carne y caseína hidrolizada, por lo que contiene proteínas y péptidos. La solución nutritiva que no se elimina, sino que solo se seca y se lava, podría generar de este modo señales alteradas de la masa de las proteínas y péptidos en el espectro de masas de las células. Sin embargo, sorprendentemente este no es el caso, tal y como se muestra en el espectro de masas de la Figura 4. Excepto para las señales de masa (1+), (2+) y (3+) de la sustancia de referencia, no hay señales alteradas de la masa en el intervalo de masas entre 4.000 y 18.000 Dalton. Esto significa que los péptidos procedentes de la solución nutritiva son tan pequeños que no interfieren, o que siguen siendo solubles y se eliminan con la etapa de lavado.

35 El procedimiento propuesto en esta memoria, con un método de lavado directamente sobre el soporte de muestras, aunque dura unos minutos más que uno sin él, muestra claras ventajas: las proteínas liberadas desde la célula se adhieren de forma sorprendente con relativa firmeza a la superficie hidrófila del soporte de muestras durante la etapa de lavado, lo que las hace en gran medida insolubles; solo las sales y otros componentes solubles, por ejemplo, procedentes del medio de cultivo, se solubilizan y se eliminan con el tampón de lavado. Esto funciona de

manera sorprendente tanto sobre placas de soporte de muestras a base de acero inoxidable pulido, como sobre las dianas de anclaje conocidas ("Anchor-Chip") y sobre las "dianas biológicas" nuevas que se encuentran en el mercado a base de material cerámico. Por el contrario, si se sigue el método presentado en el documento de solicitud de patente PCT/DE2016/100561 como preferido, de aspirar el material sobrenadante del cultivo de un punto de muestra, existe el riesgo de que se pierdan especies microbianas que tienen poca o ninguna adhesión a la superficie del soporte de muestras. A modo de ejemplo, se pueden mencionar en esta memoria algunos tipos de Salmonella que flotan como flagelados en la superficie del líquido y, por lo tanto, se pueden aspirar fácilmente.

Unas mediciones comparativas muestran que los espectros obtenidos a partir del procedimiento que comprende una etapa de lavado directamente sobre la superficie del soporte de muestras, tienen una calidad significativamente mejor (relación señal/ruido de fondo mejorada) en comparación con los espectros de muestras sin lavar, debido a la proporción de sales que alteran la ionización (en particular con el procedimiento MALDI), que se reduce significativamente por la etapa de lavado.

La realización especial del procedimiento descrita anteriormente se puede modificar de muchas maneras. Por ejemplo, en la etapa (4) se pueden usar otros disolventes volátiles desnaturalizantes para la descomposición celular, por ejemplo, acetona al 50% en agua o ácido fórmico al 70% en agua. Se pueden utilizar placas de soporte de muestras, cuyos puntos de muestra se rellenan previamente con sustancias activas, por ejemplo, aplicando diferentes tipos de antibióticos/agentes antifúngicos o el mismo antibiótico/agente antifúngico en cantidades graduadas (por ejemplo, para determinar la concentración mínima inhibidora). Los puntos de muestra también pueden contener cantidades de sustancias de referencia insolubles de forma dosificada para evaluaciones cuantitativas. Las sustancias de referencia deberían poder disolverse en la solución matriz, pero no en la solución tampón de la etapa de lavado.

Otra realización del procedimiento según los principios de la invención se reproduce en la Figura 3 y se refiere a microorganismos y otras células que no se cultivan sobre la placa de soporte de muestras, sino que simplemente se han aplicado sobre el soporte de muestras para una identificación por espectrometría de masas (clasificación taxonómica), pero que contienen en la muestra contaminantes tales como sales, detergentes y otros. Los contaminantes se pueden adherir, por ejemplo, a los microorganismos de una colonia sobre agar. En la transferencia automática de los microorganismos desde las colonias sobre las placas de agar, a menudo se transfieren pequeñas cantidades de agar, incluyendo líquido nutriente. También se pueden encontrar sales nocivas dentro de algunos tipos de microorganismos. Como en el procedimiento indicado anteriormente, esas muestras también se pueden descomponer en una etapa de tratamiento distinta sin material matriz. Sus proteínas desnaturalizadas también se pueden someter directamente a una etapa de lavado sobre el soporte de la muestra.

La ionización por desorción puede ser, en particular, una ionización por medio de una desorción con láser asistida por matriz, en donde la preparación para la ionización comprende entonces añadir y cristalizar la solución matriz. La placa de soporte de muestras puede ser de acero inoxidable, una placa con anclajes hidrófilos en un entorno hidrófobo ("AnchorChip™") o una placa recubierta con material cerámico.

Las células pueden ser microorganismos. La propiedad de los microorganismos que se va a determinar puede ser su resistencia o susceptibilidad frente a antibióticos/agentes antifúngicos. Los microorganismos se pueden cultivar sobre diferentes puntos de la placa de muestras en líquido nutriente con y sin la adición de antibióticos/agentes antifúngicos, y la resistencia frente a un antibiótico/agente antifúngico se puede determinar mediante un crecimiento continuado en presencia de ese antibiótico/agente antifúngico. El crecimiento en presencia de un antibiótico/agente antifúngico se puede determinar en particular mediante una comparación con una sustancia de referencia añadida de forma dosificada.

En general, sin embargo, las células biológicas también se pueden examinar por su comportamiento frente a productos químicos durante el cultivo sobre el soporte de muestras en presencia de esos productos químicos. La respuesta de células cancerosas a diversas sustancias activas medicinales o combinaciones de sustancias activas se puede mencionar en este caso como ejemplo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de proteínas a partir de muestras de células biológicas no purificadas sobre un soporte de muestras para una determinación mediante espectrometría de masas de las propiedades celulares, que comprende las etapas:

- 5 - proporcionar las células biológicas sobre un punto de muestra del soporte de muestras que tiene una superficie hidrófila o una placa con anclajes hidrófilos en un entorno hidrófobo,
- descomponer las células usando disolventes volátiles desnaturalizantes y/o ácidos sobre el punto de muestra, de modo que las proteínas celulares se liberan de los complejos, salen de las células descompuestas y se unen por adherencia sobre el punto de muestra,
- 10 - lavar las proteínas celulares sobre el punto de muestra con solución tampón, en donde las sales y otros componentes solubles se disuelven y se eliminan con la solución tampón, y
- preparar las proteínas celulares lavadas para una posterior ionización por desorción.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de lavado se lleva a cabo con una solución tampón en reposo.

- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque para la etapa de lavado, se aplican algunos microlitros de una solución acuosa sobre el punto de muestra, permanecen allí durante un período de tiempo predeterminado y a continuación se retiran.

- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la preparación para la ionización por desorción comprende la adición de una solución matriz y la cristalización en la misma sobre el punto de muestra para una posterior ionización por desorción con láser asistida por matriz.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el soporte de muestras para espectrometría de masas que tiene una superficie hidrófila comprende una placa de acero inoxidable o una placa recubierta con material cerámico.

- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque las células biológicas comprenden microorganismos.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque proporcionar las células biológicas comprende cultivar los microorganismos en líquido nutriente (i) directamente sobre el punto de muestra del soporte de muestras para espectrometría de masas o (ii) en un recipiente para cultivo externo con una transferencia posterior de los microorganismos cultivados sobre el punto de muestra.

- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque la propiedad celular de los microorganismos que se va a determinar es su comportamiento de resistencia frente a una sustancia antimicrobiana.

- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque los microorganismos se cultivan sobre diferentes puntos de muestra del soporte de muestras en líquido nutriente, con y sin adición de la sustancia antimicrobiana, y porque el comportamiento de resistencia frente a la sustancia antimicrobiana se determina por un crecimiento continuado en presencia de esa sustancia.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el crecimiento en presencia de la sustancia antimicrobiana se determina mediante una comparación con una sustancia de referencia añadida de forma dosificada.

- 40 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque las células biológicas se examinan mediante espectrometría de masas para determinar su comportamiento frente a productos químicos durante un cultivo sobre el punto de muestra del soporte de muestras en presencia de esos productos químicos.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque las propiedades celulares se determinan basándose en señales proteicas mediante espectrometría de masas en el intervalo de masa superior a m/z 3000.

- 45 13. Procedimiento para la preparación de proteínas a partir de muestras de células biológicas para una determinación mediante espectrometría de masas de las propiedades celulares, que comprende las etapas:

- cultivar las células biológicas en un líquido nutritivo directamente sobre un punto de muestra de un soporte de muestras para espectrometría de masas que tiene una superficie hidrófila o una placa con anclajes hidrófilos en un entorno hidrófobo y secar un material sobrenadante del cultivo sobre el punto de muestra,
- 50 - descomponer las células cultivadas sobre el punto de muestra usando disolventes volátiles

desnaturalizantes y/o ácidos orgánicos, de modo que las proteínas celulares se liberan de los complejos, salen de las células descompuestas y se unen por adherencia sobre el punto de muestra,

- lavar las proteínas celulares sobre el punto de muestra con una solución tampón, en donde las sales y otros componentes solubles se solubilizan y se eliminan con la solución tampón, y
- 5
- preparar las proteínas celulares lavadas sobre el punto de muestra para una posterior ionización por desorción.

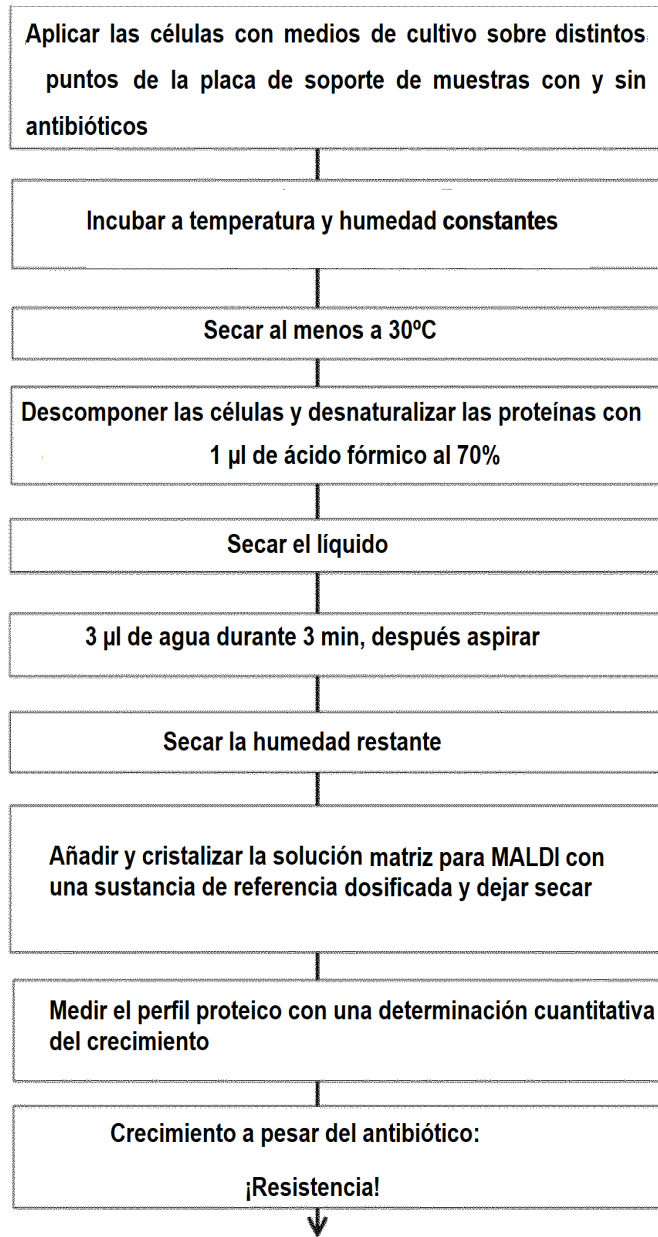
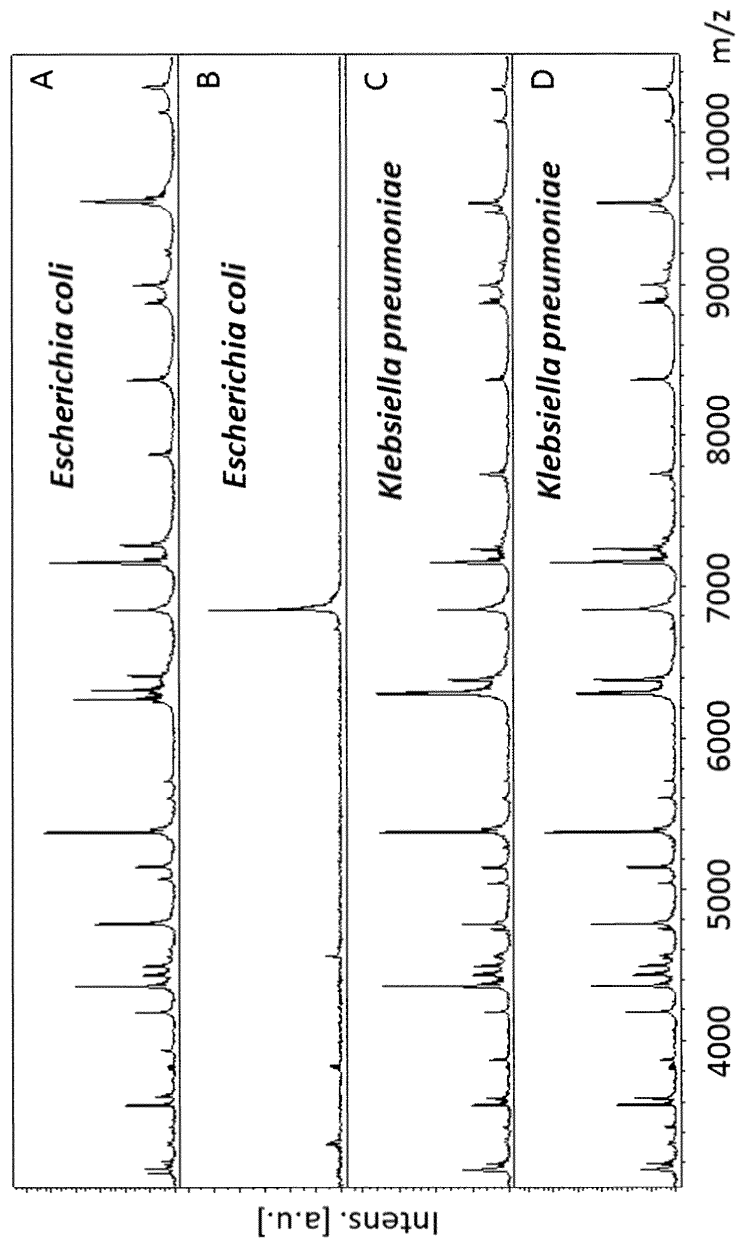


Figura 1



- A: Cepa sensible en medio Mueller-Hinton sin antibiótico
 B: Cepa sensible en medio Mueller-Hinton con antibiótico
 C: Cepa resistente a meropenem en medio Mueller-Hinton sin antibiótico
 D: Cepa resistente a meropenem en medio Mueller-Hinton con antibiótico

Figura 2

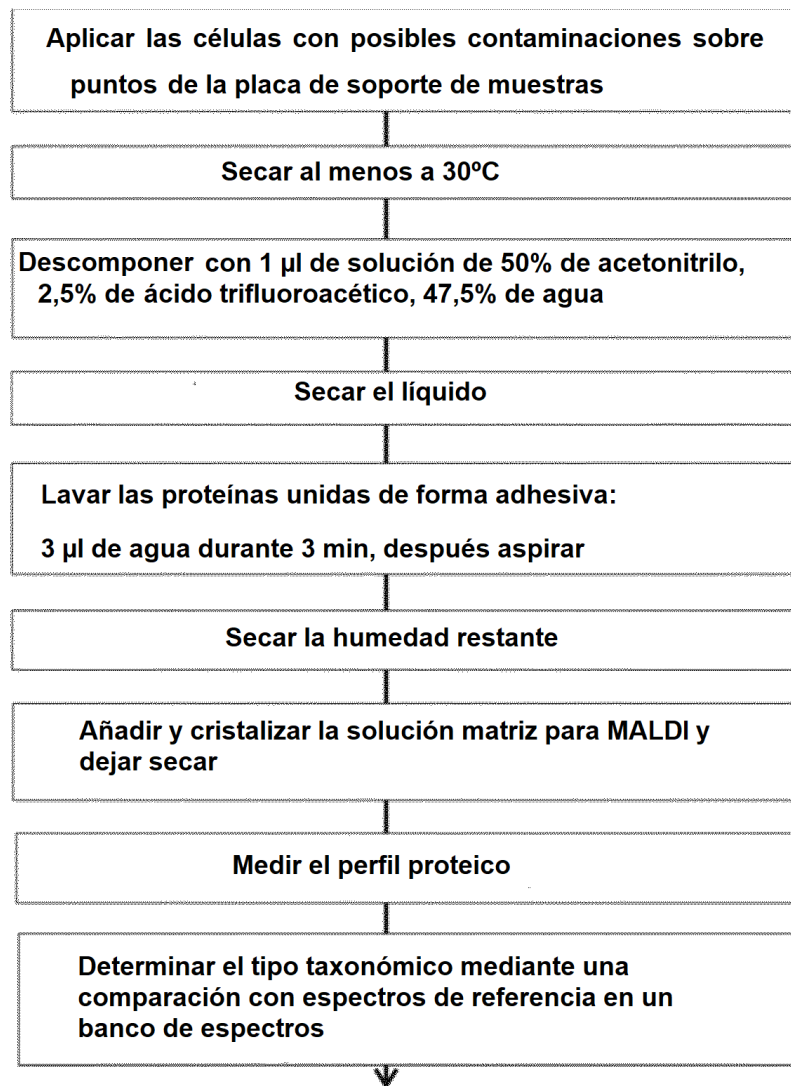
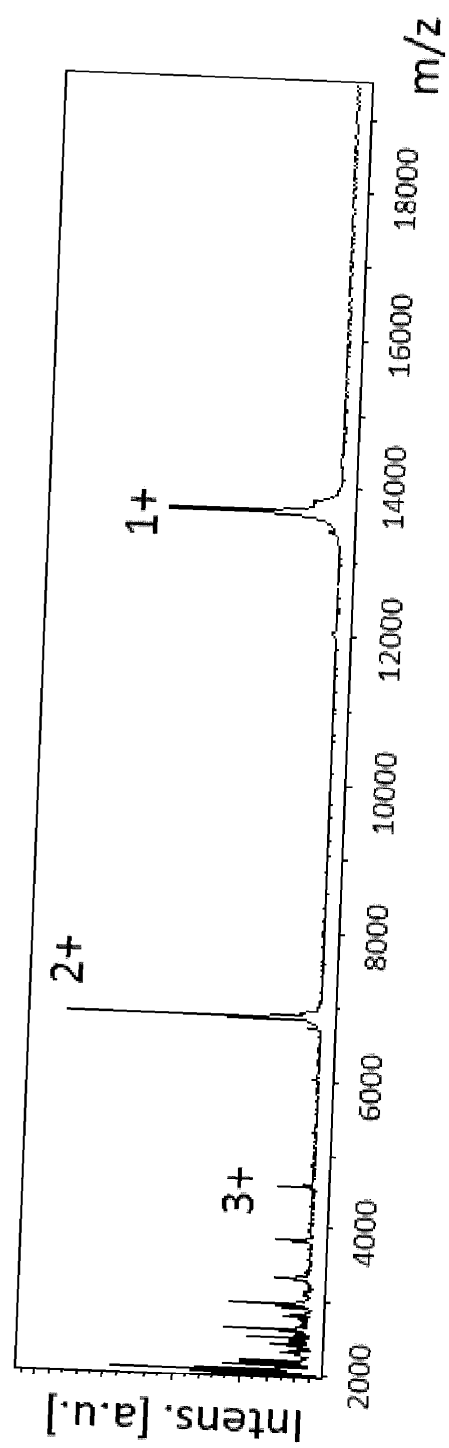


Figura 3

**Figura 4**