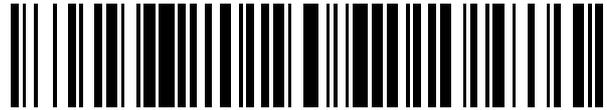


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 879**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2012 E 12794441 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2788495**

54 Título: **Procedimiento de detección de hemolisina delta de Staphylococcus aureus mediante espectrometría de masas directamente a partir de una población bacteriana**

30 Prioridad:

08.11.2011 FR 1160176

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

24.11.2015

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (33.3%)
69280 Marcy l'Étoile, FR;
HOSPICES CIVILS DE LYON (33.3%) y
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VANDENESCH, FRANÇOIS;
DAUWALDER, OLIVIER;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE y
WELKER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 551 879 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

Procedimiento de detección de hemolisina delta de *Staphylococcus aureus* mediante espectrometría de masas directamente a partir de una población bacteriana

5 La presente invención se refiere al campo técnico del análisis de bacterias de *Staphylococcus aureus*. Albergada como portador por el 20 a 30% de la población, *Staphylococcus aureus* es una bacteria responsable de colonizaciones y de infecciones (Wertheim, Melles et al. 2005). Se pueden distinguir dos grandes tipos de infecciones: las infecciones con supuración que implican factores de adhesión "*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*" o MSCRAMM (la proteína de unión del fibrinógeno [FnBP], la proteína A, las coagulasas, etc.); y las infecciones tóxicas que requieren la secreción de exotoxinas, entre las cuales, las más conocidas son las hemolisinas, la leucocidina de Pantón y Valentine [PVL], las enterotoxinas estafilocócicas y las exfoliantes (Otto 2010). No todas las cepas de *S. aureus* poseen todos los factores de virulencia y no todos estos factores se expresan al mismo tiempo durante el crecimiento bacteriano. Durante la fase de crecimiento exponencial, se produce la expresión de los factores de adhesión necesarios para la colonización y la invasión del hospedador. Por el contrario, al final de la fase de crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria, la bacteria expresa principalmente las toxinas necesarias para la destrucción de las células del hospedador, fuente de nutrientes esenciales para su crecimiento. *S. aureus* posee numerosos factores de regulación que van a controlar estos procesos (Dufour, Jarraud et al. 2002). Entre los citados, el sistema "*Accessory Gene Regulator*" [agr] es uno de los sistemas más importantes.

El sistema agr de *S. aureus* regula un gran número de genes de virulencia y del metabolismo de la bacteria. Consiste en un locus de 5 genes (*agrBDCA* y *hld*) distribuidos en dos transcritos divergentes: ARN II y ARN III. El ARN II es el mensajero del operón P2 que contiene los genes *agrBDCA*; y el ARN III contiene *hld*, el gen de la hemolisina Delta [δ]. *agrC* codifica una histidina quinasa y *agrA* es el receptor del sistema que tiene dos componentes. *agrD* codifica un péptido, que está madurado y secretado por *agrB*. El péptido resultante es un péptido autoinductor que activa *agrC*, el cual estimula *agrA*. Una vez activado, el receptor *agrA* induce las transcripciones del ARN II y del ARN III gracias a los promotores P2 y P3 respectivos. El ARN III contiene *hld*, el gen que codifica la hemolisina δ, pero es sobretodo un ARN regulador, un verdadero efector del sistema agr. De esta forma, este ARN III regula un gran número de genes tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la traducción (Verdon, Girardin et al. 2009; Felden, Vandenesch et al. 2011). Las mutaciones que inducen una disfunción del sistema agr provocan modificaciones de la expresión de las autolisinas y las hemolisinas; y efectos sobre el fenotipo bacteriano, implicados especialmente en la capacidad patógena (Schweizer, Furuno et al. 2011).

35 La hemolisina δ de *S. aureus*, también denominada toxina δ o lisina δ, está codificada por el gen *hld* que pertenece al sistema agr. Se localiza en el interior del ARN III, efector del sistema agr. La traducción del ARN III en la hemolisina δ se retrasa (≈1 hora) e interviene al final de la fase de crecimiento exponencial (Balaban y Novick 1995; Somerville, Cockayne et al. 2003). La hemolisina δ es, por lo tanto, el reflejo de la transcripción del ARN III, es decir, de la funcionalidad del sistema agr (Felden, Vandenesch et al. 2011). Pertenece a la familia de las toxinas hemolíticas de *S. aureus* y ocasiona poros en la membrana celular. Provoca particularmente la lisis de los eritrocitos humanos, del conejo, de la oveja, del caballo, del gato, del pollo, etc. mediante la destrucción de los fosfolípidos de las membranas celulares (Kreger, Kim et al. 1971). También está implicada en la prevención de la formación de biopelículas y en el inicio del estrés oxidativo en neutrófilos polinucleares humanos (Somerville, Cockayne et al. 2003). Está constituida por 26 aminoácidos como los que se ilustran en la **Figura 1** y tiene un peso molecular de 2,9 kDa (Fitton, Dell et al. 1980). Se presenta bajo dos formas: *i*) formilada en el extremo N sobre el resto de metionina, que es la forma natural y mayoritaria, denominada en este documento hemolisina δ; y *ii*) desformilada (Verdon, Girardin et al. 2009). La desformilación se realiza mediante una enzima: un péptido desformilasa dependiente de hierro. Durante la fase exponencial y en una fase exponencial posterior precoz, la hemolisina δ se desformila para proporcionar una entidad poco quimioattractiva (Somerville, Cockayne et al. 2003). A medida que las bacterias crecen, la concentración de hierro disminuye, lo que conlleva una reducción de la actividad de la desformilasa. Se produce entonces la acumulación de la hemolisina δ, que tiene las propiedades quimioattractivas de los neutrófilos polinucleares; e induce la respuesta inflamatoria, fuente de nutrientes para el futuro crecimiento bacteriano (Somerville, Cockayne et al. 2003). Por último, se han descrito polimorfismos: se ha encontrado una variante en las cepas de origen canino. Presenta variaciones en los aminoácidos; una digestión reducida mediante tripsina; una capacidad hemolítica reducida sobre los hematíes de la oveja y una actividad hemolítica reducida a temperaturas inferiores a 25°C (Turner 1978). En las cepas de origen humano se describe un polimorfismo de tipo glicina en la posición 10 sustituido por una serina (G10S) en el Genebank™ (Figueiredo, Jarraud et al. 2000) pero no se conoce la prevalencia de esta mutación.

60 Las cepas de *S. aureus* deficientes en el sistema agr tiene una frecuencia estimada entre 15% y 22% de acuerdo con los estudios (Traber, Lee et al. 2008; Schweizer, Furuno et al. 2011; Tsuji, Maclean et al. 2011). Estas cepas son más frecuentes entre los *S. aureus* resistentes a la meticilina [SARM] hospitalarios en comparación con los SARM extrahospitalarios (Tsuji, Maclean et al. 2011). Sin embargo, las cepas deficientes en agr se han encontrado en todos los fondos genéticos agr: I, II, III y IV, lo que no respalda la hipótesis clonal (Rose, Rybak et al. 2007).

65

Estas cepas tienen una relevancia clínica real ya que se han aislado de muestras biológicas que han experimentado el mínimo de manipulaciones y no son el resultado de mutaciones que se producen en los subcultivos sucesivos (Traber, Lee et al., 2008). Se han establecido diferentes conexiones clínicas entre la disfunción del sistema agr y la ausencia de hemolisina δ .

Por ejemplo, en 2011, a través de un estudio retrospectivo realizado entre el 2003 y el 2007, llevado a cabo sobre 814 bacteremias por *S. aureus*, se descubrió que un 22% de las cepas presentaban una disfunción del sistema agr. En el 18% de los casos, el paciente infectado por estas cepas fallece en un plazo de 30 días comparado con un 12% si está infectado con cepas cuyo sistema agr es funcional ($p=0,03$). De este modo, una infección por una cepa de *S. aureus* deficiente para agr puede predecir la mortalidad con una sensibilidad del 30%, una especificidad del 79%, un valor predictivo positivo del 18% y un valor predictivo negativo del 88% (Schweizer, Furuno et al. 2011).

Por otra parte, a través de un estudio clínico retrospectivo relativo a las bacteremias persistentes (BP) por SARM (es decir, persistencia de hemocultivos positivos para SARM más allá de 7 días con tratamiento adaptado con antibióticos) se ha mostrado que las cepas de SARM presentaban una disfunción del sistema agr, que ha sido objetivo de la investigación de la hemolisina δ sobre gelosa, que se ha encontrado más fácilmente en bacteremias persistentes (BP) en comparación con bacteremias resolutivas (BR) [71,4% de las cepas de los grupos BP frente a 38,9% de cepas del grupo BR; $p=0,057$]. De este modo, la ausencia de producción de hemolisina δ , testigo de la disfunción del sistema agr, podría ser un marcador de la bacteremia persistente, que necesita tener una carga mayor (es decir, tratamiento con antibióticos óptimo) (Fowler, Sakoulas et al. 2004).

Se ha establecido igualmente un vínculo con la autólisis bacteriana. El sistema agr controla la expresión de numerosos genes, particularmente *lytS* y *lytR*. Así, se ha asociado una disfunción del sistema agr con la formación de agregados en medio líquido; alteraciones de la superficie celular, que se convierte en rugosa y difusa; y una predisposición a la autólisis (Brunskill y Bayles 1996).

Vuong *et al.* han mostrado, por su parte, en un modelo de adhesión al poliestireno, que el 78% de las cepas deficientes en agr habían formado una biopelícula frente a solamente el 6% de las cepas que expresaban agr. Este fenómeno se ha confirmado también mediante la adición de inhibidores de agr y parece deberse a las propiedades tensioactivas de la hemolisina δ (Vuong, Saenz et al. 2000). Sin embargo, tan necesaria es la disfunción del sistema agr para la creación de la biopelícula como parece ser la dispersión de la biopelícula bajo la dependencia del sistema agr destacando la coexistencia probable de cepas deficientes y de cepas funcionales para el sistema agr durante las infecciones crónicas (Boles y Horswill 2008). En su conjunto, estos resultados abogan en favor de la búsqueda de cepas deficientes en agr durante las infecciones crónicas o en dispositivos intravasculares.

Se ha establecido igualmente el vínculo con la fibrosis quística. En 2000, Goerke *et al.* estudiaron la expresión del ARN III en cepas de *S. aureus* aisladas de muestras respiratorias de pacientes afectados de fibrosis quística. Demostraron la predominancia de cepas deficientes en agr. Por tanto, la funcionalidad del sistema agr no sería necesaria para la colonización y la infección durante la fibrosis quística (Sakoulas, Eliopoulos et al. 2005).

Por último, se ha notificado igualmente el vínculo con el fenotipo de resistencia a los glicopéptidos (es decir, GISA como abreviatura de "*Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus*"). La administración prolongada (es decir, superior a 9 meses) de vancomicina a un paciente infectado por una cepa de SARM con un sistema agr funcional indujo una reducción de la expresión de la hemolisina δ sin que esta última quedara completamente eliminada. Cuando se interrumpió el tratamiento, se midió un notable aumento de la expresión de la hemolisina δ (Sakoulas, Gold et al. 2006). Por otra parte, las cepas que presentan una disfunción del sistema agr muestran una sensibilidad reducida a la vancomicina, aunque la farmacodinámica de esta última no se haya alterado (Tsuji, Maclean et al. 2011). En 2002, Sakoulas *et al.* demostraron que el conjunto de cepas incluidas en la colección de GISA de su laboratorio presentaba una disfunción del sistema agr (Sakoulas, Eliopoulos et al. 2002). En 2005 se confirmó el vínculo entre la aparición de un fenotipo GISA heterogéneo y la exposición prolongada a la vancomicina de cepas deficientes en el sistema agr. Esta disminución de la sensibilidad a la vancomicina también está asociada a una reducción de la lisis bacteriana y a una menor sensibilidad a los péptidos antimicrobianos plaquetarios (Sakoulas, Eliopoulos et al. 2005). Esta asociación también se ha confirmado en el estudio de Rose *et al.* que muestran el aumento de la capacidad de cepas deficientes en agr para aumentar sus concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a la vancomicina, convirtiéndose así en GISA. Por el contrario, este fenómeno no se ha encontrado en otro antibiótico dirigido contra *S. aureus* que pertenece a otra clase de antibióticos: la daptomicina (Rose, Rybak et al. 2007). Así, la puesta de manifiesto de que la ausencia de producción de hemolisina δ podría ser un marcador precoz de detección de la evolución hacia el fenotipo GISA o el GISA heterogéneo, particularmente durante un tratamiento con vancomicina (Fowler, Sakoulas et al. 2004).

También, teniendo en cuenta el interés clínico que presenta la detección de hemolisina δ , se han descrito diferentes métodos de medida de la hemolisina δ de *S. aureus*. Se pueden citar los ensayos de hemólisis, los ensayos biológicos con modelos animales, la "*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*" [RT-PCR], la "*Northern blot*", la secuenciación y la cromatografía de alto rendimiento [HPLC].

En los ensayos de hemolisis, la hemolisina δ puede detectarse por la medida de la hemolisis inducida por una cepa de *S. aureus* cultivada sobre gelosa en sangre en presencia de anticuerpos dirigidos contra la hemolisina Alfa [α] y Beta [β]. La hemolisina δ puede detectarse igualmente mediante investigación acerca de la sinergia de la hemolisis entre la hemolisina δ y la hemolisina β (Verdon, Girardin et al. 2009). Se han descrito diferentes metodologías: Sakoulas *et al.* detectan la hemolisina δ utilizando la cepa de *S. aureus* RN4420 productora de una gran zona de hemolisis inducida por la hemolisina β . Se ha descrito igualmente una metodología derivada por Schweitzer *et al.* Estos métodos son fáciles de llevar a cabo, pero necesitan la realización de un ensayo "específico" y presentan una lectura subjetiva: la investigación de una sinergia de hemolisis, es a veces difícil de observar. Por último, estos ensayos pueden estar contaminados por falsos negativos en comparación con el "Northern Blot" y con la secuenciación del gen *agr* (Traber, Lee et al., 2008).

Históricamente, se han utilizado igualmente los ensayos biológicos con modelos animales. En este caso, la actividad de la hemolisina δ puede detectarse por la medida de la dosis letal mínima [DLM] en ratones o cobayas. Se necesitan, sin embargo dosis importantes (DLM en ratones = 110 mg/kg y cobayas = 30 mg/kg). Otra metodología consiste en investigar la capacidad de la hemolisina δ para inducir una necrosis cutánea en conejos. Aproximadamente de 1 mg de hemolisina δ indujeron, 24 h más tarde, un eritema importante (>28 mm de diámetro) y un endurecimiento seguido de una zona necrótica en D+3. Se puede observar igualmente la descamación a una dosis menor (Kreger, Kim et al. 1971).

También puede evaluarse la expresión de la hemolisina δ por la RT-PCR dirigida al ARN III. Se extrae el ARN total de una cepa, y se realiza una RT-PCR competitiva. Para normalizar los resultados, Goerke *et al.* utilizaron el gen constitutivo que codifica la girasa (*gyr*) cuya expresión es constante independientemente de cuales sean las fases de crecimiento. La RT-PCR del ARN III representa una técnica sensible, específica y cuantitativa. Sin embargo, su realización está reservada a laboratorios especializados debido al riesgo elevado de contaminaciones (Goerke, Campana et al. 2000).

Puede detectarse indirectamente la expresión de la hemolisina δ mediante la realización de un "Northern Blot" dirigido al ARN III (Kornblum, Projan et al. 1988; Goerke, Campana et al. 2000; Traber y Novick 2006).

Algunos autores han utilizado igualmente la secuenciación completa del locus *agr* para identificar las mutaciones puntuales que pueden explicar su disfunción (Traber y Novick 2006).

Se han utilizado igualmente varias técnicas de HPLC. En 2000, Otto y Gotz describieron un método cualitativo y cuantitativo para medir la hemolisina δ mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los sobrenadantes de los cultivos bacterianos realizados en caldo de tripticasa soja se centrifugaron a 19.000 g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se analizaron a continuación mediante HPLC en una columna PHE ("*Phenyl derivated*") de 1 ml, después se eluyó en un gradiente de 10 a 90% de disolvente B, siendo el disolvente A una mezcla de ácido trifluoroacético al 0,1% [TFA]/agua y siendo el disolvente B una mezcla de TFA al 0,1%/acetonitrilo. La detección se realizó mediante un espectrómetro UV con barras de diodos a 214 o 280 nm (Otto y Gotz 2000). En 2002, Somerville *et al.* describieron, por su parte, una metodología próxima a la de Otto y Gotz de detección y medida de la hemolisina δ mediante HPLC pero acoplada a una detección mediante espectrometría de masas con una fuente de electropulverización. Obtienen de este modo una m/z para 3007 Thomson [Th] y 2972 Th para las formas naturales y desformiladas de la hemolisina δ (Somerville, Cockayne et al. 2003).

En este contexto los inventores se han interesado en un nuevo procedimiento de estudio de colonias de *Staphylococcus aureus* que permita emitir un diagnóstico y/o establecer un vínculo con la presencia o ausencia de hemolisina δ . Este procedimiento debe de ser rápido y fácil de utilizar, y de forma notable no debe necesitar etapas laboriosas de extracción de proteínas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de estudio de una muestra que contiene una población bacteriana de *Staphylococcus aureus* mediante una técnica de espectrometría de masas que comprende las siguientes etapas:

- a) Poner la muestra en contacto con un medio que permita la ionización mediante la acción de un rayo láser de las moléculas presentes en la muestra,
- b) Ionizar las moléculas presentes en la muestra mediante un rayo láser,
- c) Acelerar las moléculas ionizadas obtenidas mediante una diferencia de potencial,
- d) Dejar desplazarse libremente las moléculas ionizadas y aceleradas en como mínimo un tubo a presión reducida, e) Detectar como mínimo una parte de las moléculas ionizadas y aceleradas que se están desplazando libremente, para medir el tiempo que han tardado en recorrer al menos un tubo a presión reducida y obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas detectadas en un instante dado,
- e) Calcular la relación entre masa y carga [m/z] de las moléculas detectadas, para obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que tienen la misma relación entre masa y carga [m/z], en función de la relación m/z de las moléculas detectadas,
- f) Determinar, de manera directa o indirecta, si entre las moléculas ionizadas obtenidas en la etapa b), hubo o no moléculas ionizadas de masa/carga [m/z] iguales a 3005 ± 5 Th o iguales a 3035 ± 5 Th,

g) Formular una decisión condicionada por el resultado obtenido en la etapa g).

Según una primera variante de realización, la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con la ausencia de hemolisina δ y de su variante G10S en la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada.

La hemolisina δ de la secuencia **SEC ID Nº 1**: XaaAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFTKK, siendo Xaa = metionina formilada en la posición del extremo N, tiene una masa monoisotópica protonada (MH^+) de $3005,6$ Th.

Su variante de la secuencia **SEC ID Nº 2**: XaaAQDIISTISDLVKWIIDTVNKFTKK, siendo Xaa = metionina formilada en la posición del extremo N, tiene una masa monoisotópica protonada (MH^+) de $3035,6$ Th.

Según una segunda variante de realización, la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con una disfunción del sistema agr ("Accessory Gene Regulator ") con respecto a la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada.

Según una tercera variante de realización, la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada proviene de una muestra biológica de un paciente y la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con la formulación, para el mencionado paciente, de un diagnóstico clínico conocido por estar vinculado a la disfunción del sistema agr.

Según una cuarta variante de implementación, la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada proviene de una muestra biológica de un paciente en la etapa h), que corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con el diagnóstico de una infección crónica en el paciente. Se definió una infección crónica sobre la base de un criterio clínico biológico consistente en recuperar el aislamiento, de hasta 6 meses antes, de una cepa de *S. aureus* que presentaba el mismo antibiograma que la cepa aislada durante el estudio. A modo de ejemplos de las mencionadas infecciones crónicas, se pueden citar las infecciones osteoarticulares, las infecciones crónicas del pie diabético, las infecciones en dispositivos vasculares implantables.

Según una quinta variante de realización, la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con una clasificación de la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada como en riesgo de presentar una sensibilidad disminuida a los glicopéptidos (es decir, GISA).

La muestra sobre la que se puede aplicar el procedimiento de la invención puede ser de origen biológico, particularmente, animal o humana. Puede por tanto corresponder a una muestra de fluido biológico, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, secreción orgánica, una muestra tisular o una de células aisladas. Esta muestra puede utilizarse tal cual, o bien puede someterse de antemano a estudio, una preparación de tipo enriquecimiento o un cultivo de acuerdo con los métodos conocidos por una persona experta en la materia.

En el marco de la invención, la muestra a estudiar corresponde a un medio celular que comprende una población bacteriana, y no a una o varias proteínas obtenidas tras una etapa de extracción o de purificación. Preferentemente, la muestra de estudio contiene una población bacteriana, es decir, contiene al menos 10 bacterias.

La detección puede realizarse particularmente a partir de un caldo de un cultivo bacteriano, procedente de una muestra biológica, o a partir de un hemocultivo. Con mayor frecuencia, el espectro de masas se obtiene a partir de una muestra obtenida procedente de un cultivo bacteriano sobre gelosa.

El medio celular se pone en suspensión directamente en o sobre la matriz. La mencionada técnica se conoce bajo el nombre de espectrometría de masas en células completas (WC-MS, del inglés "whole-cell mass spectrometry ") y puede realizarse sin procedimiento de extracción previo, laborioso y que emplea mucho tiempo. Esta técnica se ha utilizado ampliamente con anterioridad para la identificación bacteriana, pero su identificación en el caso de la identificación de proteínas es muy limitada, teniendo en cuenta la complejidad de la muestra. En la mayoría de casos, no se conoce la asignación de las proteínas correspondientes a los perfiles obtenidos mediante WC-MS, o bien es ambigua. Solamente se han comparado los perfiles técnicos que conducen a la identificación bacteriana sin que se conozca la composición proteica de estos perfiles (es decir, la correspondencia entre pico y proteína) (Welker y Moore 2011). Sin embargo, algunos autores han propuesto utilizar esta metodología para detectar los biomarcadores y/o los factores de virulencia implicados en la patogenia bacteriana (Bizzini y Greub 2010). Para *S. aureus*, algunos autores han mostrado que sería posible diferenciar los SARM de los SASM. Sin embargo, la colección de cepas utilizadas era limitada (n=10 cepas) y se requería la utilización de procedimientos de preparación de las muestras previos (es decir, extracciones químicas y mecánicas) (Edwards-Jones, Claydon et al. 2000). Otros autores han afirmado que era posible detectar la PVL de *S. aureus* (Bittar, Ouchenane et al. 2009). Sin embargo,

estos resultados no se han revelado específicos y eran probablemente el reflejo de la pertenencia a un mismo clon de la colección de cepas analizadas (Dauwalder, Carbonnelle et al. 2010; Szabados, Becker et al. 2011).

5 En el marco de la invención, los inventores han demostrado así de forma totalmente inesperada, que la presencia en el espectro de masas obtenido de un pico con un valor de m/z igual a 3005 ± 5 Th o a 3035 ± 5 Th, y, simultáneamente, la ausencia de picos a 3005 ± 5 Th y a 3035 ± 5 Th, podría correlacionarse respectivamente con la presencia y ausencia de hemolisina δ o de su variante, y permiten por lo tanto formular un diagnóstico clínico.

10 Preferentemente, en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención, independientemente de cuáles sean las variantes implementadas, la espectrometría de masas se realiza, ventajosamente, sobre una muestra que contiene una población de 10^4 a 10^9 bacterias, y preferentemente de 10^5 a 10^6 bacterias. El número de bacterias se asimilará al número de unidades formadoras de colonias (UFC) contadas si la muestra que se somete a espectrometría de masas se sembrara en un cultivo de gelosa normalizado para establecer el crecimiento de *Staphylococcus aureus* tras incubación durante 18-48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

15 De una manera general, en el marco de la invención puede utilizarse cualquier método de espectrometría de masas mediante desorción-ionización asistida por matriz y con medida del tiempo de vuelo.

20 De acuerdo con una realización particular, la espectrometría de masas utilizada es la espectrometría de masas (EM) [o MS del inglés "*Mass Spectrometry* "] mediante desorción-ionización asistida por matriz y con medida del tiempo de vuelo (MALDI-TOF) del inglés "[*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation/ Time Of Flight*]", que presenta particularmente la ventaja de una realización relativamente simple.

25 De acuerdo con otra realización particular, la espectrometría de masas utilizada es la EM en tándem MALDI-TOF-TOF, que presenta dos separaciones sucesivas en función del tiempo de vuelo y que tiene especialmente la ventaja de presentar una especificidad muy buena.

Antes de su ionización, la muestra se pone preferentemente en contacto con una matriz.

30 La matriz utilizada contiene ventajosamente un compuesto seleccionado entre el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (es decir, ácido sinápico o ácido sinapínico); el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (es decir, alfa-ciano, matriz alfa o CHCA), ácido ferúlico y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (es decir, DHB).

35 Existen numerosas técnicas de depósito que podrían utilizarse en el marco de la invención para poner la muestra en contacto con la matriz: depositada sobre una capa de matriz seca, denominado depósito en "capa delgada", depósito con una gota de matriz, denominado depósito en "gota seca", depósito sobre una capa de matriz, después, adición de una gota de matriz, el denominado depósito en "sándwich".

40 En general, las matrices son fotosensibles y cristalizan en presencia de la muestra preservando la integridad de las moléculas. Tales matrices especialmente adaptadas a la técnica EM MALDI-TOF son bien conocidas y se seleccionan entre el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico; el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, el ácido ferúlico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico. La persona experta en la materia conoce numerosos compuestos diferentes. Existen incluso matrices líquidas que no cristalizan ni a la presión atmosférica, ni siquiera en vacío (Tholey y Heinzle 2006). Podrá utilizarse cualquier otro compuesto que permita ionizar las moléculas de la muestra bajo el efecto de un rayo láser. Especialmente la diana, es decir, el soporte sobre el cual se dispone la muestra, podrá directamente realizar el papel de la matriz, como en el caso de las técnicas "*Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization* " (MALDI) o "*Desorption/Ionization On silicon*" (DIOS). El rayo láser podrá tener cualquier tipo de longitud de onda adecuada para la sublimación o la vaporización de la matriz. Preferentemente, se utilizarán la longitud de onda del ultravioleta o incluso la del infrarrojo.

50 En la matriz, el mencionado compuesto se disuelve, con más frecuencia en agua, preferentemente de calidad "ultrapura", o en una mezcla de agua/disolvente(s) orgánico(s). A título de ejemplo de los disolventes orgánicos clásicamente utilizados, se pueden citar: acetona, acetonitrilo, metanol o etanol. Puede utilizarse a veces el ácido trifluoroacético (TFA). Un ejemplo de matriz está constituida, por ejemplo, por 20 mg/ml de ácido sinápico en una mezcla de acetonitrilo/agua/TFA de 50/50/0,1 (v/v). El disolvente orgánico permite que las moléculas hidrófobas presentes en la muestra se disuelvan en la solución, mientras que el agua permite la disolución de las moléculas hidrófilas. La presencia de ácido, tal como TFA, favorece la ionización de las moléculas de la muestra mediante la captación de un protón (H^+).

60 Preferentemente, la muestra se deposita sobre un soporte denominado diana, lo más frecuente en forma de manchas. La matriz puede disponerse directamente sobre la muestra mientras y se mezcla con esta última.

De manera opcional, el procedimiento de acuerdo con la invención incluye antes de la etapa b), una etapa de cristalización de la matriz sobre o en la cual se han adsorbido las moléculas de la muestra.

65

Con mayor frecuencia, la cristalización de la matriz se obtiene dejando secar la matriz en o sobre la cual se ha depositado la muestra.

5 De acuerdo con una realización particular, el medio con el cual la muestra se pone en contacto corresponde a una matriz adaptada a la EM-MALDI depositada sobre una diana, y el procedimiento incluye antes de la etapa b), la obtención de la cristalización de la matriz sobre o en la cual se han adsorbido las moléculas de la muestra. En este caso, la matriz contiene preferentemente un compuesto seleccionado entre el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, el ácido ferúlico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

10 La muestra puede haber sido cultivada anteriormente en un caldo o sobre una gelosa para enriquecerla en bacterias de *Staphylococcus aureus*. Tales medios gelosados o en caldo, son bien conocidos por la persona experta en la materia. Se puede, por ejemplo, citar la gelosa en sangre (de caballo o de oveja); la gelosa columbiana; la gelosa "chocolate" polyvitex[®], la gelosa cromogénica ChromID Staph[®] para la investigación de *S. aureus* de la empresa bioMérieux, etc. El enriquecimiento sobre gelosa es particularmente favorable ya que permite obtener colonias puras de *S. aureus* que se podrán depositar sobre la diana. A continuación, el disolvente presente en la matriz se evapora, por ejemplo, dejando la muestra a una temperatura comprendida, por ejemplo, a un intervalo de 17 a 30°C, y especialmente a temperatura ambiente (22°C) durante algunos minutos, por ejemplo, de 5 minutos a 2 horas. Esta evaporación del disolvente permite la cristalización de la matriz sobre la que se ha distribuido la muestra. A continuación, la muestra, colocada en el interior de la matriz cristalina, se somete a una ionización suave. Esta ionización se realizará, preferentemente, con un láser de nitrógeno que emite un rayo UV a 337,1 nm.

25 Durante la ionización, la muestra se somete a una ionización mediante láser. Los cristales de la matriz absorben entonces la energía fotónica y la restitución de esta energía conlleva la sublimación de la matriz, la desorción de la muestra y la aparición de la materia en un estado denominado como plasma. En el interior de dicho plasma se producen intercambios de cargas entre las moléculas de la matriz y de la muestra. Por ejemplo, los protones pueden separarse de la matriz y ser transferidos a las proteínas y a los péptidos de la muestra. Esta etapa permite una ionización suave de las biomoléculas sin inducir su destrucción. Las muestras emiten de este modo iones de diferentes tamaños. A continuación, estos últimos se aceleran mediante un campo eléctrico y vuelan libremente en un tubo a presión reducida, denominado tubo de vuelo. La presión aplicada durante la ionización y durante la aceleración de los iones generados se incluye frecuentemente en un intervalo de 10^{-6} a 10^{-9} milibares [mbar] (10^{-4} a 10^{-7} Pa). Los iones más pequeños van a "viajar" más rápidamente que los iones más grandes, lo que permite así su separación. En el extremo final del tubo de vuelo se encuentra un detector. Los tiempos de vuelo (o TOF para "Time Of Flight" en inglés) de los iones se utilizan para calcular su masa. Así, se obtiene un espectro de masas, que corresponde a la señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que tienen la misma relación entre masa y carga [m/z], en función de la relación m/z de las moléculas que llegan al detector. La relación entre la masa y la carga [m/z] se expresa en unidades Thomson [Th]. Una vez introducida en el espectrómetro de masas, se obtiene el espectro de una muestra muy rápidamente, lo más frecuentemente en menos de un minuto.

40 El hecho de que la muestra analizada contenga bacterias de *Staphylococcus aureus* puede determinarse por un ensayo anterior a la EM MALDI-TOF o de manera simultánea gracias al espectro de EM MALDI-TOF. En este caso, el espectro de la EM MALDI TOF total, que comprende habitualmente entre 70 y 200 picos, se comparará con una base de datos espectrales que permite determinar si la población bacteriana analizada corresponde a *Staphylococcus aureus*. Esta comparación se basa en la utilización de diferentes algoritmos de acuerdo con los proveedores, y conduce a la obtención de la identificación bacteriana (Cherkaoui, Hibbs et al. 2010; Welker y Moore 2011).

Todos los modos de realización detallados a continuación son aplicables independientemente de cual sea la técnica de espectrometría de masas utilizada, en particular de tipo MALDI-TOF o de tipo MALDI-TOF-TOF.

50 Cuando la espectrometría de masas utilizada es la EM MALDI-TOF, la determinación de la etapa g) se deduce preferentemente de manera directa de la presencia sobre el espectro de masas obtenido de un pico a un valor de m/z igual a 3005 ± 5 Th o a 3035 ± 5 Th o de la ausencia de picos a la vez a 3005 ± 5 Th y a 3035 ± 5 Th.

55 Cuando la espectrometría de masas utilizada es la EM MALDI-TOF-TOF, se deja preferentemente desplazar las moléculas ionizadas en un primer tubo bajo presión reducida en la etapa d), se seleccionan los iones de masa m/z igual a 3005 ± 5 Th y/o de masa m/z igual a 3035 ± 5 Th, se aceleran de nuevo las moléculas ionizadas después de su fragmentación, por ejemplo, mediante colisión, y las moléculas ionizadas fragmentadas o no se dejan desplazar libremente en un segundo tubo.

60 Con la EM MALDI-TOF-TOF, la determinación de la etapa g) se deduce preferentemente de manera indirecta de la presencia de al menos cinco fragmentos, y preferentemente de al menos 10 fragmentos, entre los fragmentos iónicos y los b siguientes:

65 - los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2005,148, 2118,232, 2219,280, 2306,312, 2419,396, 2532,480, 2647,507, 2775,565, 2846,603 y 2976,635, con una tolerancia de $\pm 1,5$

Th; y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1029,516, 1144,543, 1257,627, 1356,695, 1484,790, 1670,870, 1783,954, 1897,038, 2012,065, 2113,112, 2212,181, 2326,224, 2454,319, 2601,387, 2702,435, 2830,530 y 2958,625, con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th, para el pico a 3005 ± 5 Th, y/o

- 5 - los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2035,159, 2148,243, 2249,290, 2336,322, 2449,406, 2562,491, 2677,517, 2805,576, 2876,613 y 3006,646, con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th; y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1059,526, 1174,553, 1287,638, 1386,706, 1514,801, 1700,880, 1813,964, 1927,048, 2042,075, 2143,123, 2242,191, 2356,234, 2484,329, 2631,398, 2732,445, 2860,540 y 2988,635, con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th, para el pico a 3035 ± 5 Th.

Un procedimiento de espectrometría de masas MALDI-TOF utilizable de acuerdo con la invención puede comprender particularmente las etapas sucesivas siguientes para obtener un espectro de masas:

- 15 - Colocar la muestra a estudiar en la superficie o en una matriz adaptada a la espectrometría de masas mediante desorción-ionización asistida por matriz por tiempo de vuelo,
 - Obtener la cristalización de la matriz sobre o en la cual se han adsorbido las moléculas de la muestra,
 - Ionizar la mezcla de muestra/matriz cristalizada mediante un rayo láser,
 20 - Acelerar las moléculas ionizadas obtenidas mediante una diferencia de potencial,
 - Dejar desplazarse libremente las moléculas ionizadas y aceleradas en un tubo a presión reducida,
 - Detectar las moléculas ionizadas a la salida del tubo, para medir el tiempo que han tardado en recorrer el tubo a presión reducida y obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que alcanzan el detector en un instante dado,
 25 - Calcular la relación entre masa y carga $[m/z]$ de las moléculas detectadas, para obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que tienen la misma relación entre masa y carga $[m/z]$, en función de la relación m/z de moléculas detectadas.

En general, se obtiene el cálculo de la relación m/z teniendo en cuenta la calibración anterior del espectrómetro de masas utilizado, en forma de una ecuación que vincula la relación de masa a carga $[m/z]$ y el tiempo de recorrido en el tubo bajo presión reducida de las moléculas ionizadas.

La EM MALDI-TOF que puede utilizarse en el marco de la invención se basa en la medida del tiempo necesario para ir de un punto A a un punto B de iones de diferentes cargas y de diferentes masas expuestos a un campo eléctrico. La medida de este tiempo de recorrido depende de la masa y de la carga del ion, permitiendo así su separación (Welker y Moore 2011).

Un procedimiento MALDI-TOF-TOF que puede igualmente utilizarse en el marco de la invención puede comprender particularmente las siguientes etapas para la obtención del espectro de masas:

- 40 - Colocar la muestra a estudiar en la superficie de una matriz adaptada a la MS para MALDI-TOF-TOF.
 - Obtener la cristalización de la matriz sobre o en la cual se han adsorbido las moléculas de la muestra,
 - Ionizar la mezcla de muestra/matriz cristalizada mediante un rayo láser,
 - Acelerar las moléculas ionizadas obtenidas mediante una diferencia de potencial,
 45 - Dejar desplazarse libremente las moléculas ionizadas y aceleradas en un primer tubo a presión reducida,
 - Al finalizar el paso del primer tubo, seleccionar las moléculas ionizadas que tienen la masa del ion molecular para fragmentar y eliminar los otros iones, por ejemplo con un deflector electrostático,
 - Obtener la fragmentación de las moléculas ionizadas, de manera opcional provocándola con la ayuda de un gas inerte,
 50 - Aumentar de nuevo el potencial para provocar la aceleración de las moléculas ionizadas, por ejemplo mediante rejillas de potencial para transmitir una energía cinética diferente a los fragmentos iónicos y al ion precursor,
 - Dejar desplazarse libremente las moléculas iónicas fragmentadas o no en un segundo tubo a presión reducida,
 - Detectar las moléculas ionizadas a la salida del tubo, para medir el tiempo que han tardado en recorrer el tubo a presión reducida y obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que alcanzan el detector en un instante dado,
 55 - Calcular la relación entre masa y carga $[m/z]$ de las moléculas detectadas, para obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que tienen la misma relación entre masa y carga $[m/z]$, en función de la relación m/z de moléculas detectadas.

En general, se obtiene el cálculo de la relación m/z teniendo en cuenta la calibración anterior del espectrómetro de masas utilizado, en forma de una ecuación que vincula la relación de masa a carga $[m/z]$ y el tiempo de recorrido en el tubo bajo presión reducida de las moléculas ionizadas. La masa del ion precursor puede servir para realizar esta calibración.

Se puede utilizar todo tipo de espectrómetros de masas MALDI-TOF o MALDI-TOF/TOF para la elaboración del espectro de masas. Tales espectrómetros comprenden:

- 5
- i) una fuente de ionización (en general un láser UV) destinado a ionizar la mezcla de muestra/matriz;
 - ii) un acelerador de moléculas ionizadas mediante aplicación de una diferencia de potencial,
 - iii) un tubo a presión reducida en el cual se desplazan las moléculas ionizadas y aceleradas,
 - iv) un analizador de masas destinado a separar los iones moleculares formados en función de su relación de masa a carga (m/z);
 - v) un detector destinado a medir el producto de la señal directamente por los iones moleculares.

10 Un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF es idéntico a un espectrómetro de masas MALDI-TOF, salvo que el tubo a presión reducida está dividido en dos partes situadas una en la prolongación de la otra (denominadas igualmente aquí primer tubo y segundo tubo a presión reducida). Esta geometría permite dos separaciones sucesivas de los iones moleculares en función de los tiempos de vuelo: la primera permite la selección de un ion molecular que se separará en fragmentos en la segunda parte del tubo. Se entiende por fragmentos toda estructura molecular obtenida descomponiendo el ion molecular seleccionado.

15 La fragmentación de los iones puede obtenerse bien durante la ionización inicial, bien en una celda de colisión situada entre las partes del tubo mencionadas anteriormente. Durante la ionización inicial, puede provocarse directamente la fragmentación mediante la energía del rayo láser absorbida por las moléculas o provocarse por la colisión entre moléculas neutras o ionizadas en el plasma molecular. Si la fragmentación se produce antes de la fase de aceleración de los iones, los fragmentos migran de acuerdo con sus masas respectivas. Si se produce durante la fase de aceleración, la separación de los iones, denominados metaestables, es pobre. Si se produce después de la aceleración inicial, los fragmentos iónicos y su molécula precursora ionizada (ion precursor) tienen la misma energía cinética y migran a la misma velocidad. Este último tipo de fragmentación, bautizado fragmentación posterior a la fuente se aprovecha en la técnica de EM MALDI-TOF-TOF. La primera parte del tubo (o denominado en este documento primer tubo a presión reducida) permite seleccionar un intervalo de masas que incluye la masa del ion precursor. El ion precursor y sus fragmentos se aceleran a continuación de nuevo entre las dos partes del tubo a presión reducida. Los iones adquieren entonces una energía cinética que está en función de su masa. Migran finalmente a la segunda parte del tubo a presión reducida (o denominado aquí segundo tubo a presión reducida) en función de sus masas respectivas. De este modo, es posible detectar el conjunto de fragmentos generados para un ion precursor dado.

20 Una variante de este método consiste en añadir a la celda de colisión un gas inerte, tal como argón, entre las dos partes del tubo a presión reducida. Las moléculas ionizadas se fragmentan entonces al entrar en colisión con el gas inerte. A continuación, pueden acelerarse y separarse como anteriormente.

25 Una EM mediante MALDI TOF/TOF fragmenta las proteínas de manera especial alrededor del enlace peptídico, y genera esencialmente iones de tipo b y de tipo y de acuerdo con la nomenclatura usual (Paizs y Suhai 2005). Son igualmente posibles otros fragmentos, iones imonio, fragmento a, etc.

30 La persona experta en la materia tiene el hábito de utilizar el perfil de fragmentación para generar informaciones sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína y de intentar identificar la secuencia proteica. Utiliza particularmente para este fin programas informáticos tales como el de la empresa Matrix Science (Londres, Reino Unido).

35 Así, la hemolisina δ de la SEC ID N° 1 producirá mayoritariamente:

- 40
- los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2005,148, 2118,232, 2219,280, 2306,312, 2419,396, 2532,480, 2647,507, 2775,565, 2846,603 y 2976,635;
 - y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1029,516, 1144,543, 1257,627, 1356,695, 1484,790, 1670,870, 1783,954, 1897,038, 2012,065, 2113,112, 2212,181, 2326,224, 2454,319, 2601,387, 2702,435, 2830,530 y 2958,625.

45 Análogamente, la hemolisina δ G10S de la SEC ID N°2 producirá mayoritariamente:

- 50
- los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2035,159, 2148,243, 2249,290, 2336,322, 2449,406, 2562,491, 2677,517, 2805,576, 2876,613 y 3006,646;
 - y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1059,526, 1174,553, 1287,638, 1386,706, 1514,801, 1700,880, 1813,964, 1927,048, 2042,075, 2143,123, 2242,191, 2356,234, 2484,329, 2631,398, 2732,445, 2860,540 y 2988,635.

55 Los ejemplos, en relación con las Figuras adjuntas, permiten en lo sucesivo ilustrar la invención pero no tienen ningún carácter limitativo.

60 La **Figura 1** representa la secuencia primaria de la hemolisina δ (Fitton, Dell et al. 1980).

La **Figura 2** pone de manifiesto la detección de la hemolisina δ mediante EM MALDI TOF a partir de cepas

isógenas de *Staphylococcus aureus*.

La **Figura 3** estudia el efecto de los tiempos de cultivo (18 a 48 h) sobre la detección de la hemolisina δ mediante EM MALDI TOF de 3 cepas isógenas y de 2 cepas clínicas.

La figura 4 ilustra la detección de la hemolisina δ y de su variante G10S mediante EM MALDI TOF a partir de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

EJEMPLOS

1 Material

• Matriz

Utilización de una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi cinámico [CHCA] lista para su uso (Referencia 411071, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

• Dianas y control interno

Utilización de dianas desechables MS DS[®] (Referencia 410893 bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Utilización de una cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 que permite calibrar cada análisis o verificar la validez de la calibración del espectrómetro de masas.

• Tipo de depósitos

Las cepas de *Staphylococcus aureus* se depositaron en forma de una extensión fina de una colonia puntual (extensión en forma de capa fina o "frotis" en inglés). Esta extensión se secó durante 5 a 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se depositó un microlitro de matriz CHCA, que se secó a continuación de 5 a 15 minutos a aproximadamente temperatura ambiente.

Espectrómetro de masas MALDI TOF

Utilización de un espectrómetro de masas de tipo MALDI TOF modelo Axima Assurance[®] de la compañía Shimadzu, Champs sur Marne, Francia.

Parámetros utilizados durante el análisis en el espectrómetro de masas MALDI TOF

En los análisis de las cepas de *S. aureus* se han utilizado en el espectrómetro de masas los parámetros de ajuste siguientes:

- Zona de detección de masas: 2000 - 20 000 Th
- Potencia del láser: 80 voltios
- Frecuencia del láser: 50 hertzios
- Tipo de láser; N2
- Modo del espectrómetro de masas: linear, positivo
- Potencia de extracción: 8330 Th
- Modo "auto calidad" activado
- Intensidad mínima: 10 mV
- Relación señal a ruido mínima: 10
- Resolución mínima aceptable: 300
- Número de disparos: 5 disparos 1 perfil
- Número de perfiles por espectro: 100

• Programas informáticos

Los planos de la placa se realizaron mediante el programa informático Sirweb-Maldi-Tof[®] versión 11 (I2A, Peyrols, Francia) o el programa informático Target Manager[®] versión 1.12 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). El espectrómetro de masas está controlado por el programa informático LaunchPad[®] versión 2.8.4.20081127 (Shimadzu, Champs sur Marne, Francia).

2. Metodología

Parámetros preanalíticos

Análisis de las cepas tras subcultivo de 18 a 24 h en gelosa con sangre de caballo (TSH, Referencia 43061, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera aerobia.

Calibración inicial adicional (además de la utilizada para la identificación bacteriana) del espectrómetro de masas en la zona de 2800 a 3200 m/z con la ayuda de un calibrador para espectrometría de masas compuesto por polietilenglicol (PEG) 3000.

5 • **Parámetros analíticos**

A partir de una colonia puntual, realización de un depósito en una diana desechable de acuerdo con la "técnica del frotis" utilizada de forma rutinaria en la identificación de bacterias.

10 Secado de 5-15 minutos a temperatura ambiente.

Adición de 1 µl de matriz CHCA al depósito anterior.

Secado durante 5-15 minutos.

15 Realización de un "plano de la placa" mediante el programa informático Sirweb-Maldi-Tof® o Target Manager®.

Inicio del análisis por EM MALDI TOF mediante el programa informático Launchpad® de control del espectrómetro de masas Axima Assurance®.

20 3. **Resultados**

a. **Validación de la detección**

25 i. **Utilización de cepas isógenas de *Staphylococcus aureus***

El análisis de las cepas isógenas para el sistema *agr/rnaIII/hld* obtenidas mediante la sustitución alélica del locus *agr* ha permitido demostrar la presencia de un pico a 3005 ± 5 Th para las cepas que presentan un sistema *agr* funcional. Por el contrario, las cepas isógenas, idénticas a las cepas progenitoras precedentes con la excepción de un sistema *agr* mutado, no presentan ningún pico a 3005 ± 5 Th. La cepa RN6390 ensayada posee un sistema *agr* funcional y es productora de hemolisina δ ; la cepa LUG950 procede de la cepa RN6390 en la cual se ha inactivado el gen que codifica el ARN III: la cepa es deficiente para la síntesis de la hemolisina δ ; la cepa RN6911 es una cepa obtenida mediante la delección completa del locus *agr* (ARN II y ARN III) de la cepa RN6390: la cepa es deficiente para la síntesis de hemolisina δ . La **Tabla I** y la **Figura 2** resumen los resultados obtenidos. La **Figura 2** presenta el espectro de masas **WC-EM MALDI TOF** obtenido con las tres cepas ensayadas para las relaciones m/z comprendidas entre 2800 y 3200.

Tabla I: Detección de la hemolisina δ mediante WC-EM MALDI TOF y mediante la investigación de la hemólisis en medio gelosa en una colección de cepas isógenas

Cepa de referencia	Características	Ensayo de sinergia de la hemólisis sobre gelosa en sangre	Presencia de un pico a 3005 ± 5 Th
RN6390	Cepa progenitora <i>agr</i> ⁺	+	+
LUG 950	RN6390 Δ <i>rnaIII</i>	-	-
RN 6911	RN6390 Δ <i>agr</i>	-	-

ii. **Datos de repetibilidad y de fidelidad intermedia**

45 A fin de poder evitar condiciones de cultivo demasiado estrictas necesarias para el uso de esta detección en la práctica cotidiana, se han establecido datos de repetibilidad y de fidelidad intermedia. Con este fin se han utilizado las 3 cepas isógenas anteriormente descritas (es decir, RN6390; LUG 950; y RN 6911) y 2 cepas clínicas, expresando una la hemolisina δ (es decir, BE1046 1395), y la otra no (es decir, BE1048 1354). Estas cepas se cultivaron durante 18, 24 y 48 horas sobre gelosas en sangre de caballo (TSH, Referencia 43061, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). A continuación, estas cepas se ensayaron por duplicado en WC-EM MALDI TOF. En todos los casos, y para todos los tiempos de cultivo, se detectó el pico a 3005 ± 5 Th en todas las cepas productoras de hemolisina δ y no se encontró para las cepas que presentan una disfunción del sistema *agr* (**Figura 3**).

iii. **Influencia de los medios de cultivo en la detección de la hemolisina δ**

55 Se ha evaluado igualmente la influencia de los medios de cultivo. Se cultivaron las mismas 5 cepas (las 3 cepas isógenas y las 2 cepas clínicas, expresando una la hemolisina δ , y la otra no), en 5 medios diferentes durante 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones aerobias: gelosa en sangre de caballo (TSH, Referencia 43061, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia); gelosa columbia (COS, Referencia 43041, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia); gelosa "chocolate" (PVX, Referencia 43101, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia); gelosa P (GP, Bacto-Peptona DIFCO®, Becton Dickinson,

Pont de Claix, Francia); y gelosa cromógena para la investigación de *S. aureus* (ChromID Staph[®], Referencia 43371, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Estas condiciones de cultivo diferentes no tuvieron ninguna influencia en la detección de la hemolisina δ mediante WC-EM MALDI TOF según el pico a 3005 ± 5 Th como se muestra en la **Tabla II**.

5

Tabla II: Influencia de las condiciones de cultivo en la detección de la hemolisina δ .

Cepa	TSH [®]	COS [®]	PVX [®]	GP	ChromID Staph [®]
RN6390	+	+	+	+	+
LUG 950	-	-	-	-	-
RN 6911	-	-	-	-	-
BE10482354	-	-	-	-	-
BE10461395	+	+	+	+	+

+: pico detectado a 3005 ± 5 Th. -: ausencia de pico a 3005 ± 5 Th.

iv. Análisis prospectivo de una colección de cepas clínicas procedentes del laboratorio de microbiología del Centre de

10

Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon.

15

20

25

30

Para estudiar la importancia clínica de la disfunción del sistema agr, determinado por la ausencia del pico a 3005 ± 5 Th, se recogió prospectivamente una serie de 168 aislados entre noviembre de 2010 y marzo de 2011 en el laboratorio de bacteriología del Centre de Biologie et Pathologie Est [CBPE] des Hospices Civils de Lyon [HCL]. Entre los citados, 139 (82,7%) que presentaban, en WC-EM MALDI TOF un pico a 3005 ± 5 Th; 12 (7,2 %) que poseían un pico a 3035 ± 5 Th y no a 3005 ± 5 Th; y adicionalmente 17 cepas (10,1%) que no mostraban ningún pico a 3005 ± 5 Th, y ningún pico a 3035 ± 5 Th. Para confirmar los resultados obtenidos mediante una segunda metodología, se realizaron ensayos de hemólisis sobre gelosa en sangre. Las 17 cepas que no presentaban ningún pico a 3005 ± 5 Th y a 3035 ± 5 Th no mostraron ninguna hemólisis. Por el contrario, las 10 cepas desprovistas de picos a 3005 ± 5 Th pero con un pico a 3035 ± 5 Th presentaron un ensayo de hemólisis positivo. Por último, la detección de la hemolisina δ mediante el ensayo de la hemólisis en 5 de las 139 muestras tomadas al azar y que presentaban un pico a 3005 ± 5 Th se reveló positiva. Para de explicar la presencia de hemólisis asociada a un pico a 3035 ± 5 Th y sin pico a 3005 ± 5 Th, se secuenció el gen *hld* que codificaba la hemolisina δ . En las 10 cepas se detectó una mutación que entrañaba la sustitución de una glicina por una serina en posición 10 (*es decir*, G10S), lo que explica la modificación de la masa medida mediante EM MALDI TOF (**Figura 4**). Entre las cepas cuyo espectro WC-EM MALDI TOF se ha representado mediante una relación m/z comprendida entre 2800 y 3200 en la **Figura 4**, las cepas BE1046 1395 y BE1103 3028 produjeron la hemolisina δ en la forma natural (δ^+); las cepas BE1050 5040 y BE1104 4293 produjeron la hemolisina δ que presentaba la mutación G10S (δ^{+G10S}); las cepas BE1106 5397 y BE1048 2354 son deficientes en hemolisina δ (δ^-).

v. Análisis MALDI TOF/TOF

35

40

45

Se realizó un análisis mediante espectrometría de masas "MALDI-TOF/conTiempo de vuelo " [MALDI TOF-TOF] sobre 9 cepas: las tres cepas isógenas anteriormente citadas (*es decir*, RN6390; LUG 950; y RN 6911), 2 cepas clínicas no hemolíticas que no presentaban ningún pico a 3005 ± 5 Th, ni un pico a 3035 ± 5 Th, 2 cepas clínicas hemolíticas que mostraban un pico a 3005 ± 5 Th; y dos cepas clínicas hemolíticas que presentaban un pico a 3035 ± 5 Th pero estaban desprovistas de pico a 3005 ± 5 Th.

Así, el análisis en el modo MALDI-TOF-TOF del pico a 3005 ± 5 Th de la cepa RN6390 permitió detectar los fragmentos de la hemolisina δ de masa 147,252, 201,359, 275,471, 330,459, 376,514, 446,482, 523,633, 559,574, 651,7, 672,606, 757,71, 765,841, 864,832, 965,922, 1080,95, 1194,071, 1307,149, 1356,133, 1493,23, 1621,321, 1672,21, 1720,294, 1785,044, 1833,275, 1948,428, 2005,551, 2119,576, 2219,583, 2307,544, 2420,56, 2533,786, 2600,009, 2602,657, 2647,743, 2774,373, 2776,851 y 2975,308 Th. Estos fragmentos corresponden respectivamente a los iones y1, y2, y3, y4, y5, y6, y7, y8, y9, y10, y11, y12, y13, y14, y15, y16, y17, y18, y19, y20, y21, y22, y23, y24, y26, b2, b3, b4, b5, b6, b7, b13, b15, b16 y b23 de la hemolisina δ de secuencia **SEC ID N°1** con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th. Se detectaron de esta manera más de 5 fragmentos que pertenecían a la hemolisina δ de secuencia **SEC ID N° 1**.

50

55

Análogamente, el análisis en modo MALDI-TOF-TOF del pico a 3035 ± 5 Th de la cepa BE1050 5040 permitió detectar los fragmentos de la hemolisina δ G10S de masa 275,408, 330,363, 376,414, 446,463, 523,39, 559,462, 651,572, 757,505, 765,682, 860,673, 864,661, 965,714, 1080,77, 1175,788, 1193,829, 1306,922, 1493,064, 1621,166, 1701,34, 1720,251, 1814,587, 1833,381, 1948,485, 2035,545, 2148,557, 2249,99, 2336,585, 2449,681, 2562,833, 2677,454 y 2677,935 Th. Estos fragmentos corresponden respectivamente a los iones y2, y3, y4, y5, y6, y7, y8, y9, y10, y11, y12, y13, y14, y15, y16, y17, y18, y19, y20, y21, y22, y23, b3, b4, b5, b7, b8, b11, b15 y b16 de la hemolisina δ G10S de secuencia **SEC ID N°2** con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th. Se han detectado de esta manera más de 5 fragmentos que pertenecían a la hemolisina δ de secuencia **SEC ID N°2**.

Por el contrario, el análisis MALDI-TOF-TOF del pico a 3053 ± 5 Th de la cepa LUG 950 no permitió detectar los fragmentos de masa correspondientes a la **SEC ID N°1** o a la **SEC ID N°2**. Solo se detectaron los picos de masa siguientes: 72,826, 96,485, 128,727, 214,235, 242,298, 263,249, 267,247, 285,276, 362,359, 476,458, 1206,984 y 1848,786 Th.

En todos los casos, el análisis mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF y la investigación en la base de datos Mascott® (Matrix Science Ltd, Londres, Reino Unido) confirmó la totalidad de los resultados obtenidos anteriormente, particularmente la correspondencia del pico a 3035 ± 5 Th con la forma mutada de la hemolisina δ G10S.

Estos ejemplos permiten mostrar que el modo MALDI-TOF, aunque más sencillo de llevar a cabo, conduce a las mismas identificaciones que el modo MALDI-TOF-TOF, que es más específico.

La totalidad de los resultados obtenidos se ha resumido en la **Tabla III**.

Tabla III: Detección de la hemolisina δ mediante espectrometría de masas MALDI TOF en 168 cepas clínicas y la correlación con el ensayo de sinergia de la hemolisis en difusión y la detección con espectrometría MALDI TOF/TOF.

	Pico a 3005 ± 5 Th (Número de cepas positivas /número de cepas analizadas)	Pico a 3035 ± 5 Th (Número de cepas positivas /número de cepas analizadas)	Ausencia de picos a 3005 ± 5 Th y 3035 ± 5 Th (Número de cepas positivas /número de cepas analizadas)
MALDI TOF	141/168	10/168	17/168
Ensayo de sinergia de la hemolisis sobre gelosa en sangre	5/5	10/10	0/17
MALDI TOF/TOF	2/2	2/2	0/2

Por último, para evitar el posible sesgo debido a la inclusión de cepas que pertenecen a un mismo clon, se analizaron las 17 cepas deficientes en hemolisina δ mediante chips génicos (IDENTIBAC®, Alere, Francia), mostrando su pertenencia a 4 complejos clonados y a 3 fondos genéticos diferentes.

vi. Vínculo con la cronicidad de la infección.

En paralelo a la recopilación de los 168 aislados, se recogieron informaciones clínicas que se refieren a los rasgos agudos frente a los crónicos de la infección o de la colonización por *S. aureus*. Se definió una infección crónica sobre la base de un criterio clínico biológico consistente en recuperar el aislamiento, de hasta 6 meses antes, de una cepa de *S. aureus* que presentaba el mismo antibiograma que la cepa aislada durante el estudio. En el resto de los casos, la infección o la colonización estaban clasificadas como agudas. Por otra parte, también se recogió la presencia de materiales implantables: catéteres, prótesis osteoarticulares o vasculares; frecuentemente considerados vinculados a infecciones crónicas (Hawkins, Huang et al. 2007).

De las 34 cepas aisladas en el curso de las infecciones crónicas, 11 no produjeron hemolisina δ frente a 6 en 134 aislados durante las infecciones agudas, determinando objetivamente un vínculo estadísticamente significativo entre deficiencia en hemolisina δ e infecciones crónicas en análisis univariante ($p=0,001$). Análogamente, el análisis estadístico multivariante encuentra este vínculo entre el defecto en hemolisina δ y la cronicidad de la infección, tanto para SASM ($p=0,023$) como para SARM ($p=0,082$). Por el contrario, no se ha podido encontrar ningún vínculo entre la ausencia de detección de la hemolisina y la presencia de materiales implantables ($p=0,470$).

vii. Vínculo con GISA

Se ha llevado a cabo la investigación de GISA mediante métodos fenotípicos en las 168 cepas recogidas prospectivamente. Cinco se revelaron como GISA y 4 de estas 5 cepas no presentaban ningún pico a 3005 ± 5 Th y a 3035 ± 5 Th (δ). Teniendo en cuenta el reducido número de cepas GISA obtenidas en este estudio, se analizó una colección de 28 cepas de GISA perfectamente caracterizadas por el Centre National de Référence des Staphylocoques con respecto a su producción de hemolisina δ . Nueve cepas de 28 eran δ frente a 13/163 cepas no GISA procedentes del estudio clínico, confirmando, aquí también, el vínculo entre la disfunción del sistema agr y el fenotipo de resistencia GISA ($p=0,001$).

Referencias

- Balaban, N. and R. P. Novick (1995). "Translation of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion." *FEMS Microbiol Lett* 133(1-2): 155-161.
- Bittar, F., Z. Ouchenane, et al. (2009). "MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin." *Int J Antimicrob Agents* 34(5): 467-470.

- Bizzini, A. y G. Greub (2010). "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification." *Clin Microbiol Infect* 16(11): 1614-1619.
- Boles, B. R. y A. R. Horswill (2008). "Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms." *PLoS Pathog* 4(4): e1000052.
- 5 Brunskill, E. W. y K. W. Bayles (1996). "Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 178(3): 611-618.
- Cherkaoui, A., J. Hibbs, et al. (2010). "Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level." *J Clin Microbiol* 48(4): 1169-1175.
- 10 Dauwalder, O., E. Carbonnelle, et al. (2010). "Detection of Panton-Valentine toxin in *Staphylococcus aureus* by mass spectrometry directly from colony: time has not yet come." *Int J Antimicrob Agents* 36(2): 193-194.
- Dufour, P., S. Jarraud, et al. (2002). "High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species." *J Bacteriol* 184(4): 1180-1186.
- 15 Edwards-Jones, V., M. A. Claydon, et al. (2000). "Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry." *J Med Microbiol* 49(3): 295-300.
- Felden, B., F. Vandenesch, et al. (2011). "The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence." *PLoS Pathog* 7(3): e1002006.
- Figueiredo, A. M., S. Jarraud, et al. (2000). "Direct Submission." 2000, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAG03054.1>.
- 20 Fitton, J. E., A. Dell, et al. (1980). "The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*." *FEBS Lett* 115(2): 209-212.
- Fowler, V. G., Jr., G. Sakoulas, et al. (2004). "Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein." *J Infect Dis* 190(6): 1140-1149.
- 25 Goerke, C., S. Campana, et al. (2000). "Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro." *Infect Immun* 68(3): 1304-1311.
- Hawkins, C., J. Huang, et al. (2007). "Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia: an analysis of risk factors and outcomes." *Arch Intern Med* 167(17): 1861-1867.
- 30 Kornblum, J. S., S. J. Projan, et al. (1988). "A rapid method to quantitate non-labeled RNA species in bacterial cells." *Gene* 63(1): 75-85.
- Kreger, A. S., K. S. Kim, et al. (1971). "Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin." *Infect Immun* 3(3): 449-465.
- Otto, M. (2010). "Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Annu Rev Microbiol* 64: 143-162.
- 35 Otto, M. y F. Gotz (2000). "Analysis of quorum sensing activity in staphylococci by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin." *Biotechniques* 28(6): 1088, 1090, 1092, 1096.
- Paizs, B. y S. Suhai (2005). "Fragmentation pathways of protonated peptides." *Mass Spectrom Rev* 24(4):508-548.
- 40 Rose, W. E., M. J. Rybak, et al. (2007). "Correlation of vancomycin and daptomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* in reference to accessory gene regulator (agr) polymorphism and function." *J Antimicrob Chemother* 59(6):1190-1193.
- Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, et al. (2005). "Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (agr) function." *Antimicrob Agents Chemother* 49(7): 2687-2692.
- 45 Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, et al. (2002). "Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin." *Antimicrob Agents Chemother* 46(5):1492-1502.
- Sakoulas, G., H. S. Gold, et al. (2006). "Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteraemia." *J Antimicrob Chemother* 57(4): 699-704.
- 50 Schweizer, M. L., J. P. Furuno, et al. (2011). "Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients." *Antimicrob Agents Chemother* 55(3): 1082-1087.
- Somerville, G. A., A. Cockayne, et al. (2003). "Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity." *J Bacteriol* 185(22): 6686-6694.
- 55 Szabados, F., K. Becker, et al. (2011). "The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Panton-Valentine leukocidin." *Int J Med Microbiol* 301(1): 58-63.
- Tholey, A. and E. Heinzle (2006). "Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives." *Anal Bioanal Chem* 386(1): 24-37.
- 60 Traber, K. y R. Novick (2006). "A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate delta- and alpha-haemolysins." *Mol Microbiol* 59(5):1519-1530.
- Traber, K. E., E. Lee, et al. (2008). "agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates." *Microbiology* 154(Pt 8): 2265-2274.
- 65 Tsuji, B. T., R. D. Maclean, et al. (2011). "Impact of accessory gene regulator (agr) dysfunction on vancomycin pharmacodynamics among Canadian community and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10: 20.

Turner, W. H. (1978). "Purification and characterization of an immunologically distinct delta-hemolysin from a canine strain of *Staphylococcus aureus*." *Infect Immun* 20(2): 485-494.

5 Verdon, J., N. Girardin, et al. (2009). "Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide." *Peptides* 30(4): 817-823.

Vuong, C., H. L. Saenz, et al. (2000). "Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*." *J Infect Dis* 182(6): 1688-1693.

Welker, M. and E. R. Moore (2011). "Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology." *Syst Appl Microbiol* 34(1): 2-11.

10 Wertheim, H. F., D. C. Melles, et al. (2005). "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections." *Lancet Infect Dis* 5(12): 751-762.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de estudio de una muestra que contiene una población bacteriana de *Staphylococcus aureus* mediante una técnica de espectrometría de masas que comprende las siguientes etapas:
- a) Poner la muestra en contacto con un medio que permita la ionización mediante la acción de un rayo láser de las moléculas presentes en la muestra,
 - b) Ionizar las moléculas presentes en la muestra mediante un rayo láser,
 - c) Acelerar las moléculas ionizadas obtenidas mediante una diferencia de potencial,
 - d) Dejar desplazarse libremente las moléculas ionizadas y aceleradas en como mínimo un tubo a presión reducida,
 - e) Detectar al menos una parte de las moléculas ionizadas y aceleradas que se están desplazando libremente, para medir el tiempo que han tardado en recorrer al menos un tubo a presión reducida y obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas detectadas en un instante dado,
 - f) Calcular la relación entre masa y carga [m/z] de las moléculas detectadas, para obtener una señal correspondiente al número de moléculas ionizadas que tienen la misma relación entre masa y carga [m/z], en función de la relación m/z de las moléculas detectadas,
 - g) Determinar, de manera directa o indirecta, si entre las moléculas ionizadas obtenidas en la etapa b), hubo o no moléculas ionizadas de masa/carga [m/z] iguales a 3005 ± 5 Th o iguales a 3035 ± 5 Th,
 - h) Formular una decisión condicionada por el resultado obtenido en la etapa g).
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con la ausencia de hemolisina δ y de su variante G10S en la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con una disfunción del sistema agr ("Accessory Gene Regulator ") con respecto a la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada proviene de una muestra biológica de un paciente y **por que** la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con la formulación por el mencionado paciente, de un diagnóstico clínico conocido por estar vinculado a la disfunción del sistema agr.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 4 **caracterizado por que** la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada proviene de una muestra biológica de un paciente **en que** la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con la formulación por el mencionado paciente.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 4 **caracterizado por que** la etapa h) corresponde a una etapa de correlación de la ausencia a la vez de moléculas ionizadas con m/z igual a 3005 ± 5 Th y de moléculas ionizadas con m/z igual a 3035 ± 5 Th con una clasificación de la población bacteriana de *Staphylococcus aureus* analizada como en riesgo de presentar una sensibilidad disminuida a los glicopéptidos (es decir, GISA).
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por que** la espectrometría de masas se realiza sobre una muestra que contiene una población de 10^4 a 10^9 bacterias, y preferentemente de 10^5 a 10^6 bacterias.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por que** la espectrometría de masas utilizada es la espectrometría de masas (EM) mediante desorción-ionización asistida por matriz y con medida del tiempo de vuelo (MALDI-TOF).
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 **caracterizado por que** la determinación de la etapa g) se deduce de manera directa de la presencia en el espectro de masas obtenido de un pico con un valor de m/z igual a 3005 ± 5 Th o a 3035 ± 5 Th o de la ausencia simultánea de picos a 3005 ± 5 Th y a 3035 ± 5 Th.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado por que** la espectrometría de masas utilizada es la MALDI-TOF/TOF.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizado por que** en la etapa d), las moléculas ionizadas se dejan desplazar a un primer tubo bajo presión reducida, se seleccionan los iones de masa m/z igual a 3005 ± 5 Th y/o de masa m/z igual a 3035 ± 5 Th, se aceleran de nuevo las moléculas ionizadas después de su fragmentación, y las moléculas ionizadas fragmentadas o no se dejan desplazar libremente en un segundo tubo.

12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11 **caracterizado por que** la determinación de la etapa g) se deduce de manera indirecta de la presencia de al menos de cinco fragmentos entre los fragmentos iónicos y b siguientes:

- 5 - los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2005,148, 2118,232, 2219,280, 2306,312, 2419,396, 2532,480, 2647,507, 2775,565, 2846,603 y 2976,635; y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1029,516, 1144,543, 1257,627, 1356,695, 1484,790, 1670,870, 1783,954, 1897,038, 2012,065, 2113,112, 2212,181, 2326,224, 2454,319, 2601,387, 2702,435, 2830,530 y 2958,625, con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th, para el pico a 3005 ± 5 Th, y/o
- 10 - los fragmentos iónicos y de masa 147,113, 275,208, 376,255, 523,324, 651,419, 765,462, 864,530, 965,578, 1080,605, 1193,689, 1306,773, 1492,852, 1620,947, 1720,016, 1833,100, 1948,127, 2035,159, 2148,243, 2249,290, 2336,322, 2449,406, 2562,491, 2677,517, 2805,576, 2876,613 y 3006,646; y los fragmentos iónicos b de masa 131,040, 202,077, 330,136, 445,163, 558,247, 671,331, 758,363, 859,410, 972,494, 1059,526, 1174,553, 1287,638, 1386,706, 1514,801, 1700,880, 1813,964, 1927,048, 2042,075, 2143,123, 2242,191, 2356,234, 2484,329, 2631,398, 2732,445, 2860,540 y 2988,635, con una tolerancia de $\pm 1,5$ Th, para el pico a 3035 ± 5 Th.
- 15

20 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12 **caracterizado por que** el medio con el cual la muestra se pone en contacto corresponde a una matriz adaptada a la EM-MALDI depositada sobre una diana, **donde** el procedimiento contiene además de la etapa b), la obtención de la cristalización de la matriz sobre o en la cual se han adsorbido las moléculas de la muestra.

25 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 **caracterizado por que** la matriz contiene un compuesto seleccionado entre el ácido 3,5- dimetoxi-4-hidroxicinámico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, el ácido ferúlico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

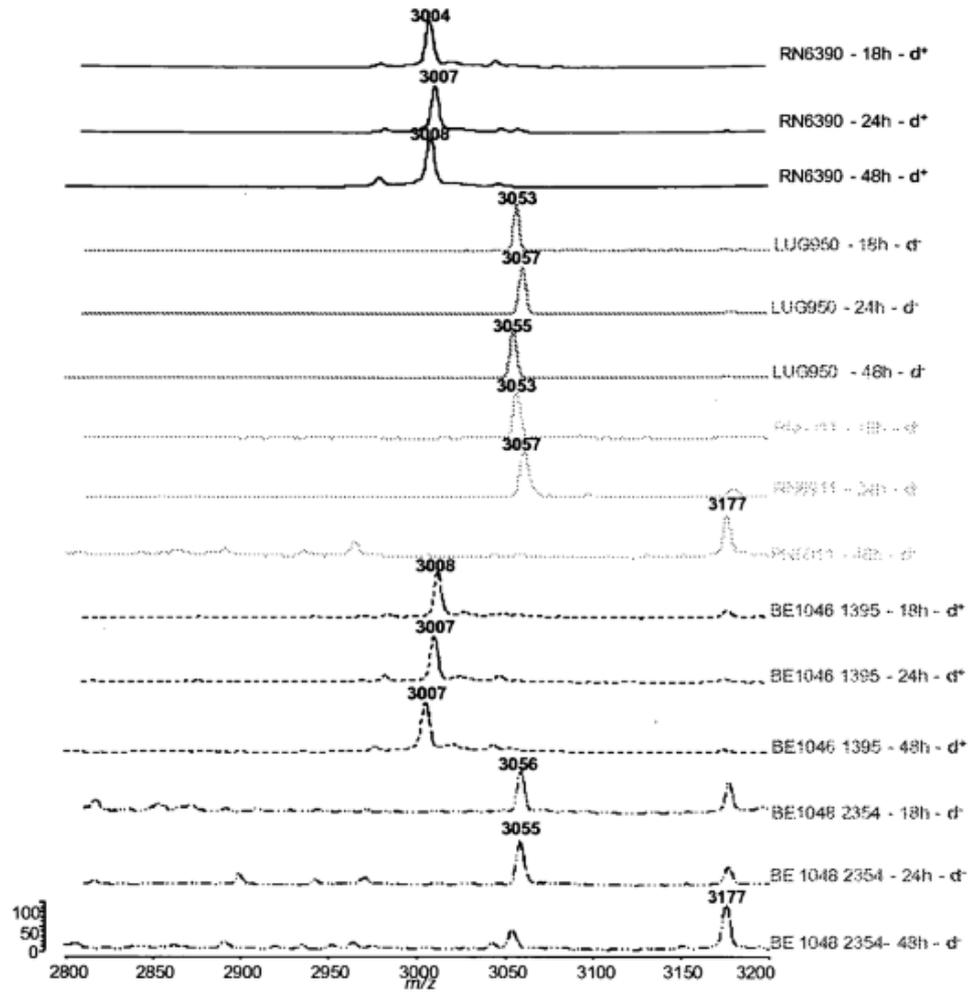


Figura 3

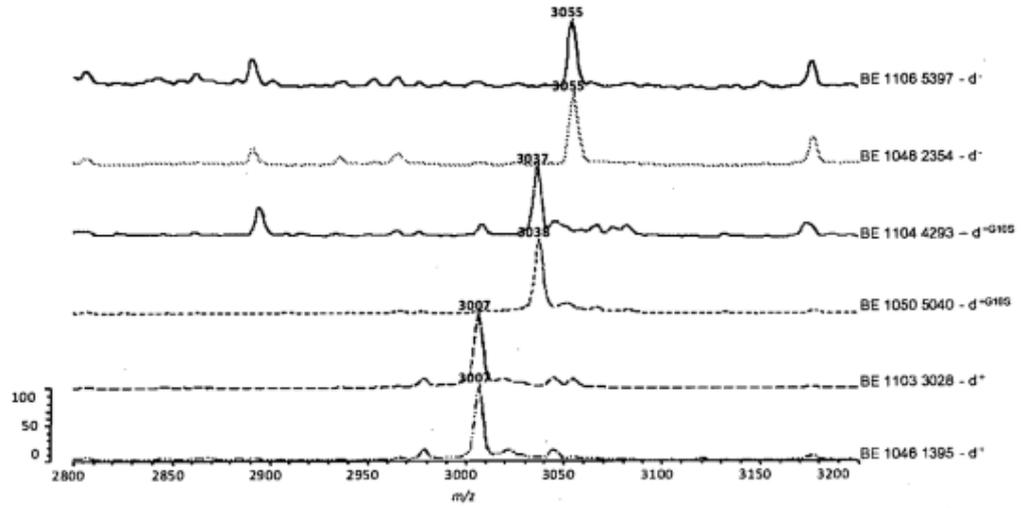


Figura 4