

PROGRAMA DE MEJORA DE LA CALIDAD
PLAN ESTRATEGICO GENERAL 2013-2018
Planes de formación e innovación

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

Implementación de una nueva práctica para el aprendizaje de la identificación mediante MALDI-TOF MS de microorganismos procariotas y eucariotas presentes en alimentos probióticos

Referencia

ID2016/242

Profesor responsable

M^a Encarnación Velázquez Pérez

Otros participantes

Pedro F. Mateos González, Belén Rubio Pérez, Eustoquio Martínez Molina, Carmen Tejedor Gil, José David Flores Félix, Lorena Celador Lera, José Manuel González Buitrago, Fernando Sánchez Juanes

Introducción

En el caso de las ciencias experimentales, se publican frecuentemente innovaciones metodológicas que deben ser incorporadas a la enseñanza práctica en el laboratorio y precisan de la utilización de herramientas que faciliten el proceso de enseñanza-aprendizaje, tanto en lo que respecta a la adquisición de conocimientos como a la de destrezas manuales por parte de los alumnos.

Una de las herramientas fundamentales son los tutoriales en los que se graba en vídeo la práctica para ser visualizada antes de su realización en el laboratorio. Estos vídeo-tutoriales pueden también subirse a plataformas que permiten a los alumnos acceder a ellos tantas veces como deseen sin necesidad de estar en el laboratorio.

Los video-tutoriales son muy útiles en las prácticas de las asignaturas que requieren el manejo de microorganismos, como es el caso de la Biotecnología Farmacéutica, ya que permiten a los alumnos observar la forma correcta de manipularlos y aprender diferentes técnicas básicas en el proceso de enseñanza-aprendizaje de las asignaturas.

También son muy útiles cuando los experimentos no pueden llevarse a cabo en el laboratorio, ya sea total o parcialmente. Este es el caso del MALDI-TOF MS, una técnica que permite la identificación de microorganismos tanto procariotas como eucariotas, pero que es actualmente inaccesible en laboratorios de enseñanzas prácticas debido al costo de las instalaciones y equipamiento necesarios, que además ha de ser manejado por personal especializado.

Debido a que esta metodología permite la identificación de microorganismos tanto procariotas como eucariotas, puede ser utilizada para identificar los presentes en probióticos que contienen bacterias (procariotas) y levaduras (eucariotas). Por lo tanto, nos planteamos incluir en la enseñanza de la asignatura de Biotecnología Farmacéutica del Grado en Farmacia una práctica de identificación de los microorganismos aislados a partir de kefir comercial utilizando MALDI-TOF MS.

Parte de esta práctica, concretamente el aislamiento de los microorganismos a partir de kefir y la preparación de las muestras, se implementó como práctica de laboratorio y el resto del proceso de identificación utilizando MALDI-TOF MS se grabó en forma de video-tutorial que se mostró a los alumnos en el laboratorio de clases prácticas. Los resultados de la identificación de los aislados a partir de kefir se explicaron a los alumnos en el laboratorio después de la visualización del video-tutorial del proceso completo.

Metodología aplicada

Se grabó en video el proceso completo de identificación mediante MALDI-TOF MS de los microorganismos aislados a partir de kefir comercial. Estos microorganismos se aislaron en medio MRS (medio Man, Rogosa y Sharpe), que es especial para el aislamiento de bacterias lácticas y permite también el crecimiento de levaduras, por lo que es muy adecuado para el aislamiento a partir de alimentos probióticos que contienen ambos tipos de microorganismos.

Las colonias aisladas se resuspendieron en 300 µl de agua MilliQ estéril y se añadieron

900 µl de etanol, centrifugándose a 15.500 g durante 2 min. El precipitado se secó al aire durante 1 h y se le añadieron 50 µl de ácido fórmico (70% v/v), mezclándose cuidadosamente antes de añadir 50 µl de acetonitrilo. Se centrifugó de nuevo a 15.500 g durante 2 min y 1 µl del sobrenadante se colocó sobre la placa de acero dejándose secar a temperatura ambiente antes de proceder al análisis mediante MALDI-TOF MS. Los resultados de la identificación se basan en una escala de valores que proporciona la casa comercial (Bruker en este caso). Valores entre 2.3 y 3.0 indican buena identificación a nivel de especie; valores entre 2.0 y 2.299 indican buena identificación a nivel de género y una posible buena identificación a nivel de especie, valores entre 1.7 y 1.999 indican buena identificación a nivel de género, pero no de especie y valores menores de 1.7 indican no identificación.

La grabación del video se realizó utilizando una cámara Sony HandyCam DCR-SR77E. A continuación, se utilizó el programa informático Windows Live Movie Maker 14.0.8091.0730 en un ordenador HP a6641es con procesador Intel Core 2 Quad Q8200 a 2,33GHz. Tras la edición y maquetado del archivo de video se procedió a realizar la grabación en formato CD haciendo uso del programa informático CyberLink PowerStarter 7.0.2216

Resultados

Los resultados obtenidos en función de los objetivos previstos en el presente proyecto se exponen a continuación:

1. Se ha elaborado un tutorial en video digital sobre la identificación de bacterias y levaduras aisladas a partir de un alimento probiótico, el kefir, utilizando MALDI-TOF MS que incluye.

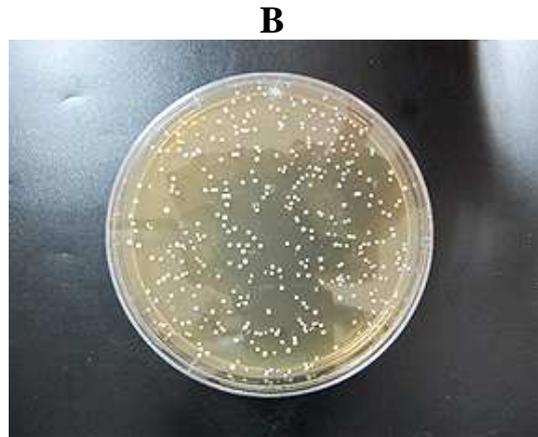
- El aislamiento de los microorganismos en medio MRS y la preparación de las muestras para ser analizadas mediante esta tecnología.
- La lectura de los resultados después del análisis que nos permitieron la identificación de los microorganismos aislados (ver Tabla 1).

2. Se ha implementado esta práctica en la asignatura de Biotecnología Farmacéutica de cuarto curso del Grado de Farmacia.

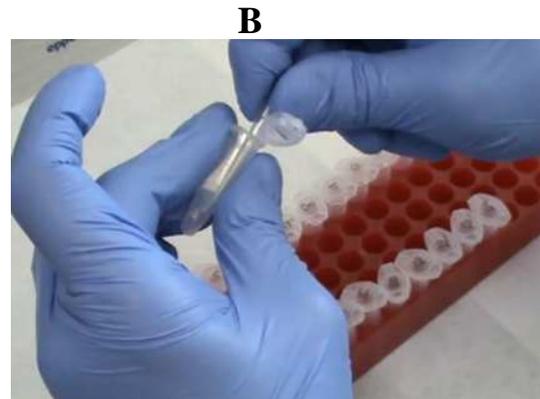
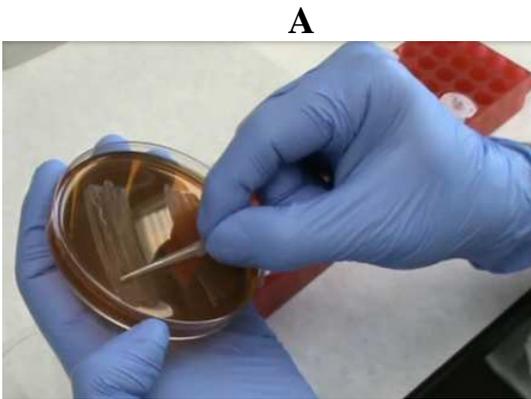
- En las prácticas en laboratorio real se ha llevado a cabo la primera fase del proceso que consiste en el aislamiento de las colonias a partir del kefir después de ser visualizados otros video-tutoriales, que se han realizado en el transcurso de varios proyectos de innovación docente previos, en los que los alumnos aprenden a realizar diluciones decimales seriadas y el aislamiento de bacterias presentes en alimentos probióticos.
- Posteriormente, a los alumnos se les ha mostrado el video-tutorial completo que se grabó utilizando las colonias aisladas por ellos en el laboratorio y finalmente se le ha explicado los resultados obtenidos utilizando MALDI-TOF MS.
- Finalmente se les ha realizado una encuesta a los alumnos sobre sus percepciones sobre la consecución de objetivos (ver más adelante en esta Memoria) y un cuestionario sobre los conocimientos adquiridos después de realizar la práctica.

A continuación se exponen los puntos básicos del video-tutorial mediante capturas de pantallas del mismo:

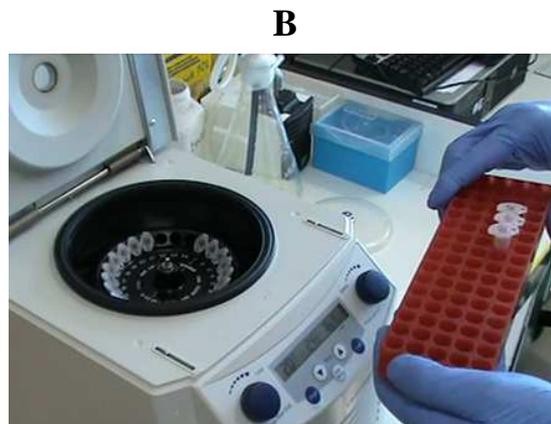
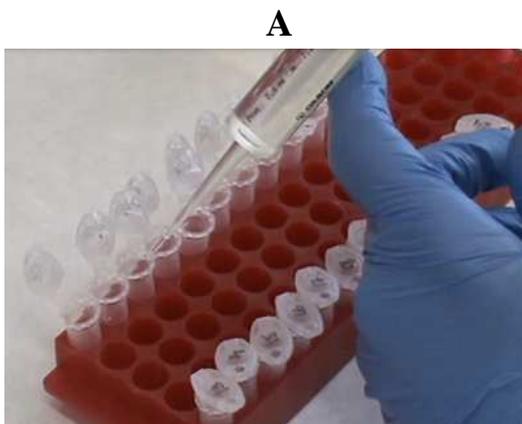
1. Para aislar los microorganismos se utilizó un kefir comercial y el medio MRS (A). Después de realizar diluciones decimales seriadas del kefir hasta 10^{-3} se inocularon las placas de MRS a partir de cada una de las diluciones y se aislaron colonias (B) de diferente morfología macroscópica para llevar a cabo la identificación mediante MALDI-TOF MS.



2. Se obtuvo un cultivo puro a partir de cada una de las colonias aisladas en placa (A) y se pasaron a tubos eppendorff para proceder a la extracción de las proteínas (B).

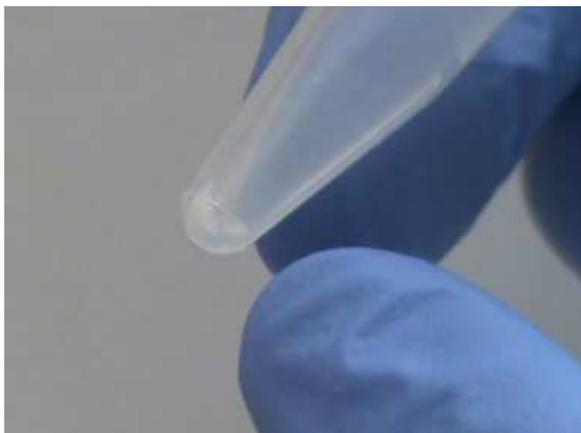


3. Las células se resuspendieron en agua MiliQ estéril (A) y se centrifugaron (B).



4. El precipitado (A) se sometió a un tratamiento con ácido fórmico y acetonitrilo (B)

A



B

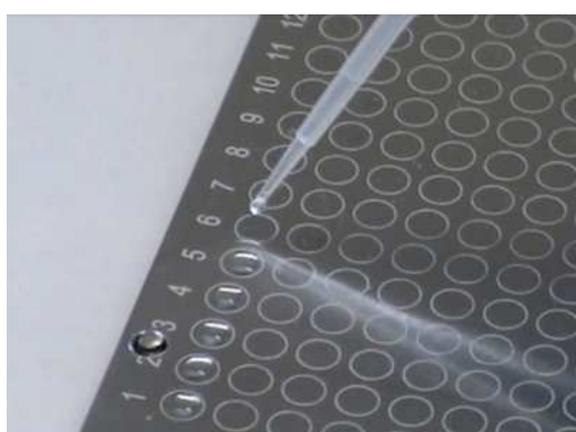


5. La muestra de cada cepa se colocó en la placa de acero (A), se dejó secar, y se cubrió con la matriz (B).

A



B

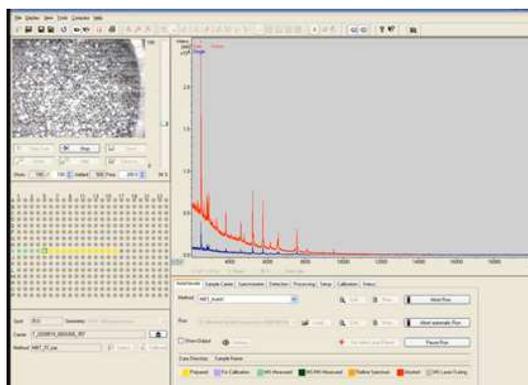


6. La placa se lee en el equipo de MALDI-TOF MS (A) que obtiene los espectros de proteínas de cada una de las muestras (B).

A



B



7. Después de comparar los espectros de cada cepa con los depositados en la base de datos Biotyper, se ofrecen los resultados marcados en verde para valores superiores a 2.0.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper
Resultados de la identificación

Bruker Logo

Información sobre el proyecto:

Nombre del proyecto: 041007_Xacaras_Pepe_Kefir
 Descripción del proyecto: Adquisición @MALDI
 Autor del proyecto: 2016-10-07T11:49:24 CDT
 Fecha Hora de creación del proyecto: 24
 Número de muestras: Desarrollo
 Tipo de proyecto: autómata
 Validación: Procedura de validación

Resumen de resultados

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación
A1 (++) (C)	LETKEF 7	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99
A10 (++) (C)	LETKEF 11	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99
A11 (++) (C)	LETKEF 12	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99
A12 (++) (C)	LETKEF 12	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99
A17 (++) (C)	LETKEF 13	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99
A14 (++) (C)	LETKEF 13	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99	<i>Candida kefyr</i> (tax) (Klebsaniaceae, Saccharomycetes)	1.99
A15 (++) (A)	LETKEF 14	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99
A16 (++) (A)	LETKEF 14	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99	<i>Lactococcus lactis</i>	1.99

Los resultados de la identificación mediante MALDI-TOF mostraron que en el kefir están presentes bacterias y levaduras y los resultados de la identificación utilizando esta técnica mostraron que todas las cepas de levaduras pertenecían a la especie *Candida kefyr*, mientras que las bacterias fueron identificadas como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteoides*, todas ellas pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas.

Al finalizar las prácticas se llevó a cabo una encuesta de percepción de objetivos que se muestra a continuación.

Encuesta de percepciones sobre consecución de objetivos

- A Totalmente de acuerdo
- B De acuerdo
- C Dudoso
- D En desacuerdo
- E Totalmente en desacuerdo

1. Después de la realización de la práctica me considero capaz de realizar un aislamiento de microorganismos para identificarlos mediante MALDI-TOF MS
 - A B C D E
2. Después de la realización de la práctica me considero capaz de interpretar los resultados obtenidos en el MALDI-TOF MS
 - A B C D E
3. Después de la realización de la práctica me considero capaz de comprender la utilidad del sistema MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos
 - A B C D E

4. La realización de esta práctica no me ha descubierto nada que no conociera ya

A B C D E

5. La práctica me ha permitido conocer aspectos tanto teóricos como prácticos a los que no hubiera podido acceder por los métodos convencionales de enseñanza práctica.

A B C D E

6. Considero la enseñanza basada en sistemas audiovisuales un complemento imprescindible de la enseñanza práctica tradicional

A B C D E

7. La realización de esta práctica me ha permitido profundizar en el conocimiento de los alimentos probióticos

A B C D E

8. La práctica me ha ayudado a conocer las posibilidades del sistema de identificación de microorganismos MALDI-TOF MS

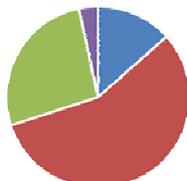
A B C D E

9. La práctica permite familiarizarse con los pasos a seguir en un proceso de identificación de microorganismos a partir de una muestra de probióticos

A B C D E

Los resultados mostraron que la mayoría de los alumnos se consideraban capaces al finalizar la práctica de realizar un aislamiento de microorganismos e interpretar los resultados del MALDI-TOF MS comprendiendo su utilidad y posibilidades (preguntas 1 al 3 y 8). Además consideraban que la práctica les aportaba conocimientos no adquiridos anteriormente (preguntas 4 y 5), profundizando en el conocimiento de los alimentos probióticos y de la identificación de los microorganismos presentes en ellos (preguntas 7 y 9). Finalmente la mayoría de los alumnos consideraron los sistemas audiovisuales un complemento imprescindible de la enseñanza práctica tradicional (pregunta 6).

Parte 1_Pregunta 1



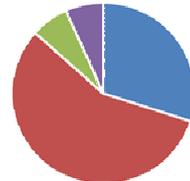
A B C D E

Parte 1_Pregunta 2



A B C D E

Parte 1_Pregunta 3



A B C D E

Parte 1_Pregunta 4



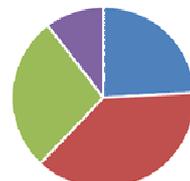
A B C D E

Parte 1_Pregunta 5



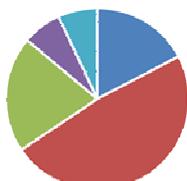
A B C D E

Parte 1_Pregunta 6



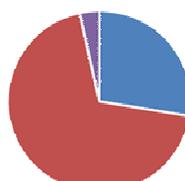
A B C D E

Parte 1_Pregunta 7



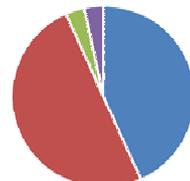
A B C D E

Parte 1_Pregunta 8



A B C D E

Parte 1_Pregunta 9



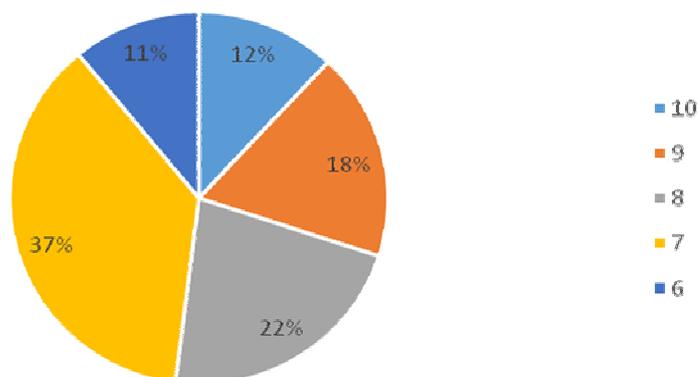
A B C D E

En cuanto al cuestionario sobre los conocimientos adquiridos sobre la identificación de microorganismos utilizando MALDI-TOF MS, se realizó al igual que la encuesta de forma anónima y las preguntas formuladas se muestran a continuación:

Cuestionario sobre los conocimientos adquiridos sobre MALDI-TOF MS

1. El MALDI-TOF MS es una técnica basada en el análisis de: a) ácidos nucleicos b) lipopolisacáridos c) poliaminas d) ácidos grasos e) proteínas
2. Permite identificar: a) sólo procariotas b) sólo eucariotas c) procariotas y eucariotas d) bacterias y levaduras e) la c y la d son correctas
3. Las limitaciones de la técnica: a) es un proceso más lento que la secuenciación b) la base de datos contiene muchos microorganismos, pero no todos c) permite identificar todas las especies clínicas, pero no todas las especies ambientales d) la a y la b son correctas e) la b y la c son correctas
4. El MALDI-TOF MS se basa en: a) la obtención de bandas de proteínas en un gel b) la obtención de espectros de proteínas mediante espectrometría de masas c) la obtención de secuencias de proteínas d) la valoración cuantitativa de proteínas totales mediante espectrometría UV e) todas son correctas
5. La identificación se basa en: a) la comparación de secuencias de proteínas frente a una base de datos b) la comparación de los espectros de proteínas de una muestra problema frente a los espectros de una base de datos c) el cálculo de similitudes que se traducen a una puntuación numérica d) la a y la c son correctas e) la b y la c son correctas
6. Los valores de similitud indican: a) buena identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2.3 y 3 b) probable identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2 y 2.3 c) buena identificación a nivel de genero cuando oscilan entre 2 y 2.3 d) probable identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2 y 2.3 e) todas son correctas
7. Es una técnica especialmente útil para: a) identificar las bacterias y levaduras ambientales b) identificar las bacterias patógenas c) identificar bacterias y levaduras presentes en alimentos d) la a y la b son correctas e) la b y la c son correctas
8. El kefir es un alimento que contiene: a) sólo bacterias b) sólo levaduras c) bacterias y levaduras d) procariotas y eucariotas e) la c y la d son correctas.
9. Utilizando MALDI-TOF MS se ha identificado en el kefir: a) *Candida parapsilosis* b) *Candida kefir* c) *Kluyveromyces lactis* d) la a y la b son correctas e) la b y la c son correctas
10. Utilizando MALDI-TOF MS se han identificado en el kefir: 1= *Lactobacillus plantarum* 2= *Lactococcus lactis* 4= *Leuconostoc paramesenteroides* 8= *Streptococcus thermophilus* 16= *Lactobacillus casei*: a) 7 b) 3 c) 6 d) 5 e) 19 f) 11

Los resultados obtenidos mostraron que más de la mitad de los alumnos (52%) contestaron de forma correcta a 8 ó más preguntas del cuestionario, y que casi un 90% de los alumnos contestaron correctamente a 7 ó más preguntas.



Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que el video-tutorial sobre MALDI-TOF MS y su aplicación a la identificación de microorganismos fue muy útil para la adquisición de conocimientos sobre esta técnica teniendo en cuenta tanto las apreciaciones de los propios alumnos como los resultados del cuestionario, ya que la totalidad de los alumnos fue capaz de responder correctamente a más de la mitad de las preguntas de dicho cuestionario.