

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2024

152

Antonio Beltrán Rosel

Utilidad de MALDI-TOF MS en la identificación de garrapatas de interés médico

Director/es

Oteo Revuelta, José Antonio
Benito Ruesca, Rafael

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Premsas de la Universidad
Universidad Zaragoza



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

UTILIDAD DE MALDI-TOF MS EN LA
IDENTIFICACIÓN DE GARRAPATAS DE INTERÉS
MÉDICO

Autor

Antonio Beltrán Rosel

Director/es

Oteo Revuelta, José Antonio
Benito Ruesca, Rafael

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2023



**Universidad
Zaragoza**

Tesis Doctoral

Utilidad de MALDI-TOF MS en la identificación de
garrapatas de interés médico

Autor

Antonio Beltrán Rosel

Director/es

José Antonio Oteo Revuelta
Rafael Benito Ruesca

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza
2023

**“Sin importar lo grande que sea tu dedicación,
nunca ganas nada por tu cuenta”**
Rafael Nadal.

“It is better to fail in originality than succeed in imitation”
Herman Melville.

**“The road to success and the road to failure are almost exactly the
same”**
Colin R. Davis.

**“Lograr aquello que has soñado te hace feliz, pero, sobre todo, te
hace feliz recordar el esfuerzo empleado para lograrlo”**
Rafael Nadal.

Agradecimientos

Estas citas resumen perfectamente lo que ha sido a nivel personal el período de doctorado (2017-2023). Dijo el escritor Herman Melville que, es mejor fracasar en la originalidad que triunfar en la imitación. Porque originalidad es una de las cualidades que definen el objeto de mi investigación. Sin embargo, no fui yo quien le eché el ojo a estos queridos (y odiados) artrópodos. Fue el Dr. Oteo quien, tras una clase magistral en el congreso de la Sociedad Internacional de Medicina del Viajero en Barcelona me propuso el tema de mi investigación. Sin la propuesta de José Antonio, yo no estaría escribiendo esta memoria. No recuerdo cuánta gente me ha preguntado a lo largo de estos años, ¿por qué garrapatas?, ¿no había otro tema para elegir? Resulta que a mí siempre me ha gustado la originalidad y me he alejado de la vulgaridad, así que, retrospectivamente, creo que elegí (elegimos) bien el objeto de mi investigación. Parafraseando al compositor británico Colin R. Davis, el camino hacia el éxito y el camino al fracaso es casi el mismo. Cuando inicias el camino no sabes cómo va a ser el viaje, desconoces dónde y, sobre todo cuándo está la meta y, sobre todo, si va a ser un camino exitoso o va a terminar en fracaso. El mío fue un camino con muchas piedras, algunas esperadas y otras no, pero el final, ahora estoy seguro, fue exitoso. Como dice uno de mis grandes héroes, Rafael Nadal, “lograr aquello que has soñado te hace feliz, pero, sobre todo, te hace feliz recordar el esfuerzo empleado para lograrlo”. Y como también dice Rafa, no puede conseguirse ningún logro por cuenta propia, porque siempre hay un equipo detrás que, de una u otra forma, te han ayudado a conseguir tus logros. Al igual que Nadal, yo he tenido la inmensa fortuna de no haber recorrido este camino sólo; mucha gente que me ha ayudado, impulsado, en el proceso. Ha sido una especie de camino de Santiago...Aquí van unas dedicatorias a los caminantes que me han ayudado a recorrer el camino.

En primer lugar, gracias a mis dos directores, el Dr. José Antonio Oteo Revuelta y el Dr. Rafael Benito Ruesca, por su maestría en la dirección en el proceso de investigación. Yo siempre había pensado que, en la encrucijada que supone la toma de decisión de realizar (o no) un doctorado, la elección de los directores es incluso más importante que la propia materia a investigar. Ahora, puedo decir que estaba en lo cierto.

Gracias a todos los facultativos, residentes, técnicos de laboratorio y resto de compañeros de trabajo por haberme ayudado, escuchado, entendido o, simplemente haber compartido un café conmigo en algunas de las innumerables mañanas o tardes en el laboratorio. Gracias a todos, porque todos habéis aportado vuestro granito de arena.

Gracias a Ángel, amigo desde el colegio, la carrera, la residencia en el hospital. Hemos encendido y apagado farolas, subido a camiones de la basura, jugado al tenis con paraguas, etc. Eres es un recurso inagotable de información y consejos. Eres como los canarios, siempre te enteras una hora antes que los demás. Gracias, de verdad, amigo.

Encarna Rubio, por tu ayuda en el manejo del Excel en los comienzos de

mi investigación, cuando tenía que analizar los espectros de masas en formato .csv. Un placer haber trabajado juntos.

Una de mis dos estancias en un centro externo como parte del programa de doctorado en la Facultad de Medicina, la realicé en el Hospital de Donostia. Nada hubiera sido igual sin la plena dedicación de María Ercibengoa (y el resto del equipo del servicio de microbiología). Me hicieron sentir realmente como en casa. Me encantaba San Sebastián. Ahora todavía más.

Francesc Márquez, de Bruker. Mi tesis es un antes y un después, desde la aparición de Francesc. Así de claro. Tus conocimientos en espectrometría de masas son de nivel Wikipedia. Tu disponibilidad, del 100 %. Tus consejos en el manejo del espectrómetro de masas han cambiado el rumbo de mi tesis. Tal cual. Un abrazo enorme, Francesc.

Esta memoria no habría sido posible hacerla sin la ayuda de Ignacio Martínez y Carlos Galve, con su ayuda inestimable en la edición del texto.

María Pilar Goñi Cepero, Pili. ¿¿!!!Qué puedo decir de Pili??!!!. Nos conocemos desde que hice la residencia en el Hospital Lozano Blesa. Compartimos algunos de los gustos más raros que se pueden tener, los parásitos. Pili me ha ayudado en la tesis como una tercera directora. Tu experiencia en el laboratorio es impagable y siempre has propuesto soluciones ante los problemas que he tenido (no pocos). Cuando no has encontrado soluciones, simplemente me has escuchado. Así que, de una u otra forma, siempre me has ayudado. En cualquier momento, a cualquier hora, 24/7. Gratitudes eternas, Pili!.

Y finalmente, la familia. La tesis, en realidad, no la realiza el doctorando. Mejor dicho, no la realiza sólo el doctorando. La realiza toda la familia. Porque para poder realizar la investigación, con miles y miles de horas invertidas, en horario extralaboral, es necesario un soporte familiar. En caso contrario es, simplemente imposible. No podré nunca agradecer lo suficiente el apoyo incondicional que he recibido de mis suegros, Javier e Isabel, y de mis padres, Blanca y Antonio. Espero que todo el esfuerzo realizado os haga sentir orgullo de vuestro hijo.

Y por supuesto, mi agradecimiento infinito a mi mujer, Beatriz, que fue quien desde el principio me animó e impulsó a realizar los estudios de doctorado, a levantarme cada vez que me tropezaba en el camino, quien me animaba cuando los resultados no fueron los esperados, quien siempre estaba allí. Te quiero reina. Espero que este trabajo sirva de ejemplo a mis tres princesas, Olivia, Goya y Beatriz, y pueda transmitirles algunos de los valores que son necesarios para poder realizar esta investigación: sacrificio, esfuerzo, curiosidad, motivación, paciencia, inconformismo, trabajo en equipo, meticulosidad y responsabilidad.

Gracias a todos por haber posible este sueño. Os quiero a todos.

Resumen

En España, al igual que en otros países del mundo, el espectro de enfermedades transmitidas por garrapatas, así como su incidencia, han aumentado en los últimos años. Ante un paciente con una picadura de garrapata, la identificación a nivel de especie del ejemplar puede ser complicado fuera del ámbito de los centros especializados. En base al hecho de que, las infecciones transmitidas por la picadura de garrapatas muestran una marcada especificidad vectorial, conocer la identidad de la garrapata puede resultar muy útil en la toma de decisiones clínicas, incluyendo, entre otras, la necesidad (o no) de instaurar un tratamiento antibiótico. Los métodos clásicos de identificación consisten en la inspección visual del espécimen y las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Sin embargo, ninguno de estos métodos está exento de limitaciones en términos de costes, tiempo de entrega de resultados, laboriosidad, necesidad de personal altamente entrenado, etc.

En los últimos años, la espectrometría de masas por desorción-ionización con láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), ha sido aplicada con éxito en la identificación de garrapatas. Sin embargo, el conocimiento acerca del rendimiento de esta tecnología en un contexto clínico (con pacientes reales) es mucho más limitado. Los objetivos del presente estudio fueron, en primer lugar, la optimización de un protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros; en segundo lugar, la construcción de una biblioteca de espectros de referencia, suficientemente representativa. Dicha biblioteca fue construida a partir de los espectros adquiridos a partir de muestras de extremidades de garrapatas. Las especies de garrapatas que fueron incluidas en la biblioteca incluyen aquellas que suelen picar a humanos en España: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus* y *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. También se incluyeron aquellas especies que, con menor frecuencia, también están involucradas en picaduras a humanos en nuestro país: *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis concinna*, *Hyalomma scupense*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes hexagonus* y *Argas* sp. Los especímenes fueron identificados, primero visualmente, y posteriormente mediante PCR y secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S.

La validación del protocolo se ejecutó mediante la realización secuencial de diversos test. En los primeros de estos ensayos de validación, realizados con especímenes recolectados de diversas fuentes, excepto pacientes, se obtuvo una correlación del 100% entre los métodos moleculares y la espectrometría de masas. En las segundas de estas pruebas, realizadas exclusivamente con garrapatas retiradas de pacientes, se observó una correlación del 92.59%, y todas las especies estudiadas obtuvieron unas puntuaciones de identificación discretamente inferiores respecto a los resultados obtenidos en los primeros ensayos. Sólo se obtuvo la identificación incorrecta en el caso de dos ninfas de *I. ricinus*, las cuales fueron identificadas como *Ctenocephalides felis* (una especie de pulga). Sin

embargo, el problema de discriminación entre estas dos especies difícilmente presente un impacto clínico apreciable, debido a que ambas especies de artrópodos presentan rasgos morfológicos muy diferenciados.

Tras la validación del protocolo, la tecnología MALDI-TOF MS fue incorporada en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa como la técnica de primera elección en la identificación de garrapatas. Tras quince meses de experiencia clínica, los resultados obtenidos permitieron confirmar el excelente rendimiento observado en los ensayos de validación. Un total de 34 ejemplares fueron remitidos al laboratorio para su identificación, de los cuales 33/34 (97,06 %) obtuvieron una identificación correcta. Tan sólo un ejemplar adulto de *R. sanguineus* s.l. fue incorrectamente identificado como *R. pusillus*, ambos con un score de identificación prácticamente idénticos (1,93 vs 1,92).

Por tanto, la tecnología MALDI-TOF MS puede ser utilizada como herramienta de identificación de garrapatas, con la rápida obtención de resultados altamente fiables. De manera clave, el conocimiento de dicha información puede ayudar al clínico a la toma de importantes decisiones, que incluyen entre otras actitudes: la indicación (o no) de administrar un antibiótico, el seguimiento del paciente (la aparición de qué síntomas, y durante cuánto tiempo deben ser vigilados), la selección de pruebas serológicas. Por último, la simplicidad del protocolo que ha sido cuidadosamente optimizado durante la presente investigación permite que su implementación sea sumamente asequible para cualquier laboratorio clínico (con una inversión inicial mínima) que esté dotado de un espectrómetro de masas.

Utilidad de MALDI-TOF MS en la identificación
de garrapatas de interés médico

Antonio Beltrán Rosel

2023

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.	12
1.1.	Garrapatas. Biología e importancia sanitaria.	12
	Introducción	12
	Importancia en Salud Pública de las enfermedades transmitidas por garrapatas.	12
	Taxonomía de las garrapatas	16
	Morfología de las garrapatas	17
	Ciclo de vida de las garrapatas	18
	Las garrapatas y su capacidad vectorial	21
	Identificación de las garrapatas	24
	Identificación morfológica	24
	Identificación por métodos moleculares	24
	Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas	26
	Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas en España	26
	Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas en Europa	35
	Coinfecciones por varios patógenos	36
	Otras patologías y complicaciones producidas por las picaduras de garrapatas	36
1.2.	Descripción de la tecnología MALDI-TOF MS y sus aplicaciones el campo de la microbiología clínica.	38
	Breve reseña histórica sobre la espectrometría de masas	38
	Fundamentos de la tecnología MALDI-TOF MS	38
	Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en microbiología clínica	42
	Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de artrópodos	43
	Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de garrapatas	44
2.	OBJETIVOS	46
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.	47
3.1.	Lista de Materiales y Equipos	47

3.2.	Optimización del protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas.	49
3.3.	Evaluación del impacto de las variables seleccionadas sobre la fragmentación de las patas y/o en el espectro adquirido.	51
	Identificación de los ejemplares de garrapatas.	53
3.4.	Selección de las especies de garrapatas y sus estadios, así como otras especies de artrópodos, que deberían incluirse en la biblioteca de espectros	54
3.5.	Aspectos relacionados con la espectrometría de masas: adquisición, análisis y procesamiento de los espectros	56
	Adquisición de los espectros.	57
3.6.	Visualización y evaluación de la calidad de los espectros. .	57
	Metodología para la creación de espectros de referencia. .	59
	Pruebas realizadas para validar el protocolo optimizado de extracción proteica y adquisición de espectros de masas	62
4.	RESULTADOS	66
4.1.	Optimización de un protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas a partir de patas de garrapatas	66
	Fragmentación de las patas con microesferas de 0,5 mm .	72
	Fragmentación de las patas con palillos de madera en distintas concentraciones de ácido fórmico	73
	Aplicación secuencial de palillos de madera y microesferas en la fragmentación de extremidades.	74
	Número de patas	75
	Fragmentación de las patas con micropistilos o con palillos de madera	78
	Tipo de micropistilo (acero o plástico) empleado en la fragmentación de las patas.	79
	Fragmentación de las patas en solución de reactivos de extracción proteica.	80
	Fragmentación de las patas en solución de reactivos de extracción proteica y con la aplicación secuencial de dos métodos de homogeneización	82
	Protocolo de extracción proteica diseñado para la extracción proteica en actinomicetos	83
	Volumen del ácido fórmico	85
	Uso del ácido fórmico en su formulación pura o AF diluido al 80 %	86
	Extracción proteica con ácido fórmico, en ausencia de acetónitrilo	89
	Ratio de muestra:matriz de 1:2. Depósitos secuenciales de muestra y matriz	91
	Ratio de volumen muestra:matriz de 2:1 y 3:1	93

	Depósito simultáneo de muestra y matriz en la placa de depósito de muestras	94
	Aumento de los volúmenes de muestra y matriz, en proporción 1:1.	95
	Cristalización de la matriz	96
	Potencia del láser	103
	Depósitos de muestra y matriz sobre una placa pre-calentada	107
	Optimización del protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas: conclusiones. . .	110
	Protocolo, implementado en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, para la extracción proteica y adquisición de espectros de masas destinado a la caracterización de garrapatas	113
	Biblioteca de espectros de referencia.	114
4.2.	Ensayos EC: pruebas de validación realizadas con ejemplares recolectados de diversas fuentes, mayoritariamente vegetación.	114
4.3.	Ensayos ENR: pruebas de validación realizadas con ejemplares recolectados de diversas fuentes, correspondientes a especies no incluidas en la biblioteca de espectros	120
4.4.	Ensayos EP: pruebas de validación realizadas con ejemplares retirados de pacientes	123
	Análisis de los espectros de masas correspondientes a <i>Ixodes ricinus</i> y <i>Ctenocephalides felis</i>	127
	Análisis de los espectros del resto de especies de garrapata.	133
4.5.	Rendimiento de la técnica MALDI-TOF MS en un contexto clínico: experiencia del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa tras quince meses desde su implementación.	149
5.	DISCUSIÓN	156
6.	CONCLUSIONES	170
7.	BIBLIOGRAFÍA	171

Índice de Tablas

1.	Especies de garrapatas descritas en España	31
2.	Ejemplares de garrapatas utilizados en la fase de optimización proteica y adquisición de espectros	69
3.	Ejemplares de garrapatas utilizados para la creación de la biblioteca de espectros de referencia	115
4.	Ejemplares de garrapatas utilizados en los ensayos de validación “EC”	118
5.	Resultados de los ensayos de validación EC	119
6.	Ejemplares de garrapatas utilizados para la realización de los ensayos de validación ENR	121
7.	Resultados de los ensayos de validación ENR	122
8.	Ejemplares de garrapatas utilizados en los ensayos de validación EP	125
9.	Resultados de los ensayos de validación EP	126
10.	Diferencias en el promedio de número de picos correspondientes a espectros de garrapatas según el sitio de su recolección	141
12.	Resultados de la identificación por MALDI-TOF MS de las garrapatas remitidas al Hospital Lozano Blesa para su identificación en el período abril 2022-Julio 2023	150

Índice de figuras

1.	Tendencia de casos registrados en EEUU durante el periodo 2004-2019 de diversas enfermedades transmitidas por garrapatas	13
2.	Tendencia de los casos registrados en Noruega durante el periodo 1995-2015 de diversas enfermedades transmitidas por garrapatas	14
3.	Evolución de la carga hospitalaria de borreliosis de Lyme en España durante el período 2005-2019	15
4.	Evolución de los casos declarados de fiebre botonosa mediterranea en Aragón durante el período 2014-2022	15
5.	Vista ventral (arriba) y dorsal (abajo) de dos garrapatas. Izquierda: argásido o garrapata blanda <i>Argas verpertilionis</i> . Derecha: ixódido o garrapata dura <i>Ixodes ricinus</i> . Fuente: Palomar, 2017.	18
6.	Vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha) del capítulo de una hembra de <i>Dermacentor</i> sp.	19
7.	Vista dorsal de hembra de <i>Dermacentor</i> sp.	19
8.	Vista interna de hembra de <i>Amblyomma</i> sp.	20
9.	Ciclo de vida, trifásico, de <i>Ixodes ricinus</i>	21
10.	Claves morfológicas para la identificación de la familia <i>Ixodidae</i>	25
11.	Distribución geográfica de la especie <i>Dermacentor reticulatus</i> en Europa.	27
12.	Distribución geográfica de la especie <i>Hyalomma lusitanicum</i> en Europa.	27
13.	Distribución geográfica de la especie <i>Hyalomma marginatum</i> en Europa.	28
14.	Distribución geográfica de la especie <i>Ixodes ricinus</i> en Europa.	28
15.	Distribución geográfica de la especie <i>Rhipicephalus bursa</i> en Europa.	29
16.	Distribución geográfica de la especie <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato en Europa.	29
17.	Funcionamiento básico de la tecnología MALDI-TOF MS.	40
18.	Ejemplo de un espectro de masas de una ninfa de <i>Ixodes ricinus</i>	41
19.	Dictamen del comité de ética de investigación con medicamentos de La Rioja (CEImLAR)	50
20.	Diferencias en el número de picos en el espectro. Ejemplo de una ninfa de <i>Ixodes ricinus</i>	51

21.	Diferencias en la intensidad de picos en el espectro. Ejemplo de una ninfa de <i>Ixodes ricinus</i>	52
22.	Diferencias en la intensidad de los picos en el espectro, según la potencia del láser. Ejemplo de un adulto de <i>Dermacentor marginatus</i>	52
23.	Configuración del número máximo de picos a ser mostrados en flexAnalysis	58
24.	Aplicación de las correcciones de los espectros en flexAnalysis	58
25.	Creación de espectros de referencia. Calidad de los espectros adquiridos: ejemplo de espectros rechazados por superar el máximo desplazamiento tolerable	60
26.	Creación de espectros de referencia. Calidad de los espectros adquiridos: máximo desplazamiento tolerable	60
27.	Creación de espectros de referencia. Introducción de metadatos en los archivos de los espectros de referencia	61
28.	MBT Compass Explorer: visualización “en espejo” de los picos de una muestra problema, por un lado, y los de un espectro de referencia, por otro	64
29.	MBT Compass Explorer: listado (por orden decreciente de similitud de la muestra problema con los espectros), de identificaciones posibles.	64
30.	Criterios de calidad de un espectro: número de picos	70
31.	Criterios de calidad de un espectro: intensidad de los picos	71
32.	Criterios de calidad de un espectro: resolución	71
33.	Fragmentación de las patas de garrapata con microesferas de circonio-sílice	72
34.	Fragmentación de las patas de garrapata con palillos de madera	74
35.	Fragmentación de las patas de garrapata con micropistilo de plástico y agitación con vórtex	79
36.	Fragmentación de las patas de garrapata con micropistilo de acero	81
37.	Fragmentación de las patas de garrapata con micropistilo de plástico. Adhesión de los fragmentos a las paredes del micropistilo y del tubo eppendorf	82
38.	Diferencias en la cristalización de la matriz, según el tratamiento de la muestra: ácido fórmico con/sin acetonitrilo	90
39.	Diferentes patrones de cristalización de la matriz	90
40.	Cristalización de la matriz fuera de la zona de depósito de muestras	91
41.	Cristalización de la matriz, con cristales de gran tamaño heterogéneamente distribuidos por la superficie del pocillo	97
42.	Exposición prolongada de la muestra al ácido fórmico: efectos sobre el espectro de masas	100
43.	Diferencias en tiempo y patrón de cristalización de la matriz ante diversas condiciones experimentales	103
44.	Incremento de la potencia del láser: efecto producido en los espectros	104

45.	Incremento excesivo de la potencia del láser: efectos indeseados sobre los espectros	106
46.	Pre-calentamiento de la placa de depósito de muestras	107
47.	Temperatura de la placa de depósito de muestras: diferencias en los patrones de cristalización de la matriz	108
48.	Calidad de los espectros de masas adquiridos en condiciones de precalentamiento, a 35 y 45°C, de la placa de depósito de muestras	110
49.	Árbol filogenético que muestra la aparición temporal estimada de los diferentes insectos	128
50.	Árbol filogenético que incluye parte de los artrópodos que fueron incluidos en la biblioteca de espectros en el presente estudio . . .	129
51.	Arbol filogenético que incluye a la mayoría de las especies de garrapatas, así como la especie de pulga <i>Ctenocephalides felis</i> . .	129
52.	Diferencias en el número de picos de los espectros de masas de dos ninfas de <i>Ixodes ricinus</i> , dependiendo del lugar dónde ha sido recolectado el ejemplar	130
53.	Diferencias en la intensidad de picos en los espectros de masas de dos ninfas de <i>Ixodes ricinus</i> , dependiendo del lugar dónde ha sido recolectado el ejemplar	130
54.	En MBT Compass Explorer, visualización “en espejo” de una ninfa de <i>Ixodes ricinus</i> recolectada de paciente frente a dos espectros de la biblioteca de referencia	132
55.	MBT Compass Explorer. Comparación de una ninfa de <i>Ixodes ricinus</i> retirada de un paciente, frente a dos espectros de referencia de la biblioteca	132
56.	Comparación de los espectros de masas de <i>Dermacentor marginatus</i> según el sitio de recolección	134
57.	Comparación de los espectros de masas de <i>Rhipicephalus bursa</i> según el sitio de recolección	135
58.	Comparación de los espectros de masas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato según el sitio de recolección	136
59.	Comparación de los espectros de masas de <i>Haemaphysalis punctata</i> según el sitio de recolección	137
60.	Comparación de los espectros de masas de <i>Hyalomma marginatum</i> según el sitio de recolección	138
61.	Dendrograma de todas las especies de garrapatas	142
62.	Dendrograma de <i>Ixodes ricinus</i> y <i>Ctenocephalides felis</i>	143
63.	Dendrograma de ninfas <i>Ixodes ricinus</i> retiradas de pacientes, con el grado de repleción de los ejemplares	146
64.	Dendrograma de <i>Dermacentor marginatus</i>	147
65.	Dendrograma de <i>Rhipicephalus bursa</i>	148
66.	Árbol filogenético de las especies de garrapata del género <i>Rhipicephalus</i> presentes en España	153
67.	Ejemplares de garrapata remitidos al Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa para su identificación, en los cuales la identificación morfológica resultó difícil	153

68. Dendrograma generado a partir de los espectros de ninfas de *Ixodes ricinus* obtenidas de pacientes en dos hospitales distintos . . 154

ACRÓNIMOS

ADN Ácido desoxirribonucleico.

AF Ácido fórmico.

ARN Ácido ribonucleico.

BTS Bruker Bacterial Test Standard. Extracto de una cepa de *Escherichia coli* que contiene un característico perfil peptídico y proteico cuando se mide en espectrometría de masas. Para cubrir todo el rango de detección del espectrómetro, a dicho reactivo se le han añadido otros dos péptidos adicionales.

CDC Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. En inglés, CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

CHCA Ácido α -cyano-4-hidroxicinámico. Tipo de matriz utilizada para el estudio de péptidos y proteínas en espectrometría de masas.

CIAP Clasificación Internacional de Atención Primaria. Clasificación médica de los motivos de consulta y los problemas de salud más frecuentes utilizada en el ámbito de la atención primaria de la salud, que fue ideada por la Organización Mundial de Médicos de Familia y la Organización Mundial de la Salud.

CIBIR Centro de Investigación Biomédica de La Rioja.

CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute. Organización sin fines de lucro, impulsada por el gobierno de EEUU, cuya finalidad es la elaboración de estándares de elevada calidad para mejorar las prácticas en el laboratorio clínico, lo que incluye la publicación de guías.

CRETAV Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores. Hospital Universitario San Pedro, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Da. Dalton. Unidad de masa atómica.

DEBONEL Dermacentor-Borne Necrosis Erythema Lymphadenopathy. Sinónimo de TIBOLA.

DHB Ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Tipo de matriz utilizada para el estudio de péptidos y proteínas en espectrometría de masas.

EC "Ejemplares recolectados del campo". En los ensayos de validación del presente estudio, se refiere a aquellos que fueron realizados utilizando ejemplares recolectados de diversas fuentes, especialmente en el campo (de vegetación).

ECDC Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades.

EDO Enfermedad de declaración obligatoria. Son un grupo de enfermedades transmisibles que deben ser declaradas, ante sospecha, por los profesionales sanitarios a las autoridades sanitarias, por ser entidades de especial importancia sanitaria para la comunidad.

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ENR “Ejemplares no registrados”. En los ensayos de validación del presente estudio, se refiere a aquellos que fueron realizados utilizando especies de garrapatas no registradas previamente en la biblioteca de espectros.

ETG Enfermedades transmitidas por garrapatas.

EP “Ejemplares de pacientes”. En los ensayos de validación del presente estudio, se refiere a aquellos que fueron realizados utilizando especies de garrapatas obtenidas de pacientes.

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos. (Food and Drug Administration.)

FHCC Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

HCULB Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución.

IDSA Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas. (Infectious Diseases Society of America).

kDa Kilodalton.

μm Micrómetro.

μL Microlitro.

mL Mililitro.

MALDI-TOF MS Espectrometría de masas con ionización-desorción por láser asistida por matriz y con detección masas por tiempo de vuelo.

m/z Unidad de masa/carga eléctrica. En espectrometría de masas, los iones generados mediante una fuente de iones son separados de acuerdo a este valor, generando un espectro con diferentes masas, cada una con distintos valores m/z.

MSP Main Spectrum Profile. En los espectrómetros de Bruker, los espectros de cada microorganismo que están contenidos en la biblioteca de espectros se generan mediante un software dedicado que realiza un “promedio” de los espectros que se obtienen a partir de varios replicados técnicos del microorganismo en cuestión.

nm Nanómetro.

OMS Organización Mundial de la Salud.

PCR Reacción en cadenas de la polimerasa (Protein Chain Reaction)

ppm Partes por millón. En espectrometría de masas, la falta de precisión (o desvío en la medición repetida de una misma masa) se mide en unidades denominadas partes por milló.

PROA. Programa de racionalización y optimización en el uso de antibióticos.

rARN ARN ribosomal.

TBE Encefalitis transmitidas por garrapatas. Tick-borne encephalitis.

TIBOLA Tick-borne lymphadenopathy. Sinónimo de DEBONEL).

UE Unión europea.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Garrapatas. Biología e importancia sanitaria.

Introducción

Las garrapatas duras (*Ixodidae*) son ectoparásitos (organismos que parasitan el exterior de otro organismo), hematófagos obligados (que necesitan consumir sangre como fuente de alimentación principal) de vertebrados durante todos los estadios de su ciclo vital (Márquez-Jiménez et al., 2004). Pueden parasitar mamíferos, aves e incluso reptiles y están presentes en todo el mundo. Su importancia sanitaria radica, sobre todo, en su capacidad para transmitir enfermedades infecciosas, siendo los principales vectores de estas en países desarrollados y los segundos en importancia a nivel mundial (solo por detrás de los mosquitos). En esta memoria nos centraremos en las garrapatas duras, ya que como se ha dicho en el párrafo anterior son los principales artrópodos vectores de enfermedades infecciosas en nuestro medio.

Importancia en Salud Pública de las enfermedades transmitidas por garrapatas.

Las garrapatas son consideradas los artrópodos que transmiten una mayor diversidad de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias (Jongejan et al., 2004; Heyman et al., 2010). En los últimos años, se han publicado varios estudios que advierten claramente sobre el aumento en la incidencia, la distribución geográfica y la gravedad de las Enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) (Paules et al., 2018), y actualmente son las enfermedades transmitidas por artrópodos vectores más frecuentes en el hemisferio norte. Este incremento en la incidencia se ha asociado a varios factores: el cambio climático (Heyman et al., 2010; Rovey et al., 2008); los cambios ambientales antropogénicos (deforestación, cambios en el uso de las tierras, ampliación de las áreas de riesgo para adquirir ETG a zonas urbanas) (Hansford et al., 2022); la introducción de garrapatas y patógenos asociados junto con sus hospedadores mediante la importación de ganado (Léger et al., 2013; Parola et al., 1998); la capacidad partenogenética de algunas especies (Beard et al., 2018); la detección de patógenos previamente conocidos en nuevas especies de garrapatas (Portillo et al., 2019); el incremento en las poblaciones de animales reservorios; la translocación de especies de fauna silvestre (Fernández de Mera et al., 2009); la translocación de especies de fauna silvestre (Fernández de Mera et al., 2009); el aumento del tiempo dedicado a actividades al aire libre (Diuk-Wasser et al., 2021), así como los avances en las técnicas diagnósticas (Portillo & Oteo, 2015a; Tokarz y Lipkin, 2021). En algunos casos, el aumento en la incidencia se ha visto acompañada de un aumento en la gravedad de los cuadros clínicos (Rovey et al., 2008).

La utilización de medios de cultivo avanzados, como el Shell-vial, y de técnicas de biología molecular en muestras clínicas y de garrapatas, junto con la posibilidad de analizar el microbioma mediante técnicas de secuenciación

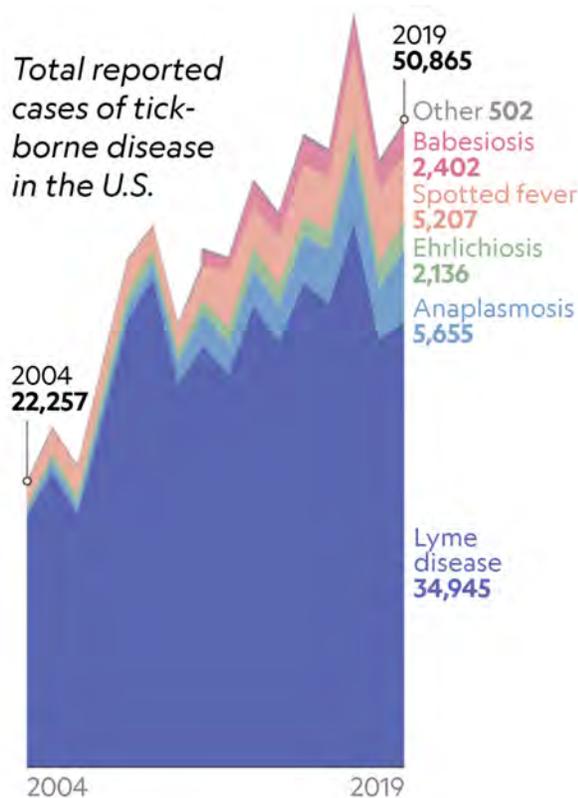


Figura 1: Tendencia de casos registrados en EEUU durante el periodo 2004-2019 de las siguientes enfermedades: borreliosis de Lyme, anaplasmosis, fiebres manchadas, ehrlichiosis, babesiosis y otras. Fuente: CDC.

masiva, ha permitido una aproximación innovadora en el estudio de las ETG (Portillo & Oteo, 2015; Portillo et al., 2019).

En las últimas décadas, se han descrito a nivel mundial nuevas ETG, incluyendo una gran diversidad taxonómica de microorganismos, lo que demuestra la capacidad vectorial de estos artrópodos. Algunos ejemplos notables de patógenos emergentes son *Rickettsia parkeri*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia mayoni*, el virus Powasan (linaje II), el virus Heartland o el virus de la fiebre severa con trombocitopenia, entre otros (Casel et al., 2021).

En los Estados Unidos, el número de casos notificados de babesiosis, ehrlichiosis, anaplasmosis y borreliosis de Lyme ha mostrado un aumento en el período 2004-2017 (figura 1) (Binder et al., 2019). Se ha documentado un aumento en el número de infecciones por *Rickettsia rickettsi* en diversos países de Sudamérica (Amâncio et al., 2011; Alvarez Hernández y Contreras Soto, 2013; Hidalgo et al., 2011; Tribaldos et al., 2011). En 1994, fue descubierta en Japón en *Ixodes persulcatus* la bacteria *Borrelia miyamotoi* y, aunque en un principio se pensó que se trataba de una bacteria comensal (endosimbionte), a partir del año 2011 comenzaron a publicarse casos de infecciones en humanos en Asia, el

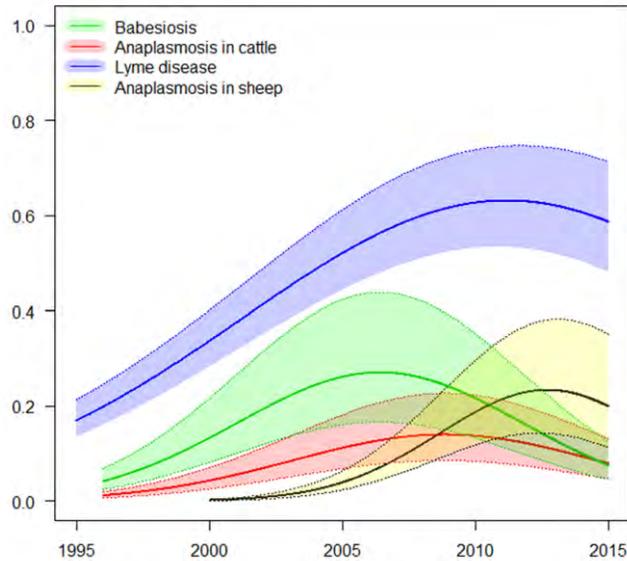


Figura 2: Tendencia de los casos registrados en Noruega durante el periodo 1995-2015 de: borreliosis de Lyme en humanos (violeta), babesiosis en ganado bovino (verde), anaplasmosis en ganado bovino y ovino (rojo y amarillo, respectivamente). Fuente: Mysterud et al., 2017.

norte de Europa y Norteamérica (Kubiak et al., 2021). Una situación similar sucede con ‘*Candidatus Neohrlichia mikurensis*’, la cual ha sido encontrada en un número creciente de países, incluyendo España, desde su descripción inicial en la isla de Mikura, Japón (Palomar et al., 2014; Portillo et al., 2018b; González-Carmona et al., 2022).

En nuestro continente, la Comisión Europea actualizó en 2018 la lista de enfermedades transmisibles y problemas de salud que deben recibir una vigilancia epidemiológica. Así, por primera vez, la neuroborreliosis de Lyme fue incluida en la lista de enfermedades de vigilancia epidemiológica de la UE. En Europa, se ha observado una tendencia similar de incremento en las ETG, tanto en humanos como en ganado. Por ejemplo, en Noruega, se ha detectado un aumento en los casos de la b. de Lyme en humanos, anaplasmosis en ganado ovino y bovino, y babesiosis en ganado bovino (Mysterud et al., 2017) (figura 2).

En España se dispone de escasa información acerca de la prevalencia de las ETG. Según datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), en el período 2005-2019 se produjo en nuestro país un incremento en el número de hospitalizaciones por b. de Lyme del 191,80% (figura 3). Aragón, por otro lado, registró, en el año 2021, el mayor número de casos de fiebre botonosa mediterránea desde que se tienen registros de la enfermedad (2014) (figura 4).

La biología de las garrapatas está influenciada de manera crítica por los factores abióticos, en particular la temperatura y la humedad (Gray et al., 2009).

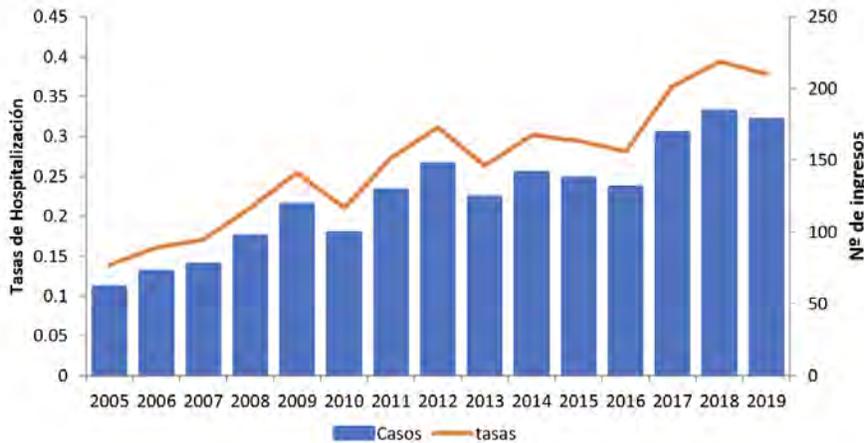


Figura 3: Evolución de la carga hospitalaria de borreliosis de Lyme en España durante el período 2005-2019. En la imagen se muestran el número de ingresados (barras de color azul) y las tasas de hospitalización por 100.000 habitantes (línea naranja). Fuente: Ministerio de Sanidad, España.

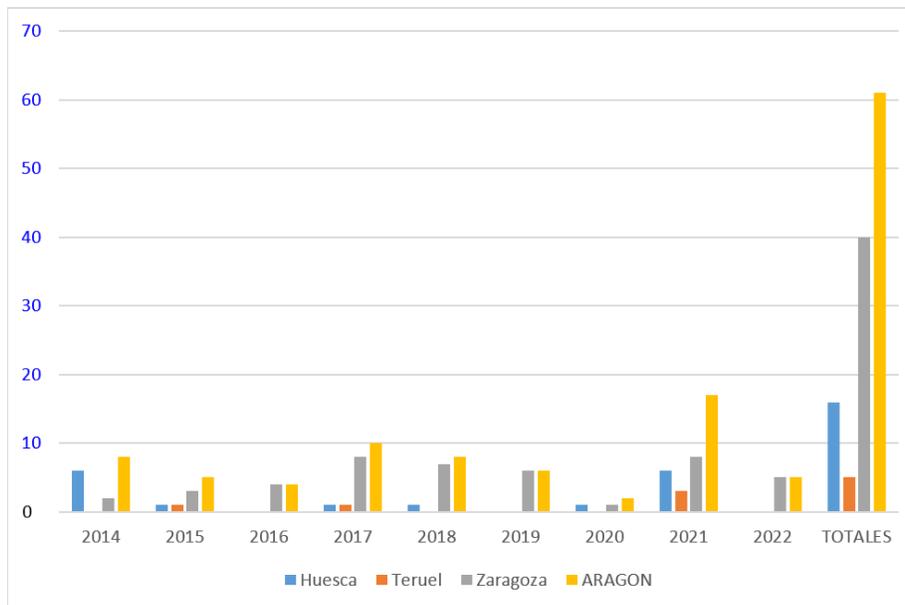


Figura 4: Evolución de los casos declarados de fiebre botonosa mediterránea en Aragón durante el período 2014-2022. Fuente: Cristina Rodríguez Martí . Servicio de Vigilancia en Salud Pública. Dirección General de Salud Pública (comunicación personal).

Los cambios previstos en las precipitaciones a nivel mundial podrían tener un efecto moderador a gran escala (Ogden et al., 2021). En todo caso, es previsible que este impacto sea distinto en función de los diferentes géneros y especies, ya que no todas las garrapatas tienen las mismas necesidades de humedad y/o otros factores limitantes. La influencia de los factores climáticos sobre las garrapatas y las modificaciones de sus hábitats puede manifestarse de diversas formas como: modificaciones en su comportamiento, el ritmo de transformación inter-estadial, los períodos de actividad, la capacidad para transmitir patógenos, así como en la abundancia y distribución de sus hospedadores (Medlock et al., 2013).

El impacto en salud de las garrapatas se debe principalmente a su capacidad para transmitir una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y protozoos, muchos de los cuales pueden causar enfermedades graves en humanos y animales. La fiebre mancha de las Montañas Rocosas (causada por *Rickettsia rickettsi*) puede tener una tasa de mortalidad del 7% (Kjemtrup et al., 2022); la fiebre botonosa mediterránea (causada por *Rickettsia conorii*), una mortalidad entre el 2-21% (Sousa et al., 2008); la anaplasmosis presenta una mortalidad geográficamente variable, pero puede alcanzar el 6% (Dumic et al., 2022); en la encefalitis transmitida por garrapatas, la mortalidad puede alcanzar el 30% (Chiffi et al., 2023); la FHCC puede alcanzar una mortalidad muy elevada, aunque variable de unas zonas a otras (Ergönül, 2006). Algunas de las ETG están incluidas en las listas, elaboradas por la OMS, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades y otras autoridades sanitarias, como agentes de potencial uso bioterrorista. Es el caso de los diferentes virus hemorrágicos transmitidos por garrapatas (como el virus de la FHCC), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Mushtaq et al., 2006), o las bacterias *Rickettsia rickettsi* y *Francisella tularensis* (Tian & Zheng, 2014).

Taxonomía de las garrapatas

Según la clasificación taxonómica propuesta por Sonenshine y Roe, las garrapatas se clasifican de la siguiente manera (Sonenshine & Roe, 2014):

- Reino: *Animalia* (organismos pluricelulares heterótrofos y locomotores).
- Phylum: *Arthropoda* (invertebrados con exoesqueleto y apéndices articulados).
- Clase: *Arachnida* (artrópodos quelicerados).
- Subclase: *Acari* = *Acarina*.
- Orden: *Parasitiformes* = *Anactinotrichidea*.
- Suborden: *Ixodida*.
- Familias: *Ixodidae*, *Argasidae*, *Nuttalliellidae*.

Desde una perspectiva sanitaria, las garrapatas duras (las especies de la familia *Ixodidae*) son las que presentan una influencia más significativa, tanto en

términos cualitativos como cuantitativos, en la salud humana. En consecuencia, el presente estudio se ha focalizado exclusivamente en estas especies.

Morfología de las garrapatas

La anatomía externa de una garrapata dura (*Ixodidae*) y una garrapata blanda (*Argasidae*) se muestran en la figura 5

Las garrapatas duras, se caracterizan por la presencia de un escudo esclerotizado en el dorso del cuerpo o idiosoma, que cubre completamente la superficie en machos adultos, denominado conscutum, y sólo una pequeña parte de la mitad anterior en larvas, ninfas y hembras adultas. A diferencia de los machos adultos, los demás estadios de garrapatas pueden expandir su volumen durante la alimentación a través de la síntesis de nueva cutícula, en lugar de la expansión de la ya existente. Esta expansión ocurre en la parte posterior del escudo, conocida como alloscutum, lo que permite que las garrapatas puedan aumentar su tamaño de manera gradual.

El cuerpo de estos arácnidos se compone de tres regiones distintas: el capítulo, el idiosoma (cuerpo) y las patas. El capítulo alberga los quelíceros (sirven para cortar la piel), los palpos (función sensorial) y el hipostoma (permite la fijación al hospedador y la alimentación) (figura 6). El idiosoma se divide en una región anterior llamada podosoma que incluye el poro genital y las patas, y una parte posterior denominada opistosoma que contiene la placa espiracular y el ano (figura 5). Las larvas tienen tres pares de patas, mientras que las ninfas y adultos poseen cuatro pares, cada una dividida en siete segmentos: coxa, trocánter, fémur, patela, tibia, tarso y pretarso (figura 7). Aunque las patas tienen una función principalmente locomotora, en la parte dorsal del tarso del primer par de patas se encuentra un órgano sensorial conocido como el órgano de Haller (Sonenshine & Roe, 2014)(figura 7). Las ninfas carecen de apertura genital y de áreas porosas de la base del capítulo en hembras adultas (Sonenshine & Roe, 2014).

La anatomía interna se muestra en la figura 8

En las garrapatas, los órganos internos se encuentran suspendidos en un líquido circulante llamado hemolinfa, que contiene células, como los hemocitos, y varias proteínas en solución (figura 8). La hemolinfa se encarga de distribuir los nutrientes, eliminar los residuos a través de los órganos excretores y proporcionar una función inmunitaria, entre otras funciones. El tubo digestivo es el órgano interno más destacado y consta de la faringe, esófago, estómago con numerosos divertículos y el saco rectal. Cuando la garrapata se alimenta por completo, el sistema digestivo ocupa la mayor parte del espacio interno y sirve como un órgano de almacenamiento, debido a la digestión lenta de las garrapatas. Además, las garrapatas tienen otros órganos internos, como las glándulas salivares, los órganos reproductores, el singanglion, los túbulos de Malpigio y las tráqueas. Las glándulas salivares, que son un par de órganos, son el segundo órgano interno más grande en las garrapatas. La importancia de sus funciones

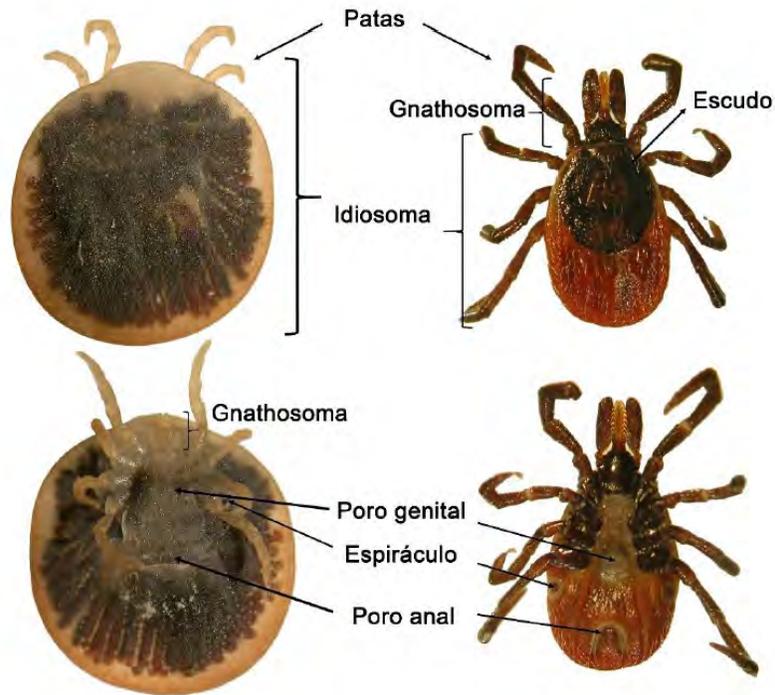


Figura 5: Vista ventral (arriba) y dorsal (abajo) de dos garrapatas. Izquierda: argásido o garrapata blanda *Argas verpertilionis*. Derecha: ixódido o garrapata dura *Ixodes ricinus*. Fuente: Palomar, 2017.

se debe a que sus proteínas tienen actividad antihemostática, antiinflamatoria, vasodilatadora y digestiva, entre otras (Sonenshine & Roe, 2014).

Ciclo de vida de las garrapatas

Las garrapatas duras, como artrópodos hematófagos obligados, requieren la ingesta de sangre para completar su ciclo biológico, en el que pasan, progresivamente, por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Cada estadio requiere (salvo en algunos adultos machos) la ingesta obligada de sangre de un hospedador para pasar al siguiente estadio (figura 9). Cada garrapata debe realizar, por tanto, al menos tres ingestas de sangre a lo largo de su vida. El proceso de desarrollo es hemimetabólico, siendo la morfología de cada estadio muy similar al anterior.

Las garrapatas usan los quelíceros para romper la piel y los vasos sanguíneos, creando un pool de sangre en la dermis a través del cual se alimentan mediante el hispotoma. Este tipo de alimentación se denomina telofagia, y su duración está condicionada por el tipo de hospedador y el estadio de la garrapata. Los ixódidos se alimentan durante períodos de 3-12 días. El proceso

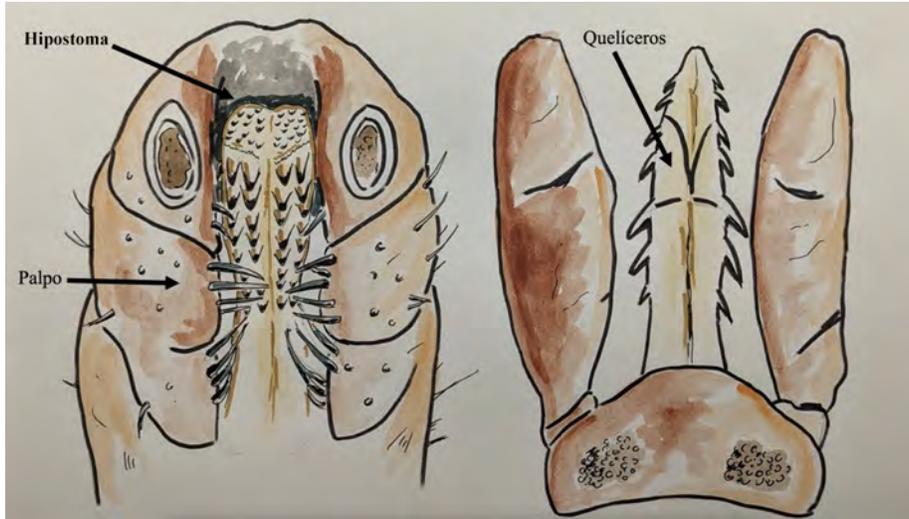


Figura 6: Vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha) del capitulo de una hembra de *Dermacentor* sp. Fuente: aportación propia.

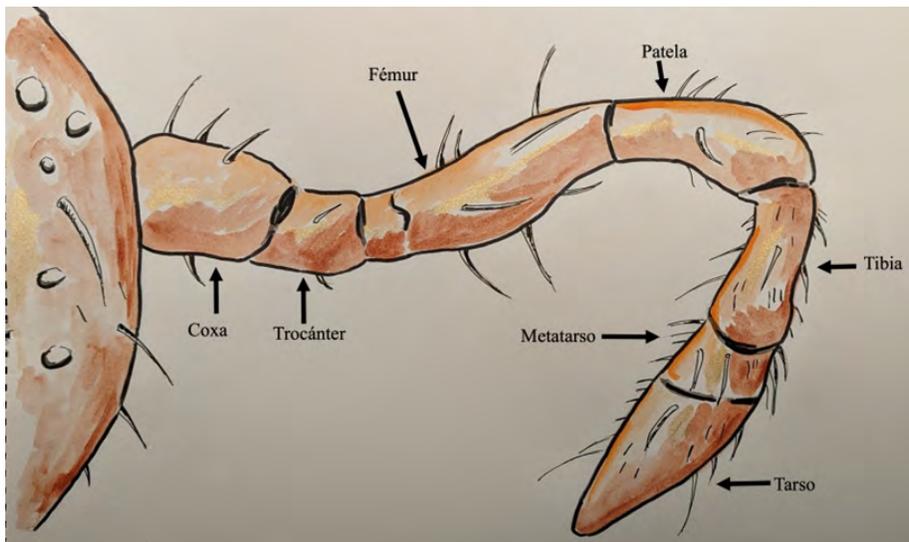


Figura 7: Vista dorsal de hembra de *Dermacentor* sp. Las patas se componen de siete segmentos. Fuente: aportación propia.

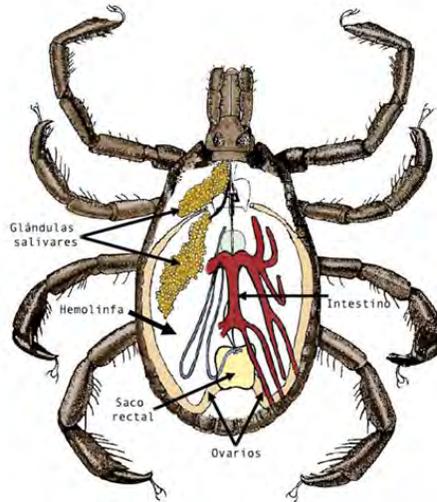


Figura 8: Vista interna de una hembra de *Amblyomma* sp.
 Fuente: Midsouth Entomologist (<https://midsouthentomologist.org.msstate.edu>) (modificado).

de digestión es intracelular y lento y los patógenos adquiridos con la sangre del hospedador quedan temporalmente protegidos en el “santuario” digestivo de la garrapata, lejos de la actividad inmunitaria de la hemolinfa. La capacidad de las garrapatas ixódidas para alimentarse durante largos períodos de tiempo se debe a la amplia variedad de moléculas presentes en su saliva, las cuales incluyen sustancias antihemostáticas, anti-citoquinas y anti-factores de crecimiento. Estas moléculas tienen efectos inmunomoduladores que no solo facilitan la alimentación de la garrapata, sino que también favorecen la transmisión de microorganismos patógenos (Bhowmick & Han, 2020).

Las hembras adultas realizan una única puesta después de desprenderse del hospedador. Estas garrapatas suelen vivir al menos un año, pero con frecuencia lo hacen 2-3 e incluso más años.

Las diferentes especies de garrapatas duras se pueden clasificar en función del número de hospedadores diferentes que utilizan. Así, las hay de ciclos trifásicos, bifásicos y monofásicos. En los ciclos trifásicos, cada estadio de la garrapata busca y se alimenta de un hospedador diferente (por ejemplo, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata*). En los ciclos bifásicos, la garrapata utiliza el mismo hospedador, normalmente en sus dos estadios inmaduros, antes de mudar a adulto (por ejemplo, *Hyalomma marginatum*). En los ciclos monofásicos, todos los estadios se alimentan del mismo hospedador (por ejemplo, algunas especies de *Boophilus* o *Dermacentor*) (Anderson & Magnarelli, 2008).

Las garrapatas también pueden ser clasificadas según su preferencia trófica, en función del tipo de animales sobre los que prefieren alimentarse. Algunas



Figura 9: Ciclo de vida, trifásico, de *Ixodes ricinus*. Fuente: Hofmeester, 2016.

especies son mucho más selectivas y se alimentan de un rango muy limitado de hospedadores, mientras que otras son generalistas y se alimentan de una amplia gama de hospedadores. Además, la preferencia de hospedadores puede variar según el estadio de la garrapata (preferencia de uno u otro tipo de hospedador según el estadio). Independientemente de su ciclo de vida y preferencia trófica, los seres humanos son considerados como hospedadores accidentales de las garrapatas (antropofilia) (McCoy et al., 2013).

La mayoría de las garrapatas duras son exofílicas o no nidícolas. Pasan gran parte del tiempo expuestas a la intemperie, en lugares como bosques, sabanas e incluso semidesiertos. Se pueden encontrar debajo de la hojarasca, la vegetación en descomposición, debajo de piedras e incluso bajo la arena. Este comportamiento implica la búsqueda de hospedadores. Los adultos y estadios inmaduros que se alimentan de grandes mamíferos escalan a una altura de al menos un metro, mientras que aquellos estadios que se alimentan de pequeños mamíferos lo hacen a escasos centímetros del suelo. La mayoría de los géneros de garrapatas duras exhiben un comportamiento de espera en la vegetación, donde aguardan a que un animal pase para adherirse a él a través de un proceso conocido como arrastre. No obstante, ciertos géneros, como *Hyalomma*, presentan una estrategia de búsqueda activa en la cual persiguen activamente a sus presas (Valcárcel et al., 2020).

Las garrapatas y su capacidad vectorial

Los factores climáticos pueden tener un efecto indirecto en la capacidad vectorial de las garrapatas; el comportamiento de búsqueda de hospedadores,

conocido como “questing”, solo ocurre cuando las temperaturas superan los 7°C (Süss et al., 2008). Por lo tanto, los factores ambientales pueden modular los encuentros entre las garrapatas y los hospedadores, y, por ende, influir en la transmisión de patógenos.

Existe distintos grados de especificidad entre vector y microorganismo. Aunque se desconoce la base exacta de esta especificidad, en el caso concreto de *Rickettsia* spp., las infecciones experimentales sugieren la existencia de un bloqueo inter-especies dentro del mismo género, donde una infección por una especie impide posteriormente la infección por otra especie (Heyman et al., 2010).

Para algunos microorganismos, los artrópodos pueden actuar no solamente como vector sino también como reservorio. Las garrapatas son consideradas el principal reservorio de *Rickettsia* spp. La transmisión de estos microorganismos puede darse horizontalmente (de garrapata a animal y viceversa), transestadialmente y, en algunas especies, transováricamente. No obstante, la transmisión transovárica solo se ha demostrado, en condiciones experimentales, y para ciertas especies de *Rickettsia* (Kubiak et al., 2021). Un aspecto crucial en la epidemiología de las garrapatas es su comportamiento estacional. En todas las especies de garrapatas, cada estadio puede presentar una estacionalidad distinta que, además puede variar según el área geográfica (figura 9).

La transmisión de patógenos a los humanos se produce de forma característica por el contacto con estadios concretos, para cada especie de garrapata (por ejemplo, ninfas de *I. ricinus*, adultos de *H. marginatum*). Por consiguiente, las ETG presentan una estacionalidad que se corresponde con el período de actividad del estadio correspondiente de su vector. La especie *I. ricinus* es una especie generalista en la elección de sus hospedadores, y tanto larvas, ninfas como adultos pueden picar a los seres humanos. Por otro lado, los estadios inmaduros de *Dermacentor reticulatus* tienen preferencia por los roedores, mientras que los adultos pueden utilizar al ser humano como hospedador ocasional, siendo solo este estadio el de importancia epidemiológica de cara a la transmisión de patógenos al ser humano.

Las especies con una baja especificidad en la elección de hospedadores (por ejemplo, *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes persulcatus* e *I. ricinus*) tienen la capacidad de alimentarse de un amplio rango de especies que pueden actuar como reservorios de numerosos patógenos (por ejemplo, pequeños mamíferos y aves), así como de seres humanos. Esta baja selectividad en la elección del hospedador contribuye notablemente a su capacidad vectorial, ya que la posibilidad de exposición a los seres humanos es mayor con estas especies en comparación con otras. Por tanto, para una especie determinada de garrapata, el grado de especificidad por el hospedador determina no solo el riesgo de adquirir patógenos durante la alimentación sino también el de transmitir dichos patógenos al ser humano en un contacto posterior (McCoy et al., 2013).

Otro aspecto epidemiológico muy importante es el modo de transmisión de microorganismos entre las garrapatas. La transmisión transovárica de microor-

ganismos no es frecuente (Swanson et al., 2006), lo que explica que el riesgo de adquirir una infección tras la picadura de una larva es, normalmente, inferior al riesgo de ser infectado tras la picadura de una ninfa o un adulto de la misma especie. Para que una garrapata tenga capacidad vectorial, es necesario que la infección por un microorganismo determinado sea transestadial, lo que significa que una infección adquirida en un estadio se mantenga en los estadios posteriores. Por lo tanto, la probabilidad de que una especie de garrapata esté infectada es mayor en los adultos que en los demás estadios.

Otros aspectos biológicos importantes de las garrapatas que pueden favorecer su papel como vectores son: la hematofagia prolongada (lo que aumentaría la probabilidad de adquirir microorganismos desde el torrente sanguíneo del hospedador), la digestión intracelular (lo que facilitaría el transporte intracelular de patógenos), la alimentación simultánea de múltiples ejemplares de la misma especie en un hospedador y su notable longevidad (Sonenshine & Roe, 2014).

La presencia de microorganismos patógenos en una especie específica de garrapata está condicionada por una multitud de factores. Uno de ellos es la tasa de prevalencia de infección en los hospedadores vertebrados de los que se nutre la garrapata, así como la capacidad de producir en éstos infecciones crónicas y actuar, así, como reservorios.

La duración de la alimentación en garrapatas es un aspecto crítico para el riesgo de transmisión, ya que cada tipo de microorganismo requiere un período mínimo de alimentación para poder ser transmitido. Estudios en animales de experimentación han sugerido que los virus pueden transmitirse en cuestión de minutos u horas, mientras que los miembros del orden *Rickettiales* requieren al menos 24 horas, al igual que *Babesia microti* y *Borrelia burgdorferi* (Boyer et al., 2022).

La presencia de un microorganismo en una especie de garrapata no implica necesariamente que ésta sea un vector competente. El papel epidemiológico de las garrapatas en la transmisión de microorganismos patógenos es, de hecho, difícil de determinar. La detección del microorganismo mediante técnicas genómicas e incluso su aislamiento mediante cultivo no garantiza necesariamente que la garrapata sea capaz de mantener y replicar el microorganismo en la naturaleza. Esto es especialmente cierto si la garrapata en cuestión ha sido obtenida desde un animal sobre el que estaba alimentándose, ya que puede haber adquirido el microorganismo durante la ingesta de sangre (Bernard, 2022).

Para que una garrapata se comporte como un vector competente de un determinado agente infeccioso deben cumplirse varios requisitos: debe poder adquirir el agente infeccioso durante la ingesta sanguínea (salvo que la infección pueda ser transmitida de garrapata a garrapata de forma vertical, como las rickettsiosis); debe permitir la replicación de dicho agente infeccioso; y, por último, debe ser capaz de poder transmitir dicho agente a otro hospedador en una alimentación posterior. Aun siendo un vector biológicamente competente, una transmisión eficiente en la naturaleza requiere además que se cumplan otras

condiciones adicionales que determinan cuál es su capacidad vectorial: densidad, longevidad, ritmo de alimentación y preferencias tróficas del vector; así como la densidad, el período de contagiosidad y susceptibilidad del hospedador (Bernard, 2022).

Las garrapatas son artrópodos con una capacidad limitada en su movilidad. Por tanto, la dispersión geográfica de las garrapatas y de los agentes infecciosos que pudieran albergar dependerá de la capacidad móvil de sus hospedadores (Bernard, 2022). En este sentido, el tráfico comercial de ganado puede favorecer la dispersión de vector y agentes infecciosos, ya que la presencia de ectoparásitos no es un aspecto normalmente controlado en las normativas de importación animal (Estrada-Peña et al., 2013).

Identificación de las garrapatas

Existen diversos métodos para la identificación de especímenes de garrapatas. A continuación, se detallan las características de cada uno de ellos.

Identificación morfológica La clasificación morfológica de las garrapatas se puede realizar mediante el uso de claves taxonómicas que permiten la identificación a nivel de especie (Manilla, 1988; Estrada-Peña et al., 2017). Algunas de estas claves incluyen, entre otras características, la forma y el tamaño del cuerpo, la disposición del surco anal, la presencia de espinas en las patas, la longitud y forma de los quelíceros, el color y la forma del escudo (figura 10). Existe un número limitado de guías de identificación que tengan en cuenta toda la diversidad existente (Yssouf et al., 2013). Estas publicaciones suelen tener un ámbito geográfico restringido y están normalmente ausentes en los países de bajos recursos, donde los estudios entomológicos y acarológicos son menos exhaustivos. Incluso en aquellos lugares donde existen guías disponibles, la identificación visual puede resultar difícil, ya que es necesario poseer un alto grado de conocimiento y experiencia acarológica. Existen guías que solamente incluyen claves para la identificación de ejemplares adultos, siendo por tanto difícil la identificación de los estadios inmaduros. Los ejemplares dañados o alimentados presentan mayores dificultades para su identificación (Yssouf et al., 2013).

Identificación por métodos moleculares La identificación de artrópodos mediante técnicas moleculares presenta numerosas ventajas (Yssouf et al., 2016). Una de las ventajas es que se puede utilizar el mismo marcador molecular para identificar los diferentes estadios de los artrópodos (huevo, larva, ninfa, adulto), ya que las secuencias genéticas de los artrópodos no se modifican durante su desarrollo. Además, estas técnicas requieren muy poca cantidad de material biológico y son compatibles con los diversos medios de conservación de artrópodos, como la congelación, el alcohol e incluso muestras secas. Sin embargo, estas técnicas también tienen algunas desventajas, como un coste relativamente elevado y un tiempo de procesamiento prolongado. Se han utilizado diferentes

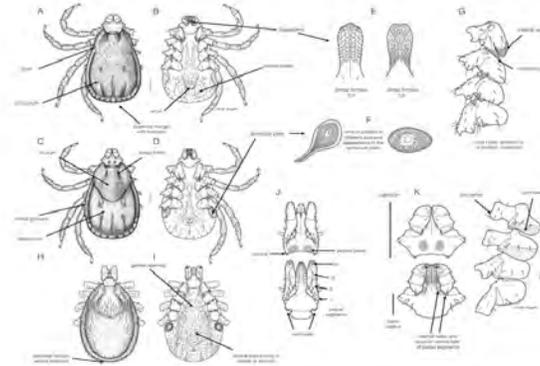


Figura 10: Claves morfológicas para la identificación de la familia *Ixodidae*. Adulto macho *Metastriata* en visión dorsal (A) y ventral (B) y adulta hembra *Metastriata* en visión dorsal (C) y ventral (D). Se muestra el hipostoma (E), placa espiracular (F) y las coxas (G). Hembra de garrapata Prostriata (género *Ixodes*) en visión dorsal (H) y ventral (I). Detalle de la base del capitulo en Prostriata (J) y *Metastriata* (K), así como detalle de algunas garrapatas *Ixodes* que poseen syncoxa (L). Fuente: Estrada-Peña et al., 2017.

regiones del genoma como dianas (Black & Piesman, 1994; Yssouf et al., 2016; Gou et al. 2018):

- ITS1, ITS2: estas regiones, denominadas espaciadores transcritos internos o ITS (Internal transcribed spacer), son secuencias ubicadas entre los genes que codifican el ADN ribosómico. Existen dos regiones que se utilizan para la clasificación, ITS1 e ITS2. La región ITS2 muestra la mayor variabilidad interespecie y la menor variabilidad intraespecie, por lo que se ha propuesto como el marcador ideal para la identificación de especies de mosquitos y garrapatas (Yssouf et al., 2016).
- 12S: gen ribosomal.
- 16S: gen ribosomal.
- 18S: gen ribosomal.
- COI: gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa mitocondrial. Es el marcador más utilizado para la identificación de artrópodos, aunque la variabilidad intraespecie hace necesaria la utilización ocasional de otros marcadores moleculares.

Sin embargo, es importante destacar que no existe un marcador genético perfecto y, a veces, se necesitan incluir varios marcadores moleculares para lograr la identificación a nivel de especie (por ejemplo, ITS2 + ITS1; ITS2 + COI) (Yssouf et al., 2016; Gou et al. 2018). Por otro lado, se debe tener en cuenta que los especímenes de garrapatas pueden contener sustancias que inhiban la PCR (Jumpertz et al., 2023).

Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas

Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas en España El riesgo poblacional de adquirir una ETG depende de varios factores:

- La abundancia y distribución de una especie de garrapata en un área geográfica determinada, lo que, a su vez, está influenciado por diversos factores, incluido el clima. España, siendo un país con una gran diversidad ecológica y una pluviometría variable, presenta condiciones propicias para diferentes especies de garrapata.
- La presencia de una fauna adecuada que pueda servir de fuente de alimentación y soporte para la población de garrapatas. En este sentido, España se destaca por tener una alta diversidad de especies animales que podrían funcionar como reservorios para las garrapatas.
- Presencia del microorganismo patógeno en su reservorio animal. En una zona geográfica determinada puede darse la presencia de una especie de garrapata, pero no de los microorganismos que pueden ser transmitidos por esta.
- Susceptibilidad individual.

Así, conocer la distribución geográfica de las especies de garrapatas con capacidad vectorial es fundamental para identificar las áreas geográficas en riesgo potencial de ETG. En Europa, el proyecto VectorNet, desarrollado en colaboración por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), elabora unos mapas con la distribución geográfica de las especies de garrapatas responsables de algunas de las enfermedades más relevantes en nuestro continente. Sin embargo, es necesario destacar dos limitaciones importantes en relación a estos mapas. En primer lugar, existen áreas geográficas con ausencia de datos, lo que puede dar la impresión de que ciertas especies de garrapatas no están presentes en dichas áreas. En segundo lugar, no todas las especies de garrapatas de relevancia sanitaria están representadas en estos mapas. Estos mapas están disponibles en la siguiente dirección: ([//www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps](http://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps)) (figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16).

En España, se han registrado un total de 31 especies de garrapatas duras y nueve especies de garrapatas blandas. De las garrapatas blandas, cinco pertenecen al género *Argas* y cuatro al género *Ornithodoros*. (Márquez-Jiménez et al., 2005). Aunque el hombre se considera un hospedador accidental, la mayoría de ellas se han encontrado alguna vez picando a humanos, pero su grado de antropofilia es diverso.

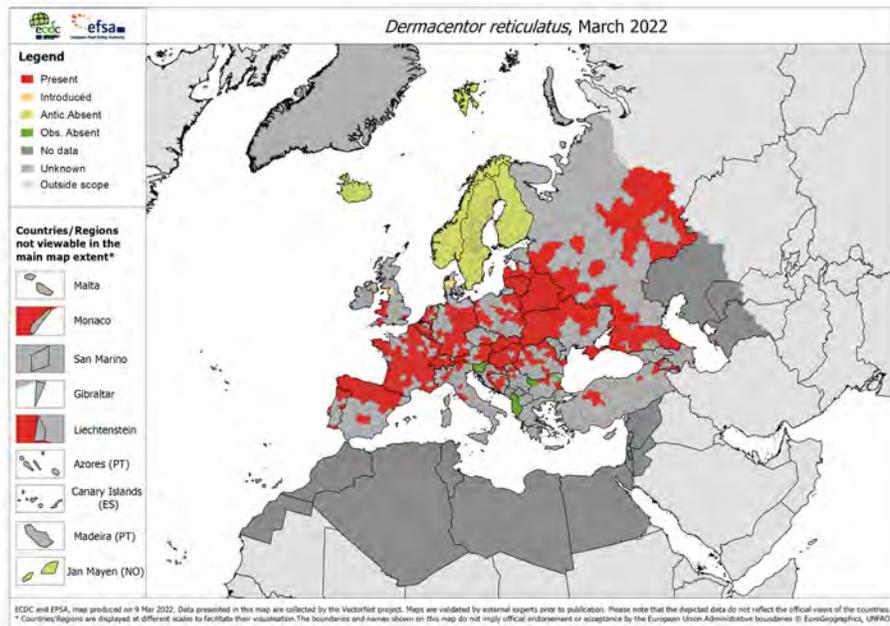


Figura 11: Distribución geográfica de la especie *Dermacentor reticulatus* en Europa.

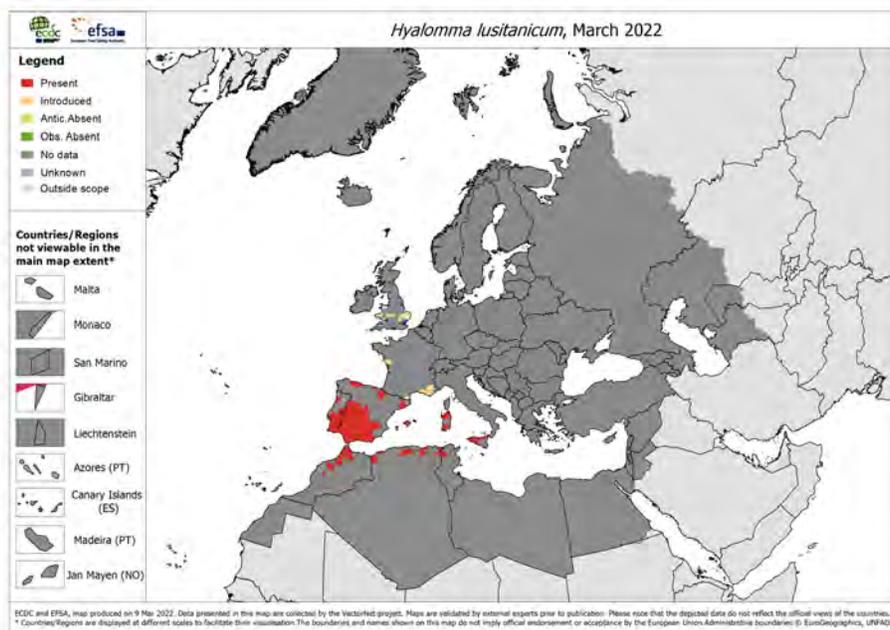


Figura 12: Distribución geográfica de la especie *Hyalomma lusitanicum* en Europa.

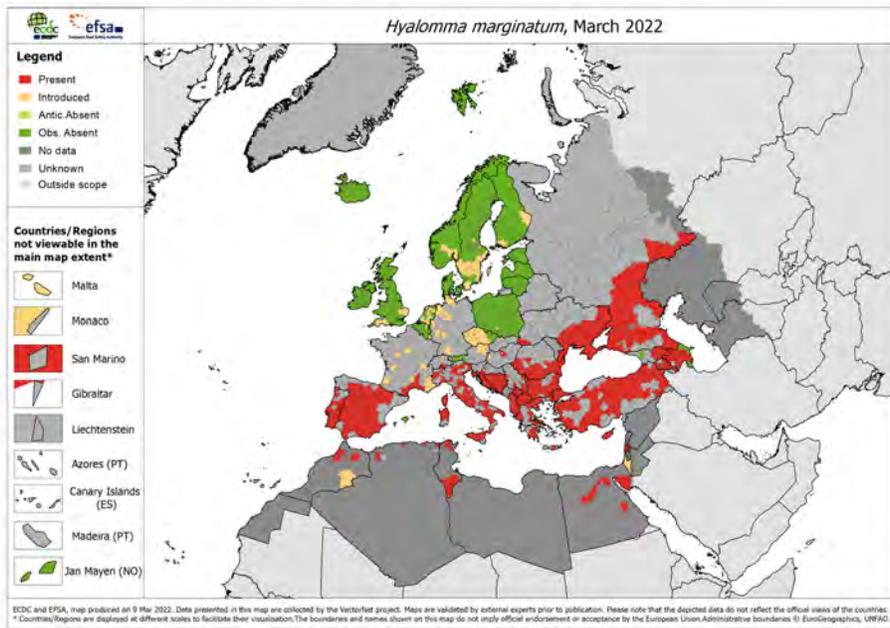


Figura 13: Distribución geográfica de la especie *Hyalomma marginatum* en Europa.

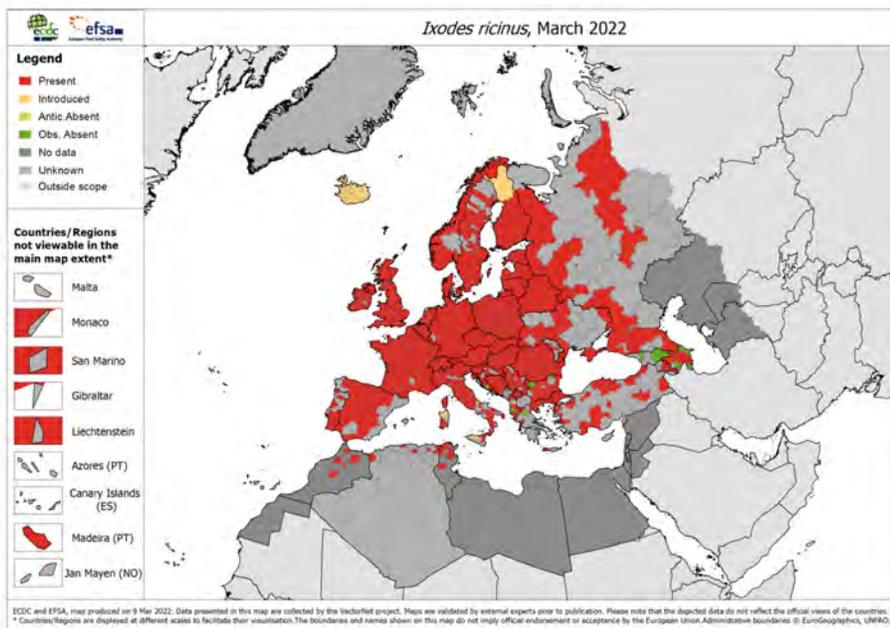


Figura 14: Distribución geográfica de la especie *Ixodes ricinus* en Europa.

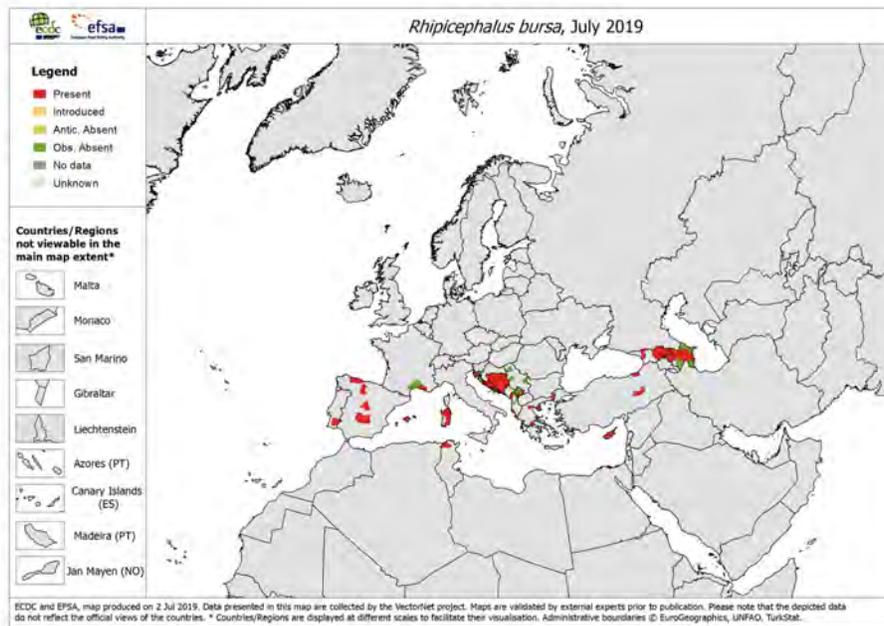


Figura 15: Distribución geográfica de la especie *Rhipicephalus bursa* en Europa.

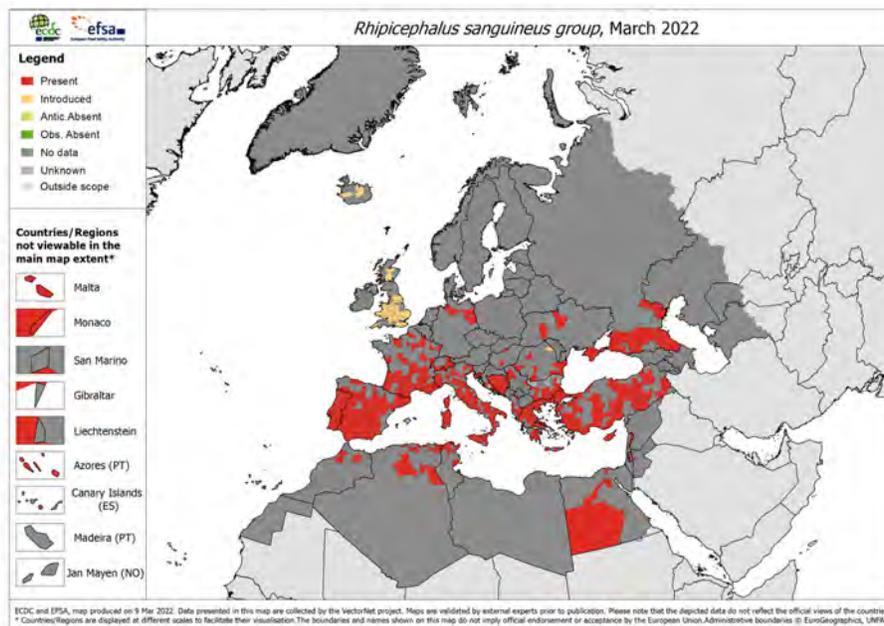


Figura 16: Distribución geográfica de la especie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato en Europa.

Las especies de garrapatas duras descritas en España, con el número de especies antropofílicas, son las siguientes (Palomar, 2017):

- *Dermacentor*: 2 especies; 2 especies antropofílicas.
- *Haemaphysalis*: 5 especies; 4 especies antropofílicas.
- *Hyalomma*: 7 especies; 7 especies antropofílicas.
- *Ixodes*: 11 especies; 8 especies antropofílicas.
- *Rhipicephalus*: 6 especies; 6 especies antropofílicas.

Aunque la picadura de la mayoría de estas especies de garrapatas no presenta un riesgo importante para la salud, algunas de ellas son importantes vectores de algunas ETG en nuestro país:

- *Dermacentor marginatus*: *Candidatus* *Rickettsia rioja*; *Rickettsia raoultii*; *Rickettsia slovacica*.
- *D. reticulatus*: ‘*Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis*’; *R. raoultii*; *R. slovacica*.
- *I. ricinus*: *A. phagocytophilum* –*I. ricinus* es el único vector conocido de anaplasmosis en Europa; *Babesia divergens* (*Babesia capreoli*, *Babesia venatorum*, *B. microti* en menor medida); *Bartonella henselae*; *B. burdogferi* sensu lato; *Borrelia miyamotoi*; ‘*Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis*’; *Rickettsia monacensis*.
- *Hyalomma lusitanicum*; virus de la FHCC (posible).
- *H. marginatum*: *Rickettsia aeschlimanii*; virus de la FHCC.
- *Rhipicephalus bursa*: *Rickettsia massiliae*; *Rickettsia sibirica mongolotimonae*; *Rickettsia aeschlimanii*.
- *Rhipicephalus pusillus*: *Rickettsia massiliae*; *Rickettsia sibirica mongolotimonae*.
- *Rhipicephalus sanguineus* s.l.: *R. conorii*; *Rickettsia rickettsi*; *R. massiliae*; *R. aeschlimanii*.

Familia	Especie	Hospedadores habituales	¿Pica a humanos?
Argasidae	<i>Argas gilcolladoi</i>	Aves	Sí
	<i>Argas persicus</i>	Aves	Sí
	<i>Argas reflexus</i>	Aves	Sí
	<i>Argas transgaripepinus</i>	Murciélagos	No
	<i>Argas vespertilionis</i>	Murciélagos	No
	<i>Ornithodoros coniceps</i>	Aves	Sí
	<i>Ornithodoros erraticus</i>	Roedores, cerdos	Sí
	<i>Ornithodoros maritimus</i>	Aves	No
Ixodidae	<i>Dermacentor marginatus</i>	Bóvidos, suidos y équidos. Erizos, lepóridos y roedores*	Sí
	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Bóvidos, suidos, cérvidos, cánidos y équidos.	Sí
	<i>Haemaphysalis concinna</i>	Erizos, lepóridos y roedores*	Sí
	<i>Haemaphysalis hispanica</i>	Aves, ungulados, roedores y otros mamíferos	Sí
	<i>Haemaphysalis inermis</i>	Lepóridos*	No
	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Suidos, bóvidos y otros ungulados, y roedores*	Sí
	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Aves, bóvidos, roedores y otros mamíferos.	Sí
	<i>Hyalomma aegyptium</i>	Aves, bóvidos y otros ungulados, carnívoros, lepóridos.	Sí
	<i>Hyalomma dromedarii**</i>	Reptiles (principalmente tortugas)*	Sí
	<i>Hyalomma excavatum</i>	Principalmente camélidos*	Sí
	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Bóvidos y camélidos, erizos, lepóridos y roedores*	Sí
	<i>Hyalomma marginatum</i>	Bóvidos, cérvidos y lepóridos*	Sí
	<i>Hyalomma scupense</i>	Aves, bóvidos y lepóridos	Sí
	<i>Hyalomma truncatum</i>	Bóvidos, équidos y otros ungulados	Sí
		Bóvidos y otros ungulados	Sí
		Lepóridos y roedores*	Sí
	<i>Ixodes acuminatus</i>	Roedores*	Sí
	<i>Ixodes arboricola</i>	Aves	No
	<i>Ixodes canisuga</i>	Carnívoros*	No
	<i>Ixodes frontalis</i>	Aves	Sí
	<i>Ixodes hexagonus</i>	Carnívoros y erizos*	Sí
	<i>Ixodes inopinatus</i>	Carnívoros y reptiles	¿?
	<i>Ixodes ricinus</i>	Bóvidos, cérvidos, carnívoros, roedores, reptiles, aves, etc.	Sí
	<i>Ixodes simplex</i>	Murciélagos	Sí
	<i>Ixodes trianguliceps</i>	Roedores*	Sí
	<i>Ixodes ventraloi</i>	Roedores, lepóridos y carnívoros*	Sí
	<i>Ixodes vespertilionis</i>	Murciélagos	Sí
<i>Rhipicephalus annulatus</i>	Bóvidos*	Sí	
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Bóvidos*	Sí	
<i>Rhipicephalus guilhoni**</i>	Bóvidos*	Sí	
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Lepóridos*	Sí	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Carnívoros	Sí	
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Bóvidos, carnívoros y otros ungulados	Sí	

Tabla 1: Especies de garrapatas descritas en España. *Las aves son hospedadores accidentales de estadios inmaduros. **Sólo en el archipiélago canario por importación de África. (Modificado a partir de: Palomar, 2017)

En España existen documentadas 12 enfermedades relacionadas con la picadura de garrapatas, diez de las cuales son enfermedades infecciosas (Oteo, comunicación personal):

- La fiebre botonosa o exantemática mediterránea (*R. conorii*).
- Babesiosis humana (*B. divergens*, *B. microti*).
- B. de Lyme (*Borrelia burgdorferi* s.l.).
- Tularemia (*F. tularensis*).
- El síndrome denominado DEBONEL (*R. slovacae*, *Candidatus Rickettsia rioja*, *R. raoultii*).
- Anaplasmosis humana (*Anaplasma phagocytophilum*).
- Infección por *Rickettsia monacensis*.
- Infección por *Rickettsia sibirica mongolitimonae*.
- FHCC.
- Infección por ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’.
- Adicionalmente, en España existen otras dos entidades no infecciosas, relacionadas con la picadura por garrapatas: la parálisis neurotóxica transmitida por garrapatas y la sensibilización a Alfa-gal.

Para una mayor profundización sobre el estado de las enfermedades transmitidas por artrópodos en España, se invita al lector a consultar la excelente revisión realizada por Portillo y colaboradores (Portillo et al., 2018a). A continuación, se presentan de manera sucinta algunas de las enfermedades transmitidas por garrapatas a humanos presentes en España.

La fiebre botonosa mediterránea es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *R. conorii*, que es transmitida por la picadura de garrapatas *R. sanguineus* s.l. Se trata de la enfermedad transmitida por garrapatas más prevalente en nuestro país (Moerbeck et al., 2022). Se caracteriza por un cuadro de fiebre de aparición súbita y exantema. Se han descrito diferentes tipos de complicaciones (Beselga et al., 2014; Colomba et al., 2014) y aunque la mayoría de los casos son leves, puede llegar a presentar una mortalidad del 2-4 %.

La babesiosis es una enfermedad causada por protozoos del género *Babesia* que se transmite naturalmente por la picadura de garrapatas *I. ricinus*, aunque también puede transmitirse por transfusión de sangre o trasplante de órganos (Almeida, 2021). En España se han publicado escasos casos de pacientes con infección por *B. divergens* (Gonzalez et al., 2011; González et al., 2015; Asensi et al., 2018), pero se sospecha que su incidencia podría ser mayor. Los síntomas incluyen fiebre, cefalea, fatiga, anorexia, síntomas gastrointestinales, mialgias, artralgias y síntomas respiratorios. En España, se publicó en 2016 el primer caso de infección por *B. microti*, aunque los antecedentes recientes de viaje no permitieron descartar que la infección hubiera sido adquirida fuera de nuestro

país (Arsuaga, 2016). Afortunadamente, en Europa, la mortalidad por babesiosis sigue siendo rara (Almeida, 2021).

La b. de Lyme no es una enfermedad de declaración obligatoria en España, lo que dificulta conocer su incidencia. El agente causante de la enfermedad, *B. burgdorferi*, es en realidad un complejo de genopecies con reservorios específicos y se ha posicionado como la ETG más prevalente en el hemisferio norte (Heyman et al., 2010). La prevalencia de la infección en garrapatas es muy variable y depende del país y la zona estudiada. En España, *Borrelia* ha sido detectada *I. ricinus* con una prevalencia de 0-48 % (Oteo et al., 2023). A nivel europeo, se reportan anualmente 85,000 casos de b. de Lyme, aunque se estima que estos datos son, con seguridad una subestimación. En nuestro medio es transmitida por *I. ricinus*. La b. de Lyme puede presentarse en tres fases: la fase localizada precoz, la fase diseminada precoz y la fase tardía crónica. En la primera fase, se puede observar el característico eritema migratorio y linfocitoma con o sin linfadenopatías. En la segunda fase, pueden aparecer eritemas migratorios múltiples, linfocitomas múltiples y diversas manifestaciones neurológicas, cardíacas, musculoesqueléticas y oftálmicas (Oteo et al., 1990a). En la fase tardía, se puede presentar una acrodermatitis crónica atrófica, neuroborreliosis y artritis recurrente o persistente (Oteo et al., 2023).

La tularemia está causada por la bacteria *F. tularensis*. Esta bacteria ha sido detectada en España con una baja tasa de prevalencia en garrapatas de diversas especies. Además de garrapatas, diversos artrópodos pueden actuar como vectores de la enfermedad, incluyendo moscas, y mosquitos. En los últimos años se ha observado un aumento generalizado en el número de casos de tularemia en toda la región europea. Según un informe emitido en 2019 por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades. (ECDC), España notificó 88 casos de tularemia (Lopes de Carvalho et al., 2016). Existen diversas presentaciones clínicas, siendo la forma más frecuente en España la forma ulceroglandular (Oteo et al., 1994). Aunque el pronóstico suele ser bueno, puede producir una enfermedad crónica debilitante (Elliset al., 2002).

El síndrome clínico conocido como DEBONEL (DERmacentor-BORne-Necrosis-Erythema-Lymphadenopathy), TIBOLA (TICK-BORne-LymphADenopathy) o SENLAT (Scalp-Eschar-and-Neck-Lymphadenopathy-After-Tick-bite) se utilizan para describir un cuadro clínico producido por la picadura de garrapatas del género *Dermacentor*, principalmente *D. marginatus*, y en ciertas localizaciones, *D. reticulatus*. Los microorganismos responsables de este síndrome pueden ser *Candidatus Rickettsia rioja*, *R. slovacica* y *R. raoultii* (Santibañez et al., 2022). Este síndrome aparece en aquellas épocas del año donde los adultos de *D. marginatus* son más activo, de octubre a mayo. Afecta con más frecuencia a mujeres y niños, y la mayoría de las picaduras se producen en el cuero cabelludo, pero también en otras zonas del cuerpo (hombros, brazos, cuello). Tras un período de incubación de 1 a 15 días, aparece una escara necrótica en el punto de inoculación, eritema perilesional y adenopatías regionales dolorosas (Oteo et al., 2004; Ibarra et al., 2005; Santibañez et al., 2022).

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *A. phagocytophilum* cuyas células diana son los leucocitos polimorfonucleares y se transmite, en nuestro país, principalmente por la picadura de garrapatas *I. ricinus*. La prevalencia de garrapatas infectadas es moderada-alta en Europa y la incidencia de la enfermedad está en aumento (Heyman et al., 2010). En España se han publicado diferentes casos de pacientes (Oteo et al., 2000; Oteo et al., 2001; García et al., 2006; Peris et al., 2007; García et al., 2014; Camprubí et al., 2021) y, aunque su número sigue siendo bajo, se sospecha que muchas de las infecciones en Europa podrían pasar desapercibidas (García et al., 2015). Los síntomas incluyen fiebre, cefalea y escalofríos y el pronóstico, en Europa, es bueno en general. El diagnóstico se establece mediante la detección de anticuerpos específicos o de la bacteria en sangre. Un aspecto característico de la infección, la visualización de mórulas en el interior de leucocitos en extensiones de sangre, está presente en tan sólo el 30 % de los casos en Europa (Silaghi et al., 2017).

Rickettsia monacensis ha sido detectada en garrapatas de varios países europeos, incluyendo España. Nuestro país fue el primero a nivel mundial en descubrir el papel patógeno de este microorganismo (Jado et al., 2007). Los síntomas clínicos incluyen escara, síntomas pseudogripales y rash cutáneo.

Rickettsia sibirica mongolotimonae ha sido detectada en diferentes especies de garrapatas. En España, se ha detectado en *R. bursa* y *R. pusillus* (Ramos et al., 2013). El cuadro clínico incluye fiebre, rash maculo-papular y adenopatías regionales con o sin linfangitis asociada. Por este motivo la enfermedad causada por esta bacteria se ha denominado “Lymphnagitis-Associated-Rickettsiosis”. La infección no suele ser fatal, pero se han descrito complicaciones como insuficiencia renal aguda, vasculitis retiniana, shock séptico y miopericarditis (Aguirrebengoa et al., 2008; Ibarra et al., 2012; Revilla-Martí et al., 2017).

El agente responsable de la FHCC es un virus esférico de ARN de sentido negativo perteneciente al género *Orthonairovirus* de la familia *Nairoviridae* (Sanchez, 2021). El virus, es transmitido por garrapatas del género *Hyalomma* sp., aunque se ha detectado el virus en otras especies de garrapatas (Sanchez, 2021). Se considera una enfermedad prioritaria por la OMS debido a su potencial pandémico y el elevado riesgo de emergencia en Europa (Bernard, 2022). Los hospedadores vertebrados actúan como fuente de infección tanto para garrapatas como para los humanos, y juegan un papel importante en la amplificación de la población de garrapatas y la dispersión del virus. Se postula que las aves migratorias podrían haber jugado un papel importante en la introducción del virus en nuestro país (Palomar et al., 2012, 2013a). El virus fue detectado por primera vez en España el año 2010 (provincia de Cáceres), en garrapatas *H. lusitanicum* (Estrada-Peña et al., 2012). Los síntomas incluyen fiebre, prostración y, en un 10-40 % de los pacientes, se puede desarrollar el típico cuadro de fiebre hemorrágica que pueden llevar a la muerte a un elevado porcentaje de los pacientes (Portillo et al., 2021).

En nuestro país se detectó ‘*Candidatus* Neohrlichia mikurensis’ en

I. ricinus recolectadas de vacas (Palomar et al., 2013b). Esta especie pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, junto a los igualmente patógenos géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia*. La mayoría de los casos registrados en Europa corresponden a pacientes con patologías subyacentes, especialmente neoplasias hematológicas, que están bajo tratamiento inmunosupresor y muchos de ellos, asplénicos. El cuadro clínico de esta enfermedad es similar al de un síndromeseudogripal, con posibles complicaciones trombóticas, con un curso subagudo o crónico (Portillo et al., 2018b). Recientemente se ha publicado en España el primer caso de infección por ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ en un paciente inmunodeprimido (González-Carmona et al., 2023).

En nuestro país, se han detectado microorganismos que en otros países han sido implicados como agentes causantes de patologías en seres humanos. Aunque hasta la fecha no se han documentado casos en pacientes, la presencia de estos microorganismos sugiere su circulación en nuestro entorno, representando un riesgo potencial para la salud de la población. Uno de los microorganismos detectados es *Rickettsia massiliae*, que ha sido aislado en varias especies de garrapatas en España, específicamente en las Islas Canarias (Fernández de Mera et al., 2009). Si bien se ha comunicado un caso en España, se trata de un viajero que adquirió la enfermedad probablemente en Argentina (García-García et al., 2010). Otro microorganismo detectado es *Rickettsia aeschlimannii*. Este microorganismo ha sido hallado en diversas especies de garrapatas de nuestro país, principalmente *H. marginatum* (Fernández-Soto et al., 2003; Fernández-Soto et al., 2008), si bien se considera que el riesgo de adquirir la enfermedad tras la picadura de este especie de garrapata es bajo (Oteo et al., 2005). La detección de *Rickettsia helvetica* en garrapatas *I. ricinus* e *I. hexagonus* ha sido comunicada en varios países europeos, incluido en España (Palomar et al., 2012). En 2018, se identificó por primera vez en España la presencia de *Borrelia miyamotoi* en garrapatas *I. ricinus* (Palomar et al., 2018). Esta especie se ha asociado con diversas manifestaciones clínicas, como cuadrosseudogripales, meningoencefalitis, fiebre recurrente e incluso eritema migratorio (Palomar et al., 2018).

Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas en Europa

De todas las ETG presentes en Europa, probablemente la más significativa por su trascendencia clínica es la encefalitis transmitida por garrapatas. Está causada por un virus del género *Flavivirus*. Dicho agente está incluido dentro la lista de agentes de potencial uso bioterrorista (Mushtaq et al. 2006). Su transmisión ocurre principalmente a través de la picadura de garrapatas infectadas, especialmente de la especie *I. ricinus* en Europa (Heyman et al., 2010). El curso de la enfermedad se caracteriza por una fase inicial con síntomas similares a los de una gripe (fase pseudogripal), seguida por una fase asintomática y, posteriormente, una fase neurológica que puede manifestarse como meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomielitis o meningoencefaloradiculitis. La tasa de mortalidad asociada a las cepas europeas del virus es generalmente baja, pero en otras variantes puede alcanzar hasta el 35 %. No se conocen las razones

por las cuales en España no circula de forma natural el virus, si bien se dan, aparentemente, todas las condiciones para que se establezca (Palomar et al., 2013c). El interés sanitario actualmente radica sobre todo en la posibilidad de que los viajeros adquieran la infección en áreas donde la enfermedad es endémica (Camprubí et al., 2020).

Coinfecciones por varios patógenos

La transmisión simultánea de varios patógenos a través de una única picadura de garrapata es posible debido a su capacidad para adquirir uno o varios patógenos en una sola ingesta de sangre o de manera secuencial a lo largo de su ciclo biológico. Este fenómeno explica que múltiples agentes patógenos puedan coexistir en una garrapata y sean transmitidos al hospedador durante una única picadura. La transmisión de varios patógenos también puede ocurrir cuando cada patógeno se transmite individualmente a través de picaduras separadas de distintos ejemplares de garrapatas. Es decir, un hospedador puede ser picado por diferentes garrapatas que porten diferentes patógenos. Se ha documentado la existencia de co-infecciones en garrapatas y en humanos, lo que podría tener implicaciones importantes en la epidemiología y gravedad de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Swanson, 2006; Boyer et al., 2022).

Otras patologías y complicaciones producidas por las picaduras de garrapatas

La parálisis por picadura de garrapata es un cuadro clínico infrecuente que se encuentra asociado a la picadura de ciertas especies de garrapatas, tales como *Dermacentor andersoni* y *Dermacentor variabilis* en Estados Unidos, así como *Ixodes holocyclus* en Australia. Este fenómeno afecta principalmente a individuos jóvenes, especialmente mujeres con cabello largo, y se manifiesta como una parálisis ascendente, similar al síndrome de Guillain-Barré. La detección precoz de esta condición es crucial, ya que puede comprometer los pares craneales y la función respiratoria, llegando incluso a ser potencialmente mortal. El tratamiento consiste en la pronta retirada de la garrapata, lo cual resulta generalmente en una rápida mejoría del paciente (James et al., 2021). Aunque esta enfermedad es poco frecuente, el primer caso comunicado en Europa fue descrito en España (Oteo et al., 1990b).

El síndrome de alergia a la carne es una condición causada por la producción de inmunoglobulina E (IgE) contra el disacárido galactosa- α -1,3-galactosa, el cual se encuentra presente en la superficie de células de mamíferos no primates. Esta enfermedad se asocia a la picadura previa de diversas especies de garrapatas, y su distribución geográfica coincide con la de las garrapata implicada. En Europa, incluida España, la especie *I. ricinus* ha sido relacionada con este síndrome (Venturini et al., 2013, 2017). Personas expuestas de forma frecuente a las picaduras de garrapatas (por ejemplo, guardas forestales) presentan un riesgo incrementado de desarrollar este síndrome (Venturini et al., 2013, 2017). El

mecanismo exacto que desencadena esta reacción alérgica no está completamente esclarecido, pero se ha sugerido que el traumatismo local en la piel producido por la picadura de la garrapata puede tener un efecto inmunomodulador clave en la fisiopatología de este síndrome. Los síntomas se asocian con niveles elevados de IgE específica, y la cantidad mínima de alérgeno necesaria para desencadenar la reacción puede variar entre pacientes. Ciertos fármacos y vacunas también pueden contener el disacárido galactosa- α -1,3-galactosa, lo que significa que pueden desencadenar este síndrome en personas previamente sensibilizadas. La exposición repetida a las picaduras de garrapata puede incrementar el riesgo de desarrollar una reacción anafiláctica en individuos sensibilizados (Saretta et al., 2021).

La alergia a la picadura de las garrapatas se produce sobre todo tras picaduras del género *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Sánchez et al., 2014). En España hay un caso publicado de una mujer con una reacción anafiláctica tras la picadura de una garrapata de la especie *R. bursa* (Sánchez et al., 2014).

Pueden aparecer otras complicaciones a consecuencia de las picaduras de estos artrópodos. Estas complicaciones incluyen inflamación local en la zona de la picadura y sobreinfección en la misma zona. La parasitación múltiple por garrapatas puede causar anemia, especialmente en mamíferos no humanos, donde cientos e incluso miles de garrapatas pueden parasitar simultáneamente a un hospedador. En algunos casos, las picaduras de garrapatas pueden favorecer la infestación por otros parásitos, como la miasis, aunque esto se ha observado principalmente en animales (Oteo et al., 1996; Palomar, 2017).

1.2. Descripción de la tecnología MALDI-TOF MS y sus aplicaciones el campo de la microbiología clínica.

Breve reseña histórica sobre la espectrometría de masas

La tecnología MALDI-TOF MS puede definirse como la espectrometría de masas mediante la ionización-desorción con láser, asistida por matriz, y con detección de las masas mediante la medición del tiempo de vuelo.

La aplicación del láser como fuente de iones en la espectrometría de masas sobre sustratos inorgánicos comenzó en los años 1960's. En aquel momento su aplicación sobre macromoléculas se consideraba imposible debido a que, la aplicación de un láser de alta intensidad sobre una macromolécula, provocaba su fragmentación y pérdida de estructura.

Uno de los hitos en la historia de la espectrometría de masas fue el descubrimiento de la desorción-ionización suave, que permitió el análisis de macromoléculas. En 1985, Koichi Tanaka utilizó la desorción-ionización en fase líquida y Franz Hillenkamp y Michael Karas describieron en 1988 la desorción-ionización en fase sólida mediante la tecnología MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization = desorción-ionización por láser asistida por matriz).

Las fuentes de ionización se han clasificado en dos grandes grupos: duras o blandas. Las fuentes duras transmiten energías muy elevadas, produciendo la fragmentación de las moléculas analizadas, dando lugar a espectros de masas complejos. Las fuentes blandas, como la desorción, producen por el contrario una escasa excitación de los iones, poca fragmentación de las moléculas y unos espectros más sencillos que las fuentes duras (Shah & Gharbia, 2010). La incorporación de la desorción suave permitió el estudio de moléculas termolábiles, no volátiles, de mucho mayor tamaño, en teoría sin un límite superior como proteínas y oligonucleótidos (Shah & Gharbia, 2010; De Hoffman & Stroobant, 2007).

Fundamentos de la tecnología MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas es una técnica que requiere que la muestra a analizar sea ionizada o cargada eléctricamente para su análisis. Las moléculas para analizar deben poseer la capacidad intrínseca de poder ser ionizadas y pasar a una fase gaseosa, transformándose a iones gaseosos (Nair & Clarke, 2017). La tecnología MALDI-TOF MS utiliza, sobre una muestra que ha sido previamente disuelta en una matriz orgánica, una fuente de iones suave para conseguir la ionización de la muestra. Las moléculas de la muestra quedan embebidas en los cristales de la matriz, siendo la función de esta matriz, la de absorber la energía a la longitud de onda del láser que vaya a ser utilizada y transferir entonces esta energía a la muestra. La elección de la matriz es sumamente importante, ya que debe: tener capacidad de absorber la energía a la longitud de onda del láser, capacidad de sublimación, estabilidad en vacío, capacidad de inducción de la ionización del analito y ser compatible con los solventes utilizados para disolver los analitos. Algunas de las moléculas más utilizadas como matriz son: el ácido

cinámico y derivados (ácido sinapínico, ácido ferúlico y ácido cafeico), el ácido α -cyano-4-hidroxicinámico (CHCA), y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

Una vez la muestra se ha mezclado con una matriz, el soporte físico que contiene las muestras es introducido en el espectrómetro de masas. La configuración básica de un sistema de espectrometría de masas se basa en tres fases secuenciales (figura 17): la generación de iones a partir de la muestra, la separación de los diferentes iones en base a sus características de masa/carga y, finalmente, la detección de los iones mediante un detector. La ionización puede realizarse de forma directa o indirecta. En la forma directa los analitos a ser ionizados se encuentran sobre una superficie o disueltos en una solución. Los tipos de láser más comunes son el láser de nitrógeno, láser Nd:YAG y láser Smartbeam y Smartbeam II. El láser dispara sobre una pequeña porción del pocillo, entre 50 y 200 μm de diámetro, y la longitud de onda del láser suele estar entre 248 y 355 nm.

Los espectrómetros de masas analizan la totalidad de las moléculas presentes en la muestra biológica. Al producirse la ionización de todas las moléculas de la muestra biológica, cada molécula individual en espectrometría de masas puede expresarse en forma de un valor cuantitativo, el valor m/z o ratio masa/carga eléctrica. El proceso íntimo mediante el cual se producen los iones en espectrometría de masas no se comprende en profundidad, pero se piensa que la ionización tiene lugar, bien en el proceso de ablación, bien en la fase gaseosa. Tras la desorción de matriz y analitos, y la formación de una nube de analitos y matriz hiperexcitados, tienen lugar reacciones de ionización primaria. Posteriormente, tiene lugar la ionización secundaria debido a colisiones entre las moléculas de la matriz (en exceso) y las del analito. Los iones resultantes de esta ionización secundaria suponen una parte sustancial de los iones observados en el espectro de masas. En MALDI-TOF MS, normalmente se producen iones protonados (iones cargados positivamente) y las moléculas de bajo peso molecular tienen normalmente un valor m/z equivalente a su masa molecular, designadas como $[M + H]^+$ para iones protonados (positivos) o $[M - H]^-$ para iones deprotonados (iones cargados negativamente). Tras la detección de los iones por el detector, el software asociado genera automáticamente un espectro de masas.

En espectrometría de masas, el espectro se refiere a la representación gráfica de la intensidad de la señal en función del valor m/z (la ratio masa/carga eléctrica) de todas las moléculas detectadas en una muestra. El espectro es una representación visual de las masas y las abundancias relativas de los iones detectados en una muestra analizada por espectrometría de masas. Cada pico en el espectro representa un ion con un valor m/z específico, y la altura de este es proporcional a la intensidad de la señal de ese ion (figura 17). Los espectrómetros de masas funcionan en ambientes de alto vacío para evitar colisiones entre iones que han sido generados, utilizando para ello diferentes tipos de bombas. La descomposición de los iones (que puede tener un efecto negativo sobre la precisión del equipo) puede evitarse seleccionando matrices suaves y reduciendo la

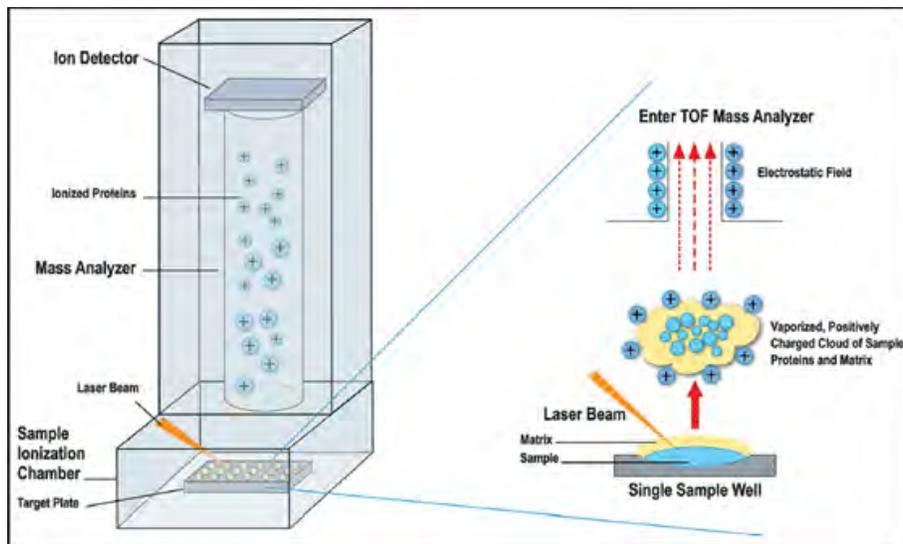


Figura 17: Funcionamiento básico de la tecnología MALDI-TOF MS. Los pocillos de la placa metálica son disparados por un láser que produce la desorción (separación de la placa metálica) y la ionización de las moléculas de la muestra y la matriz. La nube de moléculas ionizadas es acelerada en el tubo del analizador de tiempo de vuelo hacia el detector. Las moléculas pequeñas viajan más rápido, seguidas de las moléculas más pesadas. La separación de las masas se produce según su valor masa/carga, pero como la carga iónica es única, la separación de las moléculas se produce de forma efectiva según su peso molecular. Fuente: (Patel, 2015).

fluencia (=potencia) del láser (Luo et al., 2002). Los iones generados deben ser separados según su valor m/z y los espectrómetros de tiempo de vuelo utilizan campos eléctricos pulsados para favorecer el desplazamiento de los iones hacia el detector a lo largo de un tubo de vuelo. Puesto que, idealmente, todos los iones presentan la misma energía cinética, la velocidad de estos en el interior del tubo será inversamente proporcional a sus masas. El tiempo de vuelo suele oscilar entre 1 y 30 μs y para que se produzca una buena separación de los iones de distintas masas se necesitan tubos de una longitud suficiente, normalmente de un metro de longitud. El detector es la parte del espectrómetro que recibe los iones que se han generado desde la fuente de iones y van llegando hasta el mismo de forma secuencial (de acuerdo a su valor m/z), transformando esta información en una señal eléctrica que es proporcional a la intensidad de cada uno de los iones (figura 18) (De Hoffman & Stroobant, 2007).

En microbiología clínica, la identificación de microorganismos mediante tecnología MALDI-TOF MS se lleva a cabo comparando el espectro de una muestra desconocida frente a una biblioteca de espectros conocidos de microorganismos. La identificación es posible porque cada especie microbiana tiene un espectro de masas único y característico, aunque ciertos picos pueden ser compartidos por grupos filogenéticamente próximos.

Como cualquier otra técnica analítica, la tecnología MALDI-TOF MS tam-

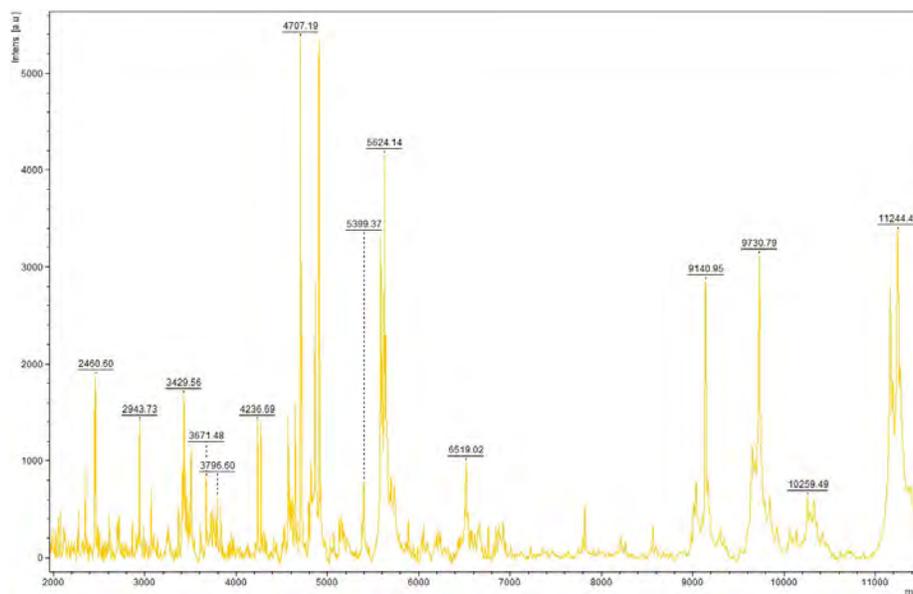


Figura 18: Espectro de una ninfa de *Ixodes ricinus*. En la imagen se muestran los iones con un valor m/z entre 2000 (moléculas con menor masa, con un menor tiempo de vuelo) y 11.000 (moléculas más pesadas, con un mayor tiempo de vuelo). Obsérvese la diferencia de intensidades entre los diferentes iones; la masa con valor 4707,19 m/z es el de máxima intensidad. Fuente: aportación propia.

bién está sujeta a errores analíticos que pueden afectar su resolución y precisión. La resolución de un espectrómetro se define como su capacidad para diferenciar masas moleculares cercanas, y la precisión se refiere a la diferencia entre la masa observada y la masa teórica de una molécula. Los errores en la técnica MALDI-TOF MS pueden derivarse de diversos factores, pero normalmente se admite un error de hasta 500 ppm (partes por millón). Los problemas de reproducibilidad se atribuyen, en parte, a la heterogeneidad intrínseca del método de depósito de muestras conocido como “dry-droplet” o gota seca, lo que se debe a las propiedades de la matriz utilizada. En las matrices de CHCA, se observa una homogeneidad en la distribución cristalina, en contraste con las matrices de DHB. En general, la matriz de CHCA se prefiere debido a su alta capacidad de ionización y, por lo tanto, es la más ampliamente utilizada (Sleno et al., 2006). Para mejorar la reproducibilidad, se emplea un enfoque de disparo múltiple aleatorio del láser en los pocillos de muestra para generar un espectro promedio (Chaurand et al., 2005).

Es importante tener en cuenta que la espectrometría de masas analiza las moléculas de forma global y no se basa en el reconocimiento de una parte de la misma. Esto evita reacciones cruzadas como las que se observan, por ejemplo, en las técnicas de inmunoensayo. Debido a la complejidad del proceso de generación de los espectros, no se puede predecir a partir de la información genética disponible, el espectro de un microorganismo.

El Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) utiliza un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius System de Bruker, con detección de iones positivos. El software del espectrómetro contiene una biblioteca de espectros de referencia de miles de microorganismos, generados a partir de varios replicados técnicos del microorganismo en cuestión, seleccionando los 70 picos más representativos. Los espectros de referencia de cada especie se denominan, en este sistema comercial, Main Spectrum Profile. (MSP) (Shah & Gharbia, 2010). Para identificar una muestra desconocida, el software denominado Maldi Biotyper compara el espectro obtenido de la muestra problema con los espectros almacenados en su biblioteca y genera un resultado numérico con un rango de valores entre 0 y 3, según el grado de similitud. El cálculo de este score se basa en tres variables, cada uno de ellas con un valor máximo de 1: la similitud del espectro problema con el MSP, la similitud del espectro MSP con el espectro problema, y la similitud en la intensidad de los picos compartidos por la muestra problema y MSP (Shah & Gharbia, 2010). Teniendo en cuenta esos tres factores el software calcula el valor log (score) o LSV (log score value) mediante el logaritmo de los tres scores multiplicados por 1000, con un valor máximo de 3 ($\log(1 \times 1 \times 1 \times 1000) = 3$). El software presenta los resultados de la comparación del espectro de la muestra problema con los espectros MSP de la biblioteca en un informe que ordena los grados de similitud de mayor a menor con las distintas especies de la biblioteca. El fabricante ha establecido puntos de corte para determinar la fiabilidad de la identificación. Si el valor LSV es ≥ 2 , la identificación es fiable a nivel de género y especie, mientras que si es $\geq 1,7$, la identificación es fiable solo a nivel de género (Shah & Gharbia, 2010).

Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en microbiología clínica

La espectrometría de masas para la identificación bacteriana fue propuesta por primera vez en 1975 basándose en la observación de que extractos de diferentes bacterias presentaban espectros proteicos únicos. Su aplicación en microbiología clínica comenzó a principios de la década de los 2000, en los laboratorios de Salud Pública del Reino Unido (Shah & Gharbia, 2010). Posteriormente dicha tecnología se utilizó también como herramienta de tipado. Inicialmente, el estudio de proteínas se focalizó en moléculas de la superficie bacteriana, pero posteriormente se observó que las proteínas ribosomales presentaban una concentración muy elevada y eran ionizadas de forma muy eficiente. Por ello, actualmente la espectrometría de masas como herramienta diagnóstica bacteriana se basa en la detección de proteínas principalmente ribosomales, constituyendo una fracción importante de las masas detectadas en el rango típico de los espectrómetros comerciales (2.000-20.000 m/z).

Las aplicaciones de MALDI-TOF MS en el laboratorio de microbiología se han incrementado con el paso del tiempo. Inicialmente se utilizó para la identificación bacteriana de colonias crecidas en placas de agar, posteriormente también en la detección directa de muestras de hemocultivos positivos, la detección de

resistencias bacterianas, la detección de factores de virulencia, el estudio de brotes mediante el tipado de cepas y en el ámbito de la parasitología clínica, entre otras muchas (Shah & Gharbia, 2010). Una de las limitaciones principales de la espectrometría de masas es su sensibilidad, requiriendo un inóculo microbiano relativamente alto.

La espectrometría de masas ha tenido un impacto significativo en el manejo de los paciente debido a su capacidad para identificar de manera muy rápida y precisa, los microorganismos, reduciendo de forma considerable el tiempo de identificación, en comparación con métodos clásicos. Además, MALDI-TOF MS con su elevada capacidad para detectar microorganismos raramente o nunca antes comunicados, puede representar un nuevo desafío en el manejo de estas infecciones. Algunas de las limitaciones de la espectrometría de masas incluyen la dificultad en la identificación de micobacterias (debido a la especial composición de su pared y bajo contenido de proteínas ribosomales), o en la insuficiente capacidad resolutive para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas como el caso de *Escherichia coli-Shigella*, o los miembros de los estreptococos del grupo *viridans*, entre otros (Shah & Gharbia, 2010).

Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de artrópodos

En el año 2005 se publicaron los primeros estudios que demostraron la capacidad de discriminación, mediante MALDI-TOF MS, de distintas subespecies de *Drosophila*, así como de distintas especies de áfidos (Murugaiyan & Roesler, 2017). Posteriormente, los estudios incluyeron mosquitos, moscas tse-tse, flebotomos, chinches, pulgas, piojos y garrapatas, entre otros artrópodos (Yssouf et al., 2016; Murugaiyan & Roesler, 2017).

Es posible discriminar entre los diferentes estadios biológicos de los artrópodos e incluso, en el caso de artrópodos hematófagos, de identificar el hospedador del que ha obtenido la sangre, así como la presencia de parásitos u otros agentes infecciosos (Murugaiyan & Roesler, 2017).

En los primeros estudios se utilizaron el cuerpo completo del artrópodo, pero posteriormente se observó que, con la exclusión del abdomen (sobre todo en el caso de artrópodos hematófagos), mejoraban la reproducibilidad y calidad general de los espectros (Yssouf et al., 2016). En este sentido, la elección de las patas como muestra presenta numerosas ventajas, ya que la influencia del género, la edad o la dieta del espécimen sobre el espectro es mínima. La conservación de otras partes del cuerpo permite, adicionalmente, realizar estudios adicionales en caso de que estos sean necesarios (por ejemplo, la detección de microorganismos patógenos). En la creación de una biblioteca de espectros de artrópodos se recomienda incluir varios espectros (=correspondientes a varios ejemplares) por especie, al menos uno por cada género, y a ser posible de diversa localización geográfica. Con la aplicación de este criterio se consigue un número suficiente de espectros que representen la variabilidad proteómica de cada especie (Yssouf et al., 2016).

Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de garrapatas

Desde la primera publicación en el año 2012 (Karger et al., 2012), la tecnología MALDI-TOF MS se ha utilizado en diversos estudios para identificar especies de garrapatas e incluso discriminar, en un único paso, su estado infeccioso (Fotso Fotso et al., 2014; Yssouf et al., 2015a; Boyer et al., 2017).

Los especímenes de garrapatas que han utilizado los investigadores son de muy diversos tipos: colonias de laboratorio (Karger et al., 2012; Yssouf et al., 2013; Yssouf et al., 2015a; Yssouf et al., 2015b; Nebbak et al., 2017; Boyer et al., 2019), vegetación (Karger et al., 2012; Yssouf et al., 2013; Boyer et al., 2017; Karger et al., 2019; Boyer et al., 2019), animales salvajes (Karger et al., 2012; Yssouf et al., 2015a; Boyer et al., 2019; Huynh et al., 2021; Benyahia et al., 2022; Ahamada et al., 2022), animales domésticos o de granjas (Karger et al., 2012; Kumsa et al., 2016; Diarra et al., 2017; Boucheikhchoukh et al., 2018; Huynh et al., 2021; Ahamada et al., 2022; Ngnindji-Youdje et al., 2023) y, ocasionalmente, pacientes (Yssouf et al., 2013; Jumpertz et al., 2023).

Cuando no se han utilizado especímenes frescos, el etanol ha sido utilizado como conservante por la mayoría de los investigadores, aunque se han utilizado otros reactivos como la solución de Carnoy (Nebbak et al., 2017). La conservación en frío ha sido una opción también utilizada con relativa frecuencia (Karger et al., 2012; Boyer et al., 2017; Diarra et al., 2017; Karger et al., 2019). De cualquier forma, estos estudios han demostrado que, aunque el empleo de conservantes puede modificar los espectros, la identificación de garrapatas sigue siendo posible.

Aunque algunos autores han utilizado con éxito el cuerpo completo de la garrapata (Karger et al., 2012; Karger et al., 2019), las patas han sido la muestra preferida para los estudios de espectrometría, ya que el contenido proteico del tubo digestivo disminuye la reproducibilidad de los espectros. El número de patas utilizadas varía de uno a ocho. Además, se ha demostrado que la hemolinfa puede ser también una muestra válida para la identificación de garrapatas y patógenos (Yssouf et al., 2015b). Los estadios de desarrollo de las garrapatas (huevo, larva, ninfa y adulto) pueden ser también diferenciados mediante espectrometría de masas (Karger et al., 2012).

Los investigadores han utilizado diferentes protocolos de extracción proteica; aplicando diversos métodos de homogeneización de las muestras (manuales o automatizados); congelación de garrapatas completas en nitrógeno líquido; homogeneización en soluciones de ácido fórmico (AF) con/sin acetonitrilo, o cloruro de guanidinio; exposición de muestras conservadas en etanol a diferentes concentraciones de etanol antes de la homogeneización, etc.

En resumen, diferentes grupos de investigación han logrado resultados sobresalientes en la identificación de garrapatas mediante la tecnología MALDI-TOF MS, utilizando para ello diferentes tipos de muestras y aplicando una va-

riedad de protocolos de extracción proteica que involucran diversos materiales de laboratorio, reactivos y volúmenes utilizados.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPALES:

1. Optimizar un protocolo que permita tanto la extracción eficaz de proteínas a partir de muestras de patas de garrapatas, como la adquisición de espectros de masas de calidad mediante la aplicación de la tecnología MALDI-TOF MS.
2. Crear una biblioteca de espectros, que incluya las especies de garrapatas más representativas en nuestro país, con el propósito de utilizar, en la práctica clínica, MALDI-TOF MS como herramienta de identificación de estos artrópodos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Simplificar el protocolo en la medida de lo posible, de forma que éste pueda ser fácilmente implementado en cualquier laboratorio con un espectrómetro de masas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Lista de Materiales y Equipos

A continuación, se ofrece, por orden alfabético, el listado de los materiales y equipos que han sido empleados en la presente investigación en el contexto de espectrometría de masas:

- Acetonitrilo LiChrosolv®.
- Ácido fórmico Sigma-Aldrich®.
- Agitador tipo vórtex.
- Agua para cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC LiChrosolv®.
- Bisturí estéril Didactic®.
- Calentador de tazas de café Cosori®.
- Espectrómetro de masas Microflex LT® de Bruker.
- Espectrómetro de masas Maldi Biotyper Sirius® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).
- Estereomicroscopio Carl Zeiss®. de x25 y x40 aumentos (examen macroscópico de los especímenes de garrapatas).
- Agua de alta pureza para cromatografía de masas HPLC LiChrosolv®.
- Matriz Bruker® HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid).
- Microcentrífuga Minispin Eppendorf®.
- Microesferas de circonio-sílice de 0,5 mm Biospec®.
- Microesferas de cristal de 0,5 mm Biospec®.
- Micropipeta de volumen variable 0,5-10 μ L CappBravo®.
- Micropipeta de volumen variable 10-100 μ L Acura® manual Socorex.
- Micropistilos de plástico desechables para tubos de 1,5 mL WWR disponible pestle®.
- Micropistilos de acero para tubos de 1,5 mL (Rotilabo®).
- Palillo de madera Times®.
- Pinzas metálicas.
- Placas desechables de MALDI-TOF MS de 96 pocillos Bruker ® MBT Biotarget 96.
- Placas metálicas de MALDI-TOF MS de 96 pocillos de Bruker ®.
- Solvente orgánico: Bruker® standard solvent.

- Tubos de microcentrífuga de 1500 μ L (1.5mL) Eppendorf Tube®.
- Puntas de plástico 0,1-10 μ L ZAP ®Premier Micro Tip.
- Software: flexAnalysis v 3.4.
- Software: flexControl v 3.4.
- Software: MBT Compass Explorer v 4.1.

Antes de proceder al diseño de la presente investigación se invirtió un tiempo sustancial con el objetivo de familiarizarse en el manejo del espectrómetro de masas y se adquirieron habilidades en el manejo de las aplicaciones de software necesarias para el análisis y procesamiento de los espectros. El desarrollo de la investigación se desarrolló en las siguientes etapas:

- Fase 1: **Optimización del protocolo de extracción proteica** (febrero 2019-diciembre 2021). La calidad de los espectros depende de una serie de factores, incluyendo la extracción proteica, la adquisición de los espectros y su procesamiento posterior. En el presente documento, cuando se hable de optimización del proceso de extracción proteica, se hará referencia tanto a la extracción proteica propiamente dicha como a la optimización del proceso de adquisición de los espectros, ya que ambos procesos, preanalíticos y analíticos, son esenciales para obtener espectros de calidad.
- Fase 2: **Creación de una librería de espectros de garrapatas** (enero 2021-febrero 2021). A partir de muestras de patas de garrapatas, se generó una librería de espectros.
- Fase 3: **Validación del protocolo** (marzo 2021-abril 2022): Para comprobar la eficacia del protocolo, se llevaron a cabo tres pruebas de validación utilizando diferentes ejemplares de garrapatas.

Un aspecto relevante de la presente investigación es que su ejecución tuvo lugar en dos ubicaciones distintas. Los especímenes empleados en el presente estudio pertenecen a la colección de artrópodos del Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores (CRETAV), Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, La Rioja. Los especímenes obtenidos de pacientes, que fueron utilizados en uno de los ensayos de validación del protocolo, forman parte de la “colección zoonótica” del citado CRETAV, que se encuentra registrada en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III (código de referencia C.0006409).

La obtención de especímenes incluidos en el presente estudio, así como su identificación (morfológica y molecular) se llevaron a cabo en el laboratorio de patógenos especiales del CIBIR. Por el contrario, la optimización del protocolo de extracción proteica, la creación de una biblioteca de espectros y los test de validación se realizaron en el Servicio de Microbiología del HCULB. Las muestras (patas de las garrapatas y resto de artrópodos) se transportaron en hielo seco desde las instalaciones del CIBIR hasta el HCULB y se conservaron a

una temperatura de -80°C para su posterior análisis. La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la investigación con medicamentos de La Rioja (figura 19).

A continuación, se detalla cada una de las fases de investigación.

3.2. Optimización del protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas.

El primer paso de la investigación consistió en realizar una exhaustiva revisión bibliográfica con el propósito de seleccionar la muestra más adecuada para el análisis, así como identificar las variables con un mayor impacto en la espectrometría de masas, tanto en las fases preanalítica como analítica. Se optó por utilizar las patas de las garrapatas como muestra, en lugar del cuerpo completo (que había sido empleado en algunos estudios).

Una vez seleccionadas todas las variables que iban a ser analizadas, el siguiente paso se enfocó en la selección de las especies y estadios de garrapatas que iban a ser utilizadas en esta fase del estudio. La revisión bibliográfica sugería que todas las especies de garrapatas contienen una cantidad suficiente de proteínas en sus patas, lo que las hacía adecuadas para su identificación mediante espectrometría de masas. Además, la literatura científica sugería que la homogeneización de las patas era un aspecto crítico para la obtención de espectros de alta calidad. Por lo tanto, se determinó que el enfoque inicial debía centrarse en lograr una fragmentación adecuada de las extremidades. En consecuencia, la elección de una especie y estadio específicos de garrapatas no parecía ser un factor crítico en esta fase de la investigación.

Para el procesamiento de las muestras, las garrapatas completas (la mayoría conservadas a -80°C) fueron descongeladas y, utilizando un bisturí estéril, se procedió a la disección de entre una y cuatro patas, las cuales fueron cuidadosamente introducidas en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL y conservadas de nuevo a -80°C . Una vez preparadas las muestras, se procedió al transporte de las mismas (desde las instalaciones del CIBIR, Logroño) hasta el lugar de su posterior análisis en Zaragoza. Para asegurar su conservación las muestras se mantuvieron en hielo seco durante el trayecto y, a su llegada a Zaragoza, las muestras fueron nuevamente almacenadas a una temperatura de -80°C para su posterior procesamiento.

Como se ha comentado anteriormente, el primer objetivo de esta fase de la investigación fue lograr una buena fragmentación de las patas. La hipótesis de trabajo fue que la liberación de una cantidad suficiente de proteínas era esencial para obtener un espectro de calidad y que la dureza del exoesqueleto de las garrapatas requería la aplicación de métodos de fragmentación mecánica eficientes sobre sus patas. Debido a las condiciones presupuestarias del proyecto, una limitación de la investigación estuvo relacionada con la restricción para la adquisición de material de laboratorio.

Fundación Rioja Salud
Entrada N.º.....
31 MAYO 2022
Salida N.º..... 82

**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON
MEDICAMENTOS DE LA RIOJA**

D^a Lara García Álvarez

Jefa de la Secretaría Técnica Profesional del Comité de Ética de la Investigación con
medicamentos de La Rioja

CERTIFICA

Que una vez evaluado el Proyecto de Investigación:

Título:

*"Identificación de garrapatas de interés médico mediante espectrofotometría de masas
(maldivos)" (Ref. CEImLAR P.I. 599)*

que se va a llevar a cabo en el Hospital San Pedro/Fundación Rioja Salud en el Servicio de
Enfermedades Infecciosas por el Dr. José Antonio Oteo Revuelta como investigador principal.

El Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja (CEImLAR) manifiesta que, en reunión
ordinaria del 26/04/2022 no se han encontrado aspectos metodológicos, éticos y legales que
impidan su realización; por lo que se emite un DICTAMEN FAVORABLE.

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente – Real
Decreto 1090/2015 y Decreto 71/2005, de 2 de diciembre, de la Comunidad Autónoma de La
Rioja– para que la decisión del citado CEIm sea válida.

Que el CEIm de La Rioja, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con
las normas de BPC (CPMP/CH/135/95) y con la legislación vigente que regula su
funcionamiento, y que la composición del citado CEIm, es la indicada en el anexo I, teniendo en
cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de
interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización
del estudio.

Lo que firmo en Logroño a 31 de Mayo de 2022



Fdo. Jefa de la Secretaría Técnica Profesional del CEImLAR

Figura 19: Dictamen del comité de ética de investigación con medicamentos de La Rioja (CEImLAR)

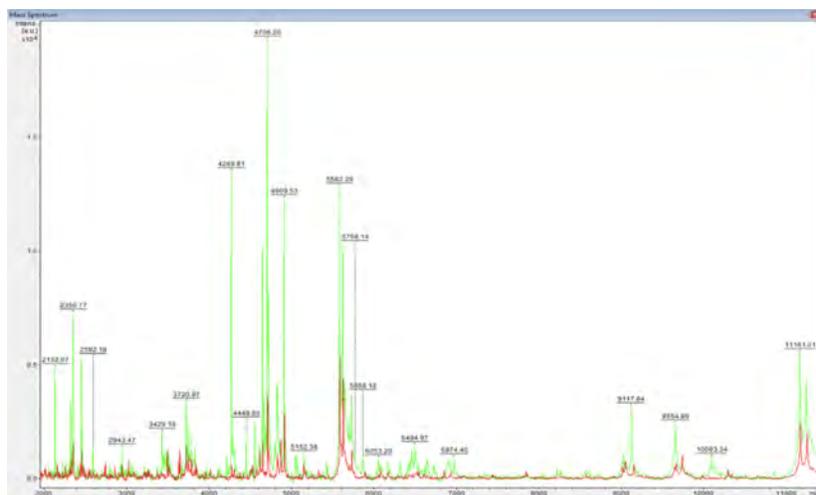


Figura 20: flexAnalysis : espectro del ejemplar 43, *Ixodes ricinus* (color rojo) con 39 picos y el ejemplar 124B, *Ixodes ricinus* (color verde) con 113 picos. El número de picos de la garrapata 124B es claramente superior. Fuente: aportación propia.

3.3. Evaluación del impacto de las variables seleccionadas sobre la fragmentación de las patas y/o en el espectro adquirido.

La medida del efecto de cada variable sobre la fragmentación de las patas y/o los espectros adquiridos se abordó utilizando uno de los dos parámetros siguientes: para las variables destinadas a lograr una adecuada fragmentación de las patas, se midió su efecto mediante inspección visual, verificando si se había producido la rotura de las patas en múltiples fragmentos. En el caso de las variables que se acompañaron de la obtención de un espectro de masas, se evaluó su efecto mediante la inspección visual de los espectros obtenidos utilizando el software flexAnalysis. Se consideraron los siguientes factores asociados a un espectro de calidad según Shah y Gharbia (2010):

- Un elevado número de picos (figura 20).
- Una alta relación señal/ruido (alto número de picos de alta intensidad y bajo nivel de ruido) (figura 21).
- Una alta resolución de picos (capacidad de discriminación de iones muy próximos en el espectro).
- Una alta precisión de los picos (es decir, baja dispersión de masas en mediciones repetidas) (figura 22).

Aunque los tres parámetros fueron inspeccionados visualmente, el número de picos en los espectros fue la variable registrada (Shah & Gharbia, 2010). En el análisis proteómico de garrapatas, no se ha establecido un valor mínimo en

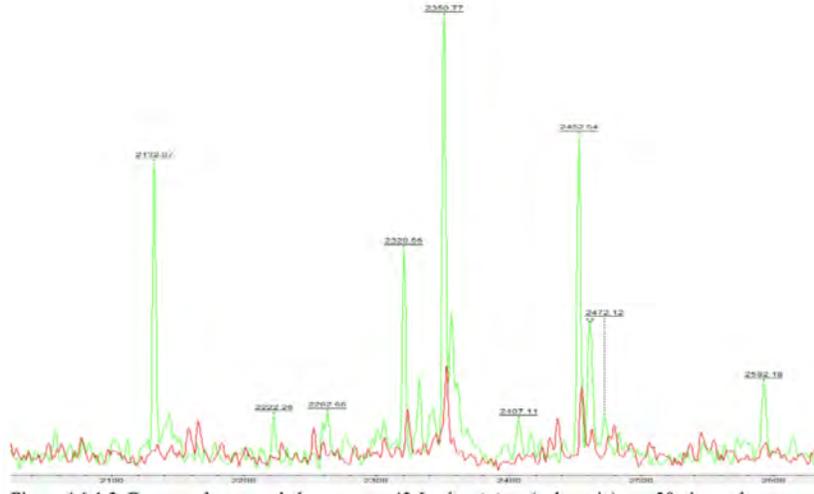


Figura 21: Espectro de masas del ejemplar 43, *Ixodes ricinus* (color rojo) con 39 picos y el ejemplar 124B, *Ixodes ricinus* (color verde) con 113 picos. Los picos obtenidos en las masas 2320 m/z, 2350 m/z y 2452 m/z son claramente más intensos en la garrapata 124B. Fuente: aportación propia.

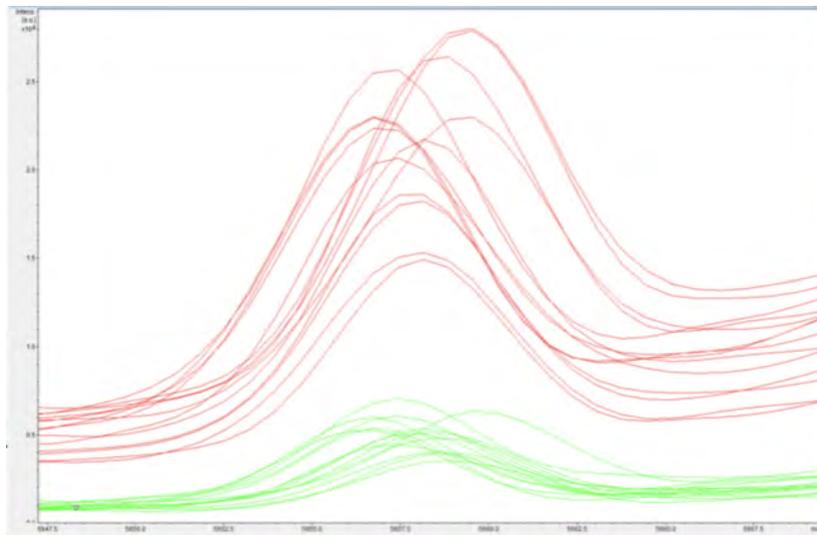


Figura 22: Espectro de masas correspondiente a una hembra adulta de *Dermacentor marginatus*. Detalle de la masa 5657,5 m/z. Dos métodos diferentes de disparo: MBT_AutoX (color verde) (método por defecto) y método MBT_AutoX 50-60% (color rojo) (potencia de láser incrementada). Obsérvese la pérdida de precisión (mayor dispersión de los picos) obtenidos al incrementar la potencia del láser (rojo). Fuente: aportación propia.

el número picos para determinar la calidad de un espectro. En las publicaciones científicas, rara vez se incluye esta información; el grupo de Rothen obtuvo un promedio de 42 picos (rango 14-145) al realizar una homogeneización manual de las patas, mientras que el grupo de Yssouf obtuvo un promedio de 106 picos (rango 60-136) al utilizar homogeneizadores automáticos (Yssouf et al., 2013; Rothen et al., 2016). A pesar de las diferencias en el número de picos, ambos estudios lograron identificar de forma correcta las especies de garrapatas, lo que indica que, a priori, el número de picos por sí mismo no es un factor limitante en la identificación de garrapatas.

Es importante destacar que, en ciertas situaciones, un pico aislado o varios de ellos, en un espectro de masas, pueden actuar como biomarcadores de factores de virulencia, mecanismos de resistencia o diferenciación de subespecies, entre otros aspectos (Shah & Gharbia, 2010). En la investigación con garrapatas, podría intuitivamente suponerse que un mayor número de picos en el espectro proporcionaría una mayor capacidad discriminatorio para poder diferenciar especies estrechamente relacionadas e incluso definir el estado infeccioso de un ejemplar en particular. Considerando toda esta información, se concluyó que un espectro que contuviese un mayor número de masas ofrecería una información más completa y, potencialmente, más relevante. Por lo tanto, se consideró que un enfoque que maximizara el número de picos en los espectros podría proporcionar una mayor riqueza de datos y, por ende, una mejor caracterización de las especies estudiadas.

Con el propósito de evaluar el efecto de cada variable del protocolo, se implementaron diversos experimentos. En la presente memoria, cada experimento se describe con la siguiente información:

- Justificación: motivo por el cual se ha seleccionado dicha variable.
- Hipótesis: efecto esperado de dicha variable.
- Experimento: descripción de las condiciones experimentales empleadas.
- Resultado: efecto observado de dicha variable.
- Conclusiones: en ciertos casos, fue necesario llevar a cabo múltiples experimentos para asegurar los efectos de una variable.

Identificación de los ejemplares de garrapatas.

Los distribuidores comerciales de espectrómetros de masas ofrecen librerías de espectros que permiten la identificación de microorganismos más comunes en el ámbito de la microbiología clínica (bacterias, hongos). Un aspecto importante de estos equipos comerciales es su flexibilidad, permitiendo al investigador incorporar nuevos espectros a la biblioteca de referencia. Para incorporar nuevos espectros a una biblioteca de referencia, el fabricante recomienda seguir unos estrictos criterios de calidad que permitan garantizar la identificación inequívoca de los organismos que pretenden ser incorporados a sus librerías. Estas recomendaciones incluyen la utilización de diversos métodos de caracterización

del organismo, por ejemplo, métodos bioquímicos, fisiológicos y de secuenciación genética que garanticen la identificación inequívoca del organismo. A nivel bacteriano, la definición de especie se basa habitualmente en la secuenciación de genes del RNA ribosomal, específicamente el gen 16S rRNA (Shah & Gharbia, 2010). En consecuencia, para la creación de una biblioteca de espectros de garrapatas, se consideró imprescindible la identificación de todos los ejemplares mediante métodos moleculares.

En la presente investigación se siguieron inicialmente criterios morfológicos para la clasificación inicial de las garrapatas, confirmándose su identidad mediante la secuenciación del gen mitocondrial 16S ribosomal (Portillo et al., 2005). El genoma mitocondrial se caracteriza por tener un bajo peso molecular, un número elevado de copias y un alto grado de conservación genética, lo que lo ha convertido en una herramienta valiosa para estudios moleculares y filogenéticos. En concreto, el genoma mitocondrial de las garrapatas es un ADN de doble cadena, de 14 a 16 kilobases, que contiene 37 genes: 13 genes codifican proteínas, 22 genes codifican ARN de transferencia y 2 genes codifican ARN ribosomal (Wang et al., 2019). Dicho genoma contiene una única copia de cada uno de los dos genes que codifican el ARN ribosomal: 12S rRNA y 16S rRNA. Debido a restricciones estructurales o funcionales, la variación nucleotídica de estos genes ha sido evolutivamente muy lenta, lo que ha llevado a que los genes mitocondriales sean ampliamente utilizados para los estudios filogenéticos de garrapatas.

Los ejemplares utilizados durante la optimización del protocolo de extracción proteica fueron identificados únicamente por sus características morfológicas, puesto que su clasificación inequívoca no era necesaria en esta fase de la investigación (los espectros correspondientes a los ejemplares utilizados en esta fase no fueron incorporados a la biblioteca de espectros). La tabla 2 muestra el listado completo de ejemplares utilizados en la fase de optimización proteica. Sin embargo, para la creación de la librería de espectros de garrapatas y para todos los test de validación se utilizaron ambos criterios de identificación, morfológicos y moleculares. Como ha sido comentado previamente, la obtención de todos los artrópodos, sus identificaciones (morfológica y molecular), así como la preparación de las muestras para su estudio por espectrometría de masas, tuvo lugar en las instalaciones del CIBIR (La Rioja).

3.4. Selección de las especies de garrapatas y sus estadios, así como otras especies de artrópodos, que deberían incluirse en la biblioteca de espectros

En el proceso de creación de una biblioteca de espectros, algunos expertos han recomendado, como criterio de calidad, realizar la comparación de los espectros entre organismos no relacionados entre sí. En algunos espectrómetros comerciales, como es el caso del espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius , el software MALDI Biotyper permite calcular el grado de similitud de

los espectros pertenecientes a diferentes (o similares) especies y generar un dendrograma. Visualmente, este dendrograma se asemeja a los utilizados en los estudios filogenéticos. Por este motivo, algunos investigadores han incluido en sus estudios, además de garrapatas, otros tipos de artrópodos. Siguiendo estas recomendaciones, se decidió incluir diferentes tipos de artrópodos en el estudio, además de las garrapatas:

- Tres especies de **mosquitos**: *Anopheles maculipennis* sensu lato (n=4), *Culex pipiens* (n=1), *Culiseta litorea* (n=1).
- Dos especies de **pulgas**: *Archaeopsylla erinacei* (n=2), *Ctenocephalides felis* (n=4).
- Dos especies de **piojos**: *Haematopinus suis* (n=3), *Pediculus humanus capitis* (n=4).
- Una especie de **mosca**: *Musca domestica* (n=1).

Las especies de garrapatas incluidas en la presente investigación, así como los estadios de éstas, fueron seleccionadas por su relevancia médica en nuestro país. El listado incluye las nueve especies de garrapatas que están involucradas de forma más frecuente en picaduras de pacientes atendidos en centros sanitarios de nuestro país (Palomar, 2017):

- *D. marginatus*.
- *D. reticulatus*.
- *H. punctata*.
- *H. lusitanicum*.
- *H. marginatum*.
- *I. ricinus*.
- *R. bursa*.
- *R. pusillus*.
- *R. sanguineus* sensu lato.

Los estadios adultos de estas especies son los que parasitan habitualmente a seres humanos, a excepción de *I. ricinus*, donde tanto larvas, ninfas como adultos se alimentan de forma habitual de animales y humanos. De forma correspondiente, sólo los espectros de adultos y, en el caso de *I. ricinus*, ninfas fueron incluidos en la biblioteca de referencia, ya que las larvas, en principio no transmitirían enfermedades en nuestro medio. La distribución geográfica de estas garrapatas en el territorio nacional, es especie-dependiente, por lo que no todas las especies están presentes en todas las regiones de España. Por dicho motivo, para garantizar una representación completa de todas las especies presentes en nuestro país, los ejemplares fueron recolectados de diversas áreas geográficas del

territorio español: Cantabria, Comunidad Valencia, Extremadura, La Rioja y País Vasco (tabla 2).

Si bien la mayor parte de las garrapatas fueron recolectadas a partir de vegetación, no todas las especies pudieron ser recolectadas de esta forma. Los ejemplares de algunas especies se obtuvieron a partir de diversos tipos de animales, como vacas, jabalíes o perros (tabla 2).

Para cubrir la heterogeneidad de los espectros entre individuos de una misma especie, se intentó incluir, para cada especie, al menos dos espectros de ejemplares machos y otros dos espectros de ejemplares hembras para cada especie de garrapata (aunque este criterio estuvo sujeto a la disponibilidad de ejemplares). Para la especie *I. ricinus*, especie de mayor relevancia en nuestro país, se determinó incluir cuatro espectros correspondientes a machos, cuatro espectros correspondientes a hembras y ocho espectros correspondientes a ninfas (tabla 2).

3.5. Aspectos relacionados con la espectrometría de masas: adquisición, análisis y procesamiento de los espectros

Los ejemplares seleccionados para crear la biblioteca de espectros fueron procesados siguiendo el protocolo de extracción proteica que había sido optimizado en la primera fase del estudio. Para la adquisición de los espectros, la configuración y manejo del espectrómetro de masas se siguieron las instrucciones del tutorial “Creation of Library Entries” de Bruker, en su versión de marzo de 2020(<https://www.bruker.com/en/services/training/microbiology-and-diagnostics/maldi-biotyper-training-movies.html>). Algunos de los aspectos más relevantes se detallan a continuación. Para un conocimiento más profundo se remite al lector a dicho tutorial.

En los espectrómetros de masas de Bruker, existen tres programas con diferentes funcionalidades:

- **MALDI Biotyper**: este software es el que se utiliza de forma rutinaria para la identificación bacteriana y de otros microorganismos.
- **flexControl**: este software permite al investigador controlar diversas condiciones durante la adquisición de los espectros, como la potencia del láser, número de disparos, el directorio de almacenamiento de los archivos, etc.
- **flexAnalysis** : este software permite la visualización detallada de los espectros adquiridos, la verificación de la calidad de los mismos, el número de picos, su intensidad, etc.
- **MaldiBiotyper Compass Explorer**: este software permite, entre otras funciones, comparar los espectros de la muestra problema con los espectros de referencia. Es el programa utilizado para crear la biblioteca de referencia.

Adquisición de los espectros.

Como se ha comentado, en el espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius, el software que gestiona la adquisición de los espectros se denomina flex-Control.

La adquisición de un espectro se produce en el contexto de un proyecto que ha sido previamente configurado. Se denomina “proyecto” a un conjunto de datos y configuraciones que el investigador puede definir y, de esta forma, modificar la forma en la que se adquieren los espectros. Los parámetros configurables incluyen el método de disparo, la potencia del láser, la ubicación de los archivos, y otros aspectos relacionados con la adquisición de espectros. Entre las opciones configurables, la selección del método “AutoXecute Method” tiene gran relevancia. El método por defecto es el denominado “MBT_AutoX” (que utiliza un rango de potencia de láser de 30-40 %), pero el investigador puede definir un método personalizado de disparo, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la potencia del láser.

Antes de adquirir los espectros es esencial realizar la calibración del equipo usando el reactivo Bacterial Test Standard (BTS), depositando dicho reactivo de forma preferente en uno de los pocillos centrales de la placa. Durante el proceso de calibración, los ocho picos característicos del Bruker Bacterial Test Standard. (BTS) deben estar dentro del rango de tolerancia aceptable de desplazamiento de masas. La calibración del equipo permite asegurar que los espectros que serán posteriormente adquiridos han sido generados en un espectrómetro que funciona en óptimas condiciones.

Para la creación de los espectros de referencia, Bruker recomienda depositar la muestra en ocho pocillos diferentes, con tres lecturas por pocillo. De esta forma, por cada muestra se generan 24 replicados técnicos. En el mismo proyecto, se pueden cargar tantas muestras como sean necesarias, siendo el número de pocillos de la placa el único factor limitante.

3.6. Visualización y evaluación de la calidad de los espectros.

Para la visualización de los espectros se utiliza el software flexAnalysis. En la barra superior de tareas, buscaremos la opción “Method” y seleccionaremos el método “MBT_Standard.FAMSMMethod”. Es importante asegurarse de que el número máximo de picos que pueden mostrarse en pantalla no esté limitado a 100. Para ello, en la barra de tareas de flexAnalysis, seleccionamos “Edit processing parameter” y estableceremos el límite superior de número de picos en 300 (figura 23). No se deben modificar otros parámetros, ya que esto puede alterar la presentación de los picos del espectro crudo. Una vez establecidos el límite superior de picos, aplicaremos dos correcciones al espectro: smoothing y baseline subtraction (figura 24). La corrección “smoothing” elimina el ruido de fondo del espectro con el fin de detectar posibles picos que pudieran estar

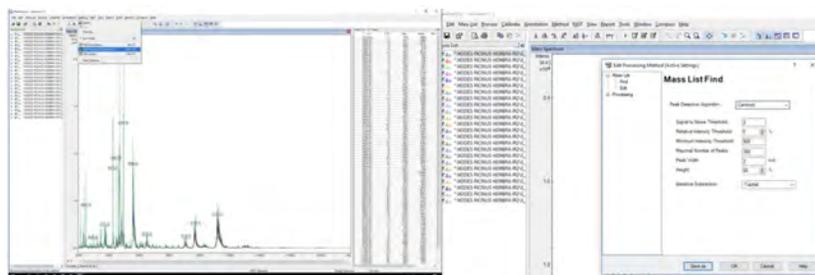


Figura 23: En flexAnalysis, barra de tareas superior, seleccionamos “Method” y dentro del menú, “Edit processing parameters”. En la ventana emergente, modificamos únicamente la opción “Maximal number of peaks”, escribiendo “300”. Es importante no modificar ningún otro parámetro que pueda afectar la presentación de los picos del espectro crudo. Fuente: aportación propia.



Figura 24: En flexAnalysis, barra de tareas superior, seleccionamos las opciones “Baseline subtraction”, “Smoothing” y “Número de picos” para corregir el aspecto original de los espectros. Fuente: aportación propia.

ocultos por dicho ruido. Esto se logra mediante la aplicación de un algoritmo matemático que suaviza el espectro. Por otro lado, la corrección “baseline subtraction” es un pre-procesado de los datos crudos de un espectro que permite eliminar las señales no peptídicas del espectro. Esto se logra mediante la eliminación de una línea base de referencia, que es una representación de la señal de fondo del espectro. Finalmente, para obtener la información sobre el número de picos detectados, hacemos clic en el icono “Number of peaks” en la barra de herramientas de flexAnalysis (figura 24). En la ventana derecha de la interfaz, se mostrará la información detallada del espectro seleccionado con los picos detectados, incluyendo su número total.

El software flexAnalysis no solo posibilita el examen individual de todas las masas en el espectro, sino también la evaluación global de la calidad del espectro adquirido. Garantizar la calidad en los espectros de referencia es fundamental para asegurar la fiabilidad de los resultados en futuras identificaciones. Como ha sido mencionado previamente, el software flexAnalysis permite al investigador realizar una inspección visual de los espectros. Dado que la generación de espectros de referencia se realiza creando un espectro promedio, a partir de los 24 replicados técnicos, antes de la creación de un espectro de referencia deben detectarse aquellos espectros marginales o “outliers”, sustancialmente diferentes del resto. Para ello, se selecciona la muestra en flexAnalysis y se cargan los 24 espectros adquiridos. Después, se selecciona un pico que tenga una intensidad suficiente y que esté, idealmente, ubicado entre 6000 y 7000 m/z. Si no se encuentra ningún pico en este rango, se ampliará el rango de búsqueda.

Una vez que se ha identificado un pico, se inspeccionan visualmente los 24 espectros, siendo este proceso facilitado por la representación en diferentes colores de cada uno de ellos. Debido al error analítico inherente, cada espectro muestra la misma molécula con valores discretamente diferentes de m/z (masa/carga), lo que implica que el valor de cada masa estará ligeramente desplazado respecto al resto de los espectros. Seleccionando la masa con el valor m/z más bajo, se calcula el rango de valores de m/z aceptables, considerando una máxima desviación de 500 partes por millón (ppm). Por ejemplo, para una hipotética molécula con el valor de m/z más bajo (de los 24 espectros) es de 6000 Da (6000 m/z), el máximo desplazamiento permitido sería de 6003 Da (6000 Da \times 500 ppm / 1,000,000 = 3). Los espectros en los cuales la molécula presenta valores de m/z por encima de este límite serían excluidos (figuras 25 y 26). Esta selección cuidadosa garantiza que solo los espectros con valores de m/z dentro del rango aceptable sean utilizados para la creación de la biblioteca de referencia.

Aunque no existe un número mínimo de espectros para generar un espectro de referencia, el fabricante recomienda contar con al menos 20 espectros, permitiendo así eliminar hasta un máximo de cuatro. En caso de no disponer de al menos 20 espectros, se sugiere repetir el proceso de preparación de la muestra para obtener un número adecuado. Una vez se han eliminado los espectros discordantes, los espectros de calidad resultantes pueden ser ya utilizados para crear el espectro de referencia.

Metodología para la creación de espectros de referencia.

En los espectrómetros de masas de la compañía Bruker, los espectros de referencia incluidos en la biblioteca se designan como “MSP” = **Main Spectrum Profile**. Como se ha comentado previamente, estos espectros son generados de manera automatizada a través de un software que realiza un promedio de todos los replicados técnicos: MBT Compass Explorer. Este proceso es muy sencillo. De manera predeterminada, el espectro de referencia tiene un límite superior de 70 picos, aunque dicho valor es ajustable por el investigador. El archivo donde se recoge toda la información relativa al espectro de masas admite la inscripción de metadatos, los cuales proporcionan información adicional sobre dicho espectro. Esta información es opcional y permite aportar detalles como la fuente del aislado, el genotipo o u otra forma de tipado, el método de extracción proteica, la matriz utilizada, las condiciones de crecimiento del cultivo (si procede) y un campo de texto libre para descripciones adicionales (figura 27).

En el marco del presente estudio, se incorporaron metadatos relativos a la fecha y la localización geográfica donde se recolectó cada ejemplar, así como el método de extracción y la matriz utilizada en el proceso.

Aunque el algoritmo de selección de los picos para la generación de espectros de referencia es desconocido, la identidad de dichos picos puede conocerse a través de la función “View MSP Peak List”, en MBT Compass Explorer. Esta

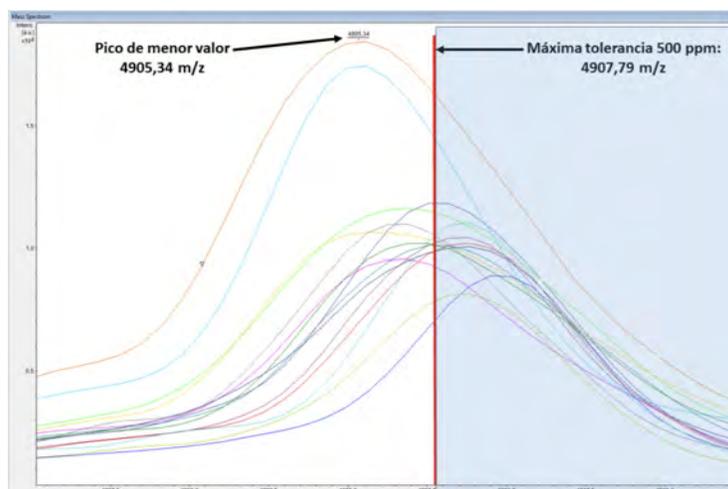


Figura 25: Ejemplar 122, macho de *Ixodes ricinus*. Se ha utilizado el método de disparo personalizado MBT_AutoX 50-60%. Aunque esta muestra no se utilizó para la creación del espectro de referencia, se puede observar que el máximo desplazamiento tolerable de 500 ppm para la masa 4905,34 m/z (la más baja de los 15 espectros adquiridos de esta muestra) es de 4907,79 m/z. Todas las masas con valores superiores (7 espectros en este ejemplo), que están sombreadas en azul en la imagen, serían rechazadas en caso de que esta muestra hubiera sido utilizada para crear un espectro de referencia. En este caso particular, se habrían rechazado 7 de los 15 espectros para la creación del espectro maestro.

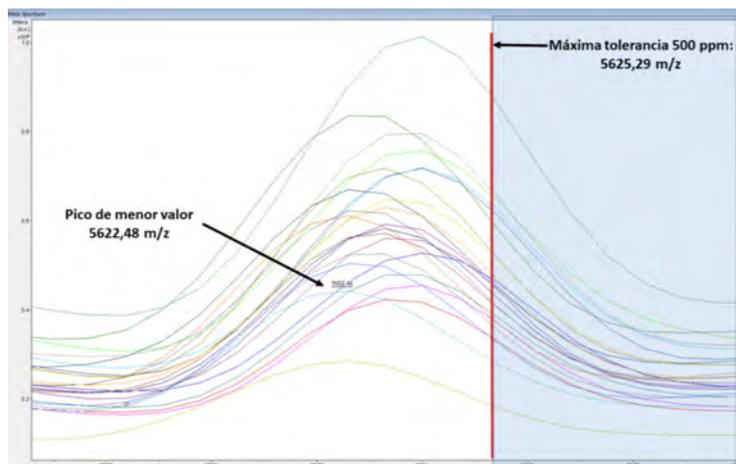


Figura 26: Ejemplar hembra de *Ixodes ricinus*, utilizado para crear la biblioteca de espectros. Para la masa específica de 5622,48 m/z, el máximo desplazamiento tolerable de 500 ppm estaba en 5625,29 m/z (línea roja en la imagen). En la totalidad de los 24 espectros adquiridos, todas las masas estaban dentro del rango de tolerancia, por lo que ninguno de esos 24 espectros fue rechazado para la creación del espectro maestro MSP.

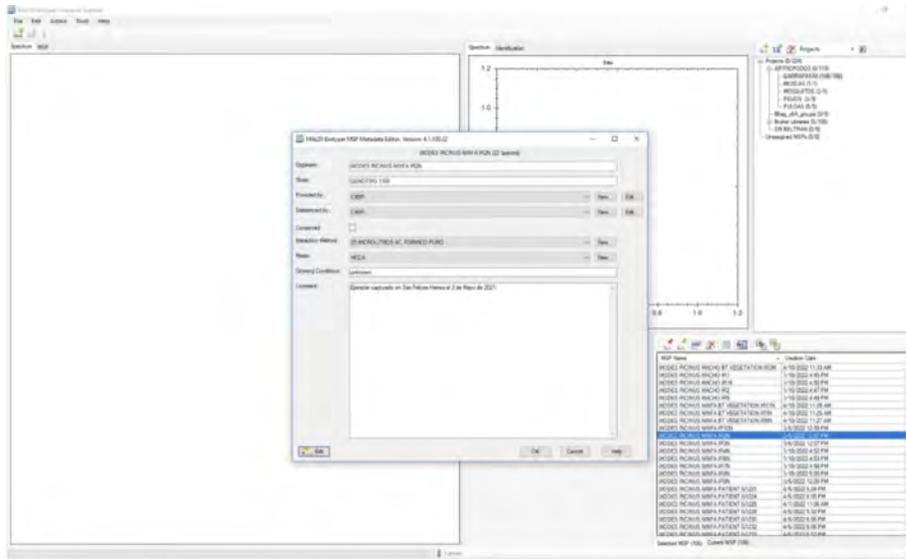


Figura 27: En MBT Compass Explorer pueden introducirse metadatos en el archivo que contiene la información del espectro de referencia. En este caso concreto, se introdujeron el genotipo, el centro de procedencia del ejemplar, el método de extracción proteica utilizado y la matriz empleada.

opción permite al investigador visualizar la lista completa de picos que conforman el espectro de referencia, incluyendo: valor m/z , la intensidad relativa, el peso relativo y la frecuencia de aparición (% de replicados técnicos en los que se detecta ese pico).

Como ya hemos comentado, MBT Compass Explorer presenta una función muy interesante que consiste en la generación de **dendrogramas**. Un dendrograma se define como una representación gráfica que se basa en un procedimiento jerárquico de agrupamiento de datos, conformando un diagrama con forma de árbol. Los datos son organizados en categorías, subcategorías o familias adicionales. MBT Compass Explorer es capaz de generar dendrogramas a partir de los espectros de referencia y estos dendrogramas son, visualmente, similares a los generados en estudios filogenéticos. Es importante señalar que, mientras que un árbol filogenético se basa en información genética, el dendrograma, en MALDI-TOF MS, está basado en proteínas que pueden haber experimentado modificaciones translacionales. Esta limitación explica la menor capacidad resolutoria de MALDI-TOF MS en comparación con los métodos moleculares para establecer relaciones filogenéticas (Shah & Gharbia, 2010). A pesar de estas limitaciones, la presentación visual en forma de dendrogramas permite obtener una idea bastante precisa del grado de correlación entre los espectros de la misma o diferente especies.

Para la construcción de un dendrograma, a partir de los MSP, se deben seguir una serie de pasos: En MBT Compass Explorer, en la parte superior de-

recha de la barra de tareas, se debe seleccionar “Bruker taxonomy” y del menú desplegable, seleccionar “projects”. Posteriormente, se procederá a la selección de la biblioteca de espectros pertinente, en este caso, la denominada “Garrapatas” Se seleccionará “Add Hierarchy To MSP Selection”, lo que resultará en la transferencia de los espectros MSP asociados a dicha biblioteca hacia la ventana inferior. Una vez completada la carga de los espectros, será posible generar dendrogramas mediante la selección de cualquier combinación de espectros (simplemente pulsando sobre cada espectro de interés), ya sea de la misma especie o de especies diferentes. Al seleccionar los espectros se pulsará sobre el botón “View MSP Dendrogram”, lo que producirá la generación automática del dendrograma. Los espectros que presenten similitudes exhibirán el mismo color en el dendrograma, y en la parte inferior existe una escala numérica que indica la distancia entre los diferentes espectros. Es relevante destacar que el dendrograma se genera a partir de los espectros de referencia y no en el espectro original que contiene la totalidad de las masas.

Conforme se ha mencionado, el archivo MSP por defecto es una selección de los 70 picos más representativos del espectro. Como resultado, en aquellos espectros que poseen una cantidad significativa de picos (muy por encima de 70), las conclusiones derivadas del dendrograma podrían no reflejar completamente el espectro en su totalidad, dado que muchos picos del espectro original quedan excluidos de este análisis.

Pruebas realizadas para validar el protocolo optimizado de extracción proteica y adquisición de espectros de masas

En espectrometría de masas, la implantación de un protocolo requiere la realización de pruebas validación, utilizando para ello muestras cuyas condiciones sean lo más parecidas a las que se esperan encontrar en la práctica clínica. Diversos factores no controlados por el investigador podrían afectar los resultados obtenidos. De forma general, es importante realizar ensayos de validación que incluyan una variedad de muestras representativas y en diferentes condiciones para obtener resultados más robustos y fiables. Con este objetivo, se llevaron a cabo tres tipos de ensayos o test de validación que, por orden cronológico, consistieron en:

- **Ensayos EC:** de todas las muestras colectadas por el CIBIR, una parte de las mismas fue destinada a la generación de la biblioteca de espectros, mientras que otra parte fue utilizada para la realización de los ensayos EC. Lógicamente, los ejemplares incluidos en estos test fueron recolectados en las mismas ubicaciones geográficas, de las mismas fuentes y almacenados bajo las mismas condiciones que los utilizados para generar la biblioteca de espectros. Puesto que los ejemplares en estos ensayos fueron recolectados mayoritariamente de vegetación, se designó este grupo “EC”: “Ejemplares recolectados en el Campo”. El diseño de este tipo de pruebas pretendía verificar si MALDI-TOF era capaz de identificar especies presentes en la biblioteca de referencia.

- **Ensayos ENR:** estas pruebas incluyeron especies no incluidas en la biblioteca de espectros (de ahí el nombre). El diseño de estas pruebas tenía como objetivo evaluar el rendimiento de MALDI-TOF MS ante especies de garrapatas que no estaban representadas en el catálogo de especies de la biblioteca, de ahí la designación “ENR”: “Ejemplares No Registrados”. Este escenario era hipotéticamente posible en situaciones reales (por ejemplo, especies de garrapatas que pican a seres humanos de forma excepcional o garrapatas adquiridas fuera de España).
- **Ensayos EP:** estas pruebas incluyeron garrapatas que habían sido retiradas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario San Pedro de Logroño, entre el 29 de abril y el 28 de mayo de 2021 (un mes completo) y que habían sido enviadas al CRETAV. Los ejemplares en estos ensayos fueron recolectados exclusivamente de pacientes, de ahí la designación de ensayos “EP”: “Ejemplares de Pacientes”. El propósito de estas pruebas consistió en evaluar la eficacia del protocolo en un contexto real y corroborar su utilidad en la identificación de especímenes de garrapatas en un entorno clínico auténtico.

Un aspecto metodológico importante en el diseño de estos ensayos de validación es la particularidad de que, en los ensayos EC y ENR, los investigadores tenían conocimiento de la identidad de los ejemplares previamente a la ejecución de dichos ensayos. Por el contrario, en los test de validación EP, la identidad de los ejemplares era previamente desconocida. Por lo tanto, el diseño metodológico de estas últimas pruebas se asemeja más fielmente a la situación clínica real.

La inclusión de especies de garrapatas en los test de validación (EC, ENR, EP) sufrió las mismas limitaciones que las correspondientes en el proceso de creación de la biblioteca de espectros: la limitada disponibilidad de ejemplares para algunas de las especies de garrapata. Por lo tanto, no todas las especies, géneros o estadios estuvieron representados en los test de validación.

En todos los test de validación, la muestra fue depositada por triplicado, realizando tres lecturas en cada pocillo. De los nueve espectros adquiridos, aquel con el valor LSV más alto es el que se muestra en las tablas de resultados. Para comprender los resultados de los test de validación, es esencial comprender como se realiza el proceso de identificación. Brevemente, la identificación de una muestra desconocida se realiza mediante la comparación del espectro adquirido de dicha muestra con todos los espectros de referencia, utilizando un algoritmo patentado por el fabricante. Este algoritmo genera una puntuación o score, que se calcula a partir de las coincidencias del espectro de la muestra desconocida con un MSP específico, las coincidencias entre el MSP específico con el espectro de la muestra desconocida y el grado de similitud en la intensidad de los picos compartidos (figura 28). El valor máximo es 3 ($\log(1 \times 1 \times 1 \times 1000) = 3$). Todas las coincidencias son presentadas por orden decreciente de puntuación (= similitud)(figura 29). En esta memoria, los términos puntuación, score o LSV se utilizan de manera intercambiable.

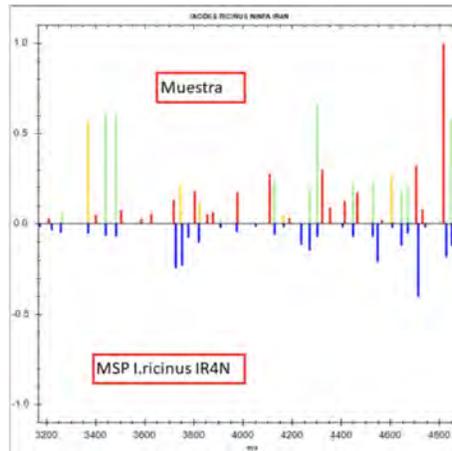


Figura 28: En MBT Compass Explorer, se muestra la comparación entre los picos del espectro de una muestra desconocida (parte superior) y los picos correspondientes a un espectro de referencia de la biblioteca, en este caso el espectro de una ninfa de *Ixodes ricinus*. En la figura pueden observarse dos de los tres factores que tiene en cuenta el software para generar el valor LSV (log score value): las coincidencias entre los picos de la muestra desconocida y los del MSP de la ninfa de *Ixodes ricinus*, así como las coincidencias en la intensidad de los picos compartidos. En verde se muestran aquellas masas de la muestra que coinciden en posición e intensidad con las del espectro de referencia; en amarillo aquellas en las que existe una ligera discordancia en posición o intensidad; y en rojo aquellas que no coinciden con ninguna masa del espectro de referencia. Fuente: aportación propia.

Ma	Detected Species	Log(Sc)	Ma	Detected Species	Log(Sc)
1	IXODES RICINUS NINFA IR8N	2.130	1	DERMACENTOR MARGINATUS HEMBRA DMH6	2.240
2	IXODES RICINUS NINFA IR2N	1.930	2	DERMACENTOR MARGINATUS MACHO DMM3	2.230
3	IXODES RICINUS NINFA IR10N	1.880	3	DERMACENTOR MARGINATUS HEMBRA DMH17	2.180
4	IXODES RICINUS NINFA IR3N	1.880	4	DERMACENTOR MARGINATUS MACHO DMM20	2.160
5	IXODES RICINUS HEMBRA IR4	1.800	5	DERMACENTOR MARGINATUS MACHO DMM5	2.160
6	IXODES RICINUS NINFA IR7N	1.740	6	DERMACENTOR MARGINATUS HEMBRA DMH8	2.040
7	IXODES RICINUS MACHO IR16	1.640	7	DERMACENTOR RETICULATUS MACHO DR2	1.150
8	IXODES RICINUS NINFA IR4N	1.560	8	DERMACENTOR RETICULATUS HEMBRA DRH2	1.100
9	IXODES RICINUS HEMBRA IR2	1.560	9	HYALOMMA MARGINATUM MACHO HM2	1.090
10	IXODES RICINUS NINFA IR8N	1.520	10	HYALOMMA MARGINATUM MACHO HM11	1.040

Figura 29: En MBT Compass Explorer, se puede visualizar los espectros de referencia con mejores coincidencias con el espectro de la muestra problema, estando ordenados de mayor a menor, según su grado de similitud. Izquierda: todas las coincidencias de la muestra corresponden a espectros de la especie *Ixodes ricinus*. Derecha: las mejores coincidencias (mayor valor LSV) corresponden a la especie *Dermacentor marginatus*, mientras que, con menores valores de LSV (menor grado de coincidencia en los espectros), se encuentran las especies *Dermacentor reticulatus* e *Hyalomma marginatum*. Fuente: aportación propia.

Las tablas de resultados pertenecientes a los ensayos EC y EP, muestran, de izquierda a derecha, la siguiente información:

1. Identidad de la especie de garrapata y su estadio / género, determinado por criterios morfológicos y moleculares.
2. Identidad de la especie de garrapata y su estadio / género, determinados por MALDI-TOF MS (utilizando para ello el espectro con mayor LSV).
3. Para la especie con mejor score de identificación, rango de valores LSV obtenidos en los nueve espectros, así como su promedio.
4. Especie con segundo mejor score de identificación. Si todas las mejores identificaciones correspondían a una única especie, el resultado en esta columna se muestra como “Ninguna”.
5. Para la especie con segundo mejor score de identificación, el promedio de puntuaciones obtenidas en los nueve espectros. Si todas las identificaciones correspondían a una única especie, el resultado en esta columna se muestra como “Ninguna”.
6. Para las dos especies con mejores puntuaciones, se calculó, para cada espectro, la diferencia de puntuaciones entre estas dos especies. El promedio de estas diferencias, es el valor que se muestra en esta columna. Si todas las identificaciones correspondían a una única especie, el resultado en esta columna se muestra como “Ninguna”.

La tabla de resultados perteneciente a los ensayos ENR, muestran, de izquierda a derecha, la siguiente información::

1. Identidad de la especie de garrapata y su estadio / género, determinado por criterios morfológicos y moleculares.
2. Identidad de la especie de garrapata y su estadio / género, determinados por MALDI-TOF MS (utilizando para ello el espectro con mayor LSV).
3. Para la especie con mejor score de identificación, rango de valores LSV.
4. Para la especie con mejor score de identificación, promedio de valores LSV.
5. Especie con segundo mejor score de identificación.
6. Para la especie con segundo mejor score de identificación, el valor LSV máximo obtenido en los 9 espectros.

4. RESULTADOS

4.1. Optimización de un protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas a partir de patas de garrapatas

La revisión bibliográfica permitió seleccionar en primer lugar el tipo de muestra y, en segundo lugar, una serie de variables que habían demostrado tener un impacto apreciable en la espectrometría de masas, tanto en la fase pre-analítica como en la analítica.

Las patas fueron utilizadas como muestra a estudio y no el cuerpo completo de la garrapata. Una vez seleccionadas las variables a testar, el siguiente paso consistió en determinar qué especies y estadios de garrapatas debían ser utilizados en esta fase del estudio. Según las referencias bibliográficas, todas las especies de garrapatas habían mostrado contener una cantidad suficiente de proteínas en sus patas para permitir su identificación mediante espectrometría de masas y, además, la bibliografía sugería que la homogeneización de las patas parecía ser un factor crítico, por lo que se decidió que el primer paso de la presente investigación debía centrarse en lograr una buena fragmentación de las extremidades. Por lo tanto, la elección de la especie y estadio concretos de garrapatas no parecía, *a priori*, ser un factor crítico en esta fase de la investigación. Se incluyeron, por lo tanto, diversas especies y estadios de garrapatas para el diseño del protocolo de extracción proteica.

Como se ha comentado previamente, todos los artrópodos incluidos en el presente estudio se obtuvieron de la colección del CRETAV. En la tabla 2 se detallan las características relativas a los ejemplares de garrapatas utilizadas en la optimización del protocolo de extracción proteica. Todos ellos corresponden a especímenes, no alimentados, recolectados en diversos municipios en el año 2010 y que se habían conservado a -80°C .

Id.	Fecha recogida	Especie	Estadio	Municipio	Conser.
1	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
2	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
3	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
4	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
5	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
6	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
7	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
8	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
9	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Larva	Ribavellosa	-80°C
10	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
11	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
12	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
13	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
...					

(Tabla 2 continua desde página previa)

Id.	Fecha recogida	Especie	Estadio	Municipio	Conser.
14	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
15	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
16	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
17	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
18	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
19	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Ninfa	Ribavellosa	-80°C
20	23/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Moncalvillo	-80°C
21	23/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Moncalvillo	-80°C
22	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Tobía	-80°C
23	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Tobía	-80°C
24	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Tobía	-80°C
25	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
26	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
27	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
28	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
29	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
30	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
31	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
32	19/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
33	22/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Moncalvillo	-80°C
34	22/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Moncalvillo	-80°C
35	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
36	24/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Tobía	-80°C
37	24/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Tobía	-80°C
38	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
39	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
40	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
41	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
42	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
43	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
44	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
45	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
46	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
47	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
48	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
49	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
50	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
51	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
52	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
53	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
54	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
55	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
...					

(Tabla 2 continua desde página previa)

Id.	Fecha recogida	Especie	Estadio	Municipio	Conser.
56	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
57	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
58	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
59	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
60	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
61	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
62	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
63	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
64	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
65	27/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
66	27/10/2010	<i>Dermacentor marginatus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
67	27/10/2010	<i>Haemaphysalis inermis</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
68	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
69	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
70	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
71	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
72	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
73	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
74	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
75	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Ribavellosa	-80°C
76	27/10/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Ribavellosa	-80°C
77	30/10/2010	<i>Dermacentor marginatus</i>	Hembra	Enciso	-80°C
78	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Enciso	-80°C
79	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Enciso	-80°C
80	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Enciso	-80°C
81	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Hembra	Enciso	-80°C
82	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Macho	Enciso	-80°C
83	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Macho	Enciso	-80°C
84	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Macho	Enciso	-80°C
85	30/10/2010	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Macho	Enciso	-80°C
86	04/11/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
87	04/11/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
88	04/11/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
89	04/11/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
90	04/11/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
91	17/10/2018	<i>Dermacentor marginatus</i>	Hembra	Torrecilla en Cameros	Nevera
92	17/10/2018	<i>Dermacentor marginatus</i>	Hembra	Torrecilla en Cameros	Nevera
93	17/10/2018	<i>Dermacentor marginatus</i>	Macho	Torrecilla en Cameros	Nevera
94	17/10/2018	<i>Dermacentor marginatus</i>	Macho	Torrecilla en Cameros	Nevera
95B	20/02/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Villalba	-80°C
96	27/04/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
97	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca de Rioja	-80°C
...					

(Tabla 2 continua desde página previa)

Id.	Fecha recogida	Especie	Estadio	Municipio	Conser.
98	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca de Rioja	-80°C
99	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca de Rioja	-80°C
100	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca de Rioja	-80°C
101	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca de Rioja	-80°C
102	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca de Rioja	-80°C
103	26/05/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca de Rioja	-80°C
104	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
105	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
106	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
107	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
108	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C
109	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
110	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
111	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
112	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
113	03/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Lumbreras	-80°C
114	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca	-80°C
115	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
116	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
117	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
118	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
119	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
120	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
121	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
122	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
123	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
124	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Daroca	-80°C
125	08/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Hembra	Daroca	-80°C
126	24/06/2010	<i>Ixodes ricinus</i>	Macho	Lumbreras	-80°C

Tabla 2: Ejemplares de garrapatas utilizadas en la fase de optimización. De izquierda a derecha: identificación del ejemplar, fecha de recolección, especie, estadio, localidad de recolección y método de conservación. Id.: número identificador del ejemplar. Conser.: método de conservación

La preparación de las muestras consistió en el descongelado del ejemplar y la posterior disección de, entre una y ocho patas. Utilizando un bisturí estéril, entre una y cuatro patas fueron diseccionadas, introducidas en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL, y conservadas de nuevo a -80°C. El transporte de las muestras hasta Zaragoza se realizó en hielo seco y, a su llegada, las muestras fueron conservadas de nuevo a -80°C hasta su procesamiento posterior.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo en las fases iniciales de la investigación se centró en lograr una buena fragmentación de las patas.

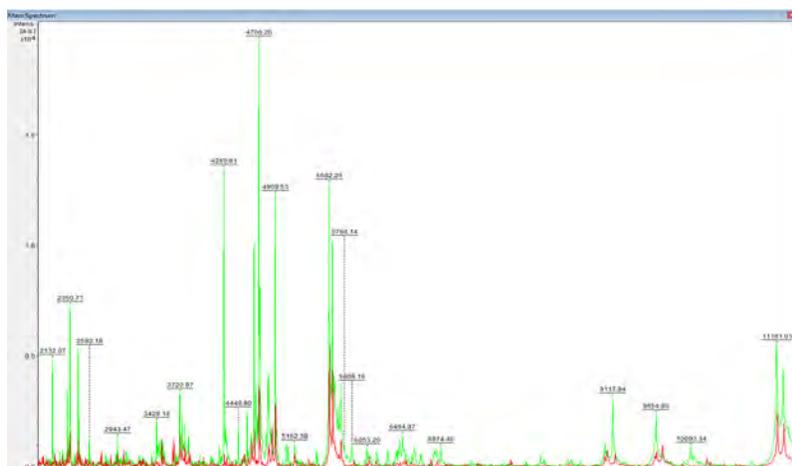


Figura 30: flexAnalysis : espectro de la garrapata 43, hembra de *Ixodes ricinus* (color rojo), con 39 picos y la garrapata 124, macho de *Ixodes ricinus* (color verde) con 113 picos. El número de picos de la garrapata 124 es claramente superior. Fuente: aportación propia.

La hipótesis fue que la liberación de una cantidad suficiente de proteínas era esencial para garantizar un espectro de calidad y que la dureza del exoesqueleto de las garrapatas requiere la aplicación de métodos de fragmentación mecánica eficientes sobre sus patas.

Debido a las condiciones presupuestarias del proyecto, así como al objetivo secundario de conseguir un protocolo de aplicación universal, una limitación de la investigación consistió en la restricción para la adquisición de material adicional de laboratorio.

Con el fin de evaluar el efecto de cada una de las variables sobre la eficiencia de la extracción proteica y/o de la obtención de espectros, se midieron algunos parámetros:

- Para las variables que implicaban diferentes métodos de fragmentación mecánica de las patas, el efecto de dicha variable se midió mediante la simple inspección visual.
- Para aquellas variables en las que se obtuvo un espectro de masas, se evaluó la calidad del mismo mediante inspección visual utilizando el software flexAnalysis. Se consideraron los siguientes factores, que habían sido asociados a un espectro de calidad (Shah & Gharbia, 2010): un elevado número de picos (figura 30), una alta relación señal/ruido (alto número de picos de alta intensidad y bajo nivel de ruido) (figura 31) y una alta precisión de los picos (es decir, baja dispersión de masas en mediciones repetidas) (figura 32).

A continuación se presenta un análisis detallado de las variables investigadas, junto con los resultados derivados de dichas variables:

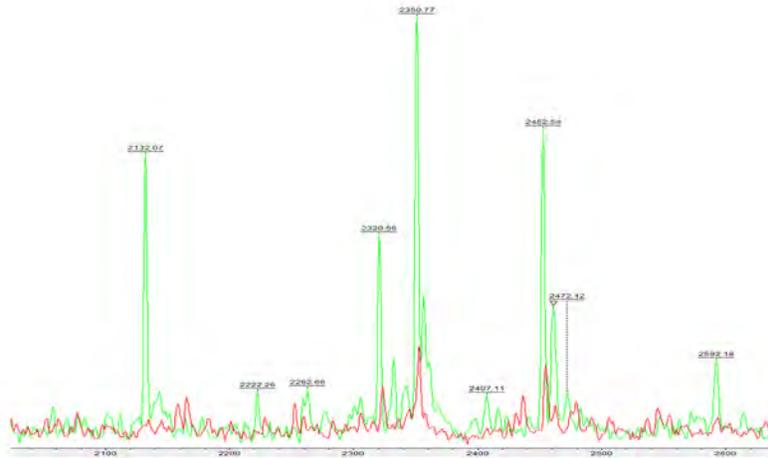


Figura 31: flexAnalysis: espectro de la garrapata 43, hembra de *Ixodes ricinus* (color rojo), con 39 picos y la garrapata 124, macho de *Ixodes ricinus* (color verde) con 113 picos. Las masas 2320 m/z, 2350 m/z y 2452 m/z son claramente más intensos en la garrapata 124

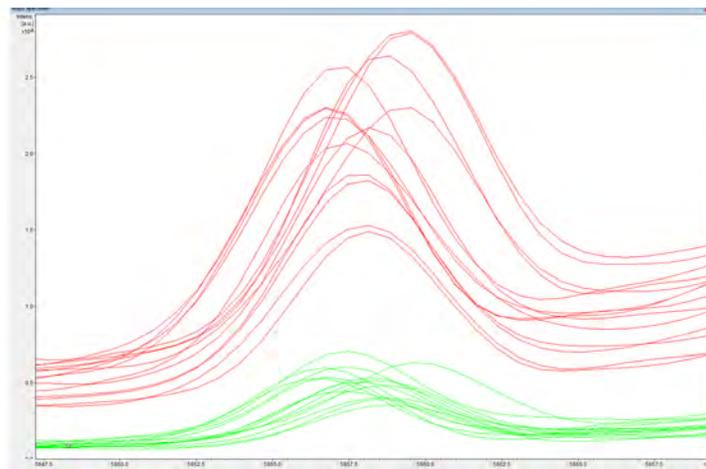


Figura 32: Espectro de una hembra de *Dermacentor marginatus*. Detalle de la masa 5657,5 m/z, con dos métodos diferentes de disparo: MBT_AutoX (color verde) (método por defecto) y método MBT_AutoX 50-60% (color rojo) (incrementando la potencia de láser). Obsérvese la pérdida de precisión (mayor dispersión de los picos) obtenidos al incrementar la potencia del láser (rojo). Fuente: aportación propia.



Figura 33: Tubo de eppendorf de 1,5 mL con microesferas de circonio-sílice de 0,5 mm de diámetro tras la agitación con vórtex durante diez minutos. Obsérvese que las patas han permanecido intactas con este método de fragmentación. Fuente: aportación propia.

Fragmentación de las patas con microesferas de 0,5 mm

Justificación: los métodos automatizados de fragmentación de patas incluyen microesferas para lograr su fragmentación. Los homogeneizadores automáticos consiguen altas velocidades de impacto entre las microesferas y la muestra. El laboratorio del HCULB no disponía de homogeneizadores automáticos, lo que exigió utilizar métodos de fragmentación alternativos.

Hipótesis: el uso de microesferas en agitación mediante vórtex, favorecería el impacto a alta velocidad de las mismas contra las patas, lo que resultaría en la fragmentación de éstas.

Experimento: el primer experimento consistió en la utilización de microesferas de 0,5 mm de diámetro depositadas en tubos eppendorf de 1,5 mL, asegurando el contacto con las patas mediante agitación en vórtex. Las microesferas fueron introducidas manualmente en los tubos eppendorf hasta que las patas quedaron cubiertas por ellas. Se utilizaron primero microesferas de circonio-sílice de 0,5 mm y posteriormente microesferas de cristal de 0,5 mm. Los primeros ensayos se realizaron “en seco” (figura 33); posteriormente, se añadieron 15 μ L de AF y 15 μ L de acetonitrilo previamente a la agitación con vórtex.

Resultados: en ambos casos, la agitación prolongada (≤ 10 minutos) no tuvo ningún efecto sobre las patas, sin conseguirse la fragmentación de las mismas (figura 33).

Conclusiones: la utilización de microesferas de 0,5 mm mediante agitación por vórtex no resulta efectiva en la fragmentación de las patas de garrapatas.

Fragmentación de las patas con palillos de madera en distintas concentraciones de ácido fórmico

Justificación: en espectrometría de masas, es práctica común utilizar palillos de madera para transferir colonias bacterianas desde el medio de agar hasta la placa metálica de depósito de muestras de MALDI-TOF MS.

Hipótesis: la aplicación de un método de fragmentación manual, con mayor control por parte del usuario, podría mejorar la fragmentación de las patas y la liberación de las proteínas contenidas en ellas.

Experimento: Muestra: ejemplar 43 (2), hembra adulta de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en cuatro tubos eppendorf (cuatro muestras), cada uno conteniendo un par de patas: muestras 43.1, 43.2, 43.3 y 43.4.

Se utilizó el AF en distintas concentraciones (utilizando agua de cromatografía de alto rendimiento -HPLC- para su dilución). Las concentraciones finales de AF fueron: 20 % (43.1), 40 % (43.2), 60 % (43.3) y 80 % (43.4).

En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco” (sin la ayuda de reactivos). Realizando movimientos repetidos de presión y rotación con la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas se consiguió la fragmentación de estas de forma relativamente sencilla (figura 34). A continuación, en cada tubo se añadieron 20 µL de AF (diferentes concentraciones según la muestra) y posteriormente 20 µL de acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 5668g (13000 rpm) durante 4 minutos. En la placa metálica MS, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz.

Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 24 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, software flexControl y un método de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio en el número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 43.1 (AF 20 %): 50,4 picos.
- Muestra 43.2 (AF 40 %): 45,4 picos.
- Muestra 43.3 (AF 60 %): 58,4 picos.
- Muestra 43.4 (AF 80 %): 64,1 picos.

Conclusiones: la fragmentación mecánica de patas de garrapatas puede lograrse utilizando palillos de madera. La concentración de AF utilizada para la extracción proteica influye en el número de picos de los espectros, si bien este incremento no es lineal. Así, con AF 20 % se obtuvieron más picos (50,4) que con AF 40 % (45,4). Aunque la fragmentación de las patas resultó relativamente fácil, los fragmentos iniciales resultantes son difíciles de machacar debido al reducido



Figura 34: Tubo de eppendorf de 1,5 mL. Fragmentación de las patas con palillo de madera. Fuente: aportación propia.

tamaño de estos, lo que dificulta su contacto con el palillo. El carácter poroso de los palillos permite, además, la pérdida de parte del eluido de la muestra junto con las proteínas disueltas en ella. Por todo ello, se decidió realizar experimentos adicionales con la finalidad de encontrar un método óptimo de fragmentación.

Aplicación secuencial de palillos de madera y microesferas en la fragmentación de extremidades.

Justificación: los resultados de los experimentos anteriores muestran que, ni la agitación de la muestra con microesferas, ni los palillos de madera son métodos eficaces en la fragmentación de las patas. Se requiere, por tanto, un método de homogeneización más efectivo.

Hipótesis: la combinación de dos métodos mecánicos de fragmentación podría tener un efecto sinérgico, lo cual resultaría beneficioso en comparación con la utilización aislada de cada uno de ellos.

Experimento.

Muestra: Espécimen 42, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en cuatro tubos eppendorf, cada uno conteniendo un par de patas: muestras 42.1, 42.2, 42.3 y 42.4. Se utilizó el AF en dos concentraciones (utilizando HPLC para su dilución). Para las muestras 42.1 y 42.2 se utilizó AF 80 %, mientras que para las muestras 42.3 y 42.4 se utilizó AF puro. En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μL de AF (diferentes concentraciones según la muestra). A continuación se introdujeron manualmente las microesferas en cantidad suficiente para que las patas quedaran totalmente cubiertas. Se utilizaron microesferas de circonio-sílice de 0,5 mm y se agitaron los tubos eppendorf a la máxima velocidad durante 120 segundos. A continuación, se añadieron 20 μL de acetonitrilo a cada muestra

y se agitó con vórtex durante escasos segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cuatro minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon 8 pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de 8 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX. de acetonitrilo y se agitó con vórtex durante escasos segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cuatro minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon 8 pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de 8 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 42.1 (AF 80 %): 28,75 picos.
- Muestra 42.2 (AF 80 %): 39,25 picos.
- Muestra 42.3 (AF puro): 22,37 picos.
- Muestra 42.4 (AF puro): 35,50 picos.

Conclusiones: en relación al número de picos, la aplicación conjunta de palillos de madera y microesferas de circonio-sílice como método de fragmentación no aporta ninguna ventaja adicional en la fragmentación de las patas de garrapatas, en comparación con los resultados obtenidos mediante la utilización exclusiva de palillos de madera. Existe un discreto, pero apreciable, aumento en el número de picos de los espectros obtenidos al utilizar AF diluido al 80 % en comparación con el AF.

Número de patas

Justificación: el número de patas utilizadas como muestra varía entre los estudios publicados, fluctuando entre un mínimo de una pata y un máximo de ocho, siendo el número más frecuentemente empleado cuatro.

Hipótesis: la inclusión de un mayor número de patas resultaría en la extracción de una mayor concentración de proteínas, lo que, en consecuencia, produciría espectros de masas con un número mayor de picos.

Experimento 1:

Muestra: espécimen 46, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas: muestras 46.1 y 46.2. Ambas muestras (46.1 y 46.2) fueron sometidas a un tratamiento similar,

siendo la única variable diferencial la concentración de AF. Se utilizó el AF en dos concentraciones (utilizando HPLC para su dilución). Para la muestra 46.1 se utilizó AF 80 %, mientras que para la muestra 46.2 se utilizó AF.

En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de AF (diferentes concentraciones según el tubo). Las microesferas fueron introducidas manualmente en los tubos eppendorf hasta que las patas quedaron cubiertas por ellas. Se utilizaron microesferas de circonio-sílice y se agitaron los tubos eppendorf a máxima velocidad durante 240 segundos. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de acetonitrilo y se agitó por vórtex durante escasos segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante un minuto. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: El promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 46.1 (AF 80 %): 37,12 picos.
- Muestra 46.2 (AF puro): 7,12 picos.

Experimento 2: muestra: ejemplar 45, hembra de *I. ricinus*; dicho espécimen contenía sólo seis patas (no ocho), que se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo tres patas (muestras: 45.1; 45.2). Se utilizó el AF en dos concentraciones. Para la muestra 45.1 se utilizó AF 80 %, mientras que para la muestra 45.2 se utilizó AF puro. Las concentraciones de AF utilizadas en este experimento fueron: AF 80 % (muestra 45.1) y AF puro (muestra 45.2).

En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de AF (diferentes concentraciones según la muestra). Se agitaron los tubos eppendorf a máxima velocidad durante 240 segundos, pero no se utilizaron microesferas en este experimento. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de acetonitrilo y se agitó con vórtex durante escasos segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante un minuto. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon 16 pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de 16

espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 45.1 (AF 80 %): 39,56 picos.
- Muestra 45.2 (AF puro): 41,50 picos.

Conclusiones de los experimentos 1 y 2: de forma paradójica, el aumento en el número de extremidades no se correlacionó de forma positiva con el número de picos. Sin embargo, es importante destacar que el diseño de ambos experimentos no permite responder a esta cuestión. Para obtener una respuesta, es indispensable comparar, en un mismo experimento, muestras con dos y cuatro extremidades.

Experimento 3: muestra: ejemplar 125, hembra de *I. ricinus*. Se dividieron las ocho patas en dos tubos eppendorf, el primero conteniendo dos patas (muestra 125.1) y el segundo seis patas (muestra 125.2). Las dos muestras fueron procesadas de forma idéntica, de forma que la única variable diferente fue el número de extremidades.

Inicialmente se agregaron 5 μ L de AF 80 % y se procedió a la fragmentación de las extremidades mediante el uso de un micropistilo de plástico desechable y mezcla intermitente por agitación con vórtex. Una vez alcanzada la fragmentación, se añadieron 35 μ L adicionales de AF 80 %. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon cinco pocillos y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 15 espectros por cada muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 25-35 %.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 125.1 (2 patas): 71,05 picos.
- Muestra 125.2 (6 patas): 117,66 picos.

Conclusiones: de forma paradójica, se ha observado un aumento del 91 % en la cantidad de picos cuando se usan dos patas en comparación con las cuatro patas empleadas en experimentos anteriores. Nuevamente, se podría atribuir a las fluctuaciones en la eficiencia operacional del espectrómetro de masas (u otras condiciones experimentales) como causantes de las discrepancias observadas.

Bajo condiciones experimentales ideales, dos extremidades podrían ser incluso suficientes para generar un espectro de alta calidad. Este incremento en el número de patas no se traduce, sin embargo, en un ascenso proporcional en el recuento de picos: así, un incremento del 300 % en el número de patas se asoció

a un aumento del 65 % en el recuento de picos. Aunque en ciertas circunstancias podría ser preciso utilizar hasta seis extremidades (por ejemplo, cuando las extremidades son particularmente pequeñas, por ejemplo en el caso de ninfas), cuatro patas parece ser una cantidad, a priori, suficiente para estudios de espectrometría de masas. En un contexto clínico, es siempre recomendable preservar la mayor cantidad del espécimen para posibles posteriores análisis, como pruebas moleculares.

Fragmentación de las patas con micropistilos o con palillos de madera

Justificación: conocer si existen diferencias entre la eficacia en la homogeneización de dos métodos diferentes de fragmentación mecánica.

Hipótesis: los micropistilos de plástico se ajustarían de manera más precisa al tamaño y forma de los tubos eppendorf en comparación con los palillos de madera, lo que podría resultar en una fragmentación más eficaz de las patas al garantizar un contacto más estrecho.

Experimento: muestra: ejemplar 48, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas: muestras 48.1 y 48.2. Las dos muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el método de fragmentación: Las patas de la muestra 48.1 fueron sido fragmentadas utilizando un micropistilo desechable de plástico de 1.5 mL, mientras que las patas de la muestra 48.2 fueron fragmentadas utilizando un palillo de madera.

Para la muestra 48.1.: las patas se colocaron con la ayuda de pinzas metálicas en el fondo del tubo eppendorf. A continuación, la punta del micropistilo se introdujo en el fondo del tubo eppendorf y se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación sobre las patas con el objetivo de fragmentar las mismas mediante la aplicación de presión en las paredes del tubo eppendorf. De forma intermitente se sometió la muestra a agitación por vórtex a velocidad máxima y se continuó con la fragmentación manual. Este procedimiento puede tomar varios minutos (figura 35). Para la muestra 48.2, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de AF 80 % y 20 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante 60 segundos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra

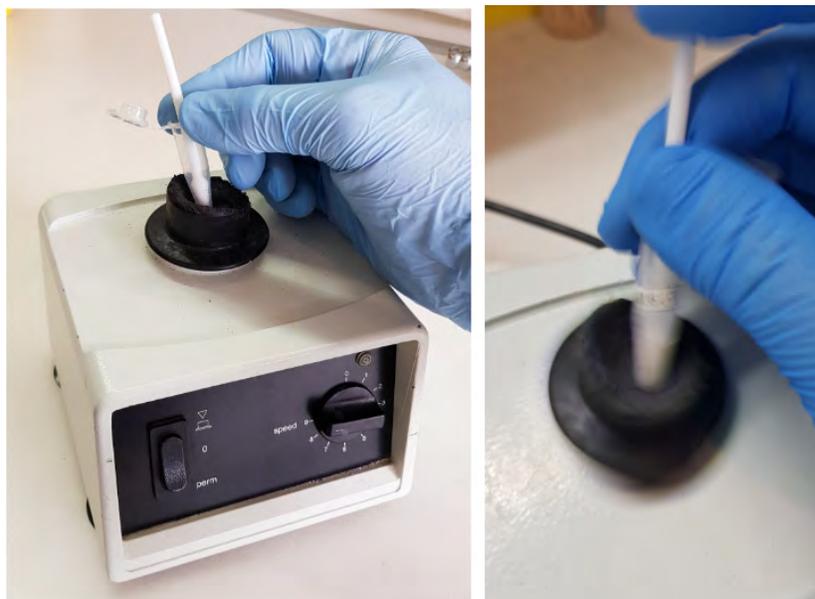


Figura 35: Tubo eppendorf de 1,5 mL. Rotura de las patas utilizando un micropistilo de plástico (izquierda) y la ocasional agitación por vórtex a velocidad máxima (derecha). A pesar de que se mantuvo la tapa del tubo eppendorf abierta durante la agitación por vórtex, la cantidad de líquido era limitada, lo que evitó su pérdida durante el proceso de homogeneización. Fuente: aportación propia.

fue:

- Muestra 48.1 (micropistilo de plástico): 37,25 picos.
- Muestra 48.2 (palillo de madera): 52,62 picos.

Conclusiones: en contra de lo esperado, la utilización de micropistilos de plástico como método de fragmentación no se asoció a un incremento en el número de picos de los espectros, sino más bien lo contrario.

Tipo de micropistilo (acero o plástico) empleado en la fragmentación de las patas.

Justificación: en la literatura científica, para la fragmentación de las patas se han utilizado con éxito tanto los micropistilos de plástico como los de metal.

Hipótesis: el micropistilo de acero inoxidable, reutilizable, podría incrementar la eficacia del proceso de fragmentación de las patas y, adicionalmente, reducir los costes asociados en comparación con los micropistilos desechables de plástico.

Experimento: muestra: ejemplar 117, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 117.1 y 117.2. Ambas muestras fueron procesadas de

forma idéntica salvo por el tipo de micropistilo utilizado en la fragmentación de las patas: muestra 117.1 (micropistilo de acero inoxidable) y 117.2 (micropistilo de plástico desechable).

Para ambas muestras, se añadieron 20 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de acero inoxidable (muestra 117.1) o micropistilo de plástico (muestra 117.2) hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó un microlitro del sobrenadante y, una vez seca, un microlitro de matriz. Para cada muestra se pipetearon cinco pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 15 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius spectrometer y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 34-44 %.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 117.1 (micropistilo de acero inoxidable): 64,6 picos.
- Muestra 117.2 (micropistilo de plástico): 71 picos.

Conclusiones: la fragmentación de las patas depende del íntimo contacto entre micropistilos y patas. A su vez, este contacto depende del grado de coincidencia en las morfologías del tubo eppendorf y del micropistilo de acero. Si el acoplamiento del micropistilo con el tubo eppendorf no es exacto, el contacto entre las patas, el micropistilo de acero y las paredes del tubo eppendorf puede verse comprometido, disminuyendo la eficacia del proceso de trituración. El acoplamiento incompleto puede justificar por qué la fragmentación con micropistilo de acero precisó más tiempo y se obtuviesen menos picos respecto al realizado con micropistilos de plástico (figura 36).

Fragmentación de las patas en solución de reactivos de extracción proteica.

Justificación: el contenido proteico liberado desde las patas durante su fragmentación puede quedar adherido a las superficies de palillos de madera, micropistilos de plástico o tubos eppendorf.

Hipótesis: en los experimentos iniciales, la fragmentación de las patas se llevó a cabo “en seco”, donde los reactivos habían sido añadidos posteriormente a su fragmentación. La homogeneización de las patas en un medio líquido podría favorecer que las proteínas liberadas desde el compartimento celular se disolvieran en la suspensión líquida, resultando en un aumento de la concentración final de proteínas.

Experimento: muestra: ejemplar 49, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas:



Figura 36: Micropistilo de acero inoxidable dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL. Obsérvese que la punta del micropistilo no llega a hacer contacto con el fondo del tubo eppendorf (flecha roja). Esto puede dificultar el contacto entre el micropistilo y las patas, haciendo que el proceso de fragmentación sea más laborioso y, posiblemente, menos eficiente

muestras 49.1 y 49.2. Las dos muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el método de fragmentación. Las patas de la muestra 49.1 fueron fragmentadas utilizando un micropistilo de plástico, mientras que las patas de la muestra 49.2 fueron fragmentadas utilizando un palillo de madera. En cada tubo se añadieron 20 μL de AF 80 % y 20 μL de acetonitrilo y se procedió a la fragmentación de las extremidades mediante el uso de un micropistilo de plástico desechable y agitación intermitente con vórtex. Una vez alcanzada la fragmentación, se añadieron 35 μL adicionales de AF 80 %. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante un minuto. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: durante el proceso de fragmentación mecánica, se observó que multitud de fragmentos de cada pata se adherían a la superficie del micropistilo (figura 37). Esto condujo a la aplicación, sobre el micropistilo, de 10 μL adicionales, tanto de AF 80 % como de acetonitrilo con la intención de desprender dichos fragmentos. En el caso de los palillos de madera, la superficie porosa de estos absorbió una cantidad significativa de reactivos (así como de la muestra).

El promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:



Figura 37: Fragmentación en seco (sin la adición de AF) del ejemplar 125, hembra de *Ixodes ricinus*, en un tubo de eppendorf de 1,5 mL. Como resultado de la homogeneización, parte de los fragmentos quedaron adheridos al micropistilo de plástico (izquierda) y a las paredes internas del tubo eppendorf (derecha). Fuente: aportación propia.

- Muestra 49.1 (micropistilo): 38,37 picos.
- Muestra 49.2 (palillo de madera): 35,50 picos.

Conclusiones: aunque los resultados son todavía subóptimos, con la utilización de micropistilos de plástico se obtienen espectros con un número discretamente superior de picos. Por consiguiente, el número obtenido de picos sigue siendo insatisfactorio en términos cuantitativos.

Fragmentación de las patas en solución de reactivos de extracción proteica y con la aplicación secuencial de dos métodos de homogeneización

Justificación: la aplicación secuencial de dos métodos de fragmentación mecánica puede tener mayor eficacia que la aplicación de cada uno de ellos de forma aislada.

Hipótesis: la utilización de los micropistilos como método coadyuvante a los palillos de madera podría mejorar los resultados respecto a la fragmentación utilizando únicamente los palillos de madera.

Experimento:

Muestra: ejemplar 50, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas: muestras 50.1 y 50.2. Las dos muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el método de fragmentación. Las patas de la muestra 50.1 fueron fragmentadas utilizando únicamente el palillo de madera; las patas de la muestra 50.2 fueron fragmentadas utilizando el palillo de madera primero y el

micropistilo de plástico, posteriormente.

En ambas muestras, las patas fueron fragmentadas utilizando un palillo de madera, hasta conseguir la rotura completa (no se observaba ninguna pata completa). Posteriormente, se añadieron 20 μL de AF y otros 20 μL de acetonitrilo. Para la muestra 50.2, se utilizó entonces un micropistilo de plástico (como ha sido comentado previamente), obteniendo fragmentos progresivamente más pequeños. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante de la muestra y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: la fragmentación con ambos métodos (muestra 50.2) produjo fragmentos más numerosos y de menor tamaño que la fragmentación exclusiva con palillos de madera. Sin embargo, los fragmentos de las patas seguían adhiriéndose a las paredes del micropistilo y del tubo eppendorf. Se observó un aumento del 53% en el número de picos en el espectro obtenido tras la fragmentación con ambos métodos. El promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 50.1 (palillo de madera): 27,50 picos.
- Muestra 50.2 (palillo de madera y micropistilo): 42,12 picos.

Conclusiones: no puede determinarse con certeza si, el incremento observado en el número de picos con la aplicación de ambos métodos de homogeneización, se debe a una mayor eficiencia en la fragmentación utilizando ambos métodos o a la actividad aislada del micropistilo de plástico. En experimentos anteriores, los resultados obtenidos con la aplicación de palillos o micropistilos fueron similares. De esta forma, es posible que los resultados observados se deban más al efecto combinado de ambos métodos. A pesar de la fragmentación en dos pasos, el número de picos obtenidos sigue siendo insuficiente.

Protocolo de extracción proteica diseñado para la extracción proteica en actinomicetos

Justificación: los actinomicetos son un grupo de bacterias que poseen paredes celulares de especial composición, la cual exige la aplicación de protocolos específicos para su identificación por MALDI-TOF MS (Shah & Gharbia, 2010). Las garrapatas, por su parte, poseen un exoesqueleto muy duro compuesto de proteínas y quitina, lo que hace que la extracción proteica requiera también el uso de métodos no convencionales en espectrometría de masas.

Hipótesis: la aplicación de un protocolo que ha sido ideado para la extracción proteica de microorganismos difíciles de identificar por MALDI-TOF

MS podría ser igualmente válido para la extracción proteica de otro grupo de organismos, no relacionados, que presentan requerimientos especiales en su identificación por espectrometría de masas.

Experimento:

Muestra: ejemplar 52, macho de *I. ricinus*; ejemplar 59, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas: muestras 52.1, 52.2, 59.1 y 59.2. Las cuatro muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el método de extracción proteica: fragmentación de las patas mediante micropistilos de plástico (muestras 52.1 y 59.1) o aplicación del protocolo de extracción proteica de actinomicetos (muestras 52.2 y 59.2).

Las muestras 52.1 y 59.1: las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico. Se añadieron 50 μL de AF y otros 50 μL de acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Las muestras 52.2 y 59.2 se procesaron siguiendo el protocolo de actinomicetos: se depositaron 500 μL de agua destilada estéril en cada tubo eppendorf. Los tubos se introdujeron en agua en ebullición durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos y se retiró el sobrenadante. Sobre el pellet se depositaron 300 μL de agua destilada estéril y 900 μL de etanol. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se mezcló con 50 μL de AF 70 % y se dejó actuar durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 50 μL de acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: debido a cuestiones informáticas no se dispone de los resultados del promedio de picos de ningunas de las dos muestras. Sin embargo, al comparar los espectros obtenidos para cada muestra, se observaron notables diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. Los espectros obtenidos mediante el método utilizado para actinomicetos (muestras 52.2 y 59.2) exhibieron un número considerablemente mayor de picos en comparación con aquellos obtenidos mediante el uso de micropistilos (52.1 y 59.1). La inspección visual de los espectros muestra que el protocolo utilizado para actinomicetos se asocia con la eliminación de algunos picos y la aparición de otros, lo que provoca una

alteración sustancial del espectro.

Conclusiones: se desaconseja utilizar el calor prolongado como método de extracción proteica debido a la modificación del espectro proteico, debido posiblemente a una desnaturalización de las proteínas.

Volumen del ácido fórmico

Justificación: En el análisis de garrapatas, la muestra a analizar mediante espectrometría de masas es una solución líquida que contiene los reactivos utilizados para la extracción proteica (normalmente de AF y/o acetonitrilo), ya que las patas de la garrapata no pueden ser utilizadas directamente como muestra. La concentración del analito (proteínas en nuestro caso) y la ratio analito:matriz son factores críticos en la espectrometría de masas y tienen un impacto significativo en los resultados obtenidos (Shah & Gharbia, 2010). Por lo tanto, es esencial ajustar cuidadosamente la concentración de la muestra.

Hipótesis: la disminución en los volúmenes de AF y acetonitrilo durante el proceso de extracción proteica resultaría en una mayor concentración de proteínas por volumen de muestra, lo que, a su vez, se traducirá en un incremento en el número e intensidad de los picos en el espectro de masas.

Experimento:

Muestra: ejemplar 98, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 98.1 y 98.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el volumen de AF y acetonitrilo utilizado en cada una de ellas: para la muestra 98.1. se utilizaron 25 μ L de AF y 25 μ L de acetonitrilo, mientras que para la muestra 98.2 se utilizaron 15 μ L de ambos reactivos.

Las muestras 98.1 y 98.2: las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Para la muestra 98.1 se añadieron 25 μ L de AF y 25 μ L de acetonitrilo. Para la muestra 98.2 se añadieron 15 μ L de AF y 15 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon nueve pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 27 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 98.1 (25 μ L de AF + 25 μ L de acetonitrilo): 46,00 picos.
- Muestra 98.2 (15 μ L de AF + 15 μ L de acetonitrilo): 47,67 picos.

Conclusiones: la reducción del 40 % en los volúmenes de AF y acetonitrilo utilizados en el proceso de extracción proteica, tiene un impacto mínimo en el número de picos del espectro (incremento del 1 %). Sin embargo, un mayor volumen de muestra ofrece la posibilidad de realizar estudios adicionales, así como la posibilidad de conservación de la muestra para su uso posterior.

Uso del ácido fórmico en su formulación pura o AF diluido al 80 %

Justificación: los datos obtenidos en los experimentos anteriores, evidenciaron que la concentración de AF (20-80 %) tiene una influencia significativa en el promedio de picos en los espectros de masas. La revisión de la literatura científica reveló que las concentraciones de AF empleadas en diversos protocolos publicados son considerablemente heterogéneas. De este modo, se contempló la necesidad de examinar con más profundidad la relación entre las distintas concentraciones de AF y el recuento de picos de los espectros.

Hipótesis: experimentos anteriores mostraron que existe una correlación directa entre las concentraciones de AF (AF) en el rango de 20 % a 80 %, y la cuantía total de picos, obteniendo el valor máximo con una concentración de AF 80 %. De forma inferencial, es plausible postular que un AF al 100 % de concentración permitiría la obtención de un espectro con un número superior de picos

Experimento 1:

Muestra: ejemplar 41, hembra adulta de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en cuatro tubos eppendorf, cada uno conteniendo un par de patas: muestras 41.1, 41.2, 41.3 y 41.4.

Se utilizó el AF en dos concentraciones diferentes. Para las muestras 41.1; 41.2 se utilizó AF 80 %, mientras que para las muestras 41.3; 41.4 se utilizó AF puro. En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 μ L de AF a diferentes concentraciones según el tubo y posteriormente 20 μ L de acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cuatro minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon ocho pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de ocho espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 41.1 (AF 80 %): 45,62 picos.
- Muestra 41.2 (AF 80 %): 42,12 picos.
- Muestra 41.3 (AF puro): 40,87 picos.
- Muestra 41.4 (AF puro): 42,20 picos.

Conclusiones: en relación al número de picos, la diferencia en los resultados obtenidos utilizando AF y AF 80 % es mínima, pudiendo utilizarse cualquiera de estas dos concentraciones de forma indistinta. Sin embargo, aunque es cierto que el AF 80 % podría aumentar ligeramente el número de picos obtenidos, debe tenerse en consideración el mayor tiempo de procesamiento requerido.

Experimento 2: Muestra: ejemplar 45, hembra de *I. ricinus*; dicho espécimen contenía sólo seis patas (no ocho), que se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo tres patas (muestras: 45.1; 45.2). Se utilizó el AF en dos concentraciones (utilizando agua de cromatografía de alto rendimiento para su dilución). Para la muestra 45.1 se utilizó AF 80 %, mientras que para la muestra 45.2 se utilizó AF (sin diluir). Las concentraciones de AF utilizadas en este experimento fueron: AF 80 % (muestra 45.1) y AF (muestra 45.2).

En primer lugar, se procedió a la rotura de las patas “en seco”. Se realizaron movimientos repetidos de presión y rotación utilizando la base del palillo de madera (debido a su mayor superficie de contacto) directamente sobre las patas, lo que resultó en su fragmentación de forma relativamente sencilla. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 µL de AF (diferentes concentraciones según el tubo). Se agitaron los tubos eppendorf a la máxima velocidad de vórtex durante 240 segundos, pero no se utilizaron microesferas en este experimento. A continuación, en cada tubo se añadieron 20 µL de acetonitrilo y se agitó con vórtex durante escasos segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante un minuto. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon 16 pocillos de la placa metálica y se realizó una lectura por pocillo, obteniéndose un total de 16 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 45.1 (AF 80 %): 39,56 picos.
- Muestra 45.2 (AF puro): 41,50 picos.

Conclusiones de los experimentos 1 y 2 : de forma paradójica, el aumento en el número de extremidades no se correlacionó de forma positiva con el número de picos. Sin embargo, es importante destacar que el diseño de ambos

experimentos no permite responder a esta cuestión. Para obtener una respuesta, sería indispensable comparar, en un mismo experimento, muestras con dos y cuatro extremidades. Otros factores, no controlados por el investigador, podrían adicionalmente haber influido en los resultados de ambos experimentos.

Experimento 3: Muestra: ejemplar 125, hembra de *I. ricinus*. Se dividió la totalidad de sus ocho patas en dos tubos eppendorf, el primero conteniendo dos patas (muestra 125.1) y el segundo seis patas (muestra 125.2). Las dos muestras fueron procesadas de forma idéntica, de forma que la única variable diferente fue la cantidad de extremidades contenidas en cada uno de los tubos eppendorf.

Inicialmente se agregaron cinco microlitros de AF 80% y se procedió a la fragmentación de las extremidades mediante el uso de un micropistilo de plástico desechable y agitación intermitente por vórtex. Una vez alcanzada la fragmentación, se añadieron 35 μ L adicionales de AF 80%. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon cinco pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 15 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex LT de Bruker, y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 25-35%.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 125.1 (2 patas): 71,05 picos.
- Muestra 125.2 (6 patas): 117,66 picos.

Conclusiones: de forma paradójica, en el experimento 3, la muestra 125.1 (que incluyó el procesamiento de, únicamente, dos patas) mostró una cifra de picos 91% superior a la observada en las muestras 41.1-41.4 (que incluyeron el procesamiento de cuatro patas). Estas discrepancias se deben probablemente a fluctuaciones en la eficiencia operacional del espectrómetro de masas (u otras condiciones experimentales).

Bajo condiciones experimentales ideales, dos extremidades podrían ser incluso suficientes para generar un espectro de alta calidad. Un incremento en el número de patas no implica un ascenso proporcional en el recuento de picos de los espectros. Un incremento del 300% (de 2 a 6) en el número de extremidades se relaciona con un aumento del 66% en el recuento de picos. Aunque en ciertas condiciones podría ser preciso utilizar hasta seis extremidades (por ejemplo, extremidades particularmente pequeñas, como en el caso de ninfas), cuatro patas parece ser una cantidad, a priori, suficiente para estudios de espectrometría de masas. En un contexto clínico, es recomendable preservar la mayor cantidad del espécimen para posibles posteriores estudios (por ejemplo. pruebas moleculares).

Extracción proteica con ácido fórmico, en ausencia de acetonitrilo

Justificación: mayores volúmenes de AF y de acetonitrilo habían producido mejoras en la cristalización de la matriz. Si embargo, el diseño de los experimentos no permitía conocer con precisión la contribución individual de cada uno de estos reactivos. El AF parece ser un componente esencial para una óptima extracción proteica, si bien algunos protocolos prescinden con éxito del acetonitrilo. Se diseñó un experimento para evaluar el papel individual del acetonitrilo en el proceso de extracción proteica. El objetivo fue determinar si la presencia o ausencia del acetonitrilo tiene un impacto significativo en la extracción de proteínas o en la cristalización de la matriz.

Hipótesis: el acetonitrilo podría ser un reactivo prescindible en el proceso de extracción proteica, ya que algunas publicaciones han demostrado que es posible la extracción proteica sin la inclusión del mismo en el protocolo de extracción.

Experimento: muestra: ejemplar 113, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 113.1 y 113.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica salvo por la presencia o ausencia de acetonitrilo en el procedimiento de extracción proteica: muestra 113.1 (20 μ L de AF), muestra 113.2 (10 μ L de AF y 10 μ L de acetonitrilo).

Para la muestra 113.1, se añadieron 20 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó un microlitro del sobrenadante y, una vez seca, un microlitro de matriz. Para cada muestra se pipetearon cinco pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 15 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius spectromete y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 34-44%. Para la muestra 113.2, se añadieron 10 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se añadieron 10 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. El resto del protocolo se realizó de forma similar a la muestra 113.1

Resultados: El promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 113.1 (20 μ L de AF): 89,0 picos.
- Muestra 113.2 (10 μ L de AF y 10 μ L de acetonitrilo): 74,47 picos.

La muestra 113.1 (20 μ L de AF) presentó cristales pequeños con una distribu-

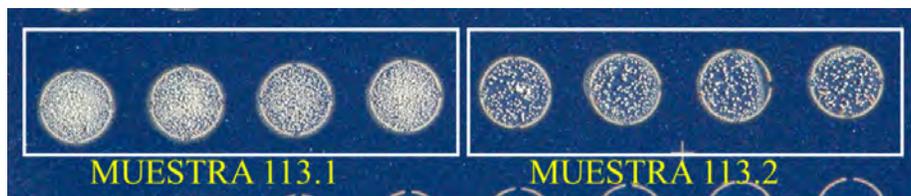


Figura 38: Ejemplar 113 (hembra de *Ixodes ricinus*). En la muestra 113.1 (izquierda), procesada con 20 μ L de ácido fórmico, se observan cristales de matriz pequeños con una distribución uniforme por el pocillo. En la muestra 113.2 (derecha), procesada con 10 μ L de ácido fórmico y 10 μ L de acetonitrilo, se observan cristales de matriz heterogéneos, de gran tamaño y de distribución irregular

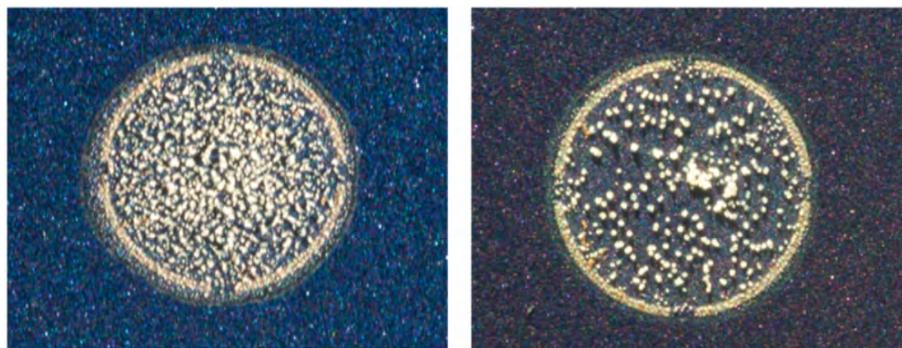


Figura 39: figura 38 a mayores aumentos. Obsérvese la diferencia en el tamaño y distribución de los cristales



Figura 40: Pocillo de una placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96. Se observa que una porción de la matriz ha cristalizado en la periferia externa del pocillo (marcado con una flecha de color amarillo). Esta cristalización ha tenido lugar en una región fuera de la zona de impacto del láser (dicha zona está representada en la imagen por un círculo rojo).

ción uniforme por toda la superficie del pocillo; la muestra 113.2 (10 μL de AF y 10 μL de acetonitrilo) presentó cristales heterogéneos, de gran tamaño, con distribución irregular, con mucha superficie de los pocillos totalmente desprovista de cristales.

Ratio de muestra:matriz de 1:2. Depósitos secuenciales de muestra y matriz

Justificación: la concentración del analito en una muestra puede tener un efecto significativo en los espectros adquiridos (Shah & Gharbia, 2010). Debido a que la distribución de la muestra en los pocillos de la placa metálica es heterogénea, la distribución del analito en la superficie de los pocillos posiblemente tampoco sea uniforme. En el proceso de depósito de la muestra líquida y la matriz, una fracción de la cantidad depositada puede extenderse fuera del pocillo y no ser alcanzada por el láser (figura 40). La distribución heterogénea de la muestra es la razón por la cual el láser de los espectrómetros dispara de manera aleatoria por toda la superficie de los pocillos, aunque lo hace predominantemente en el centro del mismo.

Hipótesis: con la intención de concentrar tanto muestra como matriz en el

centro de los pocillos, el depósito secuencial (en dos tiempos) de ambas, favorecería su distribución pericéntrica, garantizando una distribución preferente de muestra y matriz por el centro de los pocillos. La ratio de muestra:matriz es otro parámetro que puede tener un impacto en los espectros adquiridos (Shah & Gharbia, 2010). Por lo tanto, en este experimento se va a modificar la ratio muestra:matriz para evaluar su efecto en los espectros obtenidos.

Experimento:

Muestra: ejemplar 118, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 118.1 y 118.2. De forma singular, en el presente experimento se testaron dos variables de forma simultánea. La muestra 118.1 se seleccionó para evaluar el efecto del depósito secuencial de muestra y de matriz, mientras que la muestra 118.2 sirvió para evaluar el efecto de la ratio muestra:matriz.

Para la muestra 118.1, se añadieron 30 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó el sobrenadante en ocho pocillos, de la siguiente forma: en los primeros cuatro pocillos se depositó la muestra en único paso (como se hacía de forma habitual): un microlitro de sobrenadante de la muestra y una vez seco, se depositó un microlitro de la matriz. En los siguientes cuatro pocillos se depositaron 0,5 μ L de muestra, y una vez conseguido su secado, se depositaron otros 0,5 μ L de muestra. Una vez que el eluido de la muestra estaba completamente seco, se repitió el mismo proceso de depósito secuencial con la matriz. Se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose 12 espectros por cada variable. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 40-50 %.

Para la muestra 118.2, se añadieron 30 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó el sobrenadante en ocho pocillos, de la siguiente forma: en los primeros cuatro pocillos se depositó, como se hacía de forma habitual, un microlitro de sobrenadante de la muestra y una vez seco, se depositó un microlitro de la matriz. En los siguientes cuatro pocillos se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, dos microlitros de matriz, repartidos de la siguiente forma: se depositó un microlitro de matriz y, tras su secado, se depositó otro microlitro de matriz.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 118.1 (1 μ L muestra + 1 μ L matriz): 74,83 picos.
- Muestra 118.1 (1 μ L muestra + 1 μ L matriz, depósitos secuenciales): 67,25 picos.
- Muestra 118.2 (1 μ L muestra + 1 μ L matriz): 59,75 picos.
- Muestra 118.2 (1 μ L muestra + 2 μ L matriz): 52,75 picos.

Conclusiones: el depósito secuencial de la muestra y la matriz se correlaciona con una disminución en el número de picos de más del 11 %. Aumentar el volumen de la matriz en relación con el de la muestra se correlaciona con una reducción de alrededor del 12 % en el número de picos.

Ratio de volumen muestra:matriz de 2:1 y 3:1

Justificación: tanto la concentración del analito como la ratio volúmenes muestra:matriz son variables que influyen en los espectros adquiridos (Shah & Gharbia, 2010).

Hipótesis: un incremento absoluto y relativo en el volumen de la matriz no tiene un efecto beneficioso en el número de picos de los espectros. En el presente experimento, se pretende valorar el efecto (si existe) de aumentar el volumen absoluto y relativo de la muestra en relación a la matriz, con ratios de muestra:matriz de 1:1, 2:1 y 3:1.

Experimento: Muestra: ejemplar 119, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 119.1 y 119.2. Para el presente experimento solamente se utilizó la muestra 119.1.

Para la muestra 119.1, se añadieron 10 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Una vez conseguida la fragmentación se añadieron otros 10 μ L de AF. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó el sobrenadante en nueve pocillos, de la siguiente forma: en los primeros tres pocillos se depositó, como se hacía de forma habitual, un microlitro de sobrenadante y tras su secado, se depositó un microlitro de la matriz; en los siguientes tres pocillos se depositó un microlitro de muestra y, tras su secado, se depositó otro microlitro de muestra. Posteriormente, se depositó un microlitro de la matriz; en los últimos tres pocillos, se depositaron 3 μ L de muestra de forma secuencial (como se ha descrito más arriba), utilizando en cada paso un microlitro de muestra. Posteriormente, se depositó un microlitro de la matriz. Se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose nueve espectros por cada variable. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 40-50 %.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 119.1 (1 μL muestra + 1 μL matriz): 77,6 picos.
- Muestra 119.1 (2 μL muestra depósito secuencial + 1 μL matriz): 79,4 picos.
- Muestra 119.1 (3 μL muestra depósito secuencial + 1 μL matriz): 81,00 picos.

Conclusiones: El aumento de la ratio volumen muestra:matriz mejora los espectros en términos del número total de picos, aunque de forma marginal. Se obtiene un discreto incremento del 2% y del 4% en el número de picos del espectro, al utilizar ratios muestra:matriz de 2:1 y 3:1, respectivamente, en comparación con la ratio habitual de 1:1. Además, este incremento se produce a costa de un mayor tiempo de procesamiento. Por lo tanto, el mínimo beneficio obtenido debe sopesarse con la mayor laboriosidad y tiempo de procesamiento.

Depósito simultáneo de muestra y matriz en la placa de depósito de muestras

Justificación: en la tecnología MALDI-TOF, los analitos a detectar quedan embebidos en los cristales de la matriz, una vez el líquido de la solución de la matriz se ha evaporado. Este paso es fundamental, ya que la aplicación directa del láser sobre la muestra conduce a la fragmentación y pérdida de estructura de los analitos. Habitualmente, la muestra y la matriz se depositan en la placa metálica de forma secuencial. Sin embargo, Gittens et al. (2020), mezclaron muestra y matriz, y se depositó un microlitro de esta mezcla sobre la placa metálica.

Hipótesis: la administración de muestra y matriz depositadas de forma inmediata (sin esperar al secado de la muestra) sobre la placa metálica podría mejorar los resultados obtenidos en comparación con el depósito secuencial al favorecer la cocrystalización de muestra-matriz.

Experimento:

Muestra: ejemplar 119, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 119.1 y 119.2. Para el presente experimento solamente se utilizó la muestra 119.2. Para la Muestra 119.2, se añadieron 10 μL de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir su fragmentación. Se añadieron otros 10 μL de AF. Se centrifugaron las muestras a 5668g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96, se depositó el sobrenadante en seis pocillos, de la siguiente forma; en los primeros tres pocillos se depositó, como se hacía de forma habitual, un microlitro de sobrenadante de la muestra y tras su secado, se depositó un microlitro de la matriz; en los siguientes tres pocillos se depositó

un microlitro del sobrenadante de la muestra y, de forma inmediata (sin esperar al secado de la muestra), se añadió un microlitro de la matriz. Sobre el mismo pocillo, se mezclaron la muestra y la matriz mediante un suave pipeteo, La mezcla de muestra y matriz dejó secar. Se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose nueve espectros por cada variable. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 40-50 %.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 119.2 (forma clásica): 75,33 picos.
- Muestra 119.2 (depósito simultáneo de muestra y matriz): 74,77 picos.

Conclusiones: el depósito simultáneo de muestra y matriz en el centro de los pocillos de la placa MBT Biotarget 96 para favorecer una mejor cocrystalización no resulta en la obtención de espectros con un mayor número de picos en comparación con la forma clásica de depósito. En cambio, se observó un descenso del 1 % en el número de picos de los espectros.

Aumento de los volúmenes de muestra y matriz, en proporción 1:1.

Justificación: la modificación de la ratio de volumen muestra:matriz en 1:1, 2:1, 3:1 y 1:2 mostraba escasos efectos en términos del número de picos en el espectro. Si se asume que la concentración del analito en la solución líquida de la muestra es constante, una forma teórica de incrementar la cantidad de péptidos podría ser mediante el aumento de los volúmenes de muestra y matriz en los pocillos de depósito de muestras. El diseño comercial de las placas supone una limitación para aplicar este enfoque, ya que, por su tamaño la superficie de los pocillos está optimizada para el depósito de un microlitro de muestra, para evitar que parte de ésta se distribuya fuera de los pocillos. A pesar de estas limitaciones, algunos estudios han utilizado, con buenos resultados, mayores volúmenes de muestra y matriz en ratios diferentes a 1:1 (Nebbak et al., 2017; Karger et al., 2019) y han obtenido buenos resultados.

Hipótesis: el incremento en los volúmenes de muestra:matriz podría mejorar los resultados de los espectros al incrementar las concentraciones del analito y de la matriz en los pocillos de depósito de muestra.

Experimento: Muestra: ejemplar 120, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 120.1 y 120.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica salvo por los volúmenes de muestra y matriz que fueron depositados sobre los pocillos de lectura: 120.1 (1 μ L muestra +1 μ L matriz) y 120.2. (2 μ L muestra +2 μ L matriz). Para las muestras 120.1 y 120.2., se añadieron 10 μ L de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Una vez conseguida la fragmentación se añadieron otros 20 μ L de AF.

Se centrifugaron las muestras a 5668g (13000 rpm) durante cinco minutos. Para la muestra 120.1: en la placa desechable MALDI-TOF MSBruker MBT Biotarget 96, se depositó un microlitro del sobrenadante de la muestra y, una vez seca, un microlitro de matriz. Para la muestra 120.2: En la placa desechable, se depositaron dos microlitros del sobrenadante, de forma secuencial y, tras su secado, dos microlitros de matriz, depositados también de forma secuencial. En ambas muestras, se pipetearon cuatro pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 12 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 40-50%.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 120.1 (1 μ L muestra + 1 μ L matriz): 77,1 picos.
- Muestra 120.2 (2 μ L muestra + 2 μ L matriz, depósitos secuenciales): 67,1 picos.

Conclusiones: un aumento en los volúmenes de muestra y matriz se relaciona con un descenso del 13% en el número de picos del espectro.

Cristalización de la matriz

Justificación: durante la investigación se observó que, de forma intermitente, en algunos experimentos se obtenían resultados muy pobres en términos de número de picos detectados en los espectros. Una característica común en estos experimentos fue la prolongación en el tiempo de secado de la matriz. En condiciones normales, el solvente de la matriz se evapora rápidamente a temperatura ambiente, lo que conduce a la formación de cristales de matriz uniformemente distribuidos en la superficie de los pocillos de la placa metálica en pocos minutos. Sin embargo, en algunos de los citados experimentos, el secado de la matriz requirió diez o más minutos, y los cristales formados fueron muy heterogéneos en tamaño y distribución en la superficie de los pocillos de la placa metálica (figura 41). Una proporción importante de la superficie de los pocillos de la placa metálica no presentaba cristales de matriz y, como consecuencia, los disparos aleatorios del láser en la superficie de los pocillos se encontraban con muchas zonas “vacías”, sin cristales de matriz. Ante este grave problema, se diseñaron múltiples experimentos para tratar de detectar el factor responsable del retraso en la cristalización de la matriz y/o mejorar la cristalización de la matriz.

Experimento 1: Hipótesis: la existencia de alguna sustancia inhibitoria podría interferir en el proceso de cristalización de la matriz. Dicha sustancia podría estar presente en la muestra a analizar (por ejemplo, en las patas de las garrapatas) o en el material fungible del laboratorio (por ejemplo, micropistilos de plástico, tubos de eppendorf, etc.). El objetivo de este primer experimento fue cuantificar el problema de cristalización de la matriz, mediante la medición del tiempo de secado de la matriz tras el procesamiento de una muestra de

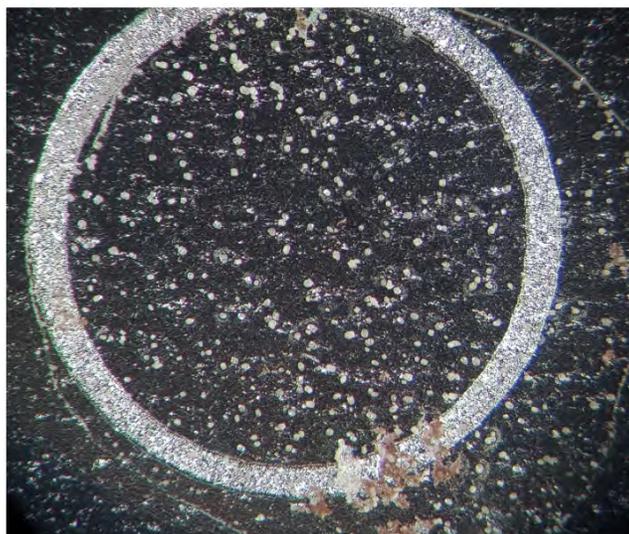


Figura 41: En el procesamiento del ejemplar 106 (macho adulto de *Ixodes ricinus*), el tiempo prolongado de cristalización de la matriz, dio lugar a la formación de cristales de la matriz de gran tamaño, dispersos de manera irregular por la superficie del pocillo de la placa metálica. Esto dio lugar a numerosas zonas “vacías” en el pocillo, donde los disparos del láser no encontraron analito cocrystalizado con la matriz. Como consecuencia, estos pocillos generaron un número muy reducido, e incluso ausencia, de picos, en algunos de los espectros adquiridos. Fuente: aportación propia.

forma ordinaria (como se venía haciendo de forma rutinaria), en comparación con el tiempo de secado de la matriz de forma aislada (sin depósito previo de muestra).

Muestra: ejemplar 106, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 106.1 y 106.2. Para el presente experimento, ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica. Las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 10 μL de AF y 10 μL de acetónitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. Se depositó un microlitro de sobrenadante de la muestra en la placa metálica e, inmediatamente (sin dejar secar la muestra), un microlitro de matriz. Para cada muestra se pipetearon nueve pocillos de la placa metálica. Puesto que el objetivo del presente experimento era detectar el origen del retraso en la cristalización, para este experimento no se realizó la captura de espectros.

Resultados: los tiempos de cristalización fueron:

- Muestras 106.1 y 106.2: 500 segundos.
- Matriz (sin depósito previo de muestra): 180 segundos.

Conclusiones: el machacado de patas de garrapata con micropistilos de

plástico, AF y acetonitrilo, interfiere, en ciertas ocasiones, con el proceso de cristalización de la matriz, por un motivo desconocido. Esta interferencia induce un retraso en el proceso de cristalización de prácticamente tres veces superior al tiempo de cristalización de la matriz sin ningún elemento añadido.

Experimento 2: Hipótesis: en espectrometría de masas, los protocolos que utilizan AF para la extracción proteica no incluyen una fase de incubación prolongada de la muestra con dicho reactivo. La acción prolongada del AF podría facilitar la recuperación de una mayor cantidad de proteínas y péptidos, debido a un posible efecto tardío del ácido sobre células presentes en la muestra biológica, mejorando así la intensidad de algunas masas en el espectro.

Muestra: ejemplar 107, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 107.1 y 107.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial el tiempo de exposición al AF: muestra 107.1 (mayor tiempo de exposición al AF) y 107.2 (tiempo de exposición habitual).

En la muestra 107.1, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Una vez conseguida la fragmentación de las patas, se añadieron 15 μ L de AF y se dejó actuar durante un tiempo prolongado (indeterminado). Posteriormente, se añadieron 15 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Mientras, en la muestra 107.2, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 15 μ L de AF y 15 μ L de acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon nueve pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 27 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 107.1 (exposición prolongada al AF): 48,73 picos.
- Muestra 107.2 (sin exposición prolongada al AF): 40,53 picos.

Conclusiones: la exposición prolongada (por un tiempo indeterminado) al AF incrementa en un 17 % el número de picos en el espectro en comparación con la muestra expuesta al AF por un tiempo menor. El diseño de este experimento no permite precisar el tiempo de exposición óptimo al AF, por lo que se decidió diseñar un nuevo experimento para obtener información más precisa.

Experimento 3: Muestra: ejemplar 108, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 108.1(cuatro patas) y 108.2 (cuatro patas). Ambas

muestras fueron sometidas a un tratamiento similar, siendo la única variable diferencial el tiempo de exposición al AF: 108.1 (tiempo de exposición al AF: 30 minutos) y 108.2 (tiempo de exposición habitual).

Para la muestra 108.1, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 15 μ L de AF y se dejó actuar durante 30 minutos. Se añadieron 15 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se completó el protocolo de forma similar a la muestra 108.2. La muestra 108.2: Las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 15 μ L de AF y 15 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon nueve pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 27 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 108.1 (exposición al AF durante 30 minutos): 43,53 picos.
- Muestra 108.2 (exposición habitual al AF): 51,73 picos.

Conclusiones: la exposición de la muestra a la actividad del AF durante 30 minutos se correlaciona con una disminución, de aproximadamente el 16 %, en el número de picos del espectro. Por tanto, no se recomienda prolongar la exposición al AF como una estrategia para mejorar la eficiencia en la extracción proteica. Se desconoce si una exposición aún más prolongada podría tener algún beneficio en la extracción proteica, para lo cual se diseñó un nuevo experimento.

Experimento 4: respecto a experimentos anteriores, cabe destacar que en este experimento se ha introducido una modificación: el depósito de la muestra y la matriz se ha realizado sobre la placa de MALDI que ha sido previamente calentada a una temperatura de 45°C:

Muestra: ejemplar 124, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 124.1 y 124.2. Para el presente experimento se utilizó exclusivamente la muestra 124.2.

Para la muestra 124.2, se añadieron cinco microlitros de AF 70 %. Las patas fueron fragmentadas utilizando micropistilos de plástico, junto al AF, hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 35 μ L de AF 70 %. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. Se depositó un microlitro de sobrenadante de la muestra en una placa

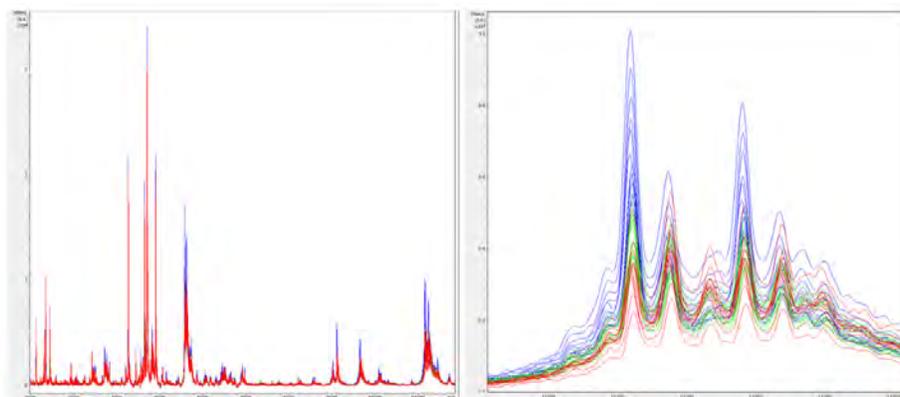


Figura 42: Ejemplar 124.2.(macho de *Ixodes ricinus*). Izquierda: los espectros de la muestra sin exposición prolongada al ácido fórmico aparecen de color azul, con exposición de 30 minutos, en verde, y de 60 minutos, en rojo. La mayoría de las masas presentan una mayor intensidad en los espectros obtenidos en ausencia de una exposición prolongada al ácido fórmico. Derecha: se observa claramente que, en los espectros obtenidos sin exposición prolongada al ácido fórmico (azul), una mayor intensidad en las masas del rango 11.100-11.300 m/z. Fuente: aportación propia.

desechable MALDI-TOF MSBruker MBT Biotarget 96 previamente calentada a 45°C y, tras su secado, un microlitro de la Matriz. Para cada muestra se pipetearon tres pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de nueve espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 25-35%. La muestra 124.2 fue sometida a un procesamiento en tres fases. En la primera, la muestra fue procesada de manera inmediata (como se ha descrito más arriba). Transcurridos 30 minutos se agregó nuevamente un microlitro del sobrenadante y, después de su secado, se añadió un microlitro de matriz. Transcurridos 60 minutos se repitieron los depósitos de sobrenadante y matriz.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 124.2 (exposición habitual al AF): 112,25 picos.
- Muestra 124.2 (exposición AF >30 minutos): 102,33 picos.
- Muestra 124.2 (exposición AF >60 minutos): 101,75 picos.

El análisis visual de los espectros, mediante flexAnalysis permitió observar que, de forma global la mayoría de las masas en los espectros presentan similitud entre sí (figura 42). Sin embargo, se observó una disminución de la intensidad en determinadas masas de los espectros correspondientes a las muestras con exposición prolongada al AF (30 y 60 minutos). Probablemente, la disminución en la intensidad de los picos explique la reducción en el menor número de picos de dichos espectros. La exposición prolongada al AF tiene un impacto negativo en la calidad de los resultados obtenidos.

Experimento 5: hipótesis: la utilización del AF durante la fragmentación de las extremidades es una práctica común. Este procedimiento podría favorecer la disolución de los péptidos y proteínas; además, la fragmentación de las patas en AF podría permitir una mayor exposición de las proteínas y péptidos a la solución de extracción, lo que a su vez podría mejorar la eficiencia de la misma.

Muestra: ejemplar 110, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 110.1 y 110.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica salvo por el método de fragmentación de las patas: para la muestra 110.1 se realizó la fragmentación “en seco”, es decir, se añadió el AF después de haber conseguido la rotura, mientras que en la muestra 110.2 se añadió el AF antes de comenzar la fragmentación de las patas.

Para la muestra 110.1, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se añadieron 15 μL de AF y se continuó con la homogeneización de las patas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se dejó en reposo la muestra durante 20 minutos. Se añadieron 15 μL de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. Para la muestra 110.2, se añadieron 15 μL de AF. Las patas fueron fragmentadas, junto con el AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. El resto del protocolo fue similar al utilizado en la muestra 110.1

Resultados: la muestra 110.2 se rompió mucho más fácilmente y en menos tiempo que la muestra 110.1.

Conclusiones: El AF altera de alguna forma la consistencia de las patas, facilitando la fragmentación de las mismas. Puede presentar ventajas la fragmentación de las patas en solución de AF, mejorando la eficiencia de la extracción proteica.

Experimento 6: Hipótesis: los problemas relacionados con la cristalización de la matriz persistieron de manera intermitente en los experimentos. Las observaciones en algunos de estos experimentos plantearon la posibilidad de que el AF y/o el acetonitrilo pudieran tener alguna influencia en el proceso de cristalización de la matriz. En consecuencia, se diseñó un experimento con el propósito de investigar de manera específica cuál es el efecto del AF y el acetonitrilo sobre el proceso de cristalización de la matriz.

Muestra: ejemplar 112, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 112.1 y 112.2. Ambas muestras fueron tratadas de forma idéntica salvo por los volúmenes de AF y acetonitrilo: 112.1 (10 μL AF, 10 μL acetonitrilo) y 112.2. (20 μL AF +20 μL acetonitrilo).

Para la muestra 112.1, se añadieron 10 μL de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmen-

tación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se añadieron 10 μL de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. Se depositó un microlitro de sobrenadante de la muestra en una placa desechable y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Por cada muestra se pipetearon cinco pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 15 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX 34-44%. Para la muestra 112.2, el protocolo utilizado para la muestra 112.2 fue similar al utilizado para la muestra 112.1, con la única diferencia de que se añadieron 20 μL de AF y 20 μL de acetonitrilo.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 112.1 (10 μL AF +10 μL acetonitrilo): 78,8 picos.
- Muestra 112.2. (20 μL AF +20 μL acetonitrilo): 96,6 picos.

Conclusiones: los volúmenes de AF, acetonitrilo o ambos reactivos, tienen un efecto positivo sobre la cristalización de la matriz, lo que dar lugar a la formación de cristales de matriz más homogéneos y uniformemente distribuidos en los pocillos y un incremento (>22%) en el número de picos en los espectros. El diseño del presente experimento sin embargo no permite discriminar si el beneficio obtenido se debe a un incremento en el volumen del AF, de acetonitrilo o de ambos, por lo que se diseñó un nuevo experimento.

Experimento 7: Hipótesis: el AF y/o acetonitrilo tienen un efecto directo sobre la cristalización de la matriz.

Muestra: ejemplar 109, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 109.1 y 109.2. Para este experimento, solamente se utilizó la muestra 109.1

Para la muestra 109.1, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la fragmentación. Se añadieron 15 μL de AF y se continuó con la homogeneización de las patas. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) g durante cinco minutos. Se dejó actuar el AF durante 30 minutos. Se añadieron 15 μL de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, una vez seca, un microlitro de matriz. Se depositó un microlitro del sobrenadante en dos pocillos de la placa metálica. En otros dos pocillos se depositó un microlitro de BTS (Bacterial Test Standard) y, tras su secado un microlitro de matriz. En otros dos pocillos se depositó un microlitro de matriz (sin depósito previo de eluido de muestra).

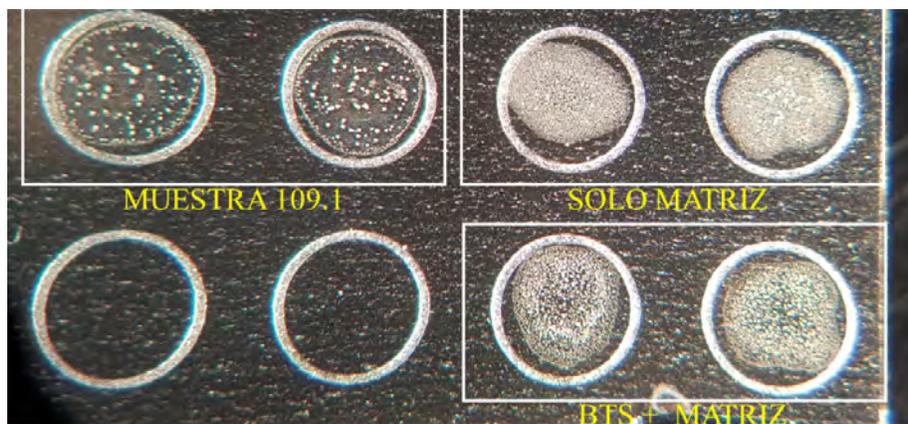


Figura 43: Distintos patrones de cristalización de la matriz. La muestra 109.1 (macho de *Ixodes ricinus*) (parte superior izquierda) presenta una cristalización muy heterogénea, con cristales de gran tamaño, distribuidos de forma irregular por la superficie del pocillo. El depósito aislado de matriz (parte superior derecha), o de matriz+BTS (parte inferior derecha), produce cristales mucho más pequeños y homogéneamente distribuidos por el pocillo. Fuente: aportación propia.

Resultados: la muestra 109.1 presentó una cristalización heterogénea, caracterizada por cristales de gran tamaño de distribución irregular; gran parte de la superficie de los pocillos estaba totalmente desprovista de cristales. Por otro lado, los pocillos con matriz y los pocillos con BTS+matriz presentaron cristales mucho más pequeños con una distribución uniforme (figura 43).

Conclusiones: los resultados mostraron que los problemas de cristalización de la matriz no se podían explicar por características intrínsecas de la misma, o por problemas derivados de la interacción del BTS con la matriz. Por tanto, los problemas de cristalización de la matriz se deben a una interacción del eluido (procedente de la homogeneización de las patas de garrapata) con la matriz.

Potencia del láser

Justificación: la potencia del láser, responsable de la desorción-ionización de la muestra, es un parámetro que puede ser modificado por el usuario. Dicha variable tiene un efecto directamente proporcional sobre el número de picos del espectro. Sin embargo, la calidad de los espectros obtenidos se afecta de forma inversamente proporcional de tal manera que, a medida que se incrementa la potencia del láser, se eleva la línea de base del espectro y los picos se ensanchan, disminuyendo la resolución (figura 44). Por lo tanto, el ajuste de la potencia del láser debe realizarse con precaución para obtener un equilibrio adecuado entre el aumento en el número de picos y la calidad del espectro.

Hipótesis: el incremento en la potencia del láser produciría un aumento en el número de picos obtenidos en el espectro proteico sin comprometer la calidad del mismo.

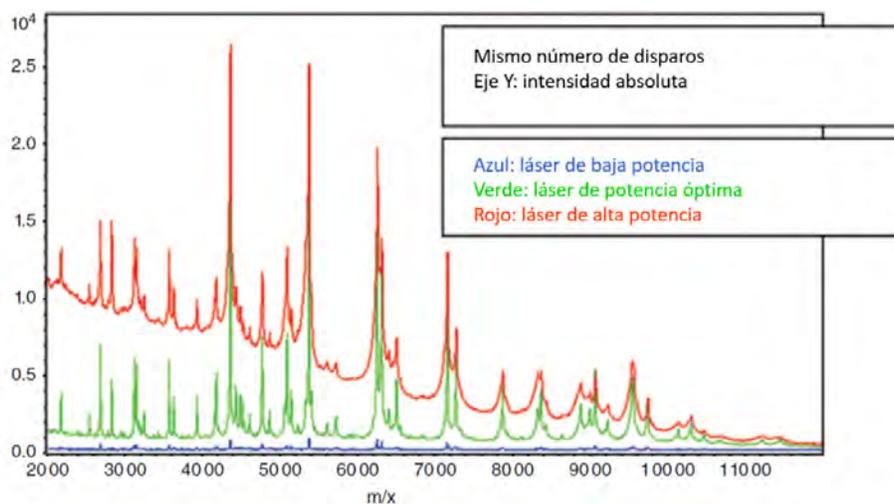


Figura 44: Ejemplo de espectros adquiridos con distinta potencia de láser. Una baja potencia da lugar a un espectro con pocos picos de baja intensidad (color azul), mientras que una potencia elevada da lugar a una elevación de la línea de base y un ensanchamiento de los picos (color rojo). Fuente: Shah & Gharbia, 2010 (modificado).

Experimento 1: muestra: ejemplar 95, hembra de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas: muestras 95.1 y 95.2. Ambas muestras fueron procesadas de forma idéntica, siendo la única variable diferencial la potencia de láser utilizada. La muestra 95.1 fue sometida al método por defecto, MBT_AutoX, el cual utiliza una potencia de láser de 30-40 %, mientras que la muestra 95.2 fue sometida a una potencia de láser con un rango de 37-47 %.

Para las muestras 95.1 y 95.2, las patas fueron fragmentadas “en seco” utilizando micropistilos de plástico. Se añadieron 25 μ L de AF y otros 25 μ L de acetonitrilo. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante dos minutos. En la placa metálica, se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Para cada muestra se pipetearon nueve pocillos de la placa metálica y se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de 27 espectros por muestra. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius. A través del software flexControl se controló el modo de disparo. Para la muestra 95.1 se utilizó el método por defecto, MBT_AutoX; para la muestra 95.2 se utilizó el método MBT_AutoX 37-47 %.

Resultados: El promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 95.1 (potencia de láser 30-40 %): 46,77 picos.
- Muestra 95.2 (potencia de láser 37-47 %): 73,78 picos.

Conclusiones: un aumento del 23 % en la potencia del láser se relacionó con un incremento del 57 % en el número de picos en el espectro de masas. Dichos resultados sugieren que la potencia del láser tiene un impacto muy significativo en el número de picos del espectro. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, debido a las diferencias en el contenido proteico de cada muestra, no puede asegurarse que todos los ejemplares se beneficien por igual de un aumento en la potencia del láser.

Experimento 2: justificación: el experimento 1 mostró cómo el aumento en la potencia del láser se correlaciona con un incremento en el número de picos en el espectro. Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto de incrementos adicionales en la potencia del láser.

Hipótesis: el aumento en la potencia del láser produciría un incremento proporcional en el número de picos del espectro de masas hasta un umbral, a partir del cual, incrementos adicionales tendrían efectos perjudiciales sobre la calidad de los espectros.

Muestra: ejemplar 122, macho de *I. ricinus*. En este experimento se utilizaron únicamente cuatro patas, las cuales se distribuyeron en un único tubo eppendorf, denominado muestra 122.2. Para la muestra 122.2, se utilizaron diferentes potencias de láser: MBT_AutoX 40-50 %, MBT_AutoX 50-60 % y MBT_AutoX 60-70 %.

En la muestra 122.2: se añadieron 10 µL de AF 70 %. Las patas fueron fragmentadas utilizando micropistilos de plástico. Una vez conseguida la fragmentación se añadieron otros 20 µL de AF 70 %. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. Se agitó con vórtex a velocidad máxima durante 240 segundos para favorecer la mezcla con la muestra. En la placa metálica, la muestra fue depositada en 15 pocillos; en cada pocillo se depositó un microlitro del sobrenadante y, tras su secado, un microlitro de la matriz. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius. A través del software flexControl se definieron los diferentes modos de disparo: los primeros cinco pocillos utilizando el método MBT_AutoX 40-50 %, los siguientes cinco pocillos utilizando el método MBT_AutoX 50-60 % y los últimos cinco pocillos utilizando el método MBT_AutoX 60-70 %. En cada pocillo se realizaron tres disparos, obteniéndose un total de 15 espectros para cada variable estudiada.

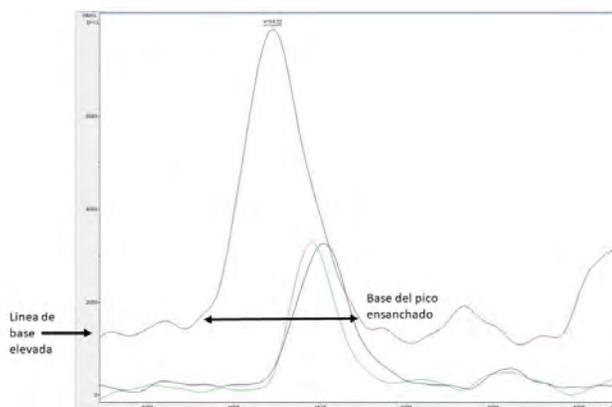


Figura 45: Espectros obtenidos de la muestra 122.2, correspondiente a un macho adulto de *Ixodes ricinus*, utilizando tres métodos de disparo: MBT_AutoX 40-50 % (verde), MBT_AutoX 50-60 % (violeta) y MBT_AutoX 60-70 % (rojo). En la masa 4170 m/z se observa una clara modificación en la forma del espectro adquirido con el método MBT_AutoX 60-70 % (rojo), donde se puede apreciar una elevación de la línea base y un ensanchamiento de los picos en su base, lo que conlleva una reducción significativa en la resolución del espectro obtenido. Fuente: aportación propia.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 122.2 (potencia de láser 40-50 %): 64,8 picos.
- Muestra 122.2 (potencia de láser 50-60 %): 48,6 picos.
- Muestra 122.2 (potencia de láser 60-70 %): 14,3 picos.

Los resultados indican que la diferencia en la calidad de los espectros obtenidos no se limita a una mera diferencia cuantitativa en el número de picos detectados, sino que también existe una diferencia cualitativa significativa. Se observó que al utilizar una potencia del láser del 60-70 %, la línea basal del espectro se elevó significativamente, y los picos se ensancharon notablemente en su base, lo que resultó en una pérdida de resolución (figura 45).

Conclusiones: un incremento en la potencia del láser produce un incremento en el número de picos del espectro. Una potencia del láser del 40-50 %, o superior, se relaciona con una disminución en el número de picos. Con una potencia del láser del 60-70 % se produce, adicionalmente, una disminución en la resolución de los picos y un aumento notable en la línea base del espectro, lo que genera un descenso adicional en el número de picos detectados. La potencia del láser óptima para cada muestra podría variar y es difícil de predecir. Por lo tanto, utilizar varios métodos de disparo o realizar pruebas de potencia del láser antes de la adquisición de los espectros podrían ser buenas estrategias para conseguir los resultados óptimos.

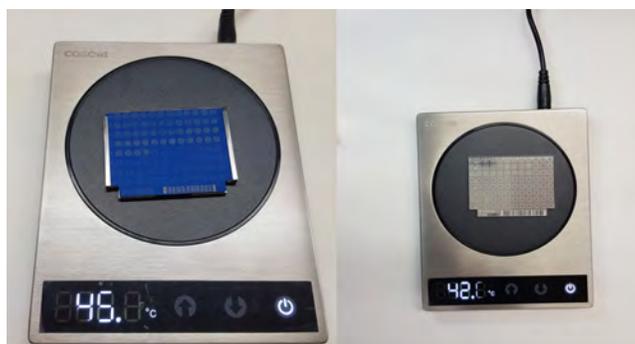


Figura 46: Calentador comercial de tazas de café. El usuario puede seleccionar la temperatura deseada, y es compatible tanto con la placa metálica reutilizable (izquierda) como con la placa desechable MALDI-TOF MS Bruker MBT Biotarget 96 (derecha). Fuente: aportación propia.

Depósitos de muestra y matriz sobre una placa pre-calentada

Justificación: el proceso de cocrystalización de la muestra y la matriz es un aspecto crítico en la espectrometría de masas. Una cristalización óptima requiere de un tiempo preciso para que se produzca la cocrystalización tenga lugar. Si la cristalización ocurre de forma muy rápida, por ejemplo, debido a una temperatura elevada, la cocrystalización no se producirá. Por otro lado, si la cristalización es demasiado lenta (por una temperatura baja, por ejemplo) se formarán cristales muy grandes, lo que exigirá más tiempo de disparo del láser hasta encontrar los denominados puntos dulces (“sweet spots”) en el pocillo e incluso podrán obtenerse espectros sin picos (“No peaks found”) (Shah & Gharbia, 2010).

Hipótesis: el aumento en la temperatura de la placa de depósito de muestras produciría una aceleración el proceso de secado de la matriz, dando lugar a la formación de cristales homogéneos de matriz distribuidos uniformemente en los pocillos. Como resultado, se obtendrían espectros más reproducibles y con un mayor número de picos. Para tal fin, se utilizó un calentador comercial (figura 46), que permite al usuario seleccionar la temperatura de calentamiento deseada. El objetivo fue determinar el impacto que, un aumento en la temperatura de la placa de depósito de muestras tiene sobre el tiempo y tipo de cristalización de la matriz.

Experimento 1:

Muestra: ejemplar 123, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 123.1 y 123.2. Para el presente experimento se seleccionó únicamente la muestra 123.1. La muestra fue procesada de forma idéntica salvo por la temperatura a la que fue sometida la placa desechable : 30°C, 35°C o 45°C.

Para la muestra 123.1, se añadieron cinco microlitros de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la

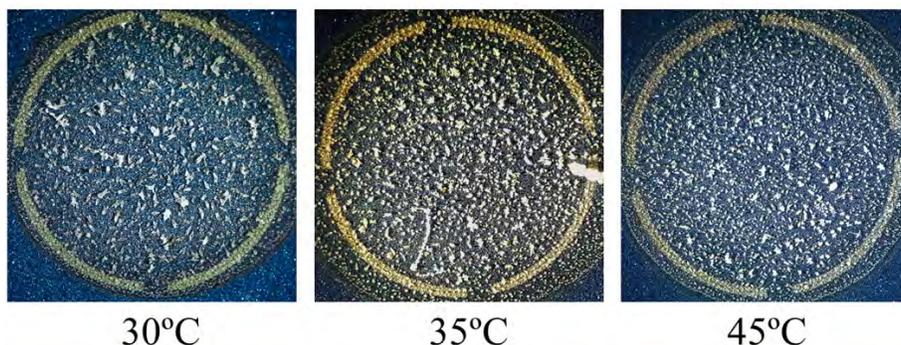


Figura 47: Ejemplar 122, macho de *Ixodes ricinus*. Diferentes patrones de cristalización dependiendo de la temperatura de secado de la matriz: 30°C (izquierda), 35°C (centro) y 45°C (derecha). Los cristales de la matriz muestran un tamaño progresivamente menor y una homogeneidad progresivamente mayor, a medida que se incrementa la temperatura de la placa de depósito de muestras previo al depósito de la matriz. Fuente: aportación propia.

fragmentación de las mismas. Una vez conseguida la fragmentación se añadieron otros 35 μ L de AF. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable, se depositó un microlitro del sobrenadante en tres pocillos y, una vez seca, se procedió de la siguiente manera: En el primer pocillo, se ajustó la temperatura del calentador de tazas a 30°C. Una vez alcanzada la temperatura, se procedió a depositar un microlitro de matriz; en el segundo pocillo, se ajustó la temperatura del calentador de tazas a 35°C y, alcanzada la temperatura, se depositó un microlitro de la matriz y se dejó secar; en el tercer pocillo, se ajustó la temperatura del calentador de tazas a 45°C y, alcanzada la temperatura, se depositó un microlitro de la matriz y se dejó secar.

Resultados: los pocillos en los que el depósito de matriz se produjo a temperaturas de 30°C, 35°C y 45°C tardaron en secarse 180, 122 y 55 segundos, respectivamente. El tamaño y heterogeneidad de los cristales se redujo progresivamente con temperaturas progresivamente superiores (figura 47).

Conclusiones: el aumento de temperatura acelera el proceso de cristalización de la matriz y se relaciona con cristales de morfología más homogénea y distribuidos de forma homogénea por los pocillos. De esta forma, el investigador puede controlar el ritmo de cristalización y la morfología de los cristales de la matriz, mediante el aumento de la temperatura de la placa de depósito de muestras. Se desconoce, sin embargo, el efecto que, el incremento en la temperatura podría tener sobre las proteínas y péptidos, así como la posible desnaturalización proteica debido al exceso de temperatura. Por lo tanto, se diseñó un nuevo experimento para evaluar el impacto de la temperatura sobre los espectros obtenidos de esta manera.

Experimento 2: Hipótesis: el aumento de temperatura de la placa de depósito, previamente a los depósitos de la muestra y la matriz no se asociaría a

una desnaturalización de las proteínas ni a modificaciones en la calidad de los espectros resultantes.

Muestra: ejemplar 123, macho de *I. ricinus*. Las ocho patas se distribuyeron en dos tubos eppendorf, cada uno conteniendo cuatro patas, denominados: muestra 123.1 y 123.2. Para el presente experimento se seleccionó únicamente la muestra 123.2. La muestra fue procesada de forma idéntica salvo por la temperatura a la que fue sometida la placa desechable, en el depósito de la muestra y de la matriz: 35°C o 45°C.

Para la muestra 123.2, se añadieron cinco microlitros de AF. Las patas fueron fragmentadas en AF, utilizando micropistilos de plástico hasta conseguir la fragmentación de las mismas. Una vez conseguida la fragmentación se añadieron otros 35 µL de AF. Se centrifugaron las muestras a 5668 g (13000 rpm) durante cinco minutos. En la placa desechable, se depositó un microlitro del sobrenadante de la muestra en seis pocillos de la siguiente manera: para los tres primeros pocillos, se ajustó la temperatura del calentador de tazas a 35°C; una vez alcanzada dicha temperatura se depositó un microlitro de muestra y se dejó secar; a continuación, se depositó un microlitro de matriz y se dejó secar. Para los siguientes tres pocillos, se ajustó la temperatura del calentador de tazas a 45°C; una vez alcanzada dicha temperatura se depositó un microlitro de muestra y se dejó secar; a continuación, se depositó un microlitro de matriz y se dejó secar. Se realizaron tres lecturas por pocillo, obteniéndose un total de nueve espectros por cada una de las dos variables de temperatura. Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI Biotyper Sirius y el software flexControl en el modo de disparo MBT_AutoX.

Resultados: el promedio del número de picos obtenidos para cada muestra fue:

- Muestra 123.2 (temperatura de la placa: 35°C): 93,7 picos.
- Muestra 123.2 (temperatura de la placa: 45°C): 98,9 picos.

Los picos en ambos espectros eran muy similares en cuanto a su forma, manteniendo una buena resolución y reproducibilidad. La intensidad de los picos fue discretamente superior en el espectro correspondiente a la muestra sometida a 45°C, lo que explicaría el mayor número de picos observados con esta temperatura (figura 48).

Conclusiones: el depósito de muestra y matriz, sobre una placa de depósito de muestras previamente calentada a 45°C, no solo mejora la cristalización de la matriz, sino que los espectros así obtenidos no se ven afectados en términos cualitativos. Los espectros así adquiridos en estas condiciones muestran un mayor número de picos. No es previsible conseguir beneficios adicionales incrementando aún más la temperatura, ya que la muestra y la matriz a 45°C se secan en menos de un minuto y, por el contrario, un aumento adicional en la temperatura podría tener efectos perjudiciales en las proteínas (desnaturalización).

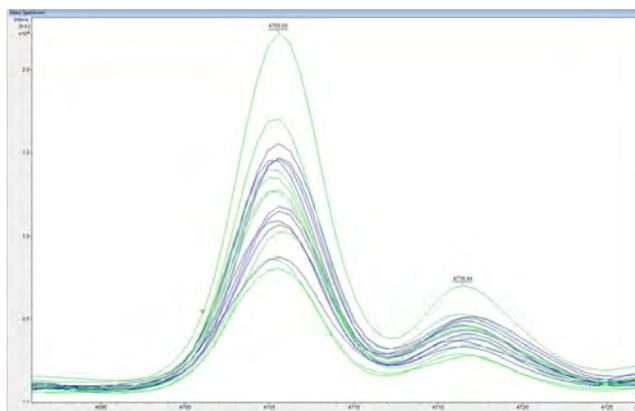


Figura 48: Ejemplar 123, macho de *Ixodes ricinus*. La muestra fue depositada en seis pocillos de la placa de MALDI: en los primeros tres pocillos tanto la muestra como la matriz fueron depositados sobre una placa precalentada a 35°C (espectros de color azul); en los siguientes tres pocillos, tanto la muestra como la matriz fueron depositados sobre una placa precalentada a 45°C (espectros de color verde). Obsérvese que los espectros resultantes son muy similares en ambas condiciones, lo que sugiere que el aumento de la temperatura no tiene un efecto negativo en la calidad de los espectros resultantes. Obsérvese también que, a 45°C, se consigue una mayor intensidad en los picos (espectros de color verde). Fuente: aportación propia.

Optimización del protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros de masas: conclusiones.

En base a los experimentos realizados, se han detectado diversas variables con un impacto diferente, bien sea sobre la fragmentación de las patas, bien sobre la adquisición de los espectros, o bien sobre algún otro aspecto relacionado con las fases preanalítica y analítica.

1. **Número de patas:** aunque pueden conseguirse resultados aceptables utilizando únicamente dos patas, parece recomendable utilizar al menos cuatro patas en espectrometría de masas. En casos donde es previsible un rendimiento óptimo del espectrómetro de masas podrían seleccionarse únicamente dos patas. Por el contrario, en algunas ocasiones podría ser recomendable la inclusión de seis patas (por ejemplo, tamaño reducido del ejemplar).
2. **Métodos de fragmentación mecánica de las patas:** la utilización de microesferas, de cualquier composición, aplicadas mediante un agitador no tiene efecto alguno sobre la fragmentación de las patas. Por tanto, se desaconseja su uso.

Aunque los palillos de madera pueden lograr la fragmentación de las patas, la dificultad en su manipulación, así como su carácter poroso, desaconsejan su uso. La utilización de micropistilos de plástico favorece la rotura de las patas de una forma relativamente sencilla.

Pueden observarse problemas de cristalización de la matriz, que puede difi-

cultar e incluso impedir la obtención de espectros con un número suficiente de picos. Los problemas en la cristalización pueden solventarse con la ayuda de otras variables como la utilización exclusiva de AF o calentamiento de la placa de depósito de muestras.

El micropistilo de acero inoxidable permite una mejor manipulación de la muestra (respecto a los micropistilos de plástico) y tiene la ventaja práctica de su reutilización, con el consiguiente ahorro en los costes. Sin embargo, en nuestros experimentos, el número de picos en los espectros fue ligeramente inferior a los obtenidos con los micropistilos de plástico. Es probable que estos resultados se deban más a la forma que a la composición de los pistilos. Los micropistilos de plástico permitieron un contacto más íntimo entre micropistilo-patas-paredes del tubo eppendorf, y es posible que la utilización de otras marcas comerciales permita mejorar los resultados observados en nuestros experimentos.

3. **Otros protocolos destinados a incrementar la eficiencia en la extracción proteica:** se desaconseja someter la muestra a un tratamiento térmico (agua a 100°C) para mejorar la eficiencia en la extracción proteica, debido a la profunda modificación en los espectros, debido posiblemente a la desnaturalización de las proteínas.
4. **Reactivos empleados en el procedimiento de extracción proteica:** los volúmenes de AF y acetonitrilo tienen una influencia mínima en el número de picos presentes en el espectro. Existen discretas diferencias empleando 15 o 25 µL de ambos reactivos. Sin embargo, la utilización de volúmenes mayores presenta como ventaja adicional, la de permitir la realización de estudios complementarios, en caso de que estos fueran requeridos.

El AF puede ser empleado en su formulación pura o diluido al 80%. Sin embargo, se observa que diluciones menos concentradas (20, 40 o 60%) se asocian con una notable disminución en el número de picos de los espectros.

Con la ayuda del AF, las patas se fragmentan de forma más rápida en comparación con la fragmentación en seco (aplicación directa del micropistilo sobre las patas, sin la ayuda de ningún reactivo). Esto conlleva a una reducción significativa en el tiempo de manipulación. Es importante limitar al máximo la exposición de la muestra al AF durante la extracción proteica. De hecho, a mayor tiempo de exposición menor el número de picos observados en el espectro.

La omisión del acetonitrilo en el procedimiento de extracción proteica (utilización exclusiva de AF) conduce a una cristalización más rápida y homogénea de la matriz, lo cual se traduce en espectros con un número superior de picos. Por consiguiente, el acetonitrilo es un reactivo prescindible en el protocolo de extracción proteica.

5. **Depósito de muestra y matriz:** los depósitos secuenciales (depositar

un determinado volumen en varios pasos) de muestra, por un lado y de matriz, por otro, se relacionan con un descenso en el número de picos en el espectro, respecto al mismo volumen de ambos, depositados en un único paso. Su aplicación, por tanto, está desaconsejado.

La utilización de un volumen de muestra:matriz en ratio 1:2 se asocia con una reducción en el número de picos en comparación con la proporción habitualmente utilizada de 1:1. Aunque incrementar el volumen de la muestra, con ratios muestra:matriz de 2:1 o 3:1, puede incrementar ligeramente el número de picos en el espectro, esta mejoría es mínima, aunque detectable. El incremento en los volúmenes de muestra y matriz en ratio 2:2, se relaciona con una reducción en el número de picos en los espectros.

El depósito simultáneo de la muestra y la matriz en la placa de depósito de muestras, sin permitir el secado previo de la muestra, se asocia con una ligera disminución en el número de picos en el espectro.

6. **Potencia del láser:** el incremento en la potencia del láser conduce a un incremento muy notable en el número de picos. Sin embargo, el incremento en la potencia debe ser utilizado con cautela, ya que un incremento excesivo conduce inevitablemente a una pérdida de calidad general de los espectros con una reducción en el número de picos. Se recomienda establecer el límite superior de la potencia del láser en el rango 50-60 %.
7. **Temperatura de la placa de depósito de muestras:** calentar la placa de depósito de muestras hasta una temperatura de 45°C, previamente a los depósitos de muestra y matriz, mejora la cristalización de la matriz, sin afectar la calidad de los espectros. Es poco probable que puedan obtenerse beneficios adicionales con incrementos de la temperatura por encima de esa cifra. Por el contrario, un aumento excesivo de la misma podría producir una alteración de las proteínas (desnaturalización), lo que comprometería la calidad de los espectros.

Protocolo, implementado en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, para la extracción proteica y adquisición de espectros de masas destinado a la caracterización de garrapatas

A continuación se describe el protocolo de extracción proteica y adquisición de espectros implementado en el HCULB.

1. **Tipo de muestra, método de conservación y envío al laboratorio:** Debe remitirse el ejemplar completo de garrapata. Se utilizará un contenedor estéril, siendo recomendable incluir en su interior una gasa humedecida, con el fin de evitar la desecación del espécimen. La muestra puede ser conservada a temperatura ambiente o refrigerada. Es importante evitar el uso de etanol, formol u otros conservantes, ya que estos pueden afectar negativamente a los resultados obtenidos por espectrometría de masas.
2. **Preparación de la muestra:** en primer lugar, se realizará la inspección visual, con la finalidad de determinar el estadio (larva, ninfa o adulto) y grado de repleción del ejemplar y, dependiendo del investigador, realizar una primera aproximación diagnóstica a nivel de género.

Dentro de una campana de bioseguridad se realizará la excisión de las patas. Para ello se depositará el ejemplar dentro de una placa de Petri estéril y, con la ayuda de bisturí y pinzas metálicas, se realizará la escisión del número requerido de patas, evitando dañar el idiosoma. El resto del espécimen se conservará en congelador de -20°C o -80°C por si fueran necesarios estudios posteriores. El número ideal de patas para el estudio por espectrometría de masas es de cuatro, pero desde dos hasta seis patas podrían ser una opción válida en determinadas circunstancias.

3. **Extracción proteica:** con la ayuda de las pinzas metálicas, se depositarán las patas en el fondo de un tubo eppendorf de 1.5 mL, intentando que estas queden alojadas en el fondo del tubo. Mediante una pipeta se depositarán 5 μL de AF en el interior del tubo. Las patas deben quedar sumergidas en el AF para favorecer el contacto con dicho reactivo. Con tal fin, se podrán utilizarán de nuevo las pinzas metálicas. A continuación, se introducirá el micropistilo de plástico hasta el fondo del tubo eppendorf, y realizando movimientos repetidos de presión/rotación sobre las patas se intentará conseguir la fragmentación de las mismas aplicando presión sobre éstas contra las paredes del tubo eppendorf. De forma intermitente se realiza una agitación por vórtex a velocidad máxima y se continuará la fragmentación manual con el micropistilo. El objetivo no debe ser la desaparición de cualquier fragmento macroscópicamente visible; la rotura de las patas enteras en fragmentos más pequeños es suficiente. Todo este proceso puede llevar escasos minutos, aunque esto depende en gran medida del ejemplar. Una vez conseguida la fragmentación, se depositarán 20 μL adicionales de AF en el interior del tubo eppendorf.

A continuación, se centrifugará la/s muestra/s a 5668g (13000 rpm) durante tres minutos. Pueden utilizarse tanto las placas metálicas reutilizables como placas desechables. Las placas desechables son preferibles por la comodidad, así como la posibilidad de su reutilización.

Previamente a los depósitos de la muestra y de la matriz, se precalentará la placa a 45°C, y se mantendrá a esta temperatura hasta que se haya conseguido el secado de la matriz. Se depositará un microlitro de muestra y, una vez seco, se depositará un microlitro de matriz. Se realizará el depósito de cada muestra por cuadruplicado (en cuatro pocillos).

4. **Adquisición de los espectros:** Para la captura de los espectros se utilizará el software flexControl. Se recomienda guardar los archivos correspondientes a los espectros en carpetas específicas. Por cada pocillo de muestra se obtendrán nueve espectros (en total 36 espectros por muestra), de la siguiente manera: por cada pocillo, se realizarán tres lecturas, con cada uno de los tres modos de disparo: MBT_AutoX, MBT_AutoX 40-50 % y el método MBT_AutoX 50-60 %.

Considerando los posibles condicionantes que pueden afectar el procesamiento de la muestra, los resultados pueden estar disponibles en tan solo 30 minutos, siempre que se den las condiciones ideales.

Biblioteca de espectros de referencia.

La adquisición de los espectros destinados a construir la biblioteca de referencia se realizó aplicando el protocolo que había sido recientemente optimizado. Para la evaluación de la calidad de los espectros y la generación de espectros de referencia se utilizó la metodología previamente descrita. La tabla 3 muestra la información relativa a los ejemplares de garrapatas que fueron utilizados para generar los espectros de referencia de la biblioteca. Dicha tabla contiene la siguiente información: número de ejemplares, estadio y género, por cada especie; la fuente de recolección, el área geográfica de donde se obtuvo el ejemplar, así como las secuencias genéticas depositadas en GenBank.

4.2. Ensayos EC: pruebas de validación realizadas con ejemplares recolectados de diversas fuentes, mayoritariamente vegetación.

La tabla 4 muestra las especies de garrapatas incluidas en los ensayos EC, con información detallada del estadio/género del ejemplar, el área geográfica de recolección, así como las secuencias genéticas depositadas en GenBank.

Espece	Número est./género	Origen (número)	Área geográfica.; Coordenadas	% identidad./ nº acceso GenBank (nº amplicones)
<i>D. marginatus</i>	3M; 3H	Vegetación(6)	La Rioja; 42°37'26"N/2°51'28"W- 42°38'12"N/2°57'30"W- 42°26'43"N/2°30'43"W	99,5/MH645513
<i>D. reticulatus</i>	2M; 2H	Vegetación(3)/jabalí(1)	Álava; 42°58'37"N/2°49'51"W;Cantabria; 43°22'5"N/3°50'54"W;La Rioja; 42°21'0"N/2°36'54"W- 42°21'49"N/3°1'40"W	100/JF791811*(4)
<i>H. punctata</i>	2M; 2H	Vegetación(4)	La Rioja; 42°38'12"N/2°57'30"W	100/KR870978*(4)
<i>H. lusitanicum</i>	2M; 2H	Vegetación(4)	Cáceres; 38°51'10"N/5°51'13"W	99.5-100/ON366982(4)
<i>H. marginatum</i>	2M; 2H	Vacas(4)	La Rioja; 42°17'20"N/2°16'12"W	99.3-100/MW366630*(2);99.8- 100/MW366631*(2)
<i>I. ricinus</i>	4M; 4H;8N	Vegetación(16)	La Rioja; 42°38'12"N/2°57'30"W- 42°37'41"N/2°52'30"W	99.8-100/GU074606*(5); 99.8-100/ON116370*(3); 99.8-100/GU074607*(2); 100/MH645519*(2); 100/MH645521*(1); 100/GU074609*(1);100/GU074589*(1); 99.8/GU074630*(1);
<i>R. bursa</i>	2M; 2H	Vacas(4)	La Rioja; 42°17'20"N/2°16'12"W	99.8-100/ON366979*(4)
<i>R. pusillus</i>	2M; 2H	Vegetación(4)	Alicante; 38°20'46"N/0°39'5"W	99.8-00/MZ420713(3);99.5/MZ420712(1)
<i>R. sanguineus s.l.</i>	1M; 2H	Vegetación(1)/Perro(2)	La Rioja; 42°37'26"N/2°51'28"W- 42°34'8"N/2°54'16"W- 42°17'20"N/2°16'12"W	99.7-100/KT382470*(3)

Tabla 3: Ejemplares de garrapatas utilizadas para la creación de la biblioteca de referencia.

D. marginatus: *Dermacentor marginatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. lusitanicum*: *Hyalomma lusitanicum*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. pusillus*: *Rhipicephallus pusillus*; *R. sanguineus s.l.*: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. M: macho; H: hembra; N: ninfa ; Número, est./género: número de ejemplares (estadio o género); nº amplicones: número de amplicones analizados.

* entre otras secuencias

Se utilizaron un total 18 ejemplares de garrapatas, pertenecientes a ocho de las nueve especies incluidas en la biblioteca de espectros.

- *D. marginatus* (una hembra; un macho).
- *H. punctata* (una hembra; un macho).
- *H. lusitanicum* (una hembra; un macho).
- *H. marginatum* (una hembra; un macho).
- *I. ricinus* (una hembra; un macho; 3 ninfas).
- *R. bursa* (una hembra; un macho).
- *R. pusillus* (una hembra; un macho).
- *R. sanguineus* s.l. (una hembra).

Debido a limitaciones de disponibilidad, no fue posible incorporar ejemplares de *D. reticulatus*, ni machos de *R. sanguineus* s.l., en el estudio. Para las especies restantes, se incorporó un ejemplar por cada género (una hembra y un macho). En el caso de *I. ricinus* se incluyeron tres ninfas, además de los ejemplares adultos. Todos los especímenes fueron recolectados de vegetación, excepto las especies *H. marginatum* y *R. bursa*, cuyos ejemplares fueron obtenidos de vacas.

Los resultados de los ensayos EC se muestran en la tabla 5:

- Para todas las especies incluidas en estos test, se obtuvo una concordancia del 100 % entre la identificación molecular y la obtenida por MALDI-TOF MS, independientemente del valor LSV obtenido.
- La mayoría de las especies (17/18= 94,44 %) obtuvieron puntuaciones superiores a 2,00. La única excepción fue un macho adulto de *H. lusitanicum*, que obtuvo una puntuación máxima de 1,77.
- Considerando la totalidad de ejemplares y especies estudiados, el promedio de puntuaciones fue de 2,06, con un rango de valores LSV de: 1,51-2,50.
- Los estadios de ninfa y adulto de *I. ricinus* solo mostraron coincidencias con espectros de *I. ricinus* .
- Para muchas de las especies incluidas, la segunda mejor identificación por MALDI-TOF MS correspondía a una especie del mismo género. Las excepciones fueron los adultos de *H. punctata* (segunda mejor identificación: *D. reticulatus*) y una hembra de *H. marginatum* (segunda mejor identificación: *R. sanguineus* s.l.).
- En aquellos casos en los que MALDI-TOF MS ofreció una segunda identificación, los valores LSV obtenidos fueron mucho más bajos para estas especies. El promedio de puntuaciones fue de 1,13 , con un rango de valores LSV de: 0,79-1,50.

- Para el global de las especies estudiadas, la diferencia de puntuación entre las dos especies con mejor identificación fue, de promedio, de 0,92 (rango 0,47-1,39).
- Para aquellos ejemplares correctamente identificados a nivel de especie, el género del ejemplar fue correctamente identificado en 17/18 (94,44 %) de los casos. La única discordancia correspondió a una hembra de *R. pusillus* que obtuvo su máxima puntuación con el espectro de un macho de la misma especie.

Especie	Número (est./género)	Origen	Área; Coordenadas	% identidad/ N ^o de acceso de GenBank
<i>D. marginatus</i>	1H	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'26"N/2 ^o 51'28"W	99,5/MH645513
<i>D. marginatus</i>	1M	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'26"N/2 ^o 51'28"W	99,5/MH645513
<i>H. punctata</i>	1H	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 38'12"N/2 ^o 57'30"W	100/JF791811*
<i>H. punctata</i>	1M	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 38'12"N/2 ^o 57'30"W	100/KR870978*
<i>H. lusitanicum</i>	1H	Vegetación	Cáceres; 38 ^o 51'10"N/5 ^o 51'13"W	99,5/ON366982
<i>H. lusitanicum</i>	1M	Vegetación	Cáceres; 38 ^o 51'10"N/5 ^o 51'13"W	99,5/ON366982
<i>H. marginatum</i>	1H	Vaca	La Rioja; 42 ^o 17'20"N/2 ^o 16'12"W	100/MW366630*
<i>H. marginatum</i>	1M	Vaca	La Rioja; 42 ^o 17'20"N/2 ^o 16'12"W	100/MW366630*
<i>I. ricinus</i>	1N	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'41"N/2 ^o 52'30"W	100/GU074632
<i>I. ricinus</i>	1N	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'41"N/2 ^o 52'30"W	100/GU074589*
<i>I. ricinus</i>	1N	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'41"N/2 ^o 52'30"W	100/ON116370*
<i>I. ricinus</i>	1H	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'41"N/2 ^o 52'30"W	100/MH645519*
<i>I. ricinus</i>	1M	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 38'12"N/2 ^o 57'30"W	100/GU074606*
<i>R. bursa</i>	1H	Vaca	La Rioja; 42 ^o 17'20"N/2 ^o 16'12"W	100/ON366979*
<i>R. bursa</i>	1M	Vaca	La Rioja; 42 ^o 17'20"N/2 ^o 16'12"W	100/ON366979*
<i>R. pusillus</i>	1H	Vegetación	Alicante; 38 ^o 20'46"N/00 ^o 39'5"W	99,5/MZ420712
<i>R. pusillus</i>	1M	Vegetación	Alicante; 38 ^o 20'46"N/00 ^o 39'5"W	99,5/MZ420712
<i>R. sanguineus s.l.</i>	1H	Vegetación	La Rioja; 42 ^o 37'26"N/2 ^o 51'28"W	100/KT382470*(3)

Tabla 4: Ejemplares de garrapatas utilizados en los ensayos de validación "EC", realizados con garrapatas recolectadas de vegetación o de vacas.

D. marginatus: *Dermacentor marginatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. lusitanicum*: *Hyalomma lusitanicum*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. pusillus*: *Rhipicephallus pusillus*; *R. sanguineus s.l.*: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. M: macho; H: hembra; N: ninfa; Número, est./género: número de ejemplares (estadio o género); (n^oamplicones): número de amplicones analizados.

* entre otras secuencias

Especie (estadio/género)	Mejor identificación (estadio/género)	LSV (rango); prom. 1 ^a id.	2 ^a mejor identifica- ción	LSV prom. 2 ^a id.	Dif. prom. 1 ^a y 2 ^a id.
<i>D. marginatus</i> (H)	<i>D. marginatus</i> (H)	(2,16-2,24); 2,19	<i>D. reticulatus</i>	1,26	0,93
<i>D. marginatus</i> (M)	<i>D. marginatus</i> (M)	(2,01-2,50); 2,19	<i>D. reticulatus</i>	1,37	0,81
<i>H. punctata</i> (H)	<i>H. punctata</i> (H)	(1,65-2,07); 1,91	<i>D. reticulatus</i>	1,03	0,88
<i>H. punctata</i> (M)	<i>H. punctata</i> (M)	(1,83-2,05); 1,93	<i>D. reticulatus</i>	0,95	0,98
<i>H. lusitanicum</i> (H)	<i>H. lusitanicum</i> (H)	(1,81-2,02); 1,91	<i>H. marginatum</i>	1,36	0,55
<i>H. lusitanicum</i> (M)	<i>H. lusitanicum</i> (M)	(1,51-1,77); 1,63	<i>H. marginatum</i>	1,16	0,47
<i>H. marginatum</i> (H)*	<i>H. marginatum</i> (H)	(2,02-2,26); 2,09	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0,97	1,12
<i>H. marginatum</i> (M)*	<i>H. marginatum</i> (M)	(1,94-2,25); 2,14	<i>H. lusitanicum</i>	0,79	1,34
<i>I. ricinus</i> (H)	<i>I. ricinus</i> (H)	(2,16-2,24); 2,21	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>I. ricinus</i> (M)	<i>I. ricinus</i> (M)	(2,00-2,18); 2,08	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,99-2,20); 2,09	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,94-2,10); 2,00	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(2,03-2,19); 2,12	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>R. bursa</i> (H)*	<i>R. bursa</i> (H)	(1,91-2,13); 2,02	<i>R. pusillus</i>	0,99	1,03
<i>R. bursa</i> (M)*	<i>R. bursa</i> (M)	(1,96-2,19); 2,09	<i>R. pusillus</i>	1,15	0,93
<i>R. pusillus</i> (H)	<i>R. pusillus</i> (M)	(2,23-2,40); 2,30	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0,90	1,39
<i>R. pusillus</i> (M)	<i>R. pusillus</i> (M)	(2,16-2,42); 2,27	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1,50	0,76
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	(1,84-2,09); 1,99	<i>R. pusillus</i>	1,27	0,72

Tabla 5: Resultados de la identificación por MALDI-TOF MS correspondiente a los ensayos de validación EC, realizados con ejemplares recolectados de vegetación o vacas.

D. marginatus : *Dermacentor marginatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. lusitanicum*: *Hyalomma lusitanicum*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. pusillus*: *Rhipicephalus pusillus*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. H: hembra; M: macho; N: ninfa ; Id.: identificación; prom.: promedio; Dif. promed. 1^a y 2^a id.: diferencia entre los promedios de puntuaciones de las dos especies con mejor identificación; LSV: log score value;

* especímenes recolectados de vacas

4.3. Ensayos ENR: pruebas de validación realizadas con ejemplares recolectados de diversas fuentes, correspondientes a especies no incluidas en la biblioteca de espectros

Se utilizaron un total seis ejemplares de garrapatas, pertenecientes a especies no incluidas en la biblioteca de espectros. La tabla 6 muestra la información relativa a los ejemplares de garrapatas que fueron utilizados en los ensayos ENR. Dicha tabla contiene la siguiente información: especie de garrapata, número de ejemplares, estadio y género, por cada especie; la fuente de recolección, el área geográfica de donde se obtuvo el ejemplar, así como las secuencias genéticas depositadas en GenBank.

- *Argas* sp. (EEZA-CRETAV 3) (un ejemplar).
- *H. inermis* (un ejemplar).
- *H. concinna* (un ejemplar).
- *H. scupense* (un ejemplar).
- *I. frontalis* (un ejemplar).
- *I. hexagonus* (un ejemplar).

Los resultados de los ensayos ENR se muestran en la tabla 7:

- No se observó ninguna concordancia entre la identificación molecular y la identificación mediante MALDI-TOF MS.
- Las puntuaciones obtenidas fueron muy bajas. El valor máximo LSV no superó 1,32.
- En tres de las seis especies analizadas, la mejor identificación correspondió a una especie del mismo género: *H. scupense* (mejor identificación: *H. marginatum*); *I. frontalis* (mejor identificación: *I. ricinus*); *I. hexagonus* (mejor identificación: *I. ricinus*).

Nota: como ha sido mencionado previamente, después de finalizar los ensayos de validación ENR, una vez verificado que los espectros adquiridos cumplían con los criterios de calidad previamente descritos, los espectros de todas las especies fueron incorporaron a la biblioteca.

Especie	Número est./géner	Origen	Área	Coordenadas	% identidad/ N ^o de acceso de GenBank
<i>Argas</i> sp. (EEZA-CRETAV 3)	1N	Nido pájaro	Almería	37.08°N, 2.35°W	99.8/MW289072
<i>H. inermis</i>	1M	Vegetación	La Rioja	42 ^o 18'12"N/2 ^o 30'25"W	99.8/NC_020335*
<i>H. concinna</i>	1M	Vegetación	Cantabria	43 ^o 22'5"N/3 ^o 50'54"W	100/MK463620
<i>H. scupense</i>	1F	Vaca	La Rioja	42 ^o 17'20"N/2 ^o 16'12"W	100/ON366976*
<i>I. frontalis</i>	1F	Ave	Navarra	42 ^o 29'4"N/2 ^o 23'47"W	100/MF370644*
<i>I. hexagonus</i>	1F	Visión	La Rioja	42 ^o 34'13"N/2 ^o 54'32"W	100/MW114503*

Tabla 6: Ejemplares utilizados para la realización de los test de validación “ENR” (ENR), realizados con garrapatas no incluidas en la biblioteca de espectros *H. inermis*: *Haemaphysalis inermis*; *H. cocina*: *Haemaphysalis concinna*; *H. scupense*: *Hyalomma scupense*; *I. frontalis*: *Ixodes frontalis*; *I. hexagonus*: *Ixodes hexagonus*. Especie: especie de garrapata; M: macho; H: hembra; N: ninfa; Número, est./género: número de ejemplares (estadio o género); n^oamplicones: número de amplicones analizados. * entre otras secuencias.

Especie	Mejor identificación (est./ género)	Rango LSV Mejor ident.	Promedio LSV Mejor ident.	2 ^a mejor ident.	Promedio LSV 2 ^a mejor ident.
<i>Argas</i> sp. (EEZA- CRETAV 3)	<i>I. ricinus</i> (M)	0,80-1,32	0,96	<i>H. lusitanicum/ H.</i> <i>punctanta</i>	0,90
<i>H. inermis</i>	<i>R. bursa</i> (M)	0-1,31	0,58	<i>H. punctanta</i>	1,13
<i>H. cocina</i>	<i>I. ricinus</i> (N)	0,57-1,18	0,81	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0,98
<i>H. scupense</i>	<i>H. marginatum</i> (H)	0-1,30	0,63	<i>R. bursa</i>	1,13
<i>I. frontalis</i>	<i>I. ricinus</i> (N)	0,62-1,11	0,78	<i>D. marginatus</i>	1,04
<i>I. hexagonus</i>	<i>I. ricinus</i> (M)	0,51-1,06	0,72	<i>H. punctanta</i>	0,94

Tabla 7: Resultados de la identificación por MALDI-TOF MS correspondiente a los ensayos de validación ENR, realizados con ejemplares no incluidos en la biblioteca de espectros.

D. marginatus: *Dermacentor marginatus*; *H. inermis*: *Haemaphysalis inermis*; *H. cocina*: *Haemaphysalis concinna*; *H. lusitanicum*: *Hyalomma lusitanicum*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. scupense*: *Hyalomma scupense*; *I. frontalis*: *Ixodes frontalis*; *I. hexagonus*: *Ixodes hexagonus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; M: macho ; H: hembra; N: ninfa. Est.: estadio; ident: identificación

4.4. Ensayos EP: pruebas de validación realizadas con ejemplares retirados de pacientes

La tabla 8 muestra las especies de garrapatas incluidas en los ensayos EP, con información detallada del estadio/género del ejemplar, así como las secuencias genéticas depositadas en GenBank.

Se analizaron un total de 27 ejemplares de garrapatas, pertenecientes a ejemplares retirados de pacientes:

- *D. marginatus* (2 hembras, 1 macho).
- *D. reticulatus* (dos hembras).
- *H. punctata* (una hembra).
- *H. marginatum* (una hembra).
- *I. ricinus* (diez ninfas).
- *R. bursa* (tres hembras, un macho).
- *R. sanguineus* s.l. (cinco hembras, un macho).

Los resultados de los ensayos EP se muestran en la tabla 9:

- Para todas las especies incluidas en estos test, la identificación por MALDI-TOF MS mostró una concordancia con la identificación molecular en 25/27 (92,59 %) ejemplares, independientemente del valor LSV obtenido.
- Las únicas dos discordancias correspondieron a *I. ricinus*: dos ninfas de esta especie fueron incorrectamente identificadas por MALDI-TOF MS como *C. felis*.
- De los 25 especímenes que fueron correctamente identificados, 20/25 (80 %) presentaron valores LSV por encima de 2,00 en al menos uno de los espectros adquiridos.
- Considerando la totalidad de ejemplares y especies estudiados, el promedio de puntuaciones fue de 1,94, con un rango de valores LSV de: 0,71-2,22.
- En la totalidad de ejemplares correctamente identificados, un 99,11 % (223/225) del total de espectros adquiridos se correspondían con la identificación correcta, independientemente del valor LSV obtenido. La única discordancia se observó en un espécimen de *D. reticulatus*, en el que en 2/9 espectros la mejor identificación se correspondió con la especie *H. lusitanicum*. Sin embargo, este ejemplar presentó el menor promedio de puntuaciones (LSV promedio: 1,37).
- Para aquellos géneros de garrapata que presentaban más de una especie en la biblioteca de espectros, se observó que la segunda mejor identificación correspondía a una especie dentro del mismo género en cuatro especies:

D. marginatus (2/3; 66,66 %); *D. reticulatus* (0/2; 0 %); *H. marginatum* (0/1; 0 %); *R. bursa* (4/4; 100 %); *R. sanguineus* s.l. (6/6; 100 %).

- En aquellos casos en los que MALDI-TOF MS ofreció una segunda identificación, los valores LSV obtenidos fueron más bajos para estas especies. El promedio de puntuaciones fue de 1,44 (rango: 0,88-1,94).
- Para las dos especies con mejores scores de identificación, se obtuvo una diferencia promedio de 0,49 (rango de diferencias: 0,14-0,98).
- Para aquellos ejemplares que fueron correctamente identificados a nivel de género y especie, el género y/o estadios fueron correctamente identificados en los siguientes casos: *D. marginatus* (0/3; 0 %); *D. reticulatus* (0/2; 0 %); *H. punctata* (1/1; 100 %); *H. marginatum* (1/1; 100 %); *I. ricinus* ninfa (8/8;100 %); *R. bursa* (3/4; 75 %); *R. sanguineus* s.l. (1/6; 16,67 %);

Después de la realización de los ensayos de validación (EC, ENR y EP), se llegaron a las siguientes conclusiones:

- El protocolo optimizado utilizado en la presente investigación incluye parámetros tanto de la fase pre-analítica (extracción proteica de muestras de patas de garrapatas) como variables de la fase analítica (configuración del espectrómetro de masas). Dicho protocolo permite generar unos espectros de calidad.
- Las especies de garrapatas no incluidas en la biblioteca de espectros, no pueden ser identificadas, obteniéndose una identificación de baja fiabilidad (bajo valor LSV) de especies de garrapatas que sí están incluidas en la biblioteca.
- Existen diferencias en los espectros obtenidos de los ejemplares retirados de pacientes (ensayos EP) en comparación con los ejemplares recolectados de otras fuentes (ensayos EC).
- Los ejemplares retirados de pacientes, respecto a los recolectados de otras fuentes (vegetación y vacas), muestran en la identificación por MALDI-TOF MS: una menor similitud con los espectros de referencia, obteniendo valores LSV más bajos; una discreta peor correlación con la identificación obtenida por pruebas moleculares (debido a una identificación incorrecta de dos ninfas de *I. ricinus* como *C. felis*); una menor capacidad de discriminación de género de las garrapatas; en los especímenes recolectados de pacientes, se observa una discreta disminución en la capacidad para discriminación entre especies, evidenciada por una reducción en las diferencias de puntuaciones obtenidas por las dos especies con los mejores scores de identificación.

Código	Especie	Est./género	% identidad / nº acceso GenBank (nº amplicones)
1214	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Macho	100/KT382470*
1215	<i>H. punctata</i>	Hembra	100/KR870978*(4)
1216	<i>R. bursa</i>	Hembra	100/ON366979 *
1217A	<i>R. bursa</i>	Hembra	100/ON366979 *
1217B	<i>R. bursa</i>	Hembra	100/ON366979 *
1218	<i>D. marginatus</i>	Hembra	99.5-100/MH645513
1220	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Hembra	100/KT382470*
1221	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074607*
1222	<i>D. marginatus</i>	Macho	99.8-100/MH645513
1223	<i>D. marginatus</i>	Hembra	100/MH645513
1224	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074588*
1225	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074645*
1228	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/MH645519*
1230	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/ GU074606*
1231	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Hembra	100/MZ420717*
1232	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/MH645519*
1233	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/ GU074606*
1234	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074607*
1235	<i>H. marginatum</i>	Hembra	100/MW366630
1236	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Hembra	100/KT382470*
1237	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074589*
1238	<i>I. ricinus</i>	Ninfa	100/GU074589*
1239	<i>R. bursa</i>	Macho	100/ON366979 *
1240	<i>D. reticulatus</i>	Hembra	100/JF791811 *(4)
1241	<i>D. reticulatus</i>	Hembra	100/JF791811 *(4)
1242	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Hembra	100/KT382470*
1243	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Hembra	100/KT382470*

Tabla 8: Ejemplares utilizados en los ensayos de validación EP, realizados con garrapatas retiradas de pacientes.

D. marginatus: *Dermacentor marginatus*; *D. reticulatus*: *Dermacentor reticulatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Código: código de identificación del ejemplar; (nº amplicones): número de amplicones analizados en GenBank. * entre otras secuencias

Especie (estadio/género)	Mejor identificación (estadio/género)	LSV (Rango); prom. 1ª id.	2ª id.	LSV prom. 2ª id.	Dif. prom. 1ª y 2ª id.
<i>D. marginatus</i> (F)	<i>D. marginatus</i> (M)	(1,55-1,78); 1,71	<i>D. reticulatus</i>	1,27	0,44
<i>D. marginatus</i> (F)	<i>D. marginatus</i> (M)	(1,81-2,02); 1,90	<i>H. punctata</i>	1,19	0,71
<i>D. marginatus</i> (M)	<i>D. marginatus</i> (F)	(1,90-2,08); 1,99	<i>D. reticulatus</i>	1,11	0,88
<i>D. reticulatus</i> (F)	<i>D. reticulatus</i> (M)	(1,78-2,02); 1,88	<i>H. punctata</i>	0,91	0,98
<i>D. reticulatus</i> (F)	<i>D. reticulatus</i> (M)	(0,71-2,01); 1,37	<i>H. lusitanicum</i>	0,88	0,49
<i>H. punctata</i> (F)	<i>H. punctata</i> (F)	(1,91-2,22); 2,07	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1,08	0,99
<i>H. marginatum</i> (F)	<i>H. marginatum</i> (F)	(2,05-2,21); 2,25	<i>D. reticulatus</i>	1,35	0,90
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,53-2,03); 1,83	<i>C. felis</i>	1,43	0,40
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,99-2,13); 2,07	<i>C. felis</i>	1,82	0,26
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>C. felis</i>	(2,11-2,34); 2,09	<i>I. ricinus</i> (N)	1,98	0,21
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(2,00-2,09); 2,06	<i>C. felis</i>	1,80	0,25
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(2,00-2,08); 2,03	<i>C. felis</i>	1,66	0,37
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,86-2,04); 1,99	<i>C. felis</i>	1,57	0,43
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(2,03-2,17); 2,10	<i>C. felis</i>	1,94	0,16
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>C. felis</i>	(1,67-2,15); 1,98	<i>I. ricinus</i> (N)	1,84	0,13
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(2,07-2,19); 2,12	Ninguno	Ninguno	Ninguno
<i>I. ricinus</i> (N)	<i>I. ricinus</i> (N)	(1,88-2,12); 1,98	<i>C. felis</i>	1,80	0,18
<i>R. bursa</i> (F)	<i>R. bursa</i> (F)	(1,87-2,06); 2,00	<i>R. pusillus</i>	1,58	0,42
<i>R. bursa</i> (F)	<i>R. bursa</i> (F)	(2,06-2,19); 2,11	<i>R. pusillus</i>	1,34	0,77
<i>R. bursa</i> (F)	<i>R. bursa</i> (F)	(1,88-2,05); 1,99	<i>R. pusillus</i>	1,37	0,62
<i>R. bursa</i> (M)	<i>R. bursa</i> (F)	(2,02-2,13); 2,11	<i>R. pusillus</i>	1,53	0,58
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (M)	(1,50-1,72); 1,57	<i>R. pusillus</i>	1,18	0,39
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (M)	(2,05-2,21); 2,13	<i>R. pusillus</i>	1,55	0,57
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (M)	(1,72-1,84); 1,78	<i>R. pusillus</i>	1,50	0,28
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	(1,64-1,80); 1,72	<i>R. pusillus</i>	1,32	0,41
<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (M)	(1,70-2,04); 1,90	<i>R. pusillus</i>	1,67	0,23
<i>R. sanguineus</i> s.l. (M)	<i>R. sanguineus</i> s.l. (F)	(1,74-1,99); 1,88	<i>R. pusillus</i>	1,73	0,14

Tabla 9: Resultados de la identificación por MALDI-TOF MS correspondiente a los ensayos de validación EP, realizados con garrapatas retiradas de pacientes. *C. felis*: *Ctenocephalides felis*. *D. marginatus*: *Dermacentor marginatus*; *D. reticulatus*: *Dermacentor reticulatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. pusillus*: *Rhipicephallus pusillus*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ; M: macho; H: hembra; N: ninfa; id.: identificación; prom.: promedio; LSV: log score value; **En negrita, especímenes con identificación incorrecta por MALDI-TOF MS**

Análisis de los espectros de masas correspondientes a *Ixodes ricinus* y *Ctenocephalides felis*. Los resultados obtenidos en los test de validación EP fueron sorprendentes, especialmente el caso de las ninfas de *I. ricinus* incorrectamente identificadas como *C. felis*. En la bibliografía estos problemas de discriminación no habían sido descritos. Debido a estos resultados, se decidió realizar una investigación más profunda. Es importante resaltar que la distancia filogenética entre estas dos especies es considerable (figuras 49, 50, 51).

Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos EC, se verificó que MALDI Biotyper había identificado correctamente las tres ninfas de *I. ricinus* recolectadas de vegetación, de hecho, con valores LSV elevados (2,20; 2,10; 2,19). Además, en MBT Compass Explorer, para estos tres ejemplares, el listado de identificaciones correspondían siempre a espectros de *I. ricinus* y, en ningún caso, de *C. felis*. Es importante mencionar en este punto que, el stock de ninfas de *I. ricinus* utilizada para crear la biblioteca de espectros fue el mismo que, posteriormente fue utilizada para la ejecución de los ensayos ENR. Es por tanto comprensible que exista similitud entre sus espectros. Por otro lado, los ejemplares utilizados en los ensayos EP procedían de pacientes, habían sido recolectados en diferentes momentos y en localizaciones geográficas desconocidas, lo que podría explicar que los resultados en estos test obtuvieran puntuaciones discretamente menores. No obstante, aunque esta hipótesis pudiera explicar las pequeñas diferencias en las puntuaciones observadas en los dos test de validación (EP y ENR), no justificaría la similitud observada entre los espectros de *I. ricinus* y *C. felis*.

En una primera aproximación, se realizó una inspección visual de los espectros adquiridos (9 para cada ejemplar) de dos ninfas de *I. ricinus*: una, recolectada de vegetación y la otra retirada de un paciente. En la visualización del rango completo de masas (2.000-20.000 m/z) y posteriormente en el rango 4.400-4.850 m/z llamaban la atención dos hechos (figura 52 y figura 53):

- En el espectro correspondiente a la ninfa de *I. ricinus* retirada de un paciente, se observó una intensidad notablemente mayor de los picos en comparación con los picos correspondientes en el espectro de la ninfa recolectada de vegetación.
- Además, se identificó un número importante de picos que estaban presentes únicamente en el espectro de la ninfa retirada de paciente, lo que indicaba la presencia de picos exclusivos en este espécimen y ausentes en la ninfa de vegetación.

Las diferencias cuantitativas y cualitativas en los picos de los espectros explican, en parte, las diferencias observadas en los test de validación. Sin embargo, estas diferencias seguirían siendo insuficientes para justificar los problemas que MALDI Biotyper presenta para la discriminación entre ninfas de *I. ricinus* y *C. felis*. La observación de que los espectros son distintos dependiendo del sitio de recolección, podría explicar por qué se han observado problemas de identificación únicamente con ninfas de *I. ricinus* extraídas de pacientes.

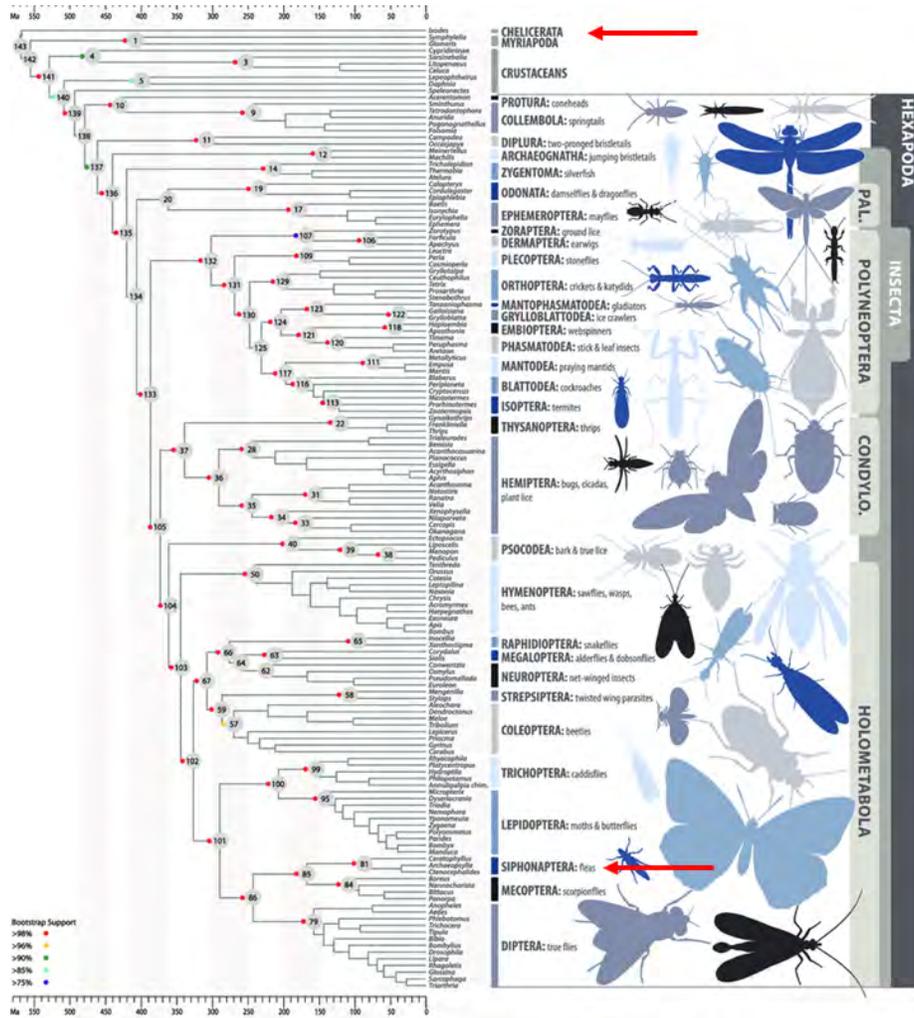


Figura 49: Árbol filogenético que muestra una estimación del momento de emergencia de los distintos tipos de insectos. Como puede observarse las garrapatas (subfilo *Chelicerata*) aparecieron muy tempranamente (flecha roja superior), mientras que las pulgas (orden *Siphonaptera*) aparecieron mucho más tardíamente (flecha roja inferior). Fuente: Misof et al., 2014.

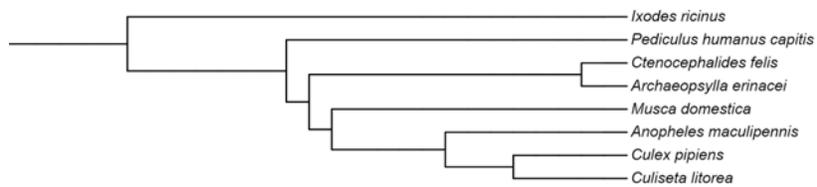


Figura 50: Árbol filogenético que incluye a muchas de las especies de artrópodos que fueron incluidas en la biblioteca de espectros en el presente estudio. Obsérvese que *Ixodes ricinus* se encuentra en una rama independiente del resto de los artrópodos. Fuente: phyloT, a phylogenetic tree generator (<https://phylot.biobyte.de/>).

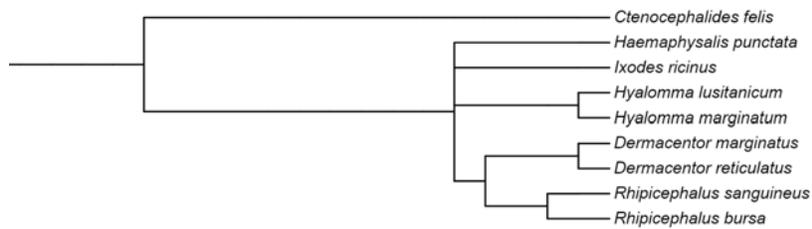


Figura 51: Árbol filogenético que incluye a la mayoría de las especies de garrapatas, y la especie de pulga *Ctenocephalides felis*. Obsérvese que *C. felis* se encuentra, en el árbol, en una rama independiente del resto de las garrapatas. Obsérvese también que, la especie con una menor distancia filogenética es *Haemaphysalis punctata*, y no *Ixodes ricinus*. Fuente: phyloT, a phylogenetic tree generator (<https://phylot.biobyte.de/>).

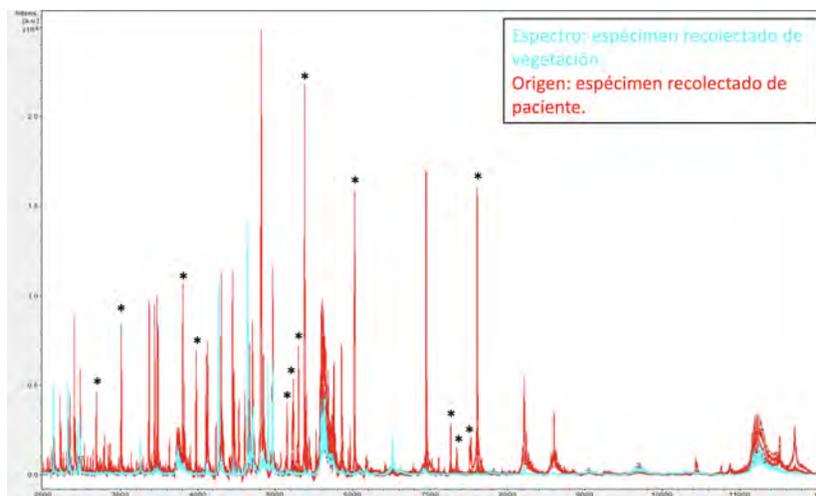


Figura 52: En flexAnalysis, comparación de los espectros de dos ninfas de *Ixodes ricinus*: una recolectada de vegetación (color turquesa) y otra retirada de un paciente (color rojo). En todo el rango de masas del espectro (2.000-11.000 m/z), se observa un mayor número de picos, de mayor intensidad, en los espectros correspondientes al ejemplar retirado de un paciente en comparación con el espécimen recolectado de vegetación. Además, se detecta la presencia de picos exclusivos (identificados por un asterisco “*”) en el espectro correspondiente al ejemplar retirado de paciente. m/z se refiere a la unidad: masa/carga eléctrica. Fuente: aportación propia.

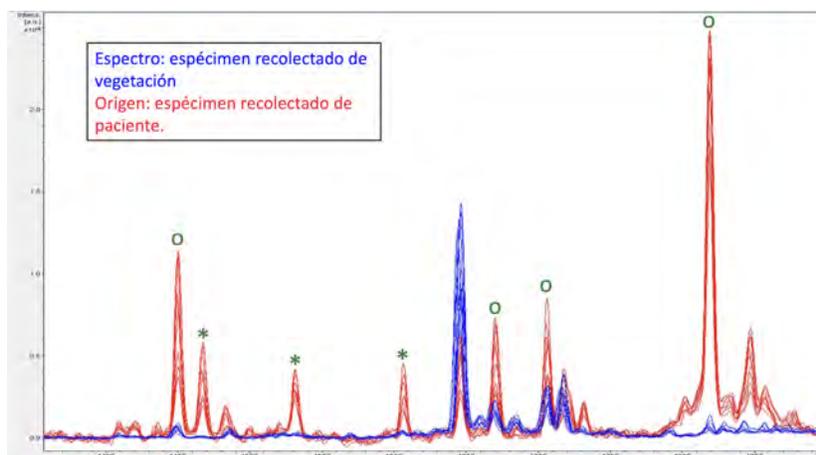


Figura 53: En flexAnalysis, comparación de los espectros de dos ninfas de *Ixodes ricinus*: una recolectada de vegetación (color azul oscuro) y la otra retirada de un paciente (color rojo). En un rango de masas más estrecho, puede apreciarse que la abundancia relativa o intensidad de muchas masas (4450 m/z, 4670 m/z, 4707 m/z y, sobre todo, 4820 m/z) es claramente superior en el ejemplar retirado de paciente (identificados con el símbolo “O” de color verde). Además, se observa la presencia de picos exclusivos en el ejemplar retirado de un paciente(rojo), como 4465 m/z, 4530 m/z y 4605 m/z (identificados en la figura con un asterisco “*”) de color verde). m/z se refiere a la unidad: masa/carga eléctrica. Fuente: aportación propia.

Así, los espectros de *C. felis* presentan cierta similitud con los espectros de ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes, pero no con los espectros de ninfas de dicha especie recolectados de la vegetación. Mediante el software MALDI Biotyper, se seleccionó una de las dos ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes que había sido incorrectamente identificada como *C. felis* (tabla 9) y se comparó su espectro con dos espectros de la biblioteca: una ninfa de *I. ricinus* recolectada de la vegetación y la pulga *C. felis*. Se observó que muchos picos del espectro de la ninfa mal identificada de *I. ricinus*, estaban presentes en ambos espectros maestros, MSP, lo que indica una similitud entre ellos (figura 54). En particular, al examinar el rango con mayor concentración de masas, 3000-6300 m/z, se encontró que la ninfa de *I. ricinus* retirada de paciente presentaba 18 y 19 picos coincidentes con los espectros de referencia de *I. ricinus* recolectada de vegetación y *C. felis*, respectivamente (figura 55). Esta similitud permite explicar por qué la muestra obtuvo, en los ensayos de validación EP, un promedio de puntuaciones (LSV) de 2,09 frente a *C. felis* y de 1,98 frente a la ninfa de *I. ricinus* recolectada de la vegetación.

Analizando en MBT Compass Explorer los espectros de las dos ninfas de *I. ricinus* erróneamente identificadas, observamos que, las mejores coincidencias se producían únicamente con espectros de referencia de ninfas de *I. ricinus* (recolectadas de vegetación) o *C. felis*. Así, la similitud en los espectros se produce únicamente con el estadio de ninfa de *I. ricinus*, en ningún caso con el estadio de adulto.

Con la función “View Peak List” de MBT Compass Explorer Durante, se constató que el MSP de una de las ninfas de *I. ricinus* (recolectada de vegetación) y el MSP de *C. felis* compartían 17/70 (24.28%) picos del espectro de referencia; ocho de estos picos se concentraban en el rango de masas entre 3200 y 4800 m/z, donde se detectaban la mayoría de las masas coincidentes. En este rango, se detectaron además siete picos exclusivos del MSP de *C. felis*. Esto indica que los MSP de ambas especies tienen un significativo grado de similitud.

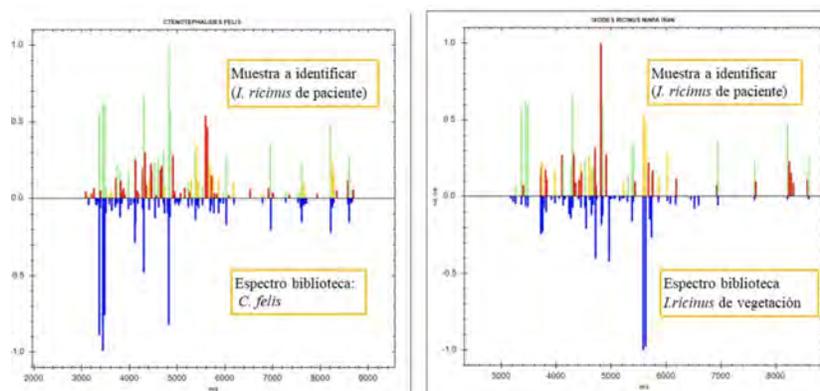


Figura 54: En MBT Compass Explorer, visualización de las coincidencias de cada pico del espectro de una ninfa de *Ixodes ricinus* retirada de un paciente (perteneciente a los ensayos EP) frente a dos espectros de la biblioteca: una ninfa de *I. ricinus* recolectada de vegetación y *Ctenocephalides felis*. Rango de masas: 2000-9000 m/z. En la parte superior se presenta la muestra problema, mientras que en la parte inferior se muestra las masas correspondientes al espectro de referencia: a la izquierda, el espectro de *C. felis*, y a la derecha, el espectro de referencia de una ninfa de *I. ricinus* recolectada de la vegetación; la muestra problema presenta muchos picos coincidentes (color verde), tanto con el espectro de *C. felis*, como con el correspondiente a la ninfa de *I. ricinus* recolectada de vegetación. Los picos de la muestra problema con una peor coincidencia con el espectro de referencia se muestran con un color amarillo-naranja. Los picos no coincidentes aparecen en color rojo. Fuente: aportación propia.

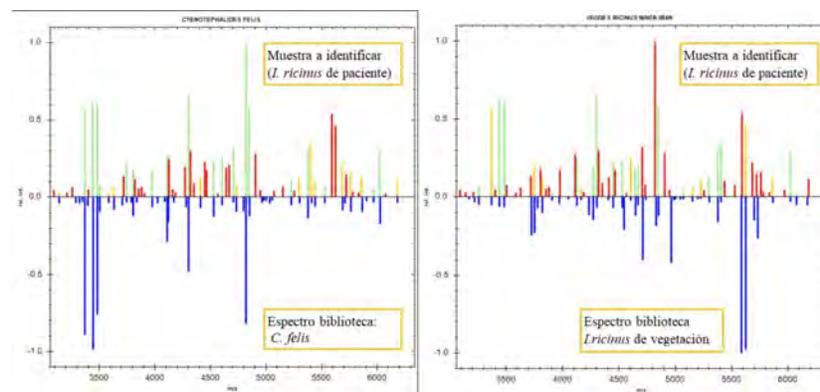


Figura 55: En MBT Compass Explorer, visualización de las coincidencias de cada pico del espectro de una ninfa de *Ixodes ricinus* retirada de un paciente (perteneciente a los ensayos EP) frente a dos espectros de la biblioteca: una ninfa de *I. ricinus* recolectada de vegetación y *Ctenocephalides felis*. En la parte superior se presenta la muestra problema, mientras que en la parte inferior se muestra las masas correspondientes al espectro de referencia: a la izquierda, el espectro de *C. felis*, y a la derecha, el espectro de referencia de una ninfa de *I. ricinus* recolectada de la vegetación; la muestra problema presenta muchos picos coincidentes (color verde), tanto con el espectro de *C. felis*, como con el correspondiente a la ninfa de *I. ricinus* recolectada de vegetación. Los picos de la muestra problema con una peor coincidencia con el espectro de referencia se muestran con un color amarillo-naranja. Los picos no coincidentes aparecen en color rojo. En rango de masas 3000-6300 m/z, donde se concentraba la mayor parte de las masas, se encontró que la ninfa de *I. ricinus* retirada de paciente presentaba 19 picos coincidentes con el espectro de *C. felis* y otros 18 picos coincidentes con el espectro de *I. ricinus* recolectado en la vegetación, lo que indica una significativa similitud entre ambos espectros. Fuente: aportación propia.

Análisis de los espectros del resto de especies de garrapata. La observación de que los espectros de las ninfas de *I. ricinus* son diferentes según el origen del ejemplar motivó reconsiderar la posibilidad de que otras especies de garrapatas mostraran también diferencias en sus espectros según la procedencia. Para abordar esta cuestión, se realizó una inspección visual de los espectros del resto de las especies, prestando una especial atención al número de picos

Debido a las cuestiones de disponibilidad comentadas más arriba, las especies para las cuales se disponía de especímenes de ambos orígenes incluyeron: *D. marginatus*, *H. punctata*, *H. marginatum*, *R. bursa* y *R. sanguineus* s.l. De acuerdo al análisis del aspecto visual de los espectros, las especies se pudieron clasificar en tres categorías:

- Especies que, en los espectros correspondientes a los especímenes retirados de pacientes, presentaban un número claramente superior de picos : *D. marginatus* (figura 56), *H. marginatum* (figura 60).
- Especies presentaban similitud en el número total de picos, pero en las cuales, las masas compartidas presentaban una intensidad relativa mucho mayor en los ejemplares retirados de pacientes : *R. sanguineus* s.l. (figura 58)
- Especies que presentaban espectros muy similares en número e intensidad de los picos: *H. punctata* (figura 59), *R. bursa* (figura 57).

Las conclusiones obtenidas del análisis visual de los espectros indican que:

- Para todas las especies estudiadas, los especímenes retirados de pacientes presentan espectros de masas diferentes a los espectros correspondientes a los especímenes recolectados de otras fuentes.
- Estas diferencias pueden apreciarse tanto como en un incremento en la intensidad de los picos como por la presencia de picos adicionales, encontrados de forma exclusiva en aquellos ejemplares retirados de pacientes.
- Estas diferencias pueden justificar la diferencia en los valores observados de LSV que, de forma general, se habían obtenido en las garrapatas retiradas de pacientes.
- Las diferencias en los espectros son diferentes según la especie.

A través de flexAnalysis se desglosó cada especie en dos categorías, de acuerdo al origen del ejemplar. Así, para cada especie, se estableció un promedio de número de picos, según el origen del ejemplar:

- El origen “No paciente”, incluía los ejemplares recolectados de vegetación así como de diversos tipos de animales (jabalíes, perros o vacas) según la especie de garrapata.
- Origen “Paciente”, que incluía los ejemplares retirados de pacientes.

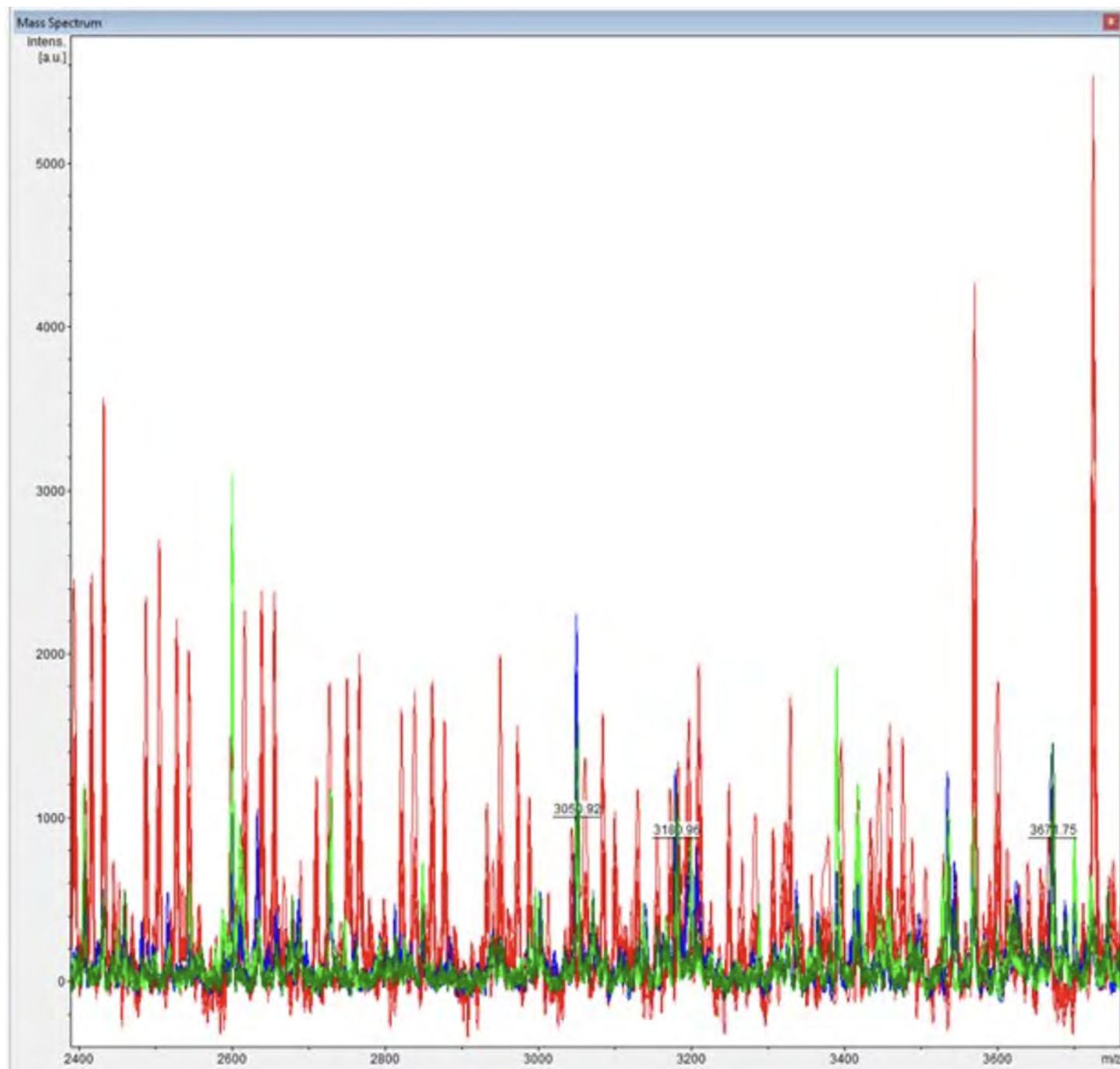


Figura 56: En flexAnalysis , visualización de los espectros de cuatro ejemplares de *Dermacentor marginatus*. El primer ejemplar fue retirado de un paciente (espectro de color rojo). Los otros tres ejemplares fueron recolectados de vegetación (espectros de color verde claro, verde oscuro y azul oscuro). Obsérvese la apreciable mayor cantidad de picos en el espectro correspondiente al ejemplar retirado de paciente. Fuente: aportación propia.

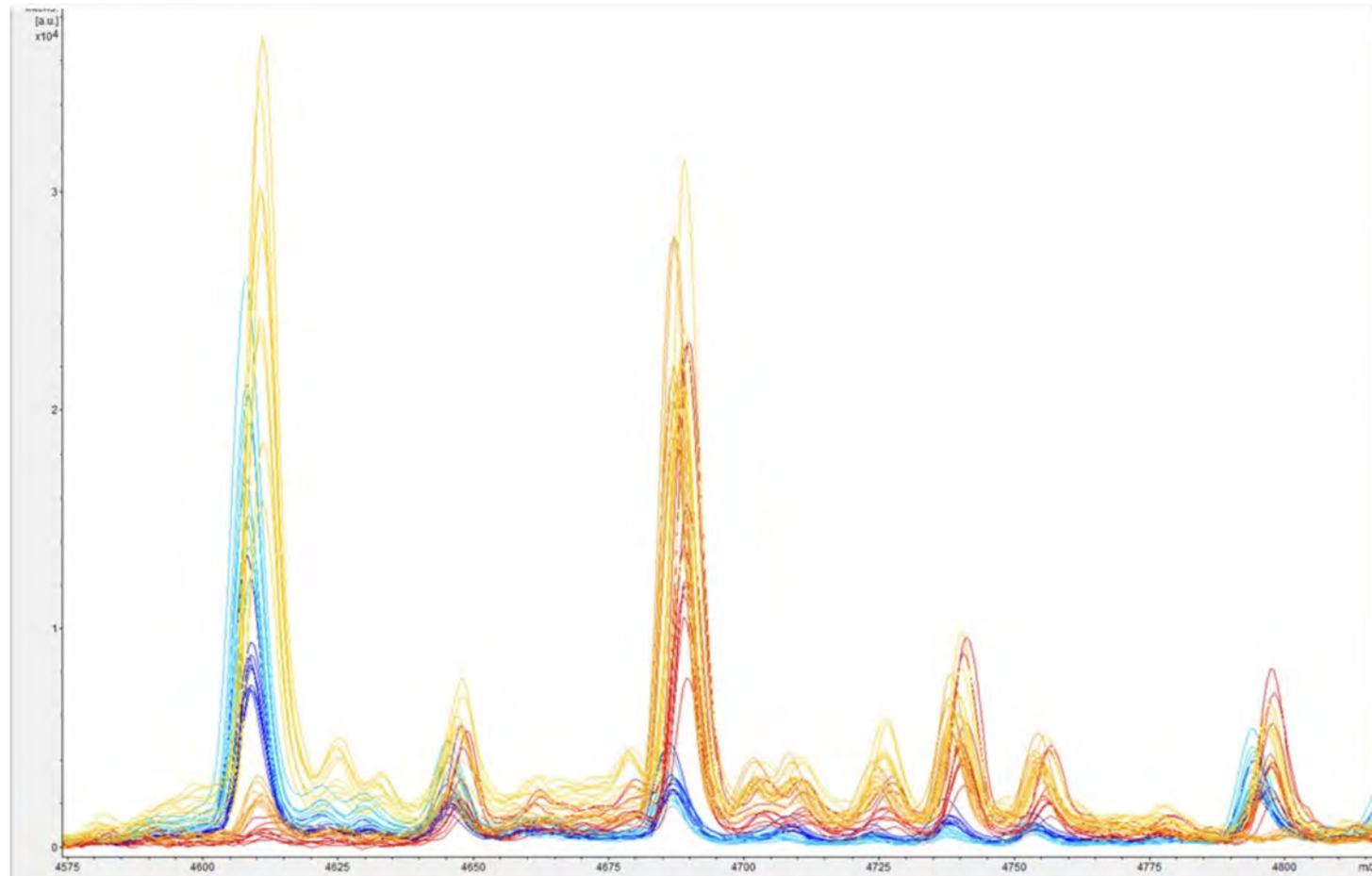


Figura 57: En flexAnalysis , visualización de los espectros de cinco ejemplares de *Rhipicephalus bursa*. Los tres primeros fueron retirados de pacientes (espectros de color rojo, naranja y amarillo). Los otros dos ejemplares fueron recolectados de vegetación (espectros de color azul claro y azul oscuro). Obsérvese que los espectros son muy similares en número e intensidad de los picos. Fuente: aportación propia.

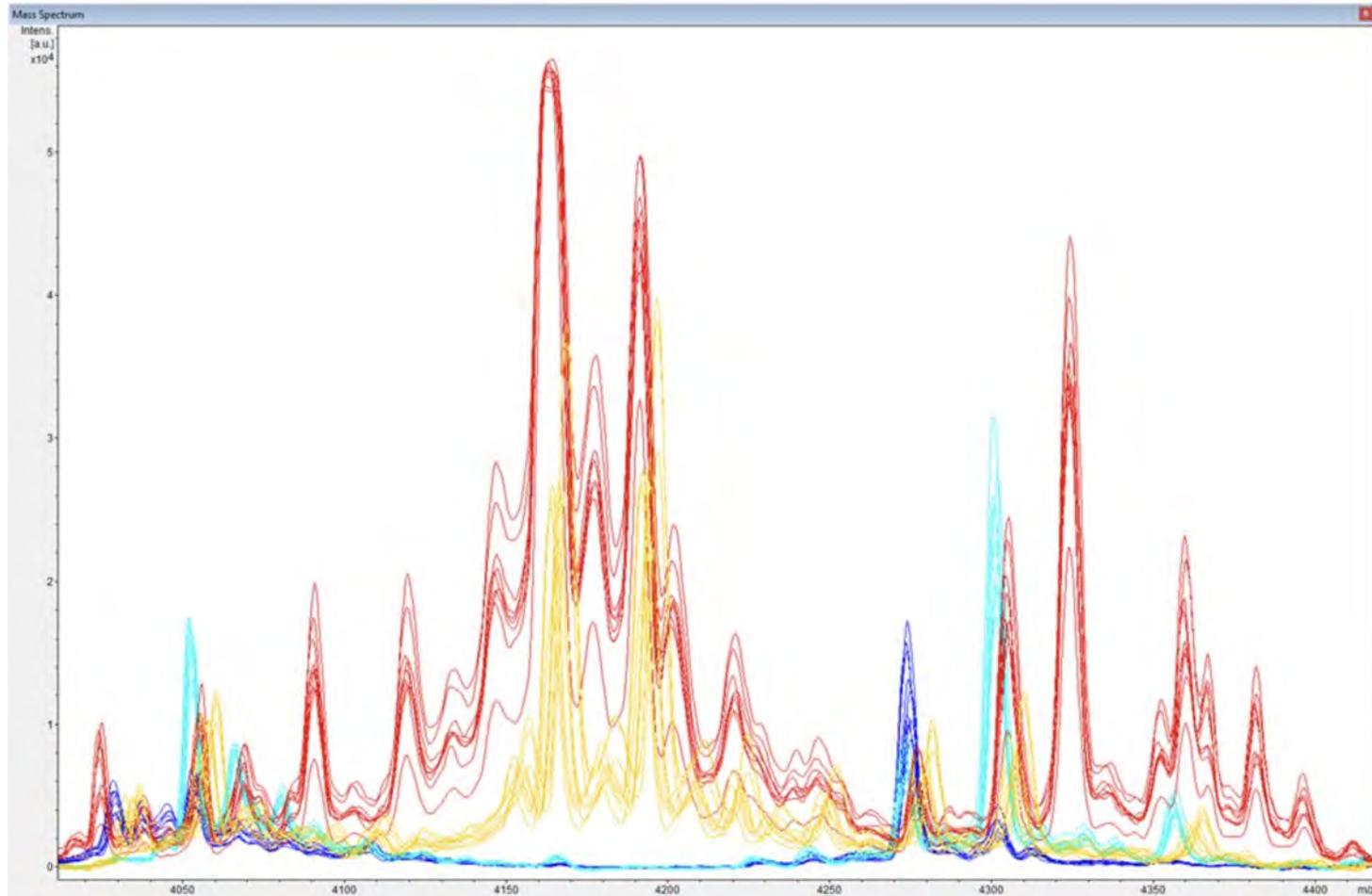


Figura 58: En flexAnalysis , visualización de los espectros de cuatro ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*: dos adultas retiradas de pacientes (espectros de color rojo, naranja) y dos hembras recolectadas de perros (espectros de color azul claro y azul oscuro). Obsérvese que, en el rango de masas 4050-4400 m/z, se observan numerosos picos con una intensidad relativa muy alta, en los ejemplares retirados de pacientes. Por lo demás los espectros de los cuatro ejemplares son muy similares entre sí. Fuente: aportación propia.

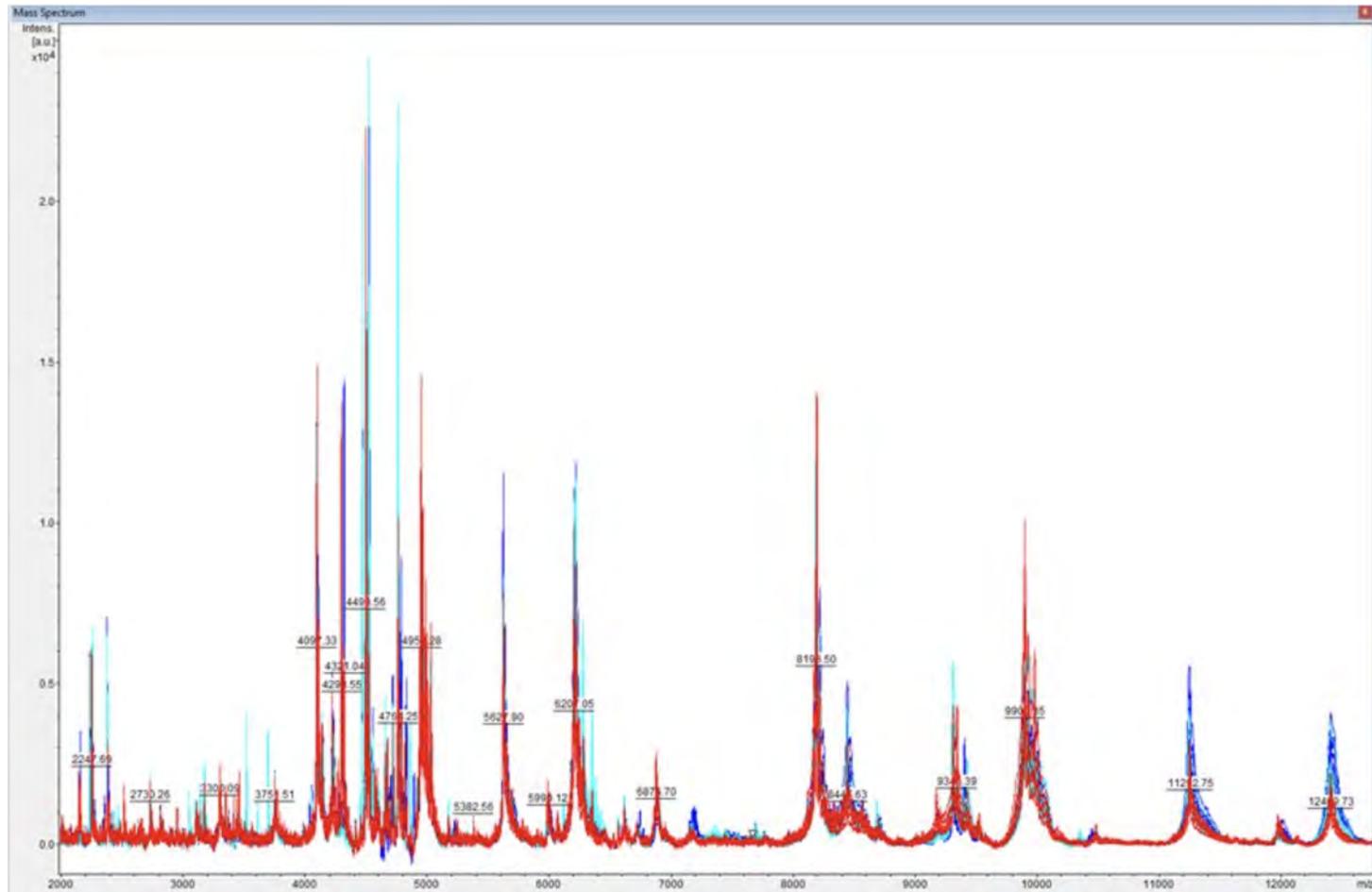


Figura 59: En flexAnalysis , visualización de los espectros de tres ejemplares adultos de *Haemaphysalis punctata*: un ejemplar retirado de paciente (espectro de color rojo) y dos hembras recolectadas de vegetación (espectros de color azul claro y azul oscuro). Obsérvese que, en el rango de masas 2.000-12.000m/z, existe una notable similitud en los espectros. Fuente: aportación propia.

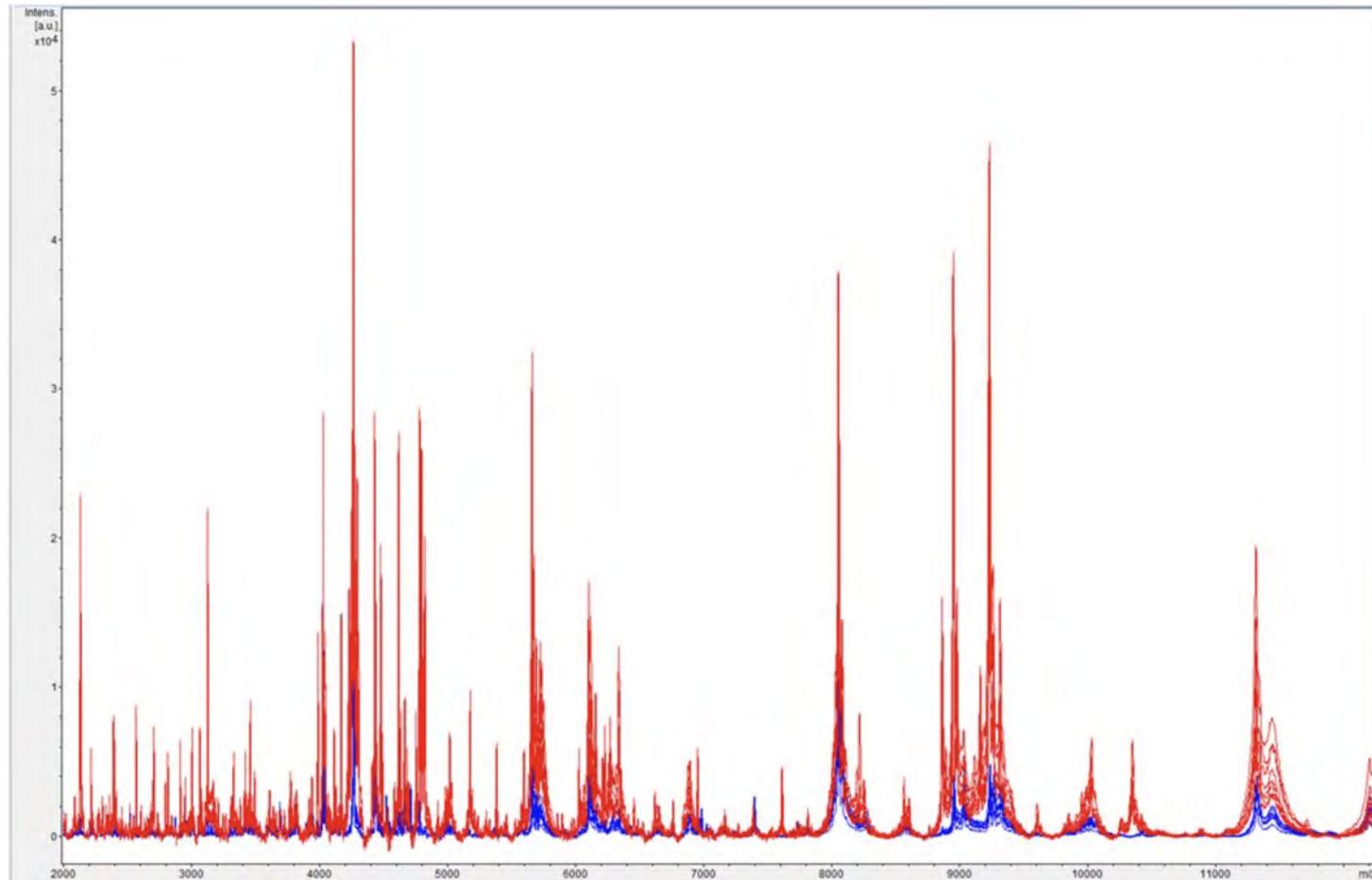


Figura 60: En flexAnalysis , visualización de los espectros de dos ejemplares de *Hyalomma marginatum*: una hembra retirada de paciente (espectro de color rojo) y otra hembra recolectada de vacas (espectro de color azul). Obsérvese que, en el rango de masas 2.000-12.000 m/z, se observa la presencia de numerosos picos con una intensidad relativa muy alta en el espectro correspondiente al ejemplar retirado de paciente. Además, para aquellos picos que eran compartidos por ambos ejemplares, la intensidad es mayor en el ejemplar retirado de paciente. Fuente: aportación propia.

Como puede observarse, el grupo “no paciente” incluía, en realidad, diferentes sitios de recolección, con ejemplares recolectados de vegetación (*D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctata*, *H. lusitanicum*, *I. ricinus*, *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l.), jabalíes (*D. reticulatus*), vacas (*H. marginatum* y *R. bursa*) y perros (*R. sanguineus* s.l.). Algunas especies incluían, además, ejemplares de diversos orígenes (*D. reticulatus*, *R. sanguineus* s.l.). Con el propósito de establecer comparaciones, se incluyeron también en este análisis aquellas especies de garrapatas de las cuales no se habían recuperado ejemplares de pacientes en los ensayos de validación EP: *H. lusitanicum*, *R. pusillus* y especímenes adultos de *I. ricinus*.

En la tabla 10 se describen los resultados del análisis del promedio en el número de picos. Se incluyen cinco columnas, que de izquierda a derecha son: la identidad de la especie y estadio de la garrapata, determinado por criterios morfológicos y moleculares (se detalla el número de adultos machos, adultas hembras o ninfas incluidos en el análisis); el sitio de recolección y, si procede, el número de ejemplares recolectados por cada sitio de recolección; los método/s de disparo de láser fue seleccionado por el usuario para la adquisición de los espectros; el promedio en el número de picos del total de espectros adquiridos de una especie de garrapata por sitio de recolección (no paciente vs paciente); la ratio entre el número de picos en ejemplares recolectados de paciente: recolectados de otras fuentes.

Como puede apreciarse en la tabla 10:

- En las especies analizadas, la mayoría presentan un mayor número de picos en los ejemplares retirados de pacientes. El número de picos en los espectros de ejemplares recolectados de pacientes, presentan unos valores que oscilan entre un 103,93 % (*R. bursa*) y un 203,14 % (*D. marginatus*), en relación a los correspondientes a otras fuentes de recolección.
- El caso de *D. reticulatus* es excepcional. En esta especie, los ejemplares recolectados de vegetación presentan, de manera muy notable, el mayor promedio en el número de picos (152,08; rango 52-201) de todas las especies recolectadas en el mismo tipo de fuentes. En esta especie, el promedio en el número de picos en los especímenes recolectados de vegetación es del 137 % respecto al de los ejemplares retirados de pacientes.
- La cuantificación del número de picos constató las impresiones obtenidas mediante la inspección visual de los espectros por flexAnalysis . Así, se confirmó que los espectros de *R. bursa* recolectados de diferentes orígenes son muy similares en términos de número de picos. De forma notable, las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes presentan un promedio de número de picos del 186,31 % en comparación con las ninfas recolectadas de vegetación.
- De forma interesante, las dos ninfas de *I. ricinus* extraídas de pacientes que habían sido identificadas como *C. felis* por MALDI-TOF MS, son los dos ejemplares que presentan, de promedio, un mayor número de picos

en sus espectros (115,78 y 116,11 picos, respectivamente)(tabla 9). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los picos exclusivos, detectados sólo en los ejemplares retirados de pacientes, pueden ser en parte responsables de las identificaciones incorrectas.

Posteriormente se compararon los espectros de referencia según el sitio de recolección. Para poder proceder al análisis, se procedió a cargar en la biblioteca los espectros correspondientes a los ejemplares utilizadas en los ensayos de validación EP (ya que estos espectros no habían sido previamente incluidos en la biblioteca). La figura 61 muestra los detalles del dendrograma. Como puede observarse:

- Todas las especies se agrupan en clusters específicos de especie. Esto indica que los espectros de cada especie de garrapata son específicos y están separados de los espectros del resto de especies. Esto confirma que cada especie de garrapata tiene un espectro diferenciado del resto. Este patrón es coherente con los resultados obtenidos en los test de validación.
- Para aquellos géneros de garrapatas que presentan más de una especie, todas las especies se agrupan en un único clúster de género. Así, el género *Dermacentor* se divide en dos subgrupos, uno que agrupa a *D. marginatus* y otro a *D. reticulatus*; lo mismo sucede con *Hyalomma* (*H. lusitanicum* y *H. marginatum*) y *Rhipicephalus* (*R. bursa*, *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l.).
- Los géneros de garrapatas con una única especie (*I. ricinus*, *H. punctata*), están separados del resto de géneros/especies.
- De forma interesante, los espectros de *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l. se agrupan juntos en un único cluster. Esto indica que algunos especímenes de *R. sanguineus* s.l. y/o *R. pusillus* podrían ser difíciles de discriminar por MALDI-TOF MS. Si bien este problema no ha sido detectado en los test EP y ENR, la segunda especie con las puntuaciones más altas en dichos test fue consistentemente *R. sanguineus* s.l. o *R. pusillus*, confirmando así la similitud entre ambas especies.
- Los resultados del dendrograma son coherentes con la relación filogenética de las especies incluidas y concuerdan con los resultados obtenidos en los test de validación.

Especie (número & estadio/género)	Sitio de recolección (número de ejemplares)	Método AutoXecute mejor id.	Núm. de picos; prom. (rango)	Número picos pac. : otros Tendencia
<i>D. marginatus</i> (3M;3F)	Vegetación	MBT_AutoX 25-35 %	66,51 (34-106)	Incremento
<i>D. marginatus</i> (1M;2F)	Paciente	MBT_AutoX 30-40 %	135,11 (79-166)	203,14 %
<i>D. reticulatus</i> (2M; 2F)	Vegetación(3), jabalí(1)	MBT AutoX 25-35 %	152,08 (50-201)	Descenso
<i>D. reticulatus</i> (2F)	Paciente	MBT AutoX 34-44 %; 40-50 %	110,28 (87-133)	-27,50 %
<i>H. punctata</i> (2M;2F)	Vegetación	MBT_AutoX 40-50 %	97,18 (44-121)	Incremento
<i>H. punctata</i> (1F)	Paciente	MBT_AutoX 40-50 %	143,33 (124-168)	147,49 %
<i>H. lusitanicum</i> (2M;2F)	Vegetación	MBT_AutoX	102,41 (38-158)	No aplica
<i>H. marginatum</i> (2M;2F)	Vacas	MBT_AutoX 45-55 %	69,03 (29-95)	Incremento
<i>H. marginatum</i> (1F)	Paciente	MBT_AutoX 34-44 %,50-60 %	108,61 (74-134)	157,33 %
<i>I. ricinus</i> (4M;4F)	Vegetación	MBT_AutoX 25-35 %	79,93 (31-106)	No aplica
<i>I. ricinus</i> (8N)	Vegetación	MBT_AutoX	71,46 (35-121)	Incremento
<i>I. ricinus</i> (8N)	Paciente	MBT_AutoX 34-44 %	133,14 (85-171)	186,31 %
<i>R. bursa</i> (2M;2F)	Vacas	MBT_AutoX 30-40 %	132,16 (61-215)	Incremento
<i>R. bursa</i> (3F)	Paciente	MBT_AutoX30-40 %	137,36 (104-157)	103,93 %
<i>R. pusillus</i> (2M;2F)	Vegetación	MBT_AutoX	114,41 (66-170)	No aplica
		MBT_AutoX34-44 %,40-50 %,45-55 %		
<i>R. sanguineus</i> s.l. (1M;2F)	Perro(2)+Vegetación(1)	55 %	95,21 (70-127)	Incremento
<i>R. sanguineus</i> s.l. (1M;3F)	Paciente	MBT_AutoX45-55 %	117,19 (54-159)	123,08 %

Tabla 10: Diferencias en el promedio de número de picos correspondientes a espectros de garrapatas según el sitio de su recolección.

D. marginatus: *Dermacentor marginatus*; *D. reticulatus*: *Dermacentor reticulatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. M: macho; H: hembra; N: ninfa. Núm.: número; prom.: promedio; pac.: paciente. **En negrita, especies en las que el número de picos observados en especímenes retirados de pacientes es menor que el número de picos de especímenes colectados de otras fuentes**

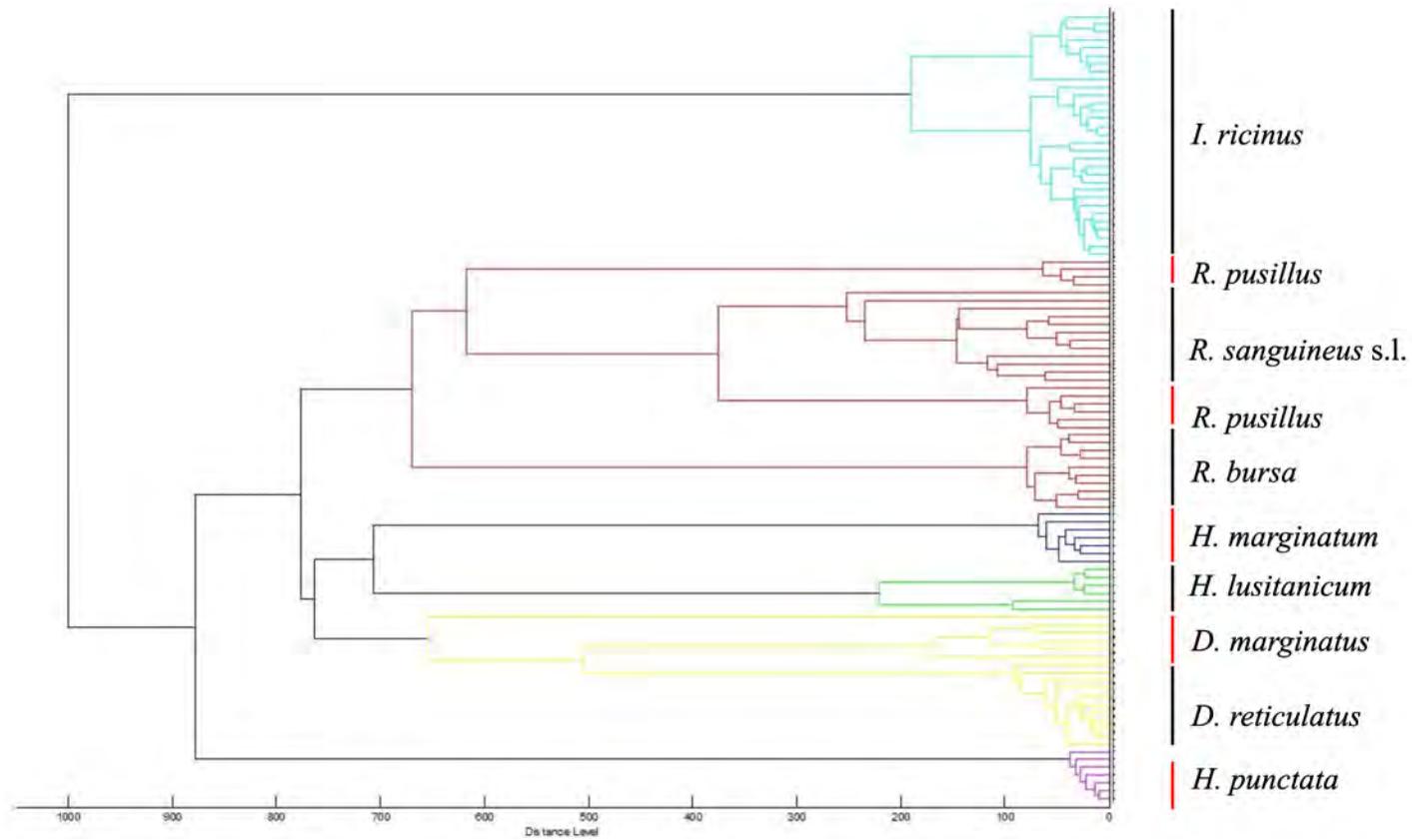


Figura 61: En MBT Compass Explorer, dendrograma construido a partir de los espectros de referencia de todas las especies de garrapatas. Se incluyen también los espectros de referencia generados a partir de los ejemplares retirados de pacientes. *D. marginatus*: *Dermacentor marginatus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; *H. lusitanicum*: *Hyalomma lusitanicum*; *H. marginatum*: *Hyalomma marginatum*; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *R. bursa*: *Rhipicephalus bursa*; *R. pusillus*: *Rhipicephallus pusillus*; *R. sanguineus* s.l.: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Fuente: aportación propia.

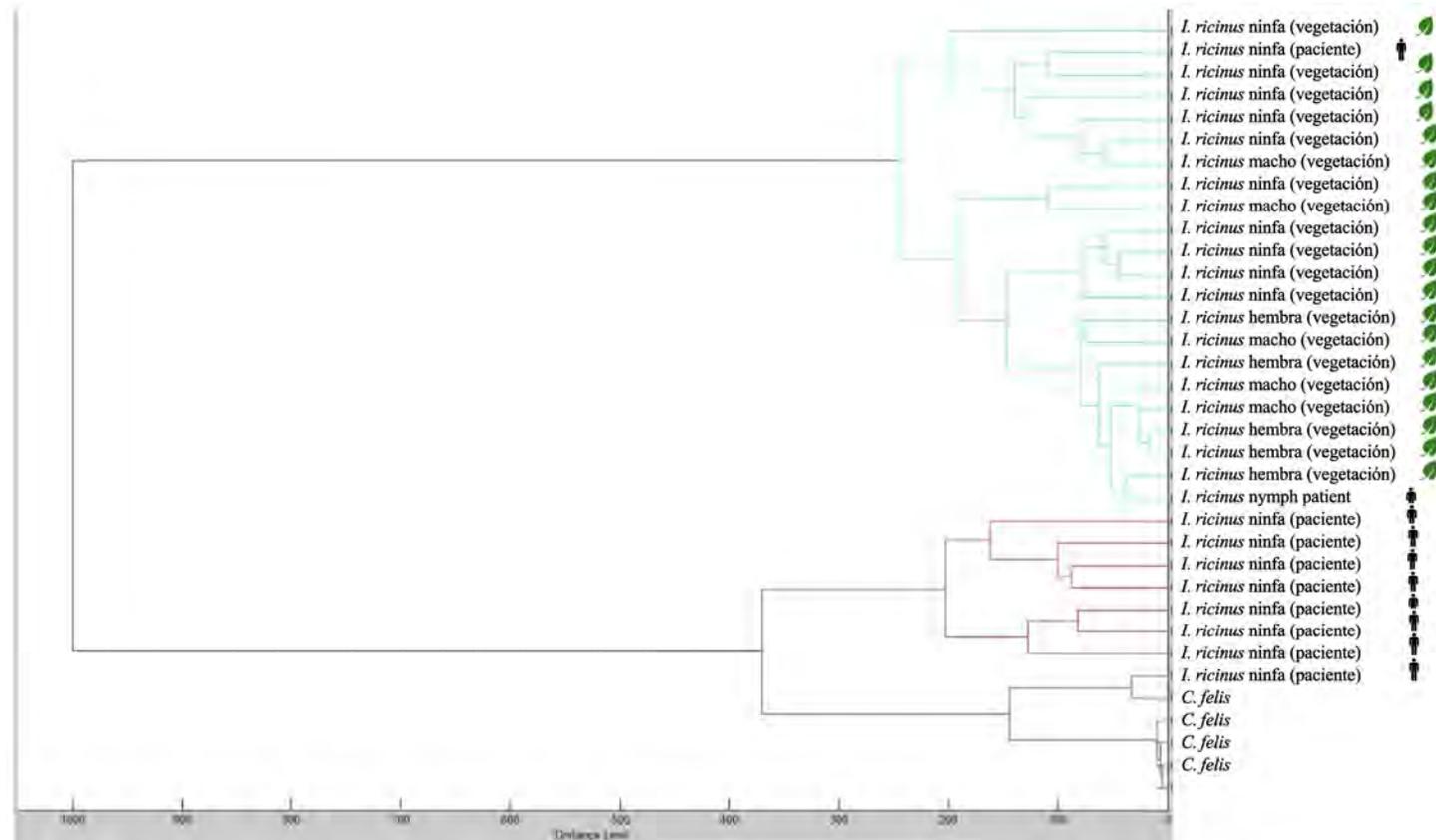


Figura 62: En MBT Compass Explorer, dendrograma construido a partir de los espectros de referencia de *Ctenocephalides felis* e *Ixodes ricinus*. Los espectros de *C. felis* se agrupan con los correspondientes a las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes (parte inferior del dendrograma). Los espectros de ninfas de *I. ricinus* recolectadas de vegetación forman otro cluster, claramente separado. Los espectros de ninfas de *I. ricinus* recolectadas de vegetación se identifican por el icono de una hoja verde a su derecha, mientras que los correspondientes a ejemplares recolectados de pacientes se identifican por el icono de una persona a su derecha. Fuente: aportación propia.

Como se ha visto previamente, MALDI-TOF MS presenta problemas para diferenciar *I. ricinus* de *C. felis*. De forma similar, se decidió analizar un dendrograma construido a partir de los espectros de *I. ricinus* y *C. felis* (figura 62). Como puede observarse:

- En el dendrograma, se observan dos ramas bien diferenciadas: la primera rama contiene los espectros de ninfas y adultos de *I. ricinus* recolectados de vegetación. En dicho cluster se incluye también el espectro correspondiente a una ninfa obtenida de paciente.
- La segunda rama agrupa a los espectros de las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes y los de *C. felis*.
- Ninfas y adultos de *I. ricinus* forman, cada uno, un subcluster. Esto quiere decir que MALDI-TOF MS en principio puede discriminar los estadios de *I. ricinus* (no se disponen de espectros de larvas).
- Las ninfas recolectadas de vegetación y las retiradas de pacientes se encuentran alejadas unas de otras. Los espectros son claramente diferentes. De hecho, los espectros de ninfas de *I. ricinus* recolectadas de vegetación son más parecidos a los espectros de adultos recolectados de la misma fuente que a los espectros de ninfas retiradas de pacientes.
- De forma notable, nueve de los diez espectros de ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes forman un clúster con los espectros de *C. felis*. Únicamente, el espectro de una ninfa de *I. ricinus* retirada de un paciente se agrupa con los espectros del resto de ninfas recolectadas de vegetación.
- Basándonos en estas observaciones, se puede deducir que, la similitud entre los espectros de *I. ricinus* está más relacionado con el sitio de recolección del ejemplar que con su estadio de desarrollo.
- Los resultados obtenidos en el dendrograma son coherentes con los observados en los ensayos de validación EP. Se comprende que MALDI-TOF MS presente dificultades para discriminar los espectros correspondientes a las ninfas de *I. ricinus* extraídas de pacientes y los de *C. felis*, debido a la alta similitud entre sus espectros.

Se plantearon algunas hipótesis para explicar las diferencias observadas en los espectros de acuerdo al sitio de recolección. Una de estas hipótesis sugería que la alimentación con sangre del hospedador podría influir, de alguna forma, en la heterogeneidad de los espectros. Para testar esta hipótesis, se clasificaron las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes en tres categorías según su grado de alimentación: poco o nada alimentado, parcialmente alimentado y repleto (figura 63). Es importante destacar que esta clasificación es subjetiva y depende del investigador, lo que podría generar un posible sesgo de clasificación. Una vez más, se utilizó el software MBT Compass Explorer para generar un dendrograma de *I. ricinus* y se asignó a cada espectro el grado de alimentación correspondiente del espécimen. Como puede observarse, la similitud de los espectros no se corresponde con el grado de alimentación. Por tanto, el análisis de dendrogramas

sugiere que la heterogeneidad en los espectros de *I. ricinus* no depende del grado de alimentación del ejemplar.

Deben existir, por tanto, otros factores que explique la variabilidad de los espectros dentro de una especie de garrapata. En el momento en que fueron realizados los ensayos de validación EP, la biblioteca contenía sólo los espectros de las ninfas de *I. ricinus* que habían sido recolectadas de la vegetación. El análisis de los dendrogramas, mostró a su vez que, para esta especie y estadio concretos de garrapata, los espectros de los ejemplares retirados de pacientes son diferentes a los espectros de los especímenes recolectados de vegetación. A continuación, para los dos ejemplares incorrectamente identificados, se realizó una nueva identificación después de haber introducido en la biblioteca, los espectros del resto de ejemplares de los ensayos de validación EP. Los resultados fueron los siguientes: una de las dos ninfas fue correctamente identificada. Sin embargo, el otro ejemplar continuó siendo identificado como *C. felis*. Estos resultados sugieren un aspecto práctico muy importante: la inclusión, en la biblioteca, de los espectros correspondientes a ejemplares obtenidos de pacientes puede mejorar la capacidad de identificación por MALDI-TOF MS de ejemplares obtenidos de pacientes.

A pesar de la obtención de valores de LSV discretamente inferiores, en los test de validación no se detectaron problemas en la identificación para el resto de especies. Sin embargo, y en vista de los resultados observados en *I. ricinus*, se consideró pertinente investigar los espectros del resto de especies. A través de MBT Compass Explorer se generó un dendrograma para cada especie. Los resultados de este análisis fueron los siguientes:

- En los dendrogramas de la mayoría de las especies de garrapatas, los espectros de los ejemplares retirados de pacientes se agrupan con el resto de los ejemplares de otras fuentes. Este fue el caso observado en: *D. reticulatus*, *H. punctata*, *H. marginatum*, *R. sanguineus* s.l.
- El dendrograma de *D. marginatus* muestra dos ramas. Una rama incluye los espectros de ejemplares retirados de pacientes (un macho y tres hembras), ubicados en la parte superior del dendrograma. La otra rama incluye los espectros de ejemplares, machos y hembras, recolectados de vegetación, ubicados en la parte inferior del dendrograma (figura 64).
- Los especímenes de *R. bursa* se agrupan igualmente en dos ramas. La primera de ellas está formada por los espectros de ejemplares retirados de pacientes (1 macho y 3 hembras), junto con los espectros de machos recolectados de vacas. La otra rama está constituida por los espectros de hembras recolectadas de vacas (figura 65).

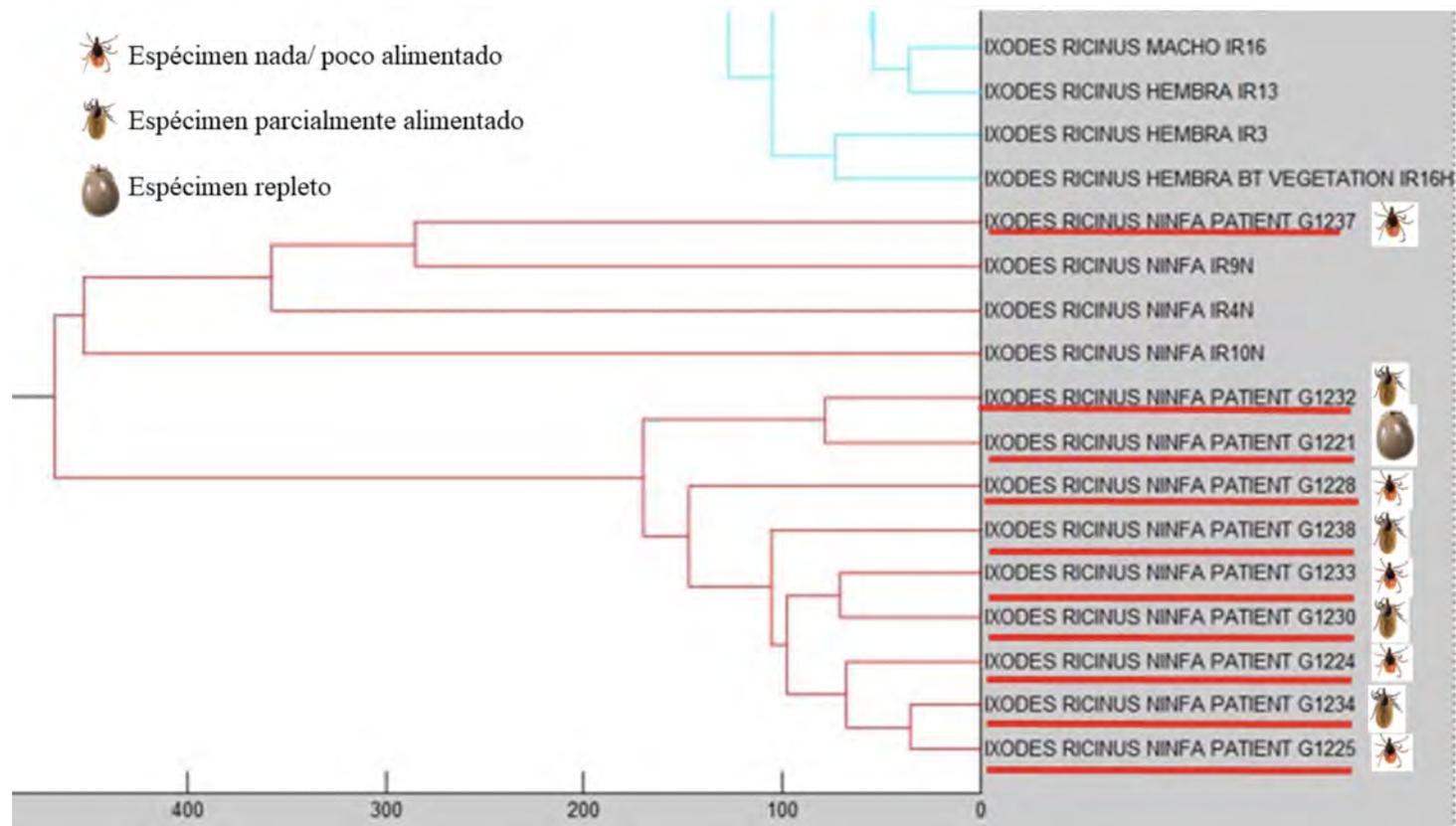


Figura 63: En MBT Compass Explorer, dendrograma generado a partir de los espectros de ninfas *Ixodes ricinus* recolectados de pacientes (junto con recolectados de vegetación). A la derecha de cada espectro de referencia aparece un icono que designa uno de los tres grados de alimentación: nada/poco alimentado, parcialmente alimentado o repleto. Como puede verse en la imagen, no existe ninguna agrupación de los espectros de acuerdo al grado de alimentación del espécimen. Fuente: aportación propia.

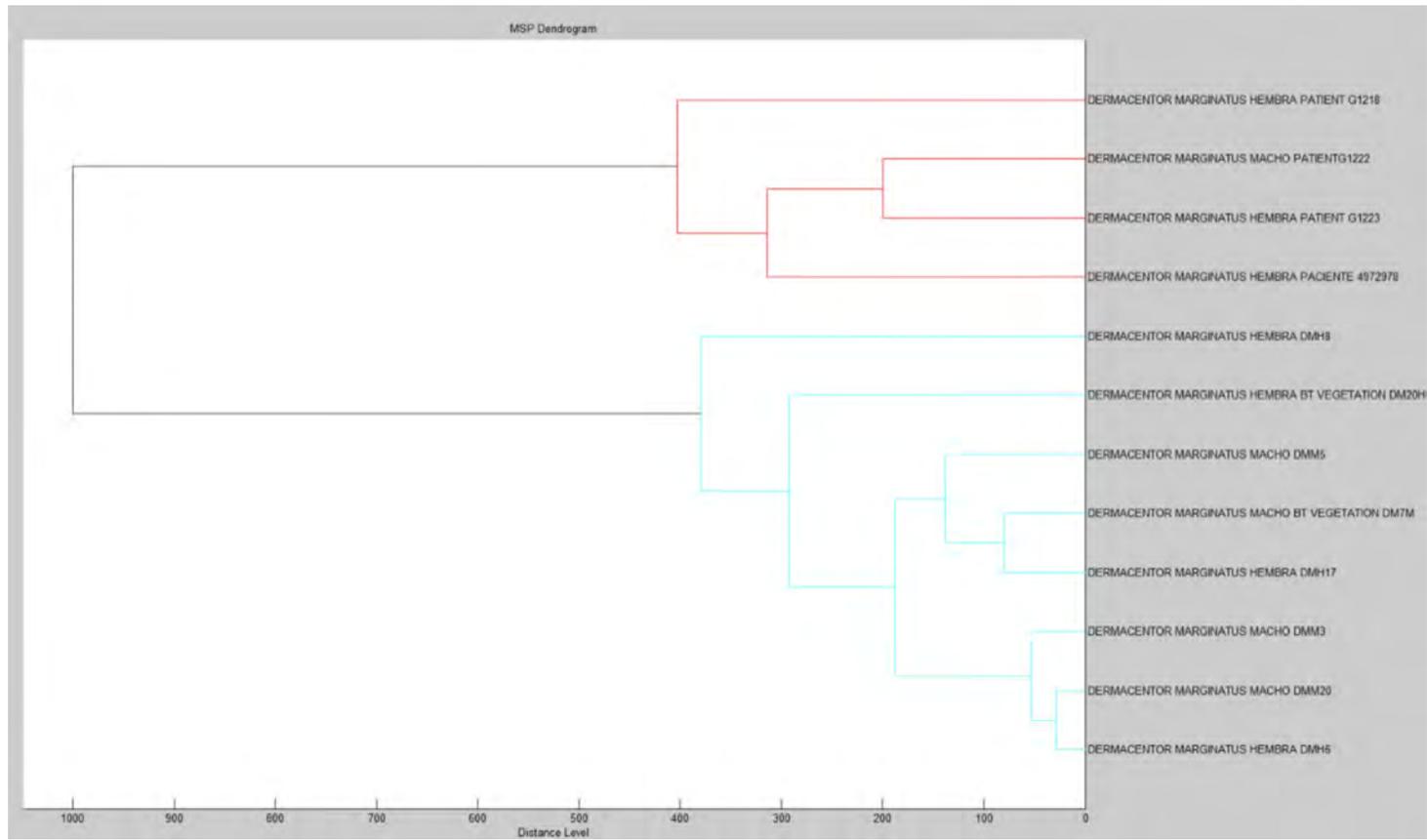


Figura 64: En MBT Compass Explorer, dendrograma generado a partir de los espectros correspondientes a adultos de *Dermacentor marginatus*. El dendrograma muestra una estructura bifurcada, con dos ramas claramente diferenciadas. La rama superior (color rojo) incluye los espectros de ejemplares retirados de pacientes. La rama inferior (color turquesa) incluye los espectros de ejemplares recolectados de vegetación, ubicados en la parte inferior del dendrograma. Fuente: aportación propia.

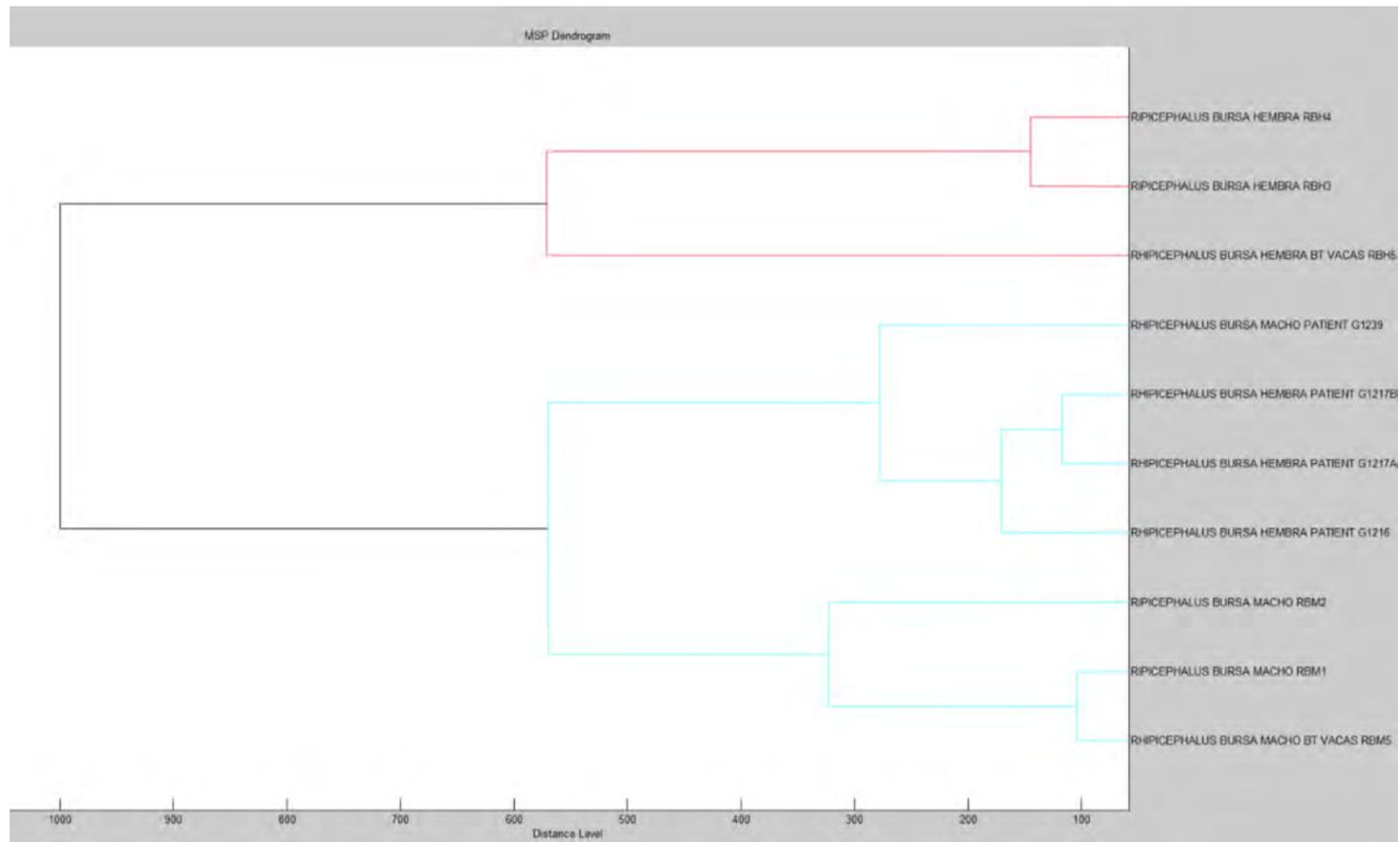


Figura 65: En MBT Compass Explorer, dendrograma generado a partir de los espectros correspondientes a adultos de *Rhipicephalus bursa*. Los espectros correspondientes a ejemplares machos recolectados de vacas y los retirados de pacientes se agrupan en una rama en la parte inferior del dendrograma (color turquesa). La otra rama está formada por los espectros correspondientes a hembras recolectadas de vacas (color rojo). Fuente: aportación propia.

En base a los análisis realizados se pudieron extraer las siguientes conclusiones en relación a los espectros adquiridos de ejemplares retirados de pacientes:

- En la identificación mediante la técnica MALDI-TOF MS de garrapatas retiradas de pacientes, las puntuaciones obtenidas (LSV) son ligeramente inferiores, utilizando como biblioteca de referencia los espectros adquiridos de diversas fuentes, que no incluyen pacientes.
- El número superior de picos en los espectros puede, al menos en parte, explicar las menores puntuaciones observadas en la identificación mediante MBT Compass Explorer.
- La disminución en las puntuaciones puede dificultar en la práctica clínica la identificación de algunos ejemplares de garrapatas, dependiendo del valor LSV límite, que el investigador establezca para aceptar como válida la identificación a nivel de especie.
- De forma importante, para la mayoría de las especies de garrapatas, la disminución en las puntuaciones (LSV) obtenidas en ejemplares de pacientes tiene un impacto menor en la capacidad de identificación de MALDI-TOS MS.
- La utilización de una biblioteca de espectros basada en ejemplares que no proceden de pacientes, es útil en la identificación de garrapatas retiradas de personas. No obstante, es recomendable tener en cuenta este hecho al establecer el umbral LSV de identificación a nivel de especie.
- Por tanto, debe considerarse la utilidad de crear una biblioteca (o ampliar una existente) de espectros basada en ejemplares retirados de pacientes para mejorar la precisión en la identificación.
- El análisis de dendrogramas ha mostrado que, en algunos casos, los MSP generados con ejemplares retirados de pacientes difieren de forma apreciable de aquellos obtenidos de otras fuentes, siendo las ninfas de *I. ricinus* un ejemplo destacado.
- Se ha mostrado cómo la incorporación a la biblioteca de aquellos espectros adquiridos a partir de ejemplares retirados de pacientes conduce a una mejoría (parcial) en la precisión de la identificación.

4.5. Rendimiento de la técnica MALDI-TOF MS en un contexto clínico: experiencia del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa tras quince meses desde su implementación.

En abril de 2022, el HCULB incorporó en su cartera de servicios la técnica MALDI-TOF MS como método de identificación de garrapatas. Tras un periodo de quince meses desde su implementación, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 12. Durante dicho período, se remitieron al servicio de Microbiología

Identificación (estadio/género)	Especie con mejor id. LSV promedio (rango)	Identificación molecular	MBT potencia láser	AutoX:	Especie con segunda mejor id. LSV promedio (rango)
1 (♀)	<i>D. marginatus</i> ; 1,91 (1,74-2,06)	No	40-50 %		<i>H. marginatum</i> ; 1,29 (1,29-1,29)
2 (♀)	<i>D. marginatus</i> ; 2,06 (1,90-2,20)	No	50-60 %		Ninguno
3 (♂)	<i>D. marginatus</i> ; 2,17 (2,01-2,26)	No	40-50 %		Ninguno
4 (♀)	<i>H. lusitanicum</i> ; 1,65 (1,47-1,78)	<i>H. lusitanicum</i>	40-50 %		<i>D. marginatus</i> ; 1,24 (1,04-1,42)
5 (♀)	<i>H. lusitanicum</i> ; 1,77 (1,62-1,90)	No	40-50 %		<i>H. marginatum</i> ; 1,33 (1,07-1,52)
6 (♀)	<i>H. marginatum</i> ; 1,87 (1,68-2,05)	No	30-40 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,38 (1,14-1,61)
7A (♀)	<i>H. marginatum</i> ; 2,12 (1,86-2,23)	No	34-44 %;	50-60 %	<i>H. lusitanicum</i> ; 1,23 (0,86-1,48)
7B (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,26 (1,98-2,40)	No	34-44 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,25 (0,99-1,45)
8 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,08 (1,94-2,24)	No	50-60 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,16 (1,02-1,34)
9 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,01 (1,86-2,12)	No	50-60 %		<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,29 (1,12-1,58)
10 (♀)	<i>H. marginatum</i> ; 2,07 (1,90-2,17)	No	40-50 %		<i>D. marginatus</i> ; 1,29 (1,12-1,56)
11 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,03 (1,91-2,16)	No	40-50 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,19 (0,89-1,40)
12 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,31 (2,22-2,39)	No	50-60 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,34 (1,05-1,57)
13 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,03 (1,89-2,24)	No	50-60 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,58 (1,41-1,75)
14 (♂)	<i>H. marginatum</i> ; 2,17 (2,05-2,24)	No	50-60 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,38 (1,14-1,60)
15 (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,52 (1,30-1,71)	No	40-50 %		<i>H. lusitanicum</i> ; 1,15 (1,02-1,40)
16 (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,80 (1,52-1,96)	No	50-60 %		Ninguno
17A (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,66 (1,48-1,82)	No	60-70 %		Ninguno
17B (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,79 (1,55-1,97)	No	60-70 %		Ninguno
18 (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,46 (1,35-1,63)	No	50-60 %		Ninguno
19 (♀)	<i>I. ricinus</i> ; 1,75 (1,61-1,96)	No	50-60 %		Ninguno
20 (♀)	<i>I. ricinus</i> ; 1,87(1,67-2,04)	No	50-60 %		Ninguno
21 (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,36 (0,91-1,61)	No	30-40 %		<i>D. reticulatus</i> ; 1,00 (0,83-1,25)
22 (♀)	<i>I. ricinus</i> ; 2,00 (1,55-2,21)	No	30-40 %		Ninguno
23 (N)	<i>I. ricinus</i> ; 1,89 (1,74-2,02)	No	30-40 %		Ninguno
24 (♀)	<i>R. bursa</i> ; 1,96 (1,77-2,11)	No	40-50 %;	50-60 %	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,21 (1,03-1,43)
25 (♀)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 2,10 (1,98-2,26)	No	50-60 %		<i>R. pusillus</i> ; 1,51 (1,22-1,75)
26A (♀)	<i>R. pusillus</i>; 1,75 (1,50-1,93)	<i>R. sanguineus</i> s.l.	60-70 %		<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,74 (1,46-1,92)
26B (♂)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,85 (1,50-2,04)	<i>R. sanguineus</i> s.l.	40-50 %		<i>H. marginatum</i> ; 1,33 (1,21-1,52)
27 (♀)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 2,05 (1,88-2,20)	No	34-44 %		<i>R. pusillus</i> ; 1,43 (1,42-1,44)
28 (♂)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,92 (1,79-2,07)	No	40-50 %;	50-60 %	<i>R. pusillus</i> ; 1,70 (1,52-1,89)
29 (♂)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 2,03 (1,89-2,19)	No	50-60 %		<i>R. pusillus</i> ; 1,54 (1,43-1,66)
30 (♂)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 2,01 (1,90-2,21)	No	40-50 %		<i>R. pusillus</i> ; 1,57 (1,48-1,69)
31 (♀)	<i>R. sanguineus</i> s.l.; 1,89 (1,80-2,00)	No	40-50 %		<i>R. pusillus</i> ; 1,34 (1,29-1,38)

Tabla 12: Ejemplares de garrapatas remitidos al HCULB para su identificación en el período Abril 2022-Julio 2023.

D.: Dermacentor *H.*: Hyalomma; *I.*: Ixodes; *R.*: Rhipicephalus; N: nifa; id.: identificación; LSV: log score value; **en negrita aparecen los ejemplares en los que se ha encontrado discordancia entre las identificaciones por MALDI-TOF MS y por técnicas moleculares.**

Nota: se han asignado las letras, A o B, al lado del número de identificación, en aquellos casos en los cuales más de un ejemplar de garrapata fue retirado del mismo paciente.

del HCULB un total de 34 ejemplares de garrapatas, pertenecientes a 31 pacientes (tres personas presentaron dos garrapatas adheridas). En todos los casos, se llevó a cabo una inspección visual de cada ejemplar con los siguientes objetivos: en primer lugar, establecer la concordancia de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas; en segundo lugar, determinar el estadio de desarrollo y el género del ejemplar; y, por último, determinar el grado de alimentación del mismo. Los ejemplares de garrapatas correspondían a seis especies:

- *D. marginatus* (n=3).
- *H. lusitanicum* (n=2).
- *H. marginatum* (n=10).
- *I. ricinus* (n=10).
- *R. bursa* (n=1).
- *R. sanguineus* s.l. (n=8).

A continuación, se ofrece un resumen de los resultados:

- Un total de 32/34 ejemplares mostraron una puntuación por encima del umbral de identificación ($\geq 1,70$). De estos, 31 de 32 ejemplares (96,88 %) fueron presumiblemente identificados de forma correcta. Únicamente una hembra de *R. sanguineus* s.l. (ejemplar 26A), fue incorrectamente identificada como *R. pusillus* (véase más abajo).
- Los scores de identificación presentaron un rango de valores de: 0,91-2,40. Si se tienen en consideración únicamente los valores LSV más elevados por ejemplar, el rango de valores fue de:1,61-2,40.
- Las especies *H. lusitanicum* e *I. ricinus* presentaron las puntuaciones más bajas (LSV). En esta última especie, ocho de diez ejemplares mostraron coincidencias exclusivamente con espectros de *I. ricinus*, aumentando las probabilidades de una correcta identificación. El resto de las especies mostraron buenos scores de identificación, con valores de LSV por encima de 1,90.
- Cuatro ninfas de *I. ricinus* (ejemplares 17A, 17B, 18 y 19) fueron identificadas utilizando medio cuerpo (en vez de las patas) como muestra debido a que el reducido tamaño de los ejemplares, impidió la amputación de sus patas. A pesar de ello, en tres de estas ninfas, las puntuaciones obtenidas estuvieron por encima del valor umbral de identificación. La máxima puntuación obtenida para el ejemplar 18 fue de 1,63. Sin embargo, a pesar de no superar el umbral de identificación, todas las coincidencias en la biblioteca de espectros correspondían a esa misma especie. Este hecho, combinado con la consideración de que se empleó medio cuerpo en lugar de las patas para el análisis, permitió aceptar como válida la identificación.
- Como ha sido comentado, 2/34 (5,89 %) ejemplares presentaron valores máximos LSV por debajo del umbral de identificación. Ambos casos co-

rrespondían a dos ninfas de *I. ricinus* (ejemplares 18 y 21). El caso del ejemplar 21 podría justificarse por su reducido tamaño, lo que podría haber afectado a la calidad y, sobre todo, cantidad de las proteínas.

En tres ocasiones, los ejemplares fueron remitidos a un centro de referencia para su identificación molecular:

- Los ejemplares 26A y 26B fueron recolectados del mismo paciente y fueron identificados mediante MALDI-TOF MS como *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l., respectivamente. Sin embargo, las pruebas moleculares revelaron que la identidad de ambos ejemplares era, en realidad, *R. sanguineus* s.l., lo que confirma que MALDI-MS MS identificó incorrectamente el ejemplar 26A. Estos resultados confirman la observación previa de que los espectros de referencia de *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l. son muy similares entre sí (de hecho, forman un cluster en el dendrograma), lo que puede dar lugar a errores de identificación mediante MALDI-TOF MS en la práctica clínica. De hecho, la identificación de este ejemplar mediante MALDI-TOF MS resultó en unas puntuaciones de identificación muy similares para *R. pusillus* y *R. sanguineus* s.l. (1,93 y 1,92 respectivamente) (figura 66).
- El tercer ejemplar remitido correspondía a una hembra de *H. lusitanicum* (ejemplar 4).
- Después de haber verificado la identidad de los ejemplares por métodos moleculares, los espectros correspondientes fueron añadidos a la biblioteca de espectros.

El ejemplar 2 fue identificado como una hembra de *D. marginatus*. Este ejemplar fue retirado de un paciente que presentaba síntomas compatibles con DEBONEL. La identidad del artrópodo fue confirmada visualmente en un centro de referencia, y posteriormente, las pruebas moleculares detectaron la presencia de *Candidatus Rickettsia rioja* en el vector, como agente responsable del síndrome. Este caso aislado tiene relevancia, ya que demuestra que la presencia de un microorganismo patógeno en el vector no necesariamente modifica significativamente su espectro de masas. Esto sugiere que MALDI-TOF MS es útil en la identificación de vectores, independientemente de su estado infeccioso.

La utilidad de la técnica MALDI-TOF MS en la identificación de garrapatas se evidenció especialmente en dos casos concretos en los cuales la identificación morfológica del ejemplar hubiera resultado difícil (figura 67):

- Un ejemplar con el capítulo separado del resto del idiosoma.
- Otro caso, con imposibilidad de identificar las partes anatómicas debido al mal estado del ejemplar.

Una observación interesante, fue descubrir que MALDI-TOF MS no presentó problemas de discriminación entre las especies *I. ricinus* y *C. felis*, problema que había sido detectado en los ensayos de validación EP. Aparentemente, las ninfas de *I. ricinus* identificadas en el HCULB parecían presentar espectros de

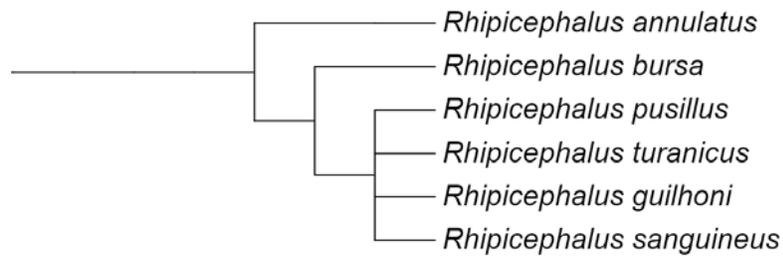


Figura 66: Árbol filogenético de las especies de garrapata del género *Rhipicephalus* presentes en España. Obsérvese que *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus pusillus* se agrupan en un cluster, separadas de *Rhipicephalus bursa*. Fuente: phyloT, a phylogenetic tree generator (<https://phylot.biobyte.de/>).



Figura 67: Izquierda: adulto de *Hyalomma marginatum* con el capítulo completamente separado del resto del idiosoma; Derecha: hembra de *Ixodes ricinus* donde el estado del ejemplar no permite la inspección visual y la identificación mediante claves morfológicas. En ambos casos, las patas pudieron ser utilizadas para la identificación por MALDI-TOF MS. Fuente: aportación propia.

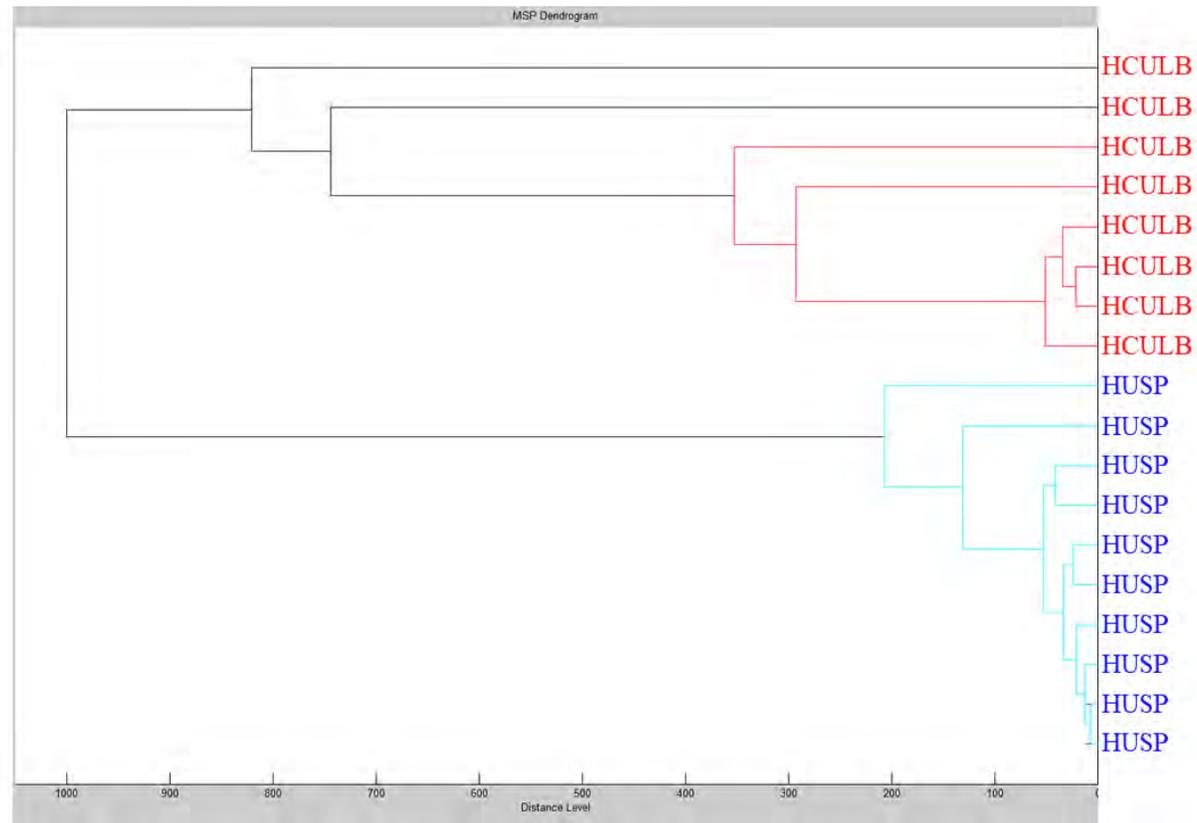


Figura 68: En MBT Compass Explorer, dendrograma generado a partir de los espectros correspondientes a ninfas de *Ixodes ricinus* retiradas de pacientes, de acuerdo al sitio de recolección de los ejemplares. En la parte superior del dendrograma se agrupan los espectros de ejemplares remitidos al Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, mientras que en la parte inferior los remitidos al Hospital Universitario San Pedro. Fuente: aportación propia.

masas diferentes a los de las ninfas de las pruebas de validación. El análisis por dendrograma confirmó que, de hecho, ambos tipos de ninfas están claramente separados en dos grupos bien diferenciados (figura 68).

5. DISCUSIÓN

Conforme ha sido expuesto en el presente documento, las ETG han emergido como un serio y creciente problema en el ámbito de la Salud Pública a nivel global (Mysterud et al., 2017; Binder et al., 2019; Ogden et al., 2021). Dado que, en ocasiones, algunas de estas enfermedades ponen en peligro la vida de los pacientes, en aquellos pacientes que por su clínica y epidemiología compatible presenten síntomas y signos graves, o se sospeche que pueden evolucionar hacia la gravedad, se recomienda instaurar de manera inmediata un tratamiento empírico, sin esperar la confirmación microbiológica. No obstante, seguir estas recomendaciones no impide que se deba proceder a la investigación del agente etiológico o de la causa que está provocando el cuadro morboso. Así, se debe proceder al procesamiento del tipo adecuado de muestras, incluidas las propias garrapatas (si se dispone de los ejemplares) (Brouqui et al., 2004; Oteo et al., 2014; Silaghi et al., 2017).

Llegados a este punto, y tal y como ha quedado patente en la introducción, existe una especificidad entre la identidad de una garrapata y su capacidad vectorial. Es por esto, que conocer el género y especie de garrapata que ha picado a un paciente tiene una gran relevancia clínica y, puede ser de gran utilidad práctica para guiar el diagnóstico de sospecha (e instaurar el tratamiento, si procede). La quimioprofilaxis antibiótica tras la picadura de una garrapata ha mostrado su eficacia para la prevención de la b. de Lyme en algunos ensayos clínicos y se ha incluido como recomendación en algunas guías clínicas, incluyendo nuestro país (Schwameis et al., 2017; Lantos et al., 2020; Harms et al., 2021; Wormser et al., 2021; Zhou et al., 2021; Oteo et al., 2023).

La identificación de garrapatas ha sido un proceso tradicionalmente basado en la inspección visual del ejemplar (Estrada-Peña et al., 2017a). No obstante, la correcta identificación del ejemplar puede resultar difícil incluso para los expertos en la materia (Estrada-Peña et al., 2017b; Laga et al., 2022). Las técnicas moleculares, encaminadas a este fin, tampoco están exentas de limitaciones, como el coste y tiempo requeridos para la obtención de resultados. En consecuencia, la posibilidad de emplear la tecnología MALDI-TOF MS para la caracterización de garrapatas representa, sin lugar a dudas, un significativo avance en el ámbito científico. Ante estas circunstancias, y en base a la reconocida versatilidad y globalización de la tecnología MALDI-TOF MS (Dieme et al., 2014; Muñoz Bellido et al., 2015; Niare et al., 2016; Elbehiry et al., 2022; Sánchez-Juanes et al., 2022) nos propusimos validar esta herramienta para la identificación de garrapatas duras (*Ixodidae*) en nuestro entorno.

En 2012, Karger et al. publicaron el primer estudio que demostraba la capacidad de MALDI-TOF MS para identificar garrapatas (Karger et al., 2012). Desde entonces, diversas investigaciones han confirmado y ampliado estos resultados. Dichos estudios han sido muy heterogéneos en cuanto al diseño, objetivos, e incluso resultados. A diferencia de lo que sucede en el ámbito de la bacteriología clínica, en donde los protocolos para la identificación mediante espectrometría

de masas, están mucho más estandarizados, en el campo de artrópodos no existe un procedimiento estándar de extracción proteica. Esto resulta evidente dada la marcada heterogeneidad de los protocolos que han sido utilizados por los diferentes grupos de investigación (Karger et al., 2012; Yssouf et al., 2013; Fotso Fotso et al., 2014; Yssouf et al., 2015a; Yssouf et al., 2015b; Kumsa et al., 2016; Rothen et al., 2016; Boyer et al., 2017; Diarra et al., 2017; Nebbak et al., 2017; Boucheikhchoukh et al., 2018; Boyer et al., 2019; Karger et al., 2019; Gittens et al., 2020; Benyahia et al., 2021; Huynh et al., 2021; Ngoy et al., 2021; Ahamada M'madi et al., 2022). Queda claro que, en espectrometría de masas, no existe una condición experimental universal que garantice una eficacia óptima de ionización para cada analito estudiado y, por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones experimentales a las características concretas de cada investigación (Wang et al., 2016). Por todo ello, el diseño del protocolo de extracción proteica fue adaptado a las particularidades de nuestra investigación, teniendo en cuenta el material de laboratorio disponible para el estudio. Así, se seleccionaron aquellas variables que habían mostrado tener un impacto sobre la espectrometría de masas. Basándonos en la bibliografía consultada, la fragmentación mecánica de las patas se estableció, como un objetivo prioritario en las fases iniciales del estudio. Debido a la falta de disponibilidad de un homogeneizador automático, se optó por el triturado manual de las patas, siendo el objetivo la fragmentación de las patas en múltiples fragmentos.

Otro aspecto relevante, sobre el que hubo que tomar una decisión, consistió en definir los criterios de calidad en los espectros adquiridos. No existe un consenso sobre cómo definir la calidad de los espectros de masas (Alatoom et al., 2011; Branda et al., 2017) y muchos laboratorios han optado por establecer procedimientos internos. Investigaciones previas habían sugerido que existe correlación entre una correcta identificación bacteriana y una mayor cantidad e intensidad de picos en el espectro (Cuénod et al., 2021). Por otro lado, se había mostrado que la presencia de un número elevado de picos en los espectros de masas posibilita la discriminación de clones dentro de una misma especie bacteriana (Krishnamurthy et al., 1996). Sin embargo, no quedaba claro el número de picos que debían contener los espectros de referencia de la biblioteca (McLafferty et al., 1999; Shah & Gharbia, 2010) y, el número de picos de los espectros en investigaciones con garrapatas, rara vez había sido detallado en las publicaciones científicas (Yssouf et al., 2013; Rothen et al., 2016). Basándonos en la información disponible, se determinó que el proceso de optimización proteica debía resultar en la obtención de espectros con un número suficiente de picos, aunque no se definió un umbral mínimo.

Cabe destacar que, en contra de los resultados previamente publicados (Nebbak et al., 2017; Diarra et al., 2017; Boucheikhchoukh et al., 2018; Boyer et al., 2019; Benyahia et al., 2021; Karger et al., 2019), la fragmentación con microesferas resultó totalmente ineficaz. No obstante, en estos estudios, los investigadores habían empleado las microesferas en combinación con dispositivos de homogeneización automática, los cuales someten las muestras a una agitación uniforme y a velocidades muy elevadas. Por lo tanto, es posible que la velocidad

de impacto de las microesferas sobre las extremidades pueda ser un factor relevante en su fragmentación. La fragmentación mecánica a través de palillos de madera fue descartada debido a la dificultad de mantener un contacto efectivo entre el palillo y la muestra, así como a la pérdida de muestra y de reactivos a través de la superficie porosa.

El uso de micropistilos, ya sean de plástico o de acero inoxidable, permiten al investigador tener un control más preciso sobre el contacto con la muestra, asegurando una fragmentación más efectiva y rápida de las extremidades. El número de picos obtenidos con el micropistilo de acero inoxidable fue ligeramente menor en comparación con el micropistilo de plástico. Estas diferencias posiblemente se deban a un acoplamiento subóptimo entre el micropistilo de acero y el tubo eppendorf, donde la punta del micropistilo no lograba hacer contacto con el fondo del tubo. En consecuencia, es posible que el uso de un tubo eppendorf adecuado para el micropistilo de acero pueda mejorar los resultados, como así ha sido comunicado (Rothen et al., 2016).

Se desaconseja la aplicación de calor húmedo durante el proceso de fragmentación de las extremidades con la finalidad de favorecer la extracción proteica. La implementación de un protocolo, concebido para la extracción de proteínas en actinomicetos, resultó en una alteración significativa de los espectros, posiblemente debido a la desnaturalización de las proteínas. Estos resultados resultaron sorprendentes, dado que la aplicación de calor húmedo (a 95 o 100°C) durante 30 minutos había demostrado su eficacia para la extracción proteica en varios grupos taxonómicos (Horneffer et al., 2004; Mareković et al., 2015; Alcolea-Medina et al., 2019; Pastrone et al., 2023), incluyendo las garrapatas (Karger et al., 2012).

La incorporación de los micropistilos de plástico coincidió con la detección de problemas en la cristalización de la matriz, la cual se retrasó significativamente. Siendo conocedores del hecho que la matriz es un reactivo absolutamente crítico en la tecnología MALDI-TOF MS (Karas M, Hillenkamp, 1988; Giege & Mikol, 1989; Vorm et al., 1994; Cohen et al., 1996; Christopher et al., 1998; Figueroa et al., 1998; Bird et al., 2002; Luxembourg et al., 2003; Shah & Gharbia, 2010; Towers et al., 2010; Wiangnon & Cramer, 2015; Wang et al., 2016; Dobberschütz et al., 2018), se diseñaron numerosos experimentos con la finalidad de detectar y resolver este grave problema. En estas pruebas se evaluó el impacto de diversas variables sobre la cristalización de la matriz, incluyendo el AF, el acetonitrilo y la temperatura. Aunque no todos los investigadores habían incluido AF en sus protocolos de extracción proteica en muestras de garrapatas (Karger et al., 2012, 2019), las características de este compuesto lo hacen especial adecuado para su utilización en espectrometría de masas (Schindler et al., 1993; Whitelegge et al., 2006; Doucette et al., 2014; Zheng S & Doucette, 2016). Un aspecto negativo a destacar es que, la exposición prolongada al AF se asoció, en nuestros experimentos, a una notable alteración de los espectros, con una disminución en el número total de picos, siendo esta modificación proporcional al tiempo de exposición. Este cambio se atribuye muy probablemente a la formilación dependiente del tiempo, que da lugar a la aparición gradual de

aductos (Zheng S & Doucette, 2016). Por otro lado, el acetonitrilo es un solvente orgánico con diversas propiedades que lo hacen igualmente apto para su empleo en espectrometría de masas. Nuevamente, algunos grupos de investigación habían prescindido del acetonitrilo en sus protocolos de extracción proteica (Rothen et al., 2016; Karger et al., 2019). En los experimentos realizados se pudo comprobar una apreciable mejoría en la cristalización de la matriz (y, en consecuencia, en los espectros resultantes) al realizar la extracción proteica de la muestra con AF en comparación con el enfoque tradicional que involucraba AF y acetonitrilo. Tras confirmar que no se producía una disminución en la calidad de los espectros, se decidió eliminar el acetonitrilo del protocolo de extracción proteica. Aunque el mecanismo exacto por el cual el AF mejora sustancialmente la cristalización de la matriz se desconoce, se sabe que este proceso está influenciado por una multitud de variables, entre ellas el pH (Wiangnon & Cramer, 2015). Así, el protocolo definitivo incluye únicamente en el AF como reactivo de extracción proteica. La temperatura y la humedad relativa son consideradas factores cruciales en el proceso de cristalización. El rango de temperaturas recomendado para lograr una óptima cristalización de proteínas oscila entre 4 y 45°C, aunque se ha logrado la cristalización de algunas proteínas a temperaturas tan altas como 60°C (Bird et al., 2002). En nuestros experimentos, se observó una mejora significativa en la cristalización al exponer tanto la muestra como la matriz a una temperatura de 45°C. Dicha temperatura, condujo a la formación de cristales de matriz más pequeños, uniformes y distribuidos de manera homogénea. Es importante destacar que los problemas en la cristalización se presentaron de forma intermitente en los experimentos. Aunque se desconoce el origen del problema, nuestras observaciones sugieren que las superficies del micropistilo y/o de los tubos eppendorf podrían contener alguna sustancia que interfiriese con la cristalización de la matriz. La aplicación de una fuerza vigorosa, ejercida a través del micropistilo, contra la pared del tubo eppendorf (necesaria para conseguir la homogeneización de las patas) habría favorecido la liberación de dichos inhibidores. Es posible que este efecto dependa del lote del material de laboratorio empleado, lo que justificaría la aparición intermitente de dicho fenómeno. En cualquier caso, incrementando la temperatura durante los depósitos de muestra y matriz, este problema fue resuelto y, así, el protocolo de extracción proteica actualmente incluye el precalentamiento de la placa a 45°C previamente al depósito de muestras. Un beneficio adicional a destacar es que, la optimización de las condiciones de cristalización no solo conduce a un incremento en la intensidad y el número de picos en el espectro, sino que, mejora, de manera significativa, la reproducibilidad de los espectros (Wang et al., 2016).

La potencia del láser es una variable con una influencia significativa en la calidad de los espectros de masas (Lloyd et al., 1995; Luo et al., 2002; Westmaccott et al., 2002). Si bien es cierto que una mayor potencia del láser se relaciona con una señal más intensa de los iones (Sakurada et al., 1998), este efecto se invierte al alcanzar un determinado umbral, pudiendo repercutir negativamente sobre los espectros (Zhang & Chait, 1997). En nuestros experimentos se estableció este umbral en una potencia de láser del 60-70 %. A pesar de la significativa

influencia de esta variable sobre los espectros de masas, la limitada información publicada sugiere que los investigadores tienden a emplear predominantemente la potencia de láser predeterminada por el fabricante (Nebbak et al., 2017; Boyer et al., 2019; Benyahia et al., 2022; Ahamada et al., 2022). Sin embargo, y como ha sido mostrado en la presente investigación, no es posible predecir con exactitud qué muestras se beneficiarán de un aumento en la potencia del láser. Por esta razón, el protocolo del HCULB incluye la adquisición de espectros utilizando diferentes potencias del láser, tanto en la identificación de muestras desconocidas como en la creación de la biblioteca de referencia.

Otro aspecto que se abordó en detalle está relacionado con los volúmenes y proporciones de muestra y matriz. La relación entre la muestra y la matriz es otro factor crítico en la espectrometría de masas. Los distintos iones dentro del rango de masas del espectro pueden ser afectados de manera desigual por el uso de diversas proporciones, y los valores extremos (en cualquier dirección) pueden resultar en espectros “sesgados” (Yao et al., 1998; Smolira & Wessely-Szponder, 2015), donde una fracción de las masas no está representada en el espectro. Un aspecto a considerar es que las placas de depósito de muestras están diseñadas comercialmente para alojar volúmenes máximos de un microlitro. Volúmenes más grandes requieren por tanto el depósito secuencial de muestra o matriz. Aunque las mejoras observadas fueron marginales (ligero incremento en el número de picos), se lograron resultados progresivamente mejores al incrementar las proporciones de volumen muestra:matriz de 1:1 a 2:1 y 3:1, respectivamente. En otro de los experimentos se analizó el impacto de incrementar los volúmenes de muestra y matriz (manteniendo la proporción 1:1). En contra de lo esperado, se observó que los resultados eran discretamente peores al emplear mayores volúmenes de muestra y matriz (en proporción 1:1). De este modo, la proporción muestra:matriz parece ser un factor más influyente sobre los espectros que el mero aumento en los volúmenes de ambos. Por lo tanto, en la definición del protocolo, se mantuvo la relación de 1:1 entre muestra y matriz, con la opción de ajustar esta proporción según los requisitos específicos de cada muestra. En contraste, los distintos investigadores han optado por emplear siempre volúmenes similares o superiores de matriz (Karger et al., 2012; Fotso Fotso et al., 2014; Kumsa et al., 2016; Rothen et al., 2016; Boyer et al., 2017; Diarra et al., 2017; Nebbak et al., 2017; Boucheikhchoukha et al., 2018; Boyer et al., 2019; Karger et al., 2019; Ahamada et al., 2022; Benyahia et al., 2022; Gittens et al., 2022; Huynh et al., 2022).

Aunque la disminución en los volúmenes de AF y acetonitrilo tenían como propósito incrementar la concentración de proteínas, dicha modificación no resultó en un aumento en el número de picos en los espectros. La hipotética desventaja de utilizar volúmenes superiores de reactivos (con la consiguiente dilución de los analitos) podría estar siendo compensada por una ionización más eficiente de los analitos (Yao et al., 1998; Smolira & Wessely-Szponder, 2015) o por los efectos beneficiosos que el AF tiene sobre la espectrometría de masas (Schindler et al., 1993; Whitelegge et al., 2006; Doucette et al., 2014; Zheng S & Doucette, 2016). Como ha sido mencionado, el protocolo del HCULB contempla

la adición inicial de cinco microlitros de AF, con la adición de otros 20 μL de AF, una vez conseguida la fragmentación de las patas. En contraste, el volumen de reactivos empleado en diferentes investigaciones varía entre: 10 μL de AF para la extracción de proteínas de dos a ocho patas (Rothen et al., 2016) y hasta 120 μL (60 μL de AF, 60 μL de acetónitrilo) para la extracción de proteínas de una sola pata (Gittens et al., 2022).

El depósito simultáneo de muestra y matriz para promover y mejorar la cocrystalización de la matriz fue otro de los aspectos investigados (Rothen et al., 2016; Gittens et al., 2022). Nuestros experimentos no lograron demostrar una ventaja realizando el depósito simultáneo, lo que llevó a la decisión de mantener el enfoque tradicional de depósitos separados de muestra y matriz.

Una vez definido el protocolo, el siguiente paso fue la creación de la biblioteca de espectros. En ese punto, un aspecto crucial fue determinar el número necesario de espectros de referencia por especie. En bacterias, se había demostrado que, una insuficiente representación de la elevada diversidad para algunas bacterias, se relacionaba con un bajo nivel de identificación mediante MALDI-TOF MS (Shah & Gharbia, 2010). En nuestro caso, y tomando como ejemplo la biblioteca de referencia del fabricante, en los microorganismos clínicamente más relevantes, el número de espectros por especie bacteriana varía entre 8 (*Streptococcus agalactiae*) y 27 (*Staphylococcus aureus*). En el ámbito específico de los artrópodos, el número de espectros de referencia por especie de garrapata oscila entre 1 especie (Huynh et al., 2021) y 51 (Ngoy et al., 2021), dependiendo del estudio y la especie en cuestión. Sin embargo, es probable que la variabilidad en la cantidad de espectros incluidos en cada estudio refleje más una limitación en la disponibilidad de ejemplares que un criterio puramente científico. Además, es importante tener en consideración que un incremento en el número de espectros no siempre mejora el rendimiento de MALDI-TOF MS, especialmente en casos donde no existe una alta heterogeneidad intra-especie (Shah & Gharbia, 2010). En base a esta información, parecía innecesario, a priori, crear una biblioteca excesivamente extensa, al menos hasta realizar los test de validación.

Como se ha mencionado anteriormente, la biblioteca incluyó, inicialmente, las nueve especies de garrapatas que han sido más frecuentemente asociadas con picaduras a humanos en España (Palomar, 2017). Sin embargo, debido a diversas circunstancias, la disponibilidad de ejemplares fue distinta, según la especie concreta. Como resultado, los lugares y fuentes de obtención de los ejemplares utilizados en este estudio fueron igualmente diversos. En la medida de lo posible, los ejemplares se obtuvieron de la vegetación. No obstante, para algunas especies, los ejemplares se recolectaron de diferentes tipos de animales, como vacas, perros o jabalíes.

El análisis de los resultados de los ensayos de validación realizados con pacientes reveló que los espectros obtenidos de éstos difieren suficientemente de aquellos recolectados de otras fuentes. No obstante, la magnitud de estas diferencias varía según la especie de garrapata y su estadio específico. Por esta razón, la versión inicial de la biblioteca se amplió posteriormente para incluir también los

espectros de garrapatas obtenidas de pacientes. En consecuencia, la biblioteca de espectros para cada especie contiene actualmente, tanto los espectros originales, como aquellos correspondientes a ejemplares de pacientes. Finalmente, los espectros de las especies de garrapatas que, estando presentes en España, sólo ocasionalmente pican a los seres humanos, fueron también incluidos en la biblioteca.

El siguiente paso en la investigación consistió en la realización de tres tipos de ensayos de validación. El objetivo de estos ensayos era doble: en primer lugar, validar el procedimiento de extracción proteica y adquisición de espectros; y, en segundo lugar, confirmar la calidad de la biblioteca de espectros. Los resultados de los primeros ensayos, EC, fueron excelentes, con una concordancia del 100 % en la identificación con los métodos moleculares, y una correcta asignación del género y el estadio (en el caso de *I. ricinus*) en un 94,44 % de los casos. Los resultados de los ensayos ENR, fueron los previstos y la concordancia entre la identificación molecular y la identificación por espectrometría de masas fue del 0 %. Esto es comprensible, dado que ninguna de las especies analizadas estaba representada en la biblioteca de espectros en el momento de la realización de estos ensayos. Sin embargo, los ensayos de mayor valor fueron los que incluyeron ejemplares retirados de pacientes (EP), ya que estos representaban el escenario práctico más parecido a la práctica clínica real.

A pesar de que no todas las especies de garrapata estaban representadas en dichas pruebas, los resultados fueron globalmente inferiores en comparación con los observados en los ensayos EC; los scores de identificación, LSV, fueron, en los ensayos EP, para todas las especies estudiadas, más bajos en comparación con los obtenidos en los test EC (1,94 vs 2,06); la tasa de asignación correcta del género fue igualmente inferior (23,53 % vs 94,44 %); y la diferencia de puntuaciones entre las dos especies con mejores scores de identificación fue igualmente menor en los ensayos EP (0,49 vs 0,92).

MALDI-TOF MS había demostrado en tener un rendimiento notable en la identificación de garrapatas. Sin embargo, los resultados de estos estudios no son comparables debido a diferencias metodológicas, con notables diferencias respecto a: los tipos de ejemplares incluidos en la investigación, la aplicación de distintos valores cut-off, la potencia de láser empleada, etc. El éxito en la identificación de garrapatas ha sido, por lo general, alto, con unas elevadas tasas elevadas de correlación con la identificación mediante pruebas moleculares: 13,3 % (Nebbak et al., 2017), 93,48 % (Boucheikhchoukha et al., 2018), 95,79 % (Rothen et al., 2016), 96,5 % (Boyer et al., 2019), 97 % (Huynh et al., 2021); 98,6 % (Benyahia et al., 2022), 99,6 % (Diarra et al., 2017); 100 % (Karger et al., 2012; Fotso Fotso et al., 2014; Yssouf et al., 2014; Yssouf et al., 2015; Kumsa et al., 2016; Diarra et al., 2017; Boyer et al., 2019; Huynh et al., 2021; Ngoy et al., 2021; Benyahia et al., 2022; Hamlili et al., 2022).

Durante el análisis de resultados de los ensayos de validación, daba la impresión de que los espectros de garrapatas retiradas de pacientes eran discreta, pero apreciablemente diferentes a los obtenidos de otras fuentes de recolección.

En este sentido, el hecho más llamativo fue la observación de que dos ninfas de *I. ricinus* fueran erróneamente identificadas como *C. felis*, una especie de pulga que filogenéticamente, se encuentra muy distante de todas las especies de garrapatas. En la bibliografía no se había comunicado ningún problema de discriminación por MALDI-TOF MS entre estas dos especies (Yssouf et al., 2013; Yssouf et al., 2015; Kumsa et al., 2017; Nebbak et al., 2017; Diarra et al., 2017; Boucheikhchoukha et al., 2018). A pesar de que en nuestra investigación se logró una concordancia global del 95,56 % (100 % y 92.59 % en los ensayos EC y EP, respectivamente) con la identificación por técnicas moleculares, estos resultados tienen un cierto componente estocástico. De hecho, retirando de la biblioteca los espectros de *C. felis*, se obtiene una concordancia del 100 %. Sin embargo, algunos autores no están de acuerdo en descartar los espectros anómalos o marginales de una biblioteca de espectros, proponiendo alternativamente que, en el proceso de búsqueda de coincidencias con los espectros de referencia, el investigador ignore aquellos espectros no esperados o discordantes. Siguiendo estas recomendaciones, en nuestro caso concreto, si las puntuaciones más altas se han obtenido con *C. felis* e *I. ricinus*, y sabemos (por inspección visual) que el ejemplar se trata de una garrapata, aceptaremos como válida la identidad de aquella garrapata con el LSV más alto, ignorando la identificación de cualquier otro artrópodo. La determinación de añadir distintos artrópodos a la biblioteca se basó en la revisión bibliográfica (Yssouf et al., 2013; Yssouf et al., 2015; Kumsa et al., 2017; Nebbak et al., 2017; Diarra et al., 2017; Boucheikhchoukha et al., 2018).

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se procedió a llevar a cabo un exhaustivo de los espectros de ambas especies. La evaluación de los dendrogramas confirmó que los espectros en *C. felis* presentan una notable similitud con los espectros de las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes, de hecho, formando un clúster, claramente separado del resto de espectros de *I. ricinus*. De manera aún más sorprendente, los espectros de *C. felis* están más próximos a los espectros de adultos recolectados de vegetación que con los correspondientes a las ninfas de *I. ricinus* recolectadas igualmente de vegetación. La inspección visual confirmó que los espectros de las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes presentan una mayor cantidad de picos, y de una intensidad significativamente superior en comparación con los correspondientes a las ninfas recolectadas de vegetación. En éstas, el promedio en el número de picos fue de 71,46, en marcado contraste con los 133,14 picos observados en las ninfas obtenidas de pacientes. Curiosamente, las dos ninfas que fueron incorrectamente identificadas durante los ensayos de validación mostraron la cifra máxima de picos en sus respectivos espectros. En los espectros de los ejemplares obtenidos de pacientes, se identificaron además numerosos picos exclusivos, que no estaban presentes en los especímenes recolectados de vegetación.

El análisis del resto de especies mostró que la variabilidad que muestran las garrapatas en sus espectros en función del sitio de recolección es un fenómeno generalizado, detectándose en la mayoría de las especies estudiadas. Un caso particularmente llamativo es evidente en la especie *D. marginatus*: los especí-

menos obtenidos de pacientes muestran una cifra de picos del 200 %, en relación a los obtenidos de otras fuentes (vegetación y jabalíes). De forma interesante, pese al incremento general en el número de picos, en la mayoría de los casos los espectros obtenidos de los ejemplares extraídos de pacientes no forman clústeres en el dendrograma, lo que sugiere que las modificaciones en los espectros son predominantemente de carácter cuantitativo más que cualitativo, y que las masas características de cada especie se mantienen conservadas, independientemente del origen del ejemplar. La conclusión principal de los análisis es que los espectros de las garrapatas experimentan modificaciones significativas que probablemente están relacionadas con el proceso de alimentación en el hospedador humano. Estas modificaciones son, al menos en parte, las responsables de las puntuaciones más bajas observadas en la identificación a través de MALDI-TOF MS.

Ya se ha discutido que los problemas en la identificación solo se observaron, en los ensayos de validación, con las ninfas de *I. ricinus* retiradas de pacientes, algunas de las cuales fueron erróneamente identificadas como *C. felis*. Sin embargo, en la práctica, esto no debería representar un problema, puesto que, tanto desde un punto de vista morfológico como clínico, ambas especies de artrópodos son claramente diferenciables. A pesar de puntuaciones más bajas, todos los especímenes en los ensayos EP superaron el umbral de identificación, establecido en 1,70. Desde una perspectiva práctica, esto implica que la identificación de garrapatas obtenidas de pacientes puede lograrse utilizando una biblioteca de espectros que no incorpore este tipo de muestras. Sin embargo, tal como se ilustró en el caso de las ninfas de *I. ricinus*, la adición de espectros de garrapatas de pacientes podría mejorar el rendimiento de la biblioteca. De hecho, una proporción significativa de las garrapatas identificadas en el HCULB mostraron la mejor correlación con espectros de ejemplares obtenidos de pacientes. Un ejemplar de *R. sanguineus s.l.* fue incorrectamente identificado como *R. pusillus* lo que podría justificarse por la escasa distancia filogenética entre ambas especies. Tal y como ha sido mencionado, todos los espectros obtenidos durante los ensayos EP fueron posteriormente agregados a la biblioteca de espectros. Del mismo modo, los espectros de aquellos ejemplares remitidos al HCULB para su identificación y de los cuales se obtuvo la confirmación de su identidad a través de técnicas moleculares, también fueron incorporados a la biblioteca.

Se desconoce cuál es la base científica para explicar la heterogeneidad observada en los espectros. ¿Es plausible que aquellas garrapatas que muestran preferencia por los humanos difieran genéticamente del resto? ¿O, en cambio, los factores ambientales podrían ser los determinantes? Existe una discreta evidencia que da respaldo a la hipótesis genética (Josek et al., 2019), mientras que otros estudios han sugerido que la aptitud de las garrapatas para alimentarse de humanos constituye un rasgo adquirido influenciado por factores ambientales y comportamentales (McCoy et al., 2013). Paralelamente, la marcada disparidad observada en el número de picos no parece encontrar sustento en una base genética (Misof et al., 2014). En consecuencia, parece más plausible que factores ambientales sean los responsables.

Los especímenes obtenidos de pacientes presentan sangre del hospedador, en un volumen que es variable según el grado de alimentación. La presencia de sangre se ha relacionado con la obtención de peores resultados en espectrometría de masas, cuando se utiliza el cuerpo completo del artrópodo. Precisamente con la finalidad de evitar la presencia de sangre, las extremidades son la muestra preferida por la mayoría de los investigadores. Se ha afirmado que, en aquellos ejemplares que están en proceso de alimentación, los espectros adquiridos a partir de las patas de garrapatas presentan menos variaciones respecto a los obtenidos mediante la utilización del cuerpo completo (Kumsa et al., 2016). A pesar de que la naturaleza de las proteínas detectadas en la espectrometría de masas es desconocida, es improbable que todas las masas detectadas en los espectros (en algunos de nuestros experimentos, superando los 200) correspondan exclusivamente a péptidos y proteínas estructurales, como los tejidos musculares y tegumentarios. Desde una perspectiva anatómica, se sabe que las patas contienen hemolinfa (Burgdorfer, 1970; Parola & Raoult, 2001). De manera muy interesante, la utilización de hemolinfa como muestra permite una correcta identificación de las garrapatas usando como referencia una biblioteca de espectros construida a partir de muestras de patas (Yssouf et al., 2013). Estos resultados muestran de forma inequívoca que, una fracción importante del espectro corresponde a proteínas y péptidos procedentes de la hemolinfa de las patas. Este hecho implica que, parte de la heterogeneidad observada en los espectros, tanto dentro de una misma especie como entre diferentes especies, se debe a las variaciones en la composición proteica de la hemolinfa.

La hemolinfa es un líquido presente en los artrópodos que se encuentra en un sistema circulatorio abierto. Las proteínas son el componente principal de la hemolinfa, y su composición y concentración experimentan notables fluctuaciones en respuesta a diversos factores ambientales, incluyendo la alimentación (Nagata, 2019). Por ejemplo, en el caso de las moscas, se ha observado que la ingesta de alimento se correlaciona con cambios tanto cualitativos como cuantitativos en la composición de la hemolinfa. En individuos alimentados, la cantidad de proteínas en el fluido hemolinfático puede duplicarse en comparación con los no alimentados, y un 10 % de estas proteínas se encuentran de forma exclusiva en los individuos alimentados (Handke et al., 2013). Durante la toma de sangre, los mosquitos adquieren anticuerpos del hospedador, que son transferidos a la hemolinfa (Hatfield, 1988). El tráfico de proteínas podría extenderse más allá de las inmunoglobulinas, ya que se ha identificado un conjunto de hasta 18 proteínas del hospedador en la hemolinfa de las garrapatas (Liu et al., 2022). Aunque los estudios referentes a la composición de la hemolinfa en insectos, incluyendo las garrapatas, son muy escasos (Handke et al., 2013; Liu et al., 2022), se han identificado 311 proteínas en la hemolinfa de la especie *Hyalomma asiaticum* (Yuan et al., 2022). Aunque la función de la mayoría de estas proteínas aún se desconoce, en garrapatas alimentadas se han identificado en la hemolinfa cerca de veinte proteínas provenientes del huésped (Liu et al., 2022). Todos estos estudios sugieren que, las variaciones en los espectros de las garrapatas, según el lugar de su recolección, podrían estar relacionadas con cambios fisiológicos.

lógicos o fisiopatológicos en el artrópodo. Es plausible que algunos de los picos exclusivos, presentes únicamente en los ejemplares de pacientes sean atribuibles a proteínas transferidas desde el compartimento sanguíneo del hospedador. En esta misma línea, las diferencias en la composición proteica de la sangre podrían ser responsables de las diferencias de los espectros en garrapatas recolectadas de diferentes tipos de hospedadores. En los ensayos de validación, las garrapatas *H. marginatum* mostraron una notable diferencia en el número de picos según el tipo de hospedador desde el que habían sido obtenidas (vacas: 69,03 picos; humano: 108,61 picos). En caso de confirmarse esta hipótesis, podrían existir diferencias cualitativas en los espectros en función del hospedador en el cual se alimenta la garrapata.

Como ha sido mencionado la identificación mediante el espectrómetro de masas comercial, se consigue al comparar el espectro de masas de una muestra problema con todos los espectros presentes en la biblioteca de referencia. El grado de similitud se expresa numéricamente en forma numérica, el denominado LSV. El software ofrece al usuario un listado de las mejores coincidencias, ordenadas de mayor a menor similitud, con los correspondientes valores LSV. Si la puntuación obtenida para la muestra supera (en su mejor coincidencia) el umbral LSV establecido, se considera que hay una coincidencia aceptable y se asigna una identificación certera a la muestra. La elección del punto de corte LSV es crítica ya que determina el nivel de confianza en la asignación de identificación. Mientras que un punto de corte demasiado bajo podría resultar en identificaciones incorrectas, uno demasiado alto podría descartar identificaciones válidas. Por lo tanto, la elección cuidadosa del punto de corte LSV se debe basar en unas pruebas de validación previas, utilizando para ello una variedad de muestras de referencia y especies conocidas. Esto es precisamente lo que se hizo mediante los tres tipos de ensayos de validación (EC, ENR, EP). De nuevo, existe una variabilidad en los puntos de corte utilizados por diversos investigadores, siendo 1,80 el valor más comúnmente empleado (Kumsa et al., 2016; Boyer et al., 2017; Nebbak et al., 2017; Boucheikhchoukha et al., 2018; Diarra et al., 2018; Huyn et al., 2021; Ngoy et al., 2021; Ahamada et al., 2021; Benyahia et al., 2022). Otros investigadores han optado por elevar el umbral hasta 2,00 (Yssouf et al., 2015). En reconocimiento a la heterogeneidad presente en sus espectros, algunos autores han recomendado reducir hasta 1,30 el umbral para la identificación de ejemplares recolectados de pacientes (Yssouf et al., 2013). En algunos casos, la especificidad en la identificación se ha considerado como un criterio adicional para la identificación, exigiendo una diferencia de al menos 0,2 en las puntuaciones entre las dos especies con las puntuaciones más altas (Kumsa et al., 2016; Boyer et al., 2019; Ngoy et al., 2021). Por último, algunos autores han recomendado testar la presencia de microorganismos patógenos ante la obtención de bajos scores de identificación, en base a la observación de que los ejemplares infectados presentan menores valores LSV (Yssouf et al., 2015).

El establecimiento del valor umbral de identificación supuso un desafío, debido a múltiples factores. En primer lugar, los resultados obtenidos en las tres pruebas de validación fueron diferentes, con valores ligeramente menores para

los test EP, respecto a los obtenidos en los EC. En segundo lugar, ninguno de los ensayos abarcó la totalidad de las especies estudiadas. Adicionalmente, los valores LSV son especie-dependiente (*R. sanguineus* s.l. presentó valores LSV más bajos que el resto de especies). Dado que los test de validación EP se asemejaban de una forma más fiel el entorno clínico real, se determinó que serían los resultados de estos ensayos los que se utilizarían para establecer el umbral de identificación. Prácticamente la totalidad de los ejemplares de los ensayos EP presentaron valores LSV superiores a 1,70. Por lo tanto, este valor fue establecido como el umbral de identificación. Sin embargo, es importante destacar que una puntuación por encima del punto de corte no es garantía de una identificación correcta (Cuénod et al., 2021). Las dos ninfas de *I. ricinus* que habían sido incorrectamente identificadas como *C. felis*, mostraron unos valores LSV de 2,15 y 2,34, respectivamente. Para mejorar la precisión en la identificación, algunos expertos han sugerido seguir la denominada “regla del 10 %”. Esta regla sugiere que, además de cumplir con el valor mínimo de umbral, para que una identificación sea aceptada como válida, debe existir al menos un 10 % de diferencia entre las puntuaciones obtenidas por las dos especies con puntuaciones más elevadas. Sin embargo, en nuestro estudio, 7/8 (87,5%) de las ninfas de *I. ricinus* correctamente identificadas no cumplían este criterio. Por el contrario, las dos ninfas que fueron incorrectamente identificadas cumplían con la regla del 10 %, lo que habría conducido a una clasificación errónea en el caso de que esta recomendación hubiera sido aplicada. Sin embargo, la identificación de garrapatas requiere tomar en consideración múltiples factores, al igual que sucede en otras áreas de la microbiología clínica: el aspecto macroscópico del artrópodo, la época del año, la sintomatología del paciente, así como diversos datos adicionales. Así, aunque *I. ricinus* y *C. felis* puedan presentar similitudes en sus espectros, una simple inspección visual permite diferenciar ambas especies. En este sentido, aunque un valor cut-off de 1,70 puede servir como orientación en la identificación del ejemplar de garrapata, es preferible adoptar un enfoque más “flexible”, donde la identificación propuesta por MALDI-TOF MS debe ser considerada en conjunción con otros datos disponibles.

Una perspectiva prometedora es la demostrada capacidad para discriminar el estado infeccioso de las garrapatas un único paso, si bien esto depende de la combinación específica de garrapata-microorganismo. MALDI-TOF MS detecta con un 100 % de precisión, los ejemplares de *R. sanguineus* s.l. que están infectados por *R. conorii* y los de *D. marginatus* que están infectados por *R. slovaca* (Yssouf et al., 2014). Sin embargo, MALDI-TOF MS no es capaz de diferenciar los ejemplares de *I. ricinus* infectados por *Borrelia afzelii* (Boyer et al., 2017). Es importante resaltar que, aún en el caso de que la detección simultánea de vector y microorganismos en un solo paso fuese técnicamente viable, no está del todo claro cuál sería el impacto clínico de esta información. Por un lado, la presencia de un microorganismo patógeno en el vector no garantiza que el paciente vaya a desarrollar la enfermedad, incluso en el caso de que se haya producido la transmisión. Por otro lado, en base a la información actual, no existen ensayos clínicos ni guías de práctica clínica que respalden el uso de quimioprofilaxis

antibiótica para la prevención de infecciones por *R. conorii*, *R. slovaca*, u otros agentes transmitidos por garrapatas. Sin embargo, con el conocimiento actual, determinar el estado infeccioso de una garrapata podría mejorar el manejo de estos pacientes al permitir una monitorización más precisa en aquellos casos en los que la identificación del microorganismo en el vector hubiera resultado positiva.

En el momento de realizar la presente investigación existía la firme sospecha (a partir de estadísticas disponibles del CRETAV) de que, la mayor parte de las garrapatas retiradas de pacientes en centros sanitarios de nuestro sector sanitario no estaban siendo remitidas al servicio de Microbiología para su identificación. Por este motivo, se decidió cuantificar la magnitud del problema de las picaduras por garrapatas en el sector sanitario Zaragoza III. En colaboración con el servicio de Farmacia de Atención Primaria, se realizó una extracción de datos a partir de los diagnósticos de la Clasificación Internacional de Atención Primaria (CIAP), registrados en la aplicación informática OMI-AP, utilizada para el registro de la historia clínica en Atención Primaria. Durante el año 2021, se documentaron en OMI-AP del sector sanitario Zaragoza III, un total de 121 consultas médicas relacionadas con la picadura de garrapatas. En una revisión parcial de las historias clínicas (27/121) se constató que el 27 % de los pacientes había recibido tratamiento antibiótico con motivo de la picadura. Los principios activos fueron diversos e incluyeron: doxiciclina 200 mg/12 horas durante 5, 7 o 21 días; eritromicina 3 ml/12horas sin especificar duración; amoxicilina /ácido clavulánico 875/125 mg en suspensión oral. En ninguna de las historias clínicas revisadas se encontró información explícita que revelara el motivo específico de la prescripción antibiótica. Sin embargo, basándonos en la información clínica y considerando el perfil de las prescripciones, se podría presuponer que una proporción significativa de dichas prescripciones estaban dirigidas a prevenir la b. de Lyme. Sin embargo, probablemente, la mayoría de las prescripciones antibióticas no estaría en concordancia con las recomendaciones de las guías clínicas actuales en nuestro país (Oteo et al., 2023). Con el objetivo de mejorar la atención sanitaria de los pacientes atendidos por picaduras de garrapatas, una vez finalizada la presente investigación, se planificaron varias reuniones con los profesionales sanitarios del Servicio de Dermatología del HCULB, así como con los responsables del programa PROA (Programa de Racionalización y Optimización en el uso de Antibióticos) de los centros de salud del sector sanitario Zaragoza III. En estas reuniones, se discutió la implementación del uso del MALDI-TOF MS como herramienta de identificación de garrapatas en el HCULB, con la finalidad de brindar un manejo más eficiente y racional a los pacientes, evitando el uso de antibióticos cuando estos no son necesarios.

Las variables analizadas en este estudio han conducido a la creación de un protocolo que se destaca por su simplicidad. Aunque algunos de los protocolos de extracción proteica previamente publicados son de ejecución sencilla (Rothen et al., 2016), muchos otros se caracterizan por incorporar múltiples reactivos, dispositivos de homogeneización automática o prolongados tiempos de procesamiento, entre otras características. En contraste, el protocolo diseñado se dis-

tingue por su fácil implementación en cualquier laboratorio de microbiología clínica que esté equipado con un espectrómetro de masas, ya que su ejecución no requiere de personal altamente capacitado y la inversión necesaria es mínima: un calentador y micropipetas de plástico desechables. Es relevante mencionar que el diseño del protocolo descrito en este estudio es adaptable y susceptible a modificaciones con el propósito de optimizar los resultados alcanzados. Recientemente, se ha introducido un cambio significativo en el protocolo que afecta el método por el cual el espectrómetro de masas lleva a cabo la identificación de las muestras. A partir de los espectros originales, se han generado tres versiones alternativas de la biblioteca de espectros: una con 40 picos, otra con 100 y una tercera con 130, además de la biblioteca original que constaba de 70 picos. A pesar de que el estudio aún se encuentra en una etapa preliminar, los resultados obtenidos hasta la fecha son prometedores. La expansión de la biblioteca de espectros ha conducido a una mejoría en los scores de identificación en la mayoría de las garrapatas, en comparación con los resultados obtenidos mediante la utilización de la biblioteca original.

6. CONCLUSIONES

1. Hemos detectado diversas variables, con efectos positivos, negativos o neutros, que influyen en los resultados de la espectrometría de masas aplicada a la identificación de garrapatas.
2. Entre las variables con mayor impacto en la espectrometría de masas se han encontrado: el uso de micropistilos de plástico como método de fragmentación mecánica de las patas, la utilización exclusiva de AF como reactivo en el proceso de extracción proteica, el precalentamiento a 45°C de la placa de depósito de muestras y el aumento en la potencia del láser.
3. Se ha optimizado un protocolo que destaca por su simplicidad y sencillez, tanto en su diseño como en su ejecución. Este diseño permite su posible implantación en todos los laboratorios de Microbiología que estén equipados con un espectrómetro de masas.
4. Se ha creado una biblioteca de referencia que contiene los espectros de masas de diversos tipos de artrópodos, incluidas las especies de garrapatas de mayor relevancia en Salud Pública en nuestro país. La inclusión, por cada especie, de un número representativo de espectros, garantiza el rendimiento óptimo en la práctica clínica.
5. La validez del protocolo se ha comprobado mediante la realización de tres ensayos de validación, que han incluido ejemplares de garrapatas recolectadas de diversos tipos de fuentes, representando diferentes escenarios clínicos.
6. Se ha conseguido por MALDI-TOF MS la correcta identificación del 95,56 % de los ejemplares evaluados. Algunos errores en la identificación pueden ser solventados mediante acciones correctoras sencillas, como la inspección visual del ejemplar.
7. En la actualidad, en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, ha introducido la espectrometría de masas como método de identificación de garrapatas. La experiencia clínica ha corroborado los resultados obtenidos en los ensayos de validación, confirmando la utilidad de este método en la identificación de garrapatas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguirrebengoa K, Portillo A, Santibáñez S, Marín JJ, Montejo M, Oteo JA. Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. Emerg Infect Dis. 2008 Mar; 14(3):528-9. doi: 10.3201/eid1403.070987. PMID: 18494099; PMCID: PMC2570842.

Ahamada M'madi S, Diarra AZ, Almeras L, Parola P. Identification of ticks from an old collection by MALDI-TOF MS. J Proteomics. 2022 Jul 30; 264:104623. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104623. Epub 2022 May 24. PMID: 35623553.

Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2011 Aug;49(8): 2868-73. doi: 10.1128/JCM.00506-11. Epub 2011 May 25. PMID: 21613431; PMCID: PMC3147777.

Alcolea-Medina A, Fernandez MTC, Montiel N, García MPL, Sevilla CD, North N, Lirola MJM, Wilks M. An improved simple method for the identification of mycobacteria by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization mass spectrometry). Sci Rep. 2019 Dec 27; 9(1):20216. doi: 10.1038/41598-019-56604-7. PMID: 31882826; PMCID: PMC6934676.

Almeida H, López-Bernus A, Rodríguez-Alonso B, Alonso-Sardón M, Romero-Alegria Á, Velasco-Tirado V, Pardo-Lledias J, Muro A, Bellhassen-García M. Is babesiosis a rare zoonosis in Spain? Its impact on the Spanish health system over 23 Years. 2021 doi:10.21203/rs.3.rs-1621485/v1. PPR: PPR491001.

Alvarez Hernández G, Contreras Soto JJ. Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de Sonora, 2004-2012 [Mortality from *Rickettsia rickettsii* spotted fever in patients at a pediatric hospital in the state of Sonora, 2004-2012]. Salud Publica Mex. 2013 Apr;55(2):151-2. Spanish. doi: 10.1590/s0036-36342013000200004. PMID: 23546404.

Amâncio FF, Amorim VD, Chamone TL, Brito MG, Calic SB, Leite AC, Fraga GL, Ferraz ML. Epidemiological characteristics of Brazilian spotted fever in Minas Gerais state, Brazil, 2000-2008. Cad Saude Publica. 2011 Oct; 27(10): 1969-76. doi: 10.1590/s0102-311x2011001000010. PMID: 22031201.

Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am*. 2008 Jun;22(2):195-215, v. doi: 10.1016/j.idc.2007.12.006. PMID: 18452797.

Ahamada M'madi S, Diarra AZ, Almeras L, Parola P. Identification of ticks from an old collection by MALDI-TOF MS. *J Proteomics*. 2022 Jul 30; 264:104623. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104623. Epub 2022 May 24. PMID: 35623553.

Arsuaga M, Gonzalez LM, Lobo CA, de la Calle F, Bautista JM, Azcárate IG, Puente S, Montero E. First report of *Babesia microti*-caused babesiosis in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016 Oct; 16(10):677-9. doi: 10.1089/vbz.2016.1946. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27560451; PMCID: PMC5065027.

Asensi V, González LM, Fernández-Suárez J, Sevilla E, Navascués RÁ, Suárez ML, Lauret ME, Bernardo A, Carton JA, Montero E. A fatal case of *Babesia divergens* infection in northwestern Spain. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018 Mar; 9(3):730-734. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.018. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29496491.

Beard CB, Occi J, Bonilla DL, Egizi AM, Fonseca DM, Mertins JW, Backenson BP, Bajwa WI, Barbarin AM, Bertone MA, Brown J, Connally NP, Connell ND, Eisen RJ, Falco RC, James AM, Krell RK, Lahmers K, Lewis N, Little SE, Neault M, Pérez de León AA, Randall AR, Ruder MG, Saleh MN, Schappach BL, Schroeder BA, Seraphin LL, Wehtje M, Wormser GP, Yabsley MJ, Halperin W. Multistate infestation with the exotic disease-vector tick *Haemaphysalis longicornis* - United States, August 2017-September 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018 Nov 30; 67(47):1310-1313. doi: 10.15585/mmwr.mm6747a3. PMID: 30496158; PMCID: PMC6276380.

Benyahia H, Diarra AZ, Gherissi DE, Bérenger JM, Benakhla A, Parola P. Molecular and MALDI-TOF MS characterisation of *Hyalomma aegyptium* ticks collected from turtles and their associated microorganisms in Algeria. *Ticks Tick Borne Dis*. 2022 Jan; 13(1):101858. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101858. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34814065.

Bernard C, Holzmüller P, Bah MT, Bastien M, Combes B, Jori F, Grosbois V, Vial L. Systematic review on Crimean-Congo hemorrhagic fever enzootic cycle and factors favoring virus transmission: special focus on France, an apparently free-disease area in Europe. *Front Vet Sci*. 2022 Jul 19; 9:932304. doi: 10.3389/fvets.2022.932304. PMID: 35928117; PMCID: PMC9343853.

Beselga D, Campos A, Castro M, Mendes S, Campos J, Neves A, Violante

L, Castro Sousa JP. A rare case of retinal artery occlusion in the context of mediterranean spotted Fever. *Case Rep Ophthalmol*. 2014 Jan 14; 5(1):22-7. doi: 10.1159/000358248. PMID: 24596555; PMCID: PMC3934608.

Bhowmick B, Han Q. Understanding tick biology and its implications in anti-tick and transmission blocking vaccines against tick-borne pathogens. *Front Vet Sci*. 2020 Jun 9; 7:319. doi: 10.3389/fvets.2020.00319. Erratum in: *Front Vet Sci*. 2020 Aug 31;7:575. PMID: 32582785; PMCID: PMC7297041.

Binder AM, Armstrong PA. Increase in reports of tick-borne rickettsial diseases in the United States. *Am J Nurs*. 2019 Jul; 119(7):20-21. doi: 10.1097/01.NAJ.0000569428.81917.6c. PMID: 31232769; PMCID: PMC7053124.

Bird GH, Lajmi AR, Shin JA. Manipulation of temperature to improve solubility of hydrophobic proteins and cocrystallization with matrix for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002 Jan 1; 74(1):219-25. doi: 10.1021/ac010683g. PMID: 11795797.

Black WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (*Acari: Ixodida*) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11; 91(21):10034-8. doi: 10.1073/pnas.91.21.10034. PMID: 7937832; PMCID: PMC44952.

Boucheikhchoukh M, Laroche M, Aouadi A, Dib L, Benakhla A, Raoult D, Parola P. MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr; 57:39-49. doi: 10.1016/j.cimid.2018.05.002. Epub 2018 May 16. PMID: 30017077.

Boyer PH, Boulanger N, Nebbak A, Collin E, Jaulhac B, Almeras L. Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* s.l. detection in *Ixodes ricinus*. *PLoS One*. 2017 Sep 26; 12(9):e0185430. doi: 10.1371/journal.pone.0185430. PMID: 28950023; PMCID: PMC5614582.

Boyer PH, Almeras L, Plantard O, Grillon A, Talagrand-Reboul É, McCoy K, Jaulhac B, Boulanger N. Identification of closely related *Ixodes* species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2019 Oct 17; 14(10):e0223735. doi: 10.1371/journal.pone.0223735. PMID: 31622384; PMCID: PMC6797106.

Boyer PH, Lenormand C, Jaulhac B, Talagrand-Reboul E. Human Co-infections between *Borrelia burgdorferi* s.l. and other *Ixodes*-borne microorga-

nisms: a systematic review. *Pathogens*. 2022 Feb 23; 11(3):282. doi: 10.3390/pathogens11030282. PMID: 35335606; PMCID: PMC8948674.

Branda, J. A., Fritsche, T. R., Burnham, C.-A., Butler-Wu, S., Doern, C., Doing, K. M. (2017). M58- Methods for the identification of cultured microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*; European network for surveillance of tick-borne diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Dec; 10(12):1108-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x. PMID: 15606643.

Burgdorfer W. Hemolymph test. A technique for detection of *Rickettsiae* in ticks. *Am J Trop Med Hyg*. 1970 Nov; 19(6):1010-4. PMID: 4992724.

Camprubí D, Moreno-García E, Almuedo-Riera A, Martínez MJ, Navarro A, Martínez-Hernández E, Muñoz J, Ambrosioni J. First imported case of tick-borne encephalitis in Spain - was it alimentary? *Travel Med Infect Dis*. 2020 Sep-Oct; 37:101701. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101701. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32339672.

Camprubí-Ferrer D, Portillo A, Santibáñez S, Almuedo-Riera A, Rodríguez-Valero N, Subirà C, Martínez MJ, Navero-Castillejos J, Fernández-Pardos M, Genton B, Cobuccio L, Van Den Broucke S, Bottieau E, Muñoz J, Oteo JA. Incidence of human granulocytic anaplasmosis in returning travellers with fever. *J Travel Med*. 2021 Jun 1; 28(4):taab056. doi: 10.1093/jtm/taab056. PMID: 33839778.

Casel MA, Park SJ, Choi YK. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: emerging novel phlebovirus and their control strategy. *Exp Mol Med*. 2021 May; 53(5):713-722. doi: 10.1038/s12276-021-00610-1. Epub 2021 May 6. PMID: 33953322; PMCID: PMC8178303.

Chaurand P, Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: principles and potentials. *Toxicol Pathol*. 2005; 33(1):92-101. doi: 10.1080/01926230590881862. PMID: 15805060.

Chiffi G, Grandgirard D, Leib SL, Chrdle A, Ružek D. Tick-borne encephalitis: A comprehensive review of the epidemiology, virology, and clinical picture. *Rev Med Virol.* 2023 Jul 1:e2470. doi: 10.1002/rmv.2470. Epub ahead of print. PMID: 37392370.

G.K. Christopher, A.G. Phipps, R.J. Gray. Temperature-dependent solubility of selected proteins. *Journal of Crystal Growth.* Volume 191, Issue 4. 1998, 820-826. ISSN 0022-0248

Clarke, W. Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. Editor(s): Hari Nair, William Clarke. *Mass spectrometry for the clinical laboratory.* Academic Press. 2017.

Cohen SL, Chait BT. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem.* 1996 Jan 1; 68(1):31-7. doi: 10.1021/ac9507956. PMID: 8779435.

Colomba C, Imburgia C, Trizzino M, Titone L. First case of Mediterranean spotted fever-associated rhabdomyolysis leading to fatal acute renal failure and encephalitis. *Int J Infect Dis.* 2014 Sep; 26:12-3. doi: 10.1016/j.ijid.2014.01.024. Epub 2014 May 15. PMID: 24846600.

Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE. Phyloproteomics: species identification of *Enterobacteriaceae* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001 Jan; 3(1):103-12. PMID: 11200222.

Cuénod A, Foucault F, Pflüger V, Egli A. Factors associated with MALDI-TOF Mass spectral quality of species identification in clinical routine diagnostics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 16;11:646648. doi: 10.3389/fcimb.2021.646648. PMID: 33796488; PMCID: PMC8007975.

De Hoffman E, Stroobant V. *Mass spectrometry. Principles and applications.* 3ed edition. Editado por De Hoffman E, Stroobant V: John Wiley and Sons Ltd. 2007.

Diarra AZ, Almeras L, Laroche M, Berenger JM, Koné AK, Bocoum Z, Dabo A, Doumbo O, Raoult D, Parola P. Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jul 24; 11(7):e0005762. doi: 10.1371/journal.pntd.0005762. PMID: 28742123; PMCID: PMC5542699.

Díaz P, Arnal JL, Remesar S, Pérez-Creo A, Venzal JM, Vázquez-López ME, Prieto A, Fernández G, López CM, Panadero R, Benito A, Díez-Baños P, Morrondo P. Molecular identification of *Borrelia* spirochetes in questing *Ixodes ricinus* from northwestern Spain. *Parasit Vectors*. 2017 Dec 20; 10(1):615. doi: 10.1186/s13071-017-2574-x. PMID: 29262835; PMCID: PMC5738910.

Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger JM, Failloux AB, Raoult D, Parola P, Almeras L. Accurate identification of *Culicidae* at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasit Vectors*. 2014 Dec 2; 7:544. doi: 10.1186/s13071-014-0544-0. PMID: 25442218; PMCID: PMC4273427.

Diuk-Wasser MA, VanAcker MC, Fernandez MP. Impact of land use changes and habitat fragmentation on the eco-epidemiology of tick-borne diseases. *J Med Entomol*. 2021 Jul 16; 58(4):1546-1564. doi: 10.1093/jme/tjaa209. PMID: 33095859.

Dobberschütz S, Nielsen MR, Sand KK, Civioc R, Bovet N, Stipp SLS, Andersson MP. The mechanisms of crystal growth inhibition by organic and inorganic inhibitors. *Nat Commun*. 2018 Apr 20; 9(1):1578. doi: 10.1038/s41467-018-04022-0. PMID: 29679006; PMCID: PMC5910393.

Doucette AA, Vieira DB, Orton DJ, Wall MJ. Resolubilization of precipitated intact membrane proteins with cold formic acid for analysis by mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2014 Dec 5; 13(12):6001-12. doi: 10.1021/pr500864a. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25384094.

Dumic I, Jevtic D, Veselinovic M, Nordstrom CW, Jovanovic M, Mogulla V, Veselinovic EM, Hudson A, Simeunovic G, Petcu E, Ramanan P. Human granulocytic anaplasmosis-a systematic review of published cases. *Microorganisms*. 2022 Jul 15; 10(7):1433. doi: 10.3390/microorganisms10071433. PMID: 35889152; PMCID: PMC9318722.

Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, ALbeloushi A, Moussa I, Ibrahem M, Albazie H, Alqarni A, Anagreyah S, Alghamdi S, Rawway M. How MALDI-TOF Mass spectrometry technology contributes to microbial infection control in healthcare settings. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 8; 10(11):1881. doi: 10.3390/vaccines10111881. PMID: 36366389; PMCID: PMC9699604.

Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct; 15(4):631-46. doi: 10.1128/CMR.15.4.631-646.2002. PMID: 12364373; PMCID: PMC126859.

Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis*. 2006 Apr;6(4):203-14. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70435-2. PMID: 16554245; PMCID: PMC7185836.

Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, Romero L, Oteo JA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Jan; 18(1):179-80. doi: 10.3201/eid1801.111040. PMID: 22261502; PMCID: PMC3310114.

Estrada-Peña A, Salman M. Current limitations in the control and spread of ticks that affect livestock: a review. *Agriculture*. 2013; 3(2):221-235. <https://doi.org/10.3390/agriculture3020221>

Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D. & Petney, T.N. Editado por Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D. & Petney, T.N . *Ticks of Europe and North Africa.*: Cham, Switzerland: Springer. 2017a.

Estrada-Peña A, D'Amico G, Palomar AM, Dupraz M, Fonville M, Heylen D, Habela MA, Hornok S, Lempereur L, Madder M, Nuncio MS, Otranto D, Pfaffle M, Plantard O, Santos-Silva MM, Sprong H, Vatansever Z, Vial L, Mihalca AD. A comparative test of ixodid tick identification by a network of European researchers. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017b Jun; 8(4):540-546. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.03.001. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28320640.

Fernández de Mera IG, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C, de la Fuente J. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis*. 2009 Nov; 15(11):1869-70. doi: 10.3201/eid1511.090681. PMID: 22531111; PMCID: PMC2857243.

Fernández-Soto P, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul; 9(7):889-90. doi: 10.3201/eid0907.030077. PMID: 12899141; PMCID: PMC3023448.

Fernández-Soto P, Díaz Martín V, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A. Increased prevalence of *Rickettsia aeschlimannii* in Castilla y León, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Jun; 28(6):693-5. doi: 10.1007/s10096-008-0667-3. Epub 2008 Nov 8. PMID: 18998174.

Figuerola ID, Torres O, Russell DH. Effects of the water content in the

sample preparation for MALDI on the mass spectra. *Anal Chem.* 1998 Nov 1; 70(21):4527-33. doi: 10.1021/ac9805605. PMID: 9823712.

Fotso Fotso A, Mediannikov O, Diatta G, Almeras L, Flaudrops C, Parola P, Drancourt M. MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crociduræ/Ornithodoros sonrai* paradigm. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jul 24; 8(7):e2984. doi: 10.1371/journal.pntd.0002984. PMID: 25058611; PMCID: PMC4109908.

García JC, Núñez MJ, Castro B, Fraile FJ, López A, Mella MC, Blanco A, Sieira C, Loureiro E, Portillo A, Oteo JA. Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR. *Ann NY Acad Sci.* 2006 Oct; 1078:545-7. doi: 10.1196/annals.1374.106. PMID: 17114773.

García JC, Núñez MJ, Portillo A, Oteo JA. Anaplasmosis humana: comunicación de 2 casos [Human anaplasmosis: two case-reports]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015 Jan; 33(1):68-9. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2014.05.009. Epub 2014 Jul 26. PMID: 25073813.

García-García JC, Portillo A, Núñez MJ, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr; 82(4):691-2. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0662. PMID: 20348520; PMCID: PMC2844561.

Giege, R. and Mikol, V. Crystallogenesis of proteins. *Trends in Biotechnology* (1989) 7, 277.

Gittens RA, Almanza A, Bennett KL, Mejía LC, Sanchez-Galan JE, Merchant F, Kern J, Miller MJ, Esser HJ, Hwang R, Dong M, De León LF, Álvarez E, Loaiza JR. Proteomic fingerprinting of neotropical hard tick species (Acari: Ixodidae) using a self-curated mass spectra reference library. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Oct 27; 14(10):e0008849. doi: 10.1371/journal.pntd.0008849. PMID: 33108372; PMCID: PMC7647123.

González-Carmona P, Portillo A, Cervera-Acedo C, González-Fernández D, Oteo JA. *Candidatus* Neohrlichia mikurensis infection in patient with antecedent hematologic neoplasm, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2023 Aug; 29(8):1659-1662. doi: 10.3201/eid2908.230428. PMID: 37486220.

Gonzalez LM, Rojo S, Gonzalez-Camacho F, Luque D, Lobo CA, Montero E. Severe babesiosis in immunocompetent man, Spain, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2014 Apr; 20(4):724-6. doi: 10.3201/eid2004.131409. PMID: 24656155; PMCID:

PMC3966382.

González LM, Castro E, Lobo CA, Richart A, Ramiro R, González-Camacho F, Luque D, Velasco AC, Montero E. First report of *Babesia divergens* infection in an HIV patient. *Int J Infect Dis.* 2015 Apr; 33:202-4. doi: 10.1016/j.ijid.2015.02.005. Epub 2015 Feb 14. PMID: 25686807.

Gou H, Xue H, Yin H, Luo J, Sun X. Molecular characterization of hard ticks by cytochrome C oxidase subunit 1 sequences. *Korean J Parasitol.* 2018 Dec; 56(6):583-588. doi: 10.3347/kjp.2018.56.6.583. Epub 2018 Dec 31. PMID: 30630279; PMCID: PMC6327197.

Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009; 2009:593232. doi: 10.1155/2009/593232. Epub 2009 Jan 4. PMID: 19277106; PMCID: PMC2648658.

Handke B, Poernbacher I, Goetze S, Ahrens CH, Omasits U, Marty F, Simigdala N, Meyer I, Wollscheid B, Brunner E, Hafen E, Lehner CF. The hemolymph proteome of fed and starved *Drosophila larvæ*. *PLoS One.* 2013 Jun 20; 8(6):e67208. doi: 10.1371/journal.pone.0067208. PMID: 23840627; PMCID: PMC3688620.

Hamlili FZ, Laroche M, Diarra AZ, Lafri I, Gassen B, Boutefna B, Davoust B, Bitam I, Parola P. MALDI-TOF MS identification of dromedary camel ticks and detection of associated microorganisms, southern Algeria. *Microorganisms.* 2022 Nov 3; 10(11):2178. doi: 10.3390/microorganisms10112178. PMID: 36363770; PMCID: PMC9692808.

Hansford KM, Wheeler BW, Tschirren B, Medlock JM. Questing *Ixodes ricinus* ticks and *Borrelia* spp. in urban green space across Europe: a review. *Zoonoses Public Health.* 2022 May; 69(3):153-166. doi: 10.1111/zph.12913. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35122422; PMCID: PMC9487987.

Harms MG, Hofhuis A, Sprong H, Bennema SC, Ferreira JA, Fonville M, Docters van Leeuwen A, Assendelft WJJ, Van Weert HCPM, Van Pelt W, Van den Wijngaard CC. A single dose of doxycycline after an *Ixodes ricinus* tick bite to prevent Lyme borreliosis: an open-label randomized controlled trial. *J Infect.* 2021 Jan; 82(1):98-104. doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.032. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32565073.

Hatfield PR. Detection and localization of antibody ingested with a

mosquito bloodmeal. *Med Vet Entomol.* 1988 Oct; 2(4):339-45. doi: 10.1111/j.1365-2915.1988.tb00206.x. PMID: 2980192.

Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, van der Giessen J, Sprong H, Porter SR, Losson B, Saegerman C, Donoso-Mantke O, Niedrig M, Papa A. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Jan; 8(1):33-50. doi: 10.1586/eri.09.118. PMID: 20014900.

Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, Fox NJ, Uhlhorn H, Artois M, Hanant D, Hutchings MR, Mattsson R, Yon L, Gavier-Widen D. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol Infect.* 2015 Jul; 143(10):2137-60. doi: 10.1017/S0950268814002398. Epub 2014 Sep 30. PMID: 25266682; PMCID: PMC9506979.

Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga JF, Lizarazo D, Mattar S, Valbuena G. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Córdoba, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Feb; 106(1):117-8. doi: 10.1590/s0074-02762011000100019. PMID: 21340366.

Hofmeester, Tim. (2016). The wild life of tick-borne pathogens. 10.18174/393112.

Horneffer V, Haverkamp J, Janssen HG, ter Steeg PF, Notz R. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: wet heat-treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2004 Oct; 15(10):1444-54. doi: 10.1016/j.jasms.2004.06.017. Erratum in: *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006 Sep;17(9):1322. ter Steeg, Pieter F [added]. PMID: 15465357.

Huynh LN, Diarra AZ, Pham QL, Le-Viet N, Berenger JM, Ho VH, Nguyen XQ, Parola P. Morphological, molecular and MALDI-TOF MS identification of ticks and tick-associated pathogens in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Sep 28; 15(9):e0009813. doi: 10.1371/journal.pntd.0009813. PMID: 34582467; PMCID: PMC8500424.

Ibarra V, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Márquez J, Oteo JA. DEBONEL/TIBOLA: is *Rickettsia slovaca* the only etiological agent? *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec; 1063:346-8. doi: 10.1196/annals.1355.056. PMID: 16481539.

Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, García-Amil C, Rodríguez-Moreno I, Anda P. *Rickettsia*

monacensis and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2007 Sep; 13(9):1405-7. doi: 10.3201/eid1309.060186. PMID: 18252123; PMCID: PMC2857266.

James V, Rajan J, Rajan S. Acute flaccid paralysis in a neonate: tick bite a differential? *Oxf Med Case Reports.* 2021 Jul 21; 2021(7):omab037. doi: 10.1093/omcr/omab037. PMID: 34306713; PMCID: PMC8297641.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004; 129 Suppl:S3-14. doi: 10.1017/s0031182004005967. PMID: 15938502.

Josek T, Gardner AM, Hedlund TJ, Parker AT, Allmann Updyke E, Allan BF. Fatal attraction: lone star ticks (*Amblyomma americanum*) exhibit preference for human female breath over male breath. *Exp Appl Acarol.* 2019 Jan; 77(1):59-64. doi: 10.1007/s10493-018-00338-0. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30632001.

Jumpertz M, Sevestre J, Luciani L, Houhamdi L, Fournier PE, Parola P. Bacterial agents detected in 418 ticks removed from humans during 2014-2021, France. *Emerg Infect Dis.* 2023 Apr; 29(4):701-710. doi: 10.3201/eid2904.221572. PMID: 36957992.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct 15; 60(20):2299-301. doi: 10.1021/ac00171a028. PMID: 3239801.

Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, Süss J, Klaus C. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Apr; 3(2):78-89. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.002. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22487425.

Karger A, Bettin B, Gethmann JM, Klaus C. Whole animal matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of ticks - Are spectra of *Ixodes ricinus* nymphs influenced by environmental, spatial, and temporal factors? *PLoS One.* 2019 Jan 15; 14(1):e0210590. doi: 10.1371/journal.pone.0210590. PMID: 30645604; PMCID: PMC6333373.

Kjemtrup AM, Padgett K, Paddock CD, Messenger S, Hacker JK, Feiszli T, Melgar M, Metzger ME, Hu R, Kramer VL. A forty-year review of Rocky Mountain spotted fever cases in California shows clinical and epidemiologic changes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022 Sep 15; 16(9):e0010738. doi: 10.1371/journal.pntd.0010738. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Jan 4;17(1):e0011030.

PMID: 36108065; PMCID: PMC9514610.

Knochenmuss R, Lehmann E, Zenobi R. Polymer cationization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *European Mass Spectrometry*. 1998; 4(6): 421-427. doi:10.1255/ejms.266

Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996; 10(8):883-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19960610)10:8<883::AID-RCM594>3.0.CO;2-V. PMID: 8777320.

Kubiak K, Szczotko M, Dmitryjuk M. *Borrelia miyamotoi*. An emerging human tick-borne pathogen in Europe. *Microorganisms*. 2021 Jan 12; 9(1):154. doi: 10.3390/microorganisms9010154. PMID: 33445492; PMCID: PMC7827671.

Kumsa B, Laroche M, Almeras L, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. Morphological, molecular and MALDI-TOF mass spectrometry identification of ixodid tick species collected in Oromia, Ethiopia. *Parasitol Res*. 2016 Nov; 115(11):4199-4210. doi: 10.1007/s00436-016-5197-9. Epub 2016 Jul 29. PMID: 27469536.

Laga AC, Granter SR, Mather TN. Proficiency at tick identification by pathologists and clinicians is poor. *Am J Dermatopathol*. 2022 Feb 1; 44(2):111-114. doi: 10.1097/DAD.0000000000001977. PMID: 33989219.

Lantos PM, Rumbaugh J, Bockenstedt LK, Falck-Ytter YT, Agüero-Rosenfeld ME, Auwaerter PG, Baldwin K, Bannuru RR, Belani KK, Bowie WR, Branda JA, Clifford DB, DiMario FJ, Halperin JJ, Krause PJ, Lavergne V, Liang MH, Meissner HC, Nigrovic LE, Nocton JJJ, Osani MC, Pruitt AA, Rips J, Rosenfeld LE, Savoy ML, Sood SK, Steere AC, Strle F, Sundel R, Tsao J, Vaysbrot EE, Wormser GP, Zemel LS. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis*. 2021 Jan 23; 72(1):1-8. doi: 10.1093/cid/ciab049. PMID: 33483734.

Léger E, Vourc'h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Exp Appl Acarol*. 2013 Feb; 59(1-2):219-44. doi: 10.1007/s10493-012-9615-0. Epub 2012 Sep 27. PMID: 23015121.

Leighton BJ, Roitberg BD, Belton P, Lowenberger CA. Host antibodies

in mosquito bloodmeals: a potential tool to detect and monitor infectious diseases in wildlife. *J Med Entomol.* 2008 May; 45(3):470-5. doi: 10.1603/0022-2585(2008)45[470:haimba]2.0.co;2. PMID: 18533442.

Liu L, Yan F, Zhang L, Wu ZF, Duan DY, Cheng TY. Protein profiling of hemolymph in *Haemaphysalis flava* ticks. *Parasit Vectors.* 2022 May 24; 15(1):179. doi: 10.1186/s13071-022-05287-7. PMID: 35610668; PMCID: PMC9128142.

Lloyd PM, Suddaby KG, Varney JE, Scrivener E, Derrick PJ, Haddleton DM. 1995. A comparison between matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry of synthetic polymers with narrow molecular-mass distributions: poly(methyl methacrylate) and poly(styrene). *Eur Mass Spectrom* 1:293.

Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, Barandika JF, Respicio-Kingry LB, Garcia-Amil C, García-Pérez AL, Olmeda AS, Zé-Zé L, Petersen JM, Anda P, Nuncio MS, Escudero R. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016 Feb;7(1):159-165. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.009. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26520052.

McLafferty FW, Stauffer DA, Loh SY, Wesdemiotis C. Unknown identification using reference mass spectra. Quality evaluation of databases. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1999 Dec; 10(12):1229-40. doi: 10.1016/S1044-0305(99)00104-X. PMID: 10584326.

Luo G, Marginean I, Vertes A. Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal Chem.* 2002 Dec 15; 74(24):6185-90. doi: 10.1021/ac020339z. PMID: 12510737.

Luxembourg SL, McDonnell LA, Duursma MC, Guo X, Heeren RM. Effect of local matrix crystal variations in matrix-assisted ionization techniques for mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003 May 15; 75(10):2333-41. doi: 10.1021/ac026434p. PMID: 12918974.

Manilla, G. (1998) Fauna d'Italia. *Acari Ixodida*. Edizioni Calderini Bologna ed. Bologna.

Mareković I, Bošnjak Z, Jakopović M, Boras Z, Janković M, Popović-Grle S. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in identification of nontuberculous mycobacteria. *Chemotherapy.* 2016; 61(4):167-70. doi: 10.1159/000442517. Epub 2016 Jan 29. PMID:

26821270.

Márquez-Jiménez FJ, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Rodríguez-Liévana JJ, Muniain-Ezcurra MA. Las garrapatas (*Acarina: Ixodida*) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España [Ticks (*Acarina: Ixodidae*) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005 Feb; 23(2):94-102. Spanish. doi: 10.1157/13071613. PMID: 15743581.

McCoy KD, Léger E, Dietrich M. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Oct 4; 3:57. doi: 10.3389/fcimb.2013.00057. PMID: 24109592; PMCID: PMC3790072.

Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. 2013 Jan 2; 6:1. doi: 10.1186/1756-3305-6-1. PMID: 23281838; PMCID: PMC3549795.

Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM, Zhou X. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*. 2014 Nov 7; 346(6210):763-7. doi: 10.1126/science.1257570. Epub 2014 Nov 6. PMID: 25378627.

Moerbeck L, Domingos A, Antunes S. Tick-borne rickettsioses in the Iberian Peninsula. *Pathogens*. 2022 Nov 18; 11(11):1377. doi: 10.3390/pathogens11111377. PMID: 36422628; PMCID: PMC9695430.

Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM. Espectrometría de masas MALDI-

TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras [MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Current situation and future perspectives]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015 Jun-Jul; 33(6):369-71. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2015.02.016. Epub 2015 May 7. PMID: 25958223.

Murugaiyan J, Roesler U. MALDI-TOF MS Profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 15; 7:184. doi: 10.3389/fcimb.2017.00184. PMID: 28555175; PMCID: PMC5430024.

Mushtaq A, El-Azizi M, Khardori N. Category C potential bioterrorism agents and emerging pathogens. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Jun; 20(2):423-41, x. doi: 10.1016/j.idc.2006.03.003. PMID: 16762745; PMCID: PMC7134992.

Mysterud A, Jore S, Østerås O, Viljugrein H. Emergence of tick-borne diseases at northern latitudes in Europe: a comparative approach. *Sci Rep*. 2017 Nov 24; 7(1):16316. doi: 10.1038/s41598-017-15742-6. PMID: 29176601; PMCID: PMC5701145.

Nagata S. Feeding modulation in insects through factors in the hemolymph. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019 Jan; 83(1):33-38. doi: 10.1080/09168451.2018.1536515. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30369294.

Nebbak A, El Hamzaoui B, Berenger JM, Bitam I, Raoult D, Almeras L, Parola P. Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Med Vet Entomol*. 2017 Dec; 31(4):438-448. doi: 10.1111/mve.12250. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28722283.

Ngoy S, Diarra AZ, Laudisoit A, Gembu GC, Verheyen E, Mubenga O, Mbalitini SG, Baelo P, Laroche M, Parola P. Using MALDI-TOF mass spectrometry to identify ticks collected on domestic and wild animals from the Democratic Republic of the Congo. *Exp Appl Acarol*. 2021 Jul; 84(3):637-657. doi: 10.1007/s10493-021-00629-z. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34146230; PMCID: PMC8257524.

Ngnindji-Youdje Y, Diarra AZ, Lontsi-Demano M, Berenger JM, Tchuinkam T, Parola P. MALDI-TOF MS identification of cattle ticks from Cameroon. *Ticks Tick Borne Dis*. 2023 May; 14(3):102159. doi: 10.1016/j.ttbdis.2023.102159. Epub 2023 Mar 10. PMID: 36907070.

Ngoy S, Diarra AZ, Laudisoit A, Gembu GC, Verheyen E, Mubenga O,

Mbalitini SG, Baelo P, Laroche M, Parola P. Using MALDI-TOF mass spectrometry to identify ticks collected on domestic and wild animals from the Democratic Republic of the Congo. *Exp Appl Acarol*. 2021 Jul; 84(3):637-657. doi: 10.1007/s10493-021-00629-z. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34146230; PMCID: PMC8257524.

Niare S, Berenger JM, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, Almeras L. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malar J*. 2016 Feb 13; 15:87. doi: 10.1186/s12936-016-1152-6. PMID: 26872451; PMCID: PMC4752743.

Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'ollivier C, Fourquet P, Roesems S, Hendrickx M, Piarroux R. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol*. 2013 Apr 8; 13:76. doi: 10.1186/1471-2180-13-76. PMID: 23565856; PMCID: PMC3691839.

Ogden NH, Ben Beard C, Ginsberg HS, Tsao JI. Possible effects of climate change on Ixodid ticks and the pathogens they transmit: predictions and observations. *J Med Entomol*. 2021 Jul 16; 58(4):1536-1545. doi: 10.1093/jme/tjaa220. PMID: 33112403.

Oteo JA, Martinez de Artola V, Maravi E, Eiros JM. Lyme disease and uveitis. *Ann Intern Med*. 1990a Jun 1; 112(11):883. doi: 10.7326/0003-4819-112-11-883. PMID: 2344119.

Oteo JA, Maravi E, Martínez de Artola V, Antuñano P. Parálisis por mordedura de garrapata [Paralysis caused by tick bite]. *Med Clin (Barc)*. 1990b Feb 24;94(7):275-6. Spanish. PMID: 2325490.

Oteo JA, Martínez de Artola V, Casas JM. Tick-borne diseases in Spain. 6th International Congress for Infectious Diseases. Prague, Czeck Republic. April 26-30, 1994

Oteo JA, Martínez de Artola V, Gómez-Cadiñanos R, Casas JM, Blanco JR, Rosel L. Evaluación de los métodos de retirada de garrapatas en la ixodidiasis humana [Evaluation of methods of tick removal in human ixodidiasis]. *Rev Clin Esp*. 1996 Sep; 196(9):584-7. Spanish. PMID: 8966318.

Oteo JA, Blanco JR, Martínez de Artola V, Ibarra V. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis*. 2000 Jul-Aug;6(4):430-2. doi: 10.3201/eid0604.000425. Erratum in: *Emerg Infect Dis*

2000 Nov-Dec;6(6):663. Erratum in: Emerg Infect Dis 2000 Sep-Oct;6(5):562. PMID: 10905986; PMCID: PMC2640892.

Oteo JA, Gil H, Barral M, Pérez A, Jimenez S, Blanco JR, Martínez de Artola V, García-Pérez A, Juste RA. Presence of granulocytic *Ehrlichia* in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect.* 2001 Oct; 127(2):353-8. doi: 10.1017/s0950268801005878. PMID: 11693514; PMCID: PMC2869756.

Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Martínez de Artola V, Márquez FJ, Portillo A, Raoult D, Anda P. *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Apr; 10(4):327-31. doi: 10.1111/j.1198-743X.2004.00782.x. PMID: 15059122.

Oteo JA, Portillo A, Blanco JR, Ibarra V, Pérez-Martínez L, Izco C, Pérez-Palacios A, Jiménez S. Low risk of developing human *Rickettsia aeschlimannii* infection in the north of Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec; 1063:349-51. doi: 10.1196/annals.1355.057. PMID: 16481540.

Oteo JA, Nava S, Sousa Rd, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, Labruna MB, Zavala-Castro J; RIICER. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas [Latinamerican guidelines for diagnosis of tick-borne rickettsioses]. *Rev Chilena Infectol.* 2014 Feb; 31(1):54-65. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182014000100009. PMID: 24740776.

Oteo JA, Corominas H, Escudero R, Fariñas-Guerrero F, García-Moncó JC, Goenaga MA, Guillén S, Mascaró JM, Portillo A. Executive summary of the consensus statement of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), Spanish Society of Neurology (SEN), Spanish Society of Immunology (SEI), Spanish Society of Pediatric Infectology (SEIP), Spanish Society of Rheumatology (SER), and Spanish Academy of Dermatology and Venereology (AEDV), on the diagnosis, treatment and prevention of Lyme borreliosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2023 Jan; 41(1):40-45. doi: 10.1016/j.eimce.2022.11.011. PMID: 36621247.

Palomar AM, Santibáñez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jul; 18(7):1188-91. doi: 10.3201/eid1807.111777. PMID: 22709801; PMCID: PMC3376802.

Palomar AM, Portillo A, Santibáñez P, Mazuelas D, Arizaga J, Crespo A, Gutiérrez Ó, Cuadrado JF, Oteo JA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerg Infect Dis*. 2013a Feb; 19(2):260-3. doi: 10.3201/eid1902.121193. PMID: 23347801; PMCID: PMC3559059.

Palomar AM, García-Álvarez L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. Detection of tick-borne '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013b. *Parasit Vectors*. 2014 Jan 31; 7:57. doi: 10.1186/1756-3305-7-57. PMID: 24484637; PMCID: PMC3912351.

Palomar AM, Portillo A, Eiros JM, Oteo JA. The risk of introducing tick-borne encephalitis and Crimean-Congo hemorrhagic fever into southwestern Europe (Iberian peninsula). *Virology II – Advanced Issues*, iConcept Press Ltd (2013c). Retrieved from <https://www.iconceptpress.com/book/virology-ii-advanced-issues/11000086/>.

Palomar AM. Role of birds in dispersal of ticks and their microorganisms [Dissertation]. Logroño: Universidad de La Rioja; 2017. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=46014>

Parola P, Jourdan J, Raoult D. Tick-borne infection caused by *Rickettsia africae* in the West Indies. *N Engl J Med*. 1998 May 7; 338(19):1391. doi: 10.1056/NEJM199805073381918. PMID: 9575061.

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 2001 Mar 15;32(6):897-928. doi: 10.1086/319347. Epub 2001 Mar 14. Erratum in: *Clin Infect Dis* 2001 Sep 1;33(5):749. PMID: 11247714.

Pastrone L, Curtoni A, Criscione G, Scaiola F, Bottino P, Guarrasi L, Iannaccone M, Timke M, Costa C, Cavallo R. Evaluation of two different preparation protocols for MALDI-TOF MS nontuberculous mycobacteria identification from liquid and solid media. *Microorganisms*. 2023 Jan 3; 11(1):120. doi: 10.3390/microorganisms11010120. PMID: 36677412; PMCID: PMC9866535.

Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2015 Jan; 61(1):100-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770. Epub 2014 Oct 2. PMID: 25278500.

Paules CI, Marston HD, Bloom ME, Fauci AS. Tickborne diseases - confronting a growing threat. *N Engl J Med*. 2018 Aug 23; 379(8):701-703. doi:

10.1056/NEJMp1807870. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30044925.

Peris-García J, Cuadrado-Pastor JM, Jover-Díaz F, Botas-Velasco M. Probable caso de anaplasmosis humana importada [Probable case of imported human anaplasmosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007 Dec; 25(10):656-7. Spanish. doi: 10.1157/13112945. PMID: 18053479.

Portillo A, Santos AS, Santibáñez S, Pérez-Martínez L, Blanco JR, Ibarra V, Oteo JA. Detection of a non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec; 1063:333-6. doi: 10.1196/annals.1355.053. PMID: 16481536.

Portillo A, Oteo JA. New tools, new tick-borne diseases? *World J Clin Infect Dis* 2015a; 5(3): 51-54

Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Palomar AM, Oteo JA. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect*. 2015b Nov-Dec; 17(11-12):834-8. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.009. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26384814.

Portillo A, Ruiz-Arrondo I, Oteo JA. Arthropods as vectors of transmissible diseases in Spain. *Med Clin (Engl Ed)*. 2018a Dec 14; 151(11):450-459. doi: 10.1016/j.medcle.2018.10.008. Epub 2018 Nov 13. PMID: 32289078; PMCID: PMC7140251.

Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Santibáñez S, Oteo JA. ‘*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis’ in Europe. *New Microbes New Infect*. 2018b Jan 6; 22:30-36. doi: 10.1016/j.nmmi.2017.12.011. PMID: 29556406; PMCID: PMC5857181.

Portillo A, Palomar AM, de Toro M, Santibáñez S, Santibáñez P, Oteo JA. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for diagnosis. *PLoS One*. 2019 Mar 19; 14(3):e0213384. doi: 10.1371/journal.pone.0213384. PMID: 30889229; PMCID: PMC6424421.

Portillo A, Palomar AM, Santibáñez P, Oteo JA. Epidemiological Aspects of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Western Europe: What about the Future? *Microorganisms*. 2021 Mar 21; 9(3):649. doi: 10.3390/microorganisms9030649. PMID: 33801015; PMCID: PMC8003855.

Revilla-Martí P, Cecilio-Irazola Á, Gayán-Ordás J, Sanjoaquín-Conde I,

Linares-Vicente JA, Oteo JA. Acute myopericarditis associated with tickborne *Rickettsia sibirica mongolitimonae*. Emerg Infect Dis. 2017 Dec; 23(12):2091-2093. doi: 10.3201/eid2312.170293. PMID: 29148392; PMCID: PMC5708254.

Rothen J, Githaka N, Kanduma EG, Olds C, Pflüger V, Mwaura S, Bishop RP, Daubenberger C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for comprehensive indexing of East African ixodid tick species. Parasit Vectors. 2016 Mar 15; 9:151. doi: 10.1186/s13071-016-1424-6. PMID: 26979606; PMCID: PMC4792108.

Rovero C, Brouqui P, Raoult D. Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis. 2008 Sep; 14(9):1360-7. doi: 10.3201/eid1409.071133. PMID: 18760001; PMCID: PMC2603122.

Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2011 Mar; 49(3):887-92. doi: 10.1128/JCM.01890-10. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21209160; PMCID: PMC3067728.

Sakurada N, Fukuo T, Arakawa R, Ute K, Hatada K. 1998. Characterization of poly(methyl methacrylate) by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. A comparison with supercritical fluid chromatography and gel permeation chromatography. Rapid Commun Mass Spectrom 12:1895.

Sánchez M, Venturini M, Blasco A, Lobera T, Bartolomé B, Oteo JA. Tick bite anaphylaxis in a patient allergic to bee venom. J Investig Allergol Clin Immunol. 2014; 24(4):284-5. PMID: 25219117.

Sánchez-Juanes F, Calvo Sánchez N, Belhassen García M, Vieira Lista C, Román RM, Álamo Sanz R, Muro Álvarez A, Muñoz Bellido JL. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry to the identification of parasites and arthropod vectors of human diseases. Microorganisms. 2022 Nov 20; 10(11):2300. doi: 10.3390/microorganisms10112300. PMID: 36422371; PMCID: PMC9695109.

Sánchez-Seco MP, Sierra MJ, Estrada-Peña A, Valcárcel F, Molina R, de Arellano ER, Olmeda AS, San Miguel LG, Jiménez M, Romero LJ, Negrodo A; Group for CCHFv Research. Widespread detection of multiple strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Spain. Emerg Infect Dis. 2021 Feb; 28(2):394-402. doi: 10.3201/eid2802.211308. PMID: 35076008; PMCID: PMC8798670.

Santibáñez S, Portillo A, Ibarra V, Santibáñez P, Metola L, García-García C, Palomar AM, Cervera-Acedo C, Alba J, Blanco JR, Oteo JA. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics in a large series of patients affected by *Dermacentor*-Borne-Necrosis-Erythema-Lymphadenopathy from a unique centre from Spain. *Pathogens*. 2022 Apr 30; 11(5):528. doi: 10.3390/pathogens11050528. PMID: 35631049; PMCID: PMC9146834.

Saretta F, Giovannini M, Mori F, Arasi S, Liotti L, Pecoraro L, Barni S, Castagnoli R, Mastroianni C, Caminiti L, Marseglia GL, Novembre E. Alpha-Gal Syndrome in children: peculiarities of a “tick-borne” allergic disease. *Front Pediatr*. 2021 Dec 23; 9:801753. doi: 10.3389/fped.2021.801753. PMID: 35004549; PMCID: PMC8732990.

Schindler, P. A., Van Dorsselaer, A., Falick, A. M. Analysis of hydrophobic proteins and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem*. 1993, 213, 256–263.

Schwameis M, Kündig T, Huber G, von Bidder L, Meinel L, Weisser R, Aberer E, Härter G, Weinke T, Jelinek T, Fätkenheuer G, Wollina U, Burchard GD, Aschoff R, Nischik R, Sattler G, Popp G, Lotte W, Wiechert D, Eder G, Maus O, Staubach-Renz P, Gräfe A, Geigenberger V, Naudts I, Sebastian M, Reider N, Weber R, Heckmann M, Reisinger EC, Klein G, Wantzen J, Jilma B. Topical azithromycin for the prevention of Lyme borreliosis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 efficacy trial. *Lancet Infect Dis*. 2017 Mar; 17(3):322-329. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30529-1. Epub 2016 Dec 20. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2017 Nov 21; PMID: 28007428.

Shah, HN, Gharbia SE. *Mass spectrometry for microbial proteomics*. Edited por Shah HN & Gharbia SE: John Wiley and Sons Ltd. 2010

Silaghi C, Santos AS, Gomes J, Christova I, Matei IA, Walder G, Domingos A, Bell-Sakyi L, Sprong H, von Loewenich FD, Oteo JA, de la Fuente J, Dumler JS. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in diagnosis and epidemiological studies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017 Jan; 17(1):12-22. doi: 10.1089/vbz.2016.1960. PMID: 28055579.

Sleno L, Volmer DA. Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20(10):1517-24. doi: 10.1002/rcm.2498. PMID: 16628567.

Smolira A, Wessely-Szponder J. Importance of the matrix and the matrix/sample ratio in MALDI-TOF-MS analysis of cathelicidins obtained from porcine neutrophils. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 Feb; 175(4):2050-65. doi: 10.1007/s12010-014-1405-1. Epub 2014 Nov 29. PMID: 25432341; PMCID: PMC4322226.

Soneshinke DE, Roe RM: *Biology of Ticks*, volumen 1. Editado por Soneshinke DE & Roe RM: Oxford & New York: Oxford University Press. 2014.

Sousa Rd, França A, Dória Nóbrega S, Belo A, Amaro M, Abreu T, Poças J, Proença P, Vaz J, Torgal J, Bacellar F, Ismail N, Walker DH. Host and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15; 198(4):576-85. doi: 10.1086/590211. PMID: 18582199; PMCID: PMC2614375.

Süss J, Klaus C, Gerstengarbe FW, Werner PC. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med*. 2008 Jan-Feb; 15(1):39-45. doi: 10.1111/j.1708-8305.2007.00176.x. PMID: 18217868.

Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Oct; 19(4):708-27. doi: 10.1128/CMR.00011-06. PMID: 17041141; PMCID: PMC1592693.

Tian D, Zheng T. Comparison and analysis of biological agent category lists based on biosafety and biodefense. *PLoS One*. 2014 Jun 30; 9(6):e101163. doi: 10.1371/journal.pone.0101163. PMID: 24979754; PMCID: PMC4076228.

Tokarz R, Lipkin WI. Discovery and Surveillance of Tick-Borne Pathogens. *J Med Entomol*. 2021 Jul 16; 58(4):1525-1535. doi: 10.1093/jme/tjaa269. PMID: 33313662; PMCID: PMC8285023.

Towers MW, McKendrick JE, Cramer R. Introduction of 4-chloro-alpha-cyanocinnamic acid liquid matrices for high sensitivity UV-MALDI MS. *J Proteome Res*. 2010 Apr 5; 9(4):1931-40. doi: 10.1021/pr901089j. PMID: 20148516.

Tribaldos M, Zaldivar Y, Bermudez S, Samudio F, Mendoza Y, Martinez AA, Villalobos R, Ereemeeva ME, Paddock CD, Page K, Smith RE, Pascale JM. Rocky Mountain spotted fever in Panama: a cluster description. *J Infect Dev Ctries*. 2011 Oct 13; 5(10):737-41. doi: 10.3855/jidc.2189. PMID: 21997944.

Valcárcel F, González J, González MG, Sánchez M, Tercero JM, Elhachimi

L, Carbonell JD, Olmeda AS. Comparative Ecology of *Hyalomma lusitanicum* and *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (*Acarina: Ixodidae*). Insects. 2020 May 13; 11(5):303. doi: 10.3390/insects11050303. PMID: 32414220; PMCID: PMC7290797.

Van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? Ann Lab Med. 2017 Nov;37(6):475-483. doi: 10.3343/alm.2017.37.6.475. PMID: 28840984; PMCID: PMC5587819.

Venturini M, Lobera T, Portillo A, Oteo JA, Blasco A, González I. Sensibilización a α -gal en pacientes con múltiples picaduras de garrapata en La Rioja. J Invest Allergol Clin Immunol. 2013; 23 Supplement 2:165-203.

Venturini M, Lobera T, Sebastián A, Portillo A, Oteo JA. IgE to α -Gal in foresters and forest workers from La Rioja, north of Spain. J Invest Allergol Clin Immunol. 2018; 28(2):106-112. doi: 10.18176/jiaci.0218. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29235434.

Vorm O, Roepstorff P, Mann M. 1994 Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. Anal. Chem. 66, 3281-3287. doi:10.1021/ac00091a044

Wang CC, Lai YH, Ou YM, Chang HT, Wang YS. Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2016 Oct 28; 374(2079):20150371. doi: 10.1098/rsta.2015.0371. PMID: 27644968; PMCID: PMC5031637.

Wang T, Zhang S, Pei T, Yu Z, Liu J. Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications. Parasit Vectors. 2019 Sep 13; 12(1):451. doi: 10.1186/s13071-019-3705-3. PMID: 31519208; PMCID: PMC6743180.

Westmacott G, Ens W, Hillenkamp F, Dreisewerd K, Schurenberg M. 2002 The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom. 221, 67-81. (doi:10.1016/S1387-3806(02)00898-9)

Whitelegge, J. P.; Halgand, F.; Souda, P.; Zabrouskov, V. Topdown mass spectrometry of integral membrane proteins. Exp. Rev. Proteomics 2006, 3,

585–596.

Wiangnon K, Cramer R. Sample preparation: a crucial factor for the analytical performance of rationally designed MALDI matrices. *Anal Chem*. 2015 Feb 3; 87(3):1485-8. doi: 10.1021/ac504412p. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25597381.

Wormser GP, Warshafsky S, Visintainer P. Aggregation of data from 4 clinical studies demonstrating efficacy of single-dose doxycycline postexposure for prevention of the spirochetal infections: Lyme disease, syphilis, and tick-borne relapsing fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Apr; 99(4):115293. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115293. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33360515.

Yao J, Scott JR, Young MK, Wilkins CL. 1998 Importance of matrix: analyte ratio for buffer tolerance using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 9, 805–813. doi:10.1016/s1044-0305(98)00046-4

Yuan C, Yang Q, Wu J, Peng Y, Li Y, Xiong S, Zhou J, Wang M, Hu Z, Zou Z, Xia Q. Proteomics reveals the hemolymph components of partially fed *Hyalomma asiaticum* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2022 Aug 28; 13(6):102032. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102032. Epub ahead of print. PMID: 36088665.

Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, Raoult D, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb; 51(2):522-8. doi: 10.1128/JCM.02665-12. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23224087; PMCID: PMC3553915.

Yssouf A, Almeras L, Terras J, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015a Feb 6; 9(2):e0003473. doi: 10.1371/journal.pntd.0003473. PMID: 25659152; PMCID: PMC4319929.

Yssouf A, Almeras L, Berenger JM, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015b Jul; 6(5):579-86. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.013. Epub 2015 May 6. PMID: 26051210.

Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol*. 2016; 11(4):549-66. doi: 10.2217/fmb.16.5.

Epub 2016 Apr 12. PMID: 27070074.

Zhang W, Chait BT. 1997 Radial velocity distributions of molecular ions produced by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 160, 259–267. (doi:10.1016/S0168-1176(96)04526-0)

Zheng S, Doucette AA. Preventing N- and O-formylation of proteins when incubated in concentrated formic acid. *Proteomics.* 2016 Apr; 16(7):1059-68. doi: 10.1002/pmic.201500366. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26840995.

Zhou G, Xu X, Zhang Y, Yue P, Luo S, Fan Y, Chen J, Liu M, Dong Y, Li B, Kong J, Wen S, Liu A, Bao F. Antibiotic prophylaxis for prevention against Lyme disease following tick bite: an updated systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2021 Nov 8; 21(1):1141. doi: 10.1186/s12879-021-06837-7. PMID: 34749665; PMCID: PMC8573889.