

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

37.

Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología

2 0 1 0

Coordinador: Germán Bou Arévalo

**Autores: Ana Fernández Olmos
Celia García de la Fuente
Juan Antonio Saéz Nieto
Sylvia Valdezate Ramos**



ISBN-978-84-614-7932-0

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Métodos fenotípicos de identificación

2.1. Introducción

2.2. Objetivos y utilidad de los métodos fenotípicos de identificación

2.3. Fundamentos de la identificación fenotípica

2.4. Identificación

2.4.1. Características microscópicas

2.4.2. Características macroscópicas

2.4.2.1. Morfología

2.4.2.2. Hemólisis

2.4.3. Cultivo

2.4.3.1. Medios de cultivo

2.4.3.2. Requisitos de crecimiento

2.4.3.2.1. Atmósfera

2.4.3.2.2. Temperatura

2.4.3.2.3. Nutrición

2.4.4. Pruebas bioquímicas

2.4.4.1. Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata

2.4.4.1.1. Catalasa

2.4.4.1.2. Oxidasa

2.4.4.2. Pruebas rápidas, con lectura en menos de 6h

2.4.4.2.1. Hidrólisis del hipurato

2.4.4.2.2. β -galactosidasa (ONPG)

2.4.4.2.3. Aminopeptidasa

2.4.4.2.4. LAP

2.4.4.2.5. Ureasa

2.4.4.2.6. Indol

2.4.4.3. Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h

2.4.4.3.1. Óxido-Fermentación

2.4.4.3.2. Reducción de nitratos

2.4.4.3.3. Rojo de metilo

2.4.4.3.4. Voges-Proskauer

2.4.4.3.5. Agar hierro de Kligler

2.4.4.3.6. Fermentación de azúcares

2.4.4.3.7. Hidrólisis de la esculina

2.4.4.3.8. Coagulasa

2.4.4.3.9. Fenilalanina-desaminasa

2.4.4.3.10. ADNasa

2.4.4.3.11. Hidrólisis de la gelatina

2.4.4.3.12. Descarboxilasas

2.4.4.3.13. Lipasa

2.4.4.3.14. Lecitinasa

2.4.4.3.15. Utilización de citrato

2.4.4.3.16. Utilización de malonato

2.4.4.3.17. Prueba de CAMP

2.4.5. Pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias

2.4.5.1. Optoquina

2.4.5.2. Bacitracina

2.4.5.3. Solubilidad en bilis

2.4.5.4. Crecimiento en caldo hipersalino

2.5. Sistemas comerciales multipuebas

2.5.1. Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas

2.5.2. Sistemas comerciales automatizados

3. Métodos moleculares de identificación bacteriana

- 3.1. Introducción
- 3.2. Genes empleados como dianas moleculares para la identificación de bacterias
 - 3.2.1. ARNr 16S (*rrs*)
 - 3.2.2. ARNr 16S-23S y ARNr 23S
 - 3.2.3. *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa)
 - 3.2.4. *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa)
- 3.3. Fundamento de las técnicas de identificación molecular bacteriana
 - 3.3.1. Extracción del ADN cromosómico
 - 3.3.2. Amplificación
 - 3.3.3. Secuenciación del amplicón
- 3.4. Análisis de secuencias
- 3.5. Criterios para la interpretación de resultados
- 3.6. Indicaciones de la identificación molecular
 - 3.6.1. Identificación de cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento, o fenotípicamente atípicas
 - 3.6.2. Identificación de cepas de difícil identificación o de crecimiento fastidioso
 - 3.6.3. Descripción de nuevos patógenos
 - 3.6.4. Identificación de bacterias difíciles de cultivar
- 3.7. Desventajas de la identificación molecular
 - 3.7.1. Calidad disminuida de las secuencias depositadas en la base de datos y errónea asignación de especies
 - 3.7.2. Ausencia o baja correlación entre la identificación genotípica y fenotípica
 - 3.7.3. Baja resolución en la identificación mediante ARNr 16S
 - 3.7.4. Presencia de electroferogramas o cromatogramas de ADN mixtos
- 3.8. Nuevas tecnologías en la identificación molecular microbiana

4. Métodos proteómicos de identificación bacteriana

- 4.1. Introducción
- 4.2. Fundamento y variantes técnicas
 - 4.2.1. Espectrometría de masas
 - 4.2.2. Componentes del espectrómetro de masas
 - 4.2.3. Variantes de la espectrometría de masas
 - 4.2.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF
 - 4.2.5. Aplicaciones de la espectrometría de masas
 - 4.2.6. Plataformas comerciales de espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana
- 4.3. Procedimiento de trabajo
 - 4.3.1. Calibración
 - 4.3.2. Tratamiento previo de los microorganismos
 - 4.3.3. Transferencia a la tarjeta y adición de la matriz
 - 4.3.4. Análisis
- 4.4. Interpretación de los resultados
- 4.5. Indicaciones
- 4.6. Ventajas, inconvenientes y limitaciones
- 4.7. Control de Calidad
 - 4.7.1. Validación de plataformas comerciales
 - 4.7.2. Calibración y verificación rutinaria
 - 4.7.3. Mantenimiento
- 4.8. Otras aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF
 - 4.8.1. Análisis de muestras clínicas
 - 4.8.2. Resistencia a antimicrobianos y detección de genes de virulencia de los microorganismos
 - 4.8.3. Epidemiología

5. Bibliografía

- 5.1. Bibliografía. Métodos fenotípicos de identificación bacteriana.
- 5.2. Bibliografía. Métodos moleculares de identificación bacteriana
- 5.3. Bibliografía. Métodos de identificación bacteriana mediante espectrometría de masas

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-ID-01. Métodos fenotípicos de identificación bacteriana
2. PNT-ID-02. Métodos moleculares de identificación bacteriana
3. PNT-ID-03. Métodos de identificación bacteriana mediante espectrometría de masas

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

37. METODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 2010

Coordinador: Germán Bou Arévalo

**Autores: Ana Fernández Olmos
Celia García de la Fuente
Juan Antonio Saéz Nieto
Sylvia Valdezate Ramos**

1. INTRODUCCIÓN

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano.

De manera rutinaria, el laboratorio de microbiología aplica técnicas fenotípicas que permiten lograr los objetivos expuestos. Estos métodos están consolidados en los laboratorios de microbiología y en la práctica rutinaria diaria muestran algunas limitaciones que se observan de manera específica y más evidente para algún tipo de microorganismos. Los métodos moleculares permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios. Este hecho se debe a un coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia. En un futuro cercano el abaratamiento de los costes permitirá un uso más generalizado en los laboratorios de microbiología.

Por otra parte, en el trabajo diario de estos laboratorios se necesitan soluciones rápidas y eficaces para la identificación de los microorganismos de interés médico. Por ello, en los últimos años hemos asistido a un crecimiento importante en la oferta de métodos moleculares rápidos aplicados al diagnóstico microbiológico. En general, acortan los tiempos de respuesta de los denominados métodos convencionales ya que no dependen del cultivo. Sin embargo, suelen tener un coste superior, ya que requieren un equipamiento instrumental y personal cualificado de los que no se dispone en todos los laboratorios. Asimismo, la identificación molecular no es siempre accesible de forma inmediata y generalmente se utiliza conjuntamente con la identificación tradicional. Cada uno de los dos métodos, tomados en el momento adecuado, aporta soluciones de gran valor al microbiólogo clínico.

Recientemente los métodos basados en proteómica han irrumpido de manera importante en el campo del diagnóstico microbiológico y se está produciendo un cambio profundo en la forma de trabajar en los laboratorios de microbiología. La proteómica no es una ciencia nueva; su capacidad de resolver problemas biológicos y de ayudar a entender el funcionamiento del mundo microbiano data de hace varios años. Sin embargo, es notorio como su reciente implementación como arma diagnóstica en los laboratorios de microbiología está suponiendo una verdadera revolución en el

diagnóstico microbiológico, proceso, que sin duda va a tener un gran impacto en la organización futura de los Servicios de Microbiología.

En este documento se presentan tres maneras diferentes de abordar la identificación bacteriana: i) métodos fenotípicos o “tradicionales”, ii) métodos moleculares y iii) métodos basados en proteómica. Aunque no son los únicos, son los más importantes y los que mayor impacto tienen o tendrán en el trabajo diario del microbiólogo clínico.

2. MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

2.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características “observables” de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas. Los laboratorios deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado en su actividad diaria, que utilice de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie y que incluya la mayoría de las bacterias desde el punto de vista infeccioso.

2.2. OBJETIVOS Y UTILIDAD DE LOS MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN

En este apartado se revisan las técnicas de identificación fenotípica de las principales bacterias que pueden encontrarse en muestras clínicas y pretende ser una guía detallada del proceso de identificación. No incluiremos en este documento microorganismos con características especiales como son micobacterias, anaerobios, rickettsias, clamidias, micoplasmas y espiroquetas ya que son tratados específicamente en otros procedimientos.

Estas técnicas son dependientes del cultivo bacteriano y no son aplicables para identificación de bacterias directamente de las muestras.

En ningún caso, los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta. Únicamente indicarán cuál es el género y/o la especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer.

2.3. FUNDAMENTOS DE LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. En Microbiología Clínica, la experiencia y asociación entre el microorganismo y el sitio y tipo de infección es de gran ayuda en la identificación preliminar.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

a) Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, como la morfología en la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en diferentes atmósferas de incubación, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo, oxidasa y catalasa. Utilizando estas pocas pruebas generalmente es posible situar a las bacterias, de manera provisional, en uno de los principales grupos de importancia médica. A continuación se pueden seleccionar otros métodos con mayor poder de discriminación, ya que muchos microorganismos pueden presentar un aspecto muy similar en el examen macro y microscópico.

b) El segundo nivel de identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo. Tanto en este nivel como en el anterior, la hipótesis sobre la probable identidad de un microorganismo se apoya en las características del cultivo (por ejemplo atmósfera) y en pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Las pruebas primarias son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, fermentación de glucosa, producción de esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad. También deben tenerse en cuenta los datos clínicos. Esto dependerá, en gran medida, de un patrón estable de características fenotípicas y en la experiencia del microbiólogo.

c) Por último, la conclusión debe hacerse con la identificación a nivel de especie. El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas.

Si la identificación no pudiera hacerse usando este primer esquema, puede utilizarse una batería de

pruebas más amplia como las que se encuentra en diferentes sistemas comerciales. El resultado se coteja y compara con pruebas estandarizadas o en base a perfiles numéricos de identificación.

El inconveniente de este proceso es que resultados erróneos en las pruebas primarias pueden conducir a una identificación equivocada, perdiendo tiempo y recursos, y llevar también a un resultado erróneo.

2.4. IDENTIFICACIÓN

2.4.1. Características microscópicas. El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la identificación bacteriana.

Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso.

Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas:

- tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- cápsula: presente o ausente
- endosporas: ovales, esféricas, terminales, subterminales
- tamaño: cortos, largos, etc.
- bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- extremos: redondeados, puntiagudos
- disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
- formas irregulares: variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes, etc.

En algunos casos, la información derivada de las tinciones puede comunicarse inmediatamente al clínico, siendo de gran relevancia y utilidad como en tinciones del LCR en el diagnóstico de meningitis; tinciones de frotis uretrales en las infecciones de transmisión sexual, diagnóstico de infecciones por *Nocardia* spp. y otros actinomicetos, etc.

2.4.2. Características macroscópicas

2.4.2.1. Morfología. La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus

características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color.

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo) aunque en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas).

2.4.2.2. Hemólisis. Algunas bacterias producen hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. Esta hemólisis puede ser beta (zona clara alrededor de la colonia) o alfa (halo de color verdoso alrededor de la colonia).

2.4.3. Cultivo

2.4.3.1 Medios de cultivo. En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales.

En los Servicios de Microbiología Clínica se utilizan medios de cultivo líquidos y sólidos. En los medios líquidos las sustancias nutritivas se encuentran disueltas. Los medios sólidos suelen consistir en una base de agar, polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas y que forma un gel al enfriarse, que mantiene una alta humedad y contiene los elementos nutricionales necesarios. El cultivo sobre medios sólidos permite disponer fácilmente de las colonias bacterianas. Por otro lado, en medios líquidos, el crecimiento suele ser mayor porque la disponibilidad de nutrientes también es mayor. El uso de uno u otro tipo de medios depende del tipo de muestra y del patógeno que se busca. Según su capacidad para permitir el crecimiento microbiano se clasifican en medios básicos o generales, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales. También deben mencionarse los medios cromogénicos.

a) Medios básicos: son medios ricos en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras clínicas. Uno de los medios más utilizados en los laboratorios es el agar sangre.

b) Medios de enriquecimiento: están desarrollados para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Se utilizan para bacterias que no crecen en medios básicos. Los

más utilizados suelen ser medios líquidos como es el caldo de tioglicolato o el caldo cerebro corazón (BHI).

c) Medios selectivos: contienen sustancias como cloruro sódico a dosis elevadas, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares o antibióticos y antisépticos que fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras. Son de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta.

d) Medios diferenciales: se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de las colonias. Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. Por ejemplo, el agar MacConkey es un medio sólido que permite el crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Los primeros adoptan una coloración rosada que los diferencia de los segundos. Los medios diferenciales, además, pueden poner de manifiesto mezclas y contaminaciones en los cultivos.

e) Medios cromogénicos: en éstos se incorporan sustancias cromogénicas para detectar distintas enzimas producidas por los microorganismos. Cuando la bacteria produce el enzima, hidroliza el sustrato y se libera un compuesto cromogénico que adquiere un color intenso, dando color a la colonia. Estos enzimas pueden ser específicas de un género, una especie o de un grupo reducido de especies. En algunos casos la identificación presuntiva de las bacterias aisladas tiene una especificidad tan elevada que, en la práctica podría hacer innecesaria la realización de pruebas confirmatorias.

En muchas ocasiones los medios de cultivo entran en más de una categoría de las anteriores. No es infrecuente el empleo de medios de enriquecimiento que son a su vez selectivos para algunos microorganismos. También se usan medios que son diferenciales y selectivos al mismo tiempo, es el caso del agar manitol, selectivo para bacterias del género *Staphylococcus* y diferencial para *Staphylococcus aureus* (fermenta el manitol y sus colonias aparecen de color amarillo sobre el agar como resultado de la acidificación del medio). Los medios con capacidad simultánea de seleccionar y diferenciar microorganismos ofrecen grandes ventajas en el diagnóstico microbiológico porque ahorran tiempo y orientan decisivamente hacia el resultado definitivo. En la actualidad la mayoría de los medios pueden adquirirse comercialmente de forma deshidratada (en polvo) o como placas y tubos con los medios ya preparados.

2.4.3.2. Requisitos de crecimiento.

2.4.3.2.1. Atmósfera. Las bacterias se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos:

- Aerobias estrictas, que crecen solo en presencia de oxígeno.
- Anaerobias estrictas, que solo crecen en ausencia de oxígeno.
- Facultativas, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

- Microaerofílicas, que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno.

- Capnofílicas, que requieren CO₂ adicional para crecer.

2.4.3.2.2. *Temperatura*. Se clasifican además en función de la temperatura necesaria para su crecimiento:

- Psicofílicas, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2-5°C (óptimo 10-30°C).

- Mesofílicas, crecen a temperaturas entre 10-45°C (óptimo 30-40°C).

- Termofílicas, crecen muy poco a 37°C (óptimo 50-60°C).

La mayoría de las bacterias encontradas en muestras clínicas son mesofílicas.

2.4.3.2.3. *Nutrición*. El estudio de los requerimientos nutricionales de un microorganismo se usa en la identificación. Tal es el caso de la capacidad para crecer en medios ordinarios, o con la adición de sangre, suero o glucosa. También por la necesidad de factores específicos de crecimiento como el factor X (hemina) y el factor V (NAD) en el caso de *Haemophilus* spp.

2.4.4. Pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (hay discos o tabletas comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado).

2.4.4.1. Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con lectura inmediata:

2.4.4.1.1. *Catalasa*. La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (negativa).

2.4.4.1.2. *Oxidasa*. Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie

bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

2.4.4.2. Pruebas rápidas, con lectura en menos de 6h:

2.4.4.2.1. *Hidrólisis del hipurato*. Demuestra la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipuricasa. Como indicador de la reacción se utiliza ninhidrina. Esta prueba se utiliza en la identificación de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus agalactiae*.

2.4.4.2.2. *β-galactosidasa (ONPG)*. Esta prueba demuestra la presencia de la enzima β-galactosidasa. Hay bacterias que a pesar de poseer enzimas que hidrolizan la lactosa (β-galactosidasas), no pueden actuar sobre ella porque les faltan las enzimas extracelulares apropiadas (permeasas). Para conocer si un microorganismo es productor de β-galactosidasa, basta añadir el compuesto orgánico O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) que es incoloro. Si la bacteria posee las enzimas hidrolizantes (β-galactosidasa), el compuesto se transforma en ortonitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo. Todas las bacterias fermentadoras lentas de la lactosa son β-galactosidasa positivas.

2.4.4.2.3. *Aminopectidasa: PYR*. La L-pirrolidonil-β-naftilamida sirve como sustrato para la detección de pirrolidonil peptidasa. Se utiliza principalmente en la identificación de *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus* spp. También en la diferenciación de *Staphylococcus lugdunensis* de otros estafilocos coagulasa negativa.

2.4.4.2.4. *LAP*. Se utiliza para la detección de la enzima leucina aminopectidasa (LAP) y es una de las pruebas para la identificación de cocos grampositivos catalasa negativa; diferencia específicamente los géneros *Aerococcus* y *Leuconostoc* de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, y *Pediococcus*.

2.4.4.2.5. *Ureasa*. Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado. La prueba también se utiliza para diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de

Moraxella spp. *Helicobacter pylori* y *Brucella* spp. también hidrolizan la urea. Esta prueba puede ayudar en la identificación de *Cryptococcus* spp. que produce un resultado positivo después de una incubación prolongada.

2.4.4.2.6. *Indol*. Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.

2.4.4.3. Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h:

2.4.4.3.1. *Óxido-Fermentación*. Mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno).

2.4.4.3.2. *Reducción de nitratos*. Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos. Se utiliza para asignar bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*, en la diferenciación de *Moraxella catarrhalis* del género *Neisseria* y en la identificación de bacilos grampositivos aerobios.

2.4.4.3.3. *Rojo de metilo*. El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido-mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos gramnegativos.

2.4.4.3.4. *Voges-Proskauer*. Permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiolica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el α -naftol. Se usa en la identificación a nivel de especie de bacilos entéricos gramnegativos, *Aeromonas* spp., y *Vibrio* spp.

2.4.4.3.5. *Agar hierro de Kligler*. Mediante esta prueba se puede determinar:

a. La capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico (en este caso glucosa, lactosa o ambas) incorporado en un medio de crecimiento básico.

b. Producción o no de gases: CO_2 e H_2 como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono.

c. Producción de ácido sulfhídrico (SH_2).

El medio de Kligler contiene como hidratos de carbono la glucosa y la lactosa. Existe otro medio, el *triple sugar iron* (TSI) que posee un tercer hidrato de carbono, la sacarosa.

2.4.4.3.6. *Fermentación de azúcares*. Las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H_2 o CO_2). Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH.

2.4.4.3.7. *Hidrólisis de la esculina*. Hay microorganismos con capacidad de hidrolizar la esculina en esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un compuesto castaño oscuro o negro. El citrato férrico actúa como indicador de la hidrólisis de la esculina. Si se añade bilis al medio se inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos del género *Streptococcus* pero no de la especie *Streptococcus bovis* y tampoco inhibe el crecimiento de microorganismos de los géneros *Enterococcus* y *Listeria*.

2.4.4.3.8. *Coagulasa*. Permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus*. La prueba de la coagulasa en tubo se puede leer tras incubación de 4h, pero si es negativa debe incubarse hasta 24h.

2.4.4.3.9. *Fenilalanina-desaminasa*. Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por la actividad enzimática de la fenilalanina desaminasa, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* por lo que se utiliza para separar estos tres géneros de otros géneros de enterobacterias.

2.4.4.3.10. *ADNasa*. Se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar enzimáticamente el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos.

2.4.4.3.11. *Hidrólisis de la gelatina*. Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas.

2.4.4.3.12. *Descarboxilasas*. La descarboxilación es un proceso en el cual las descarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que la descarboxilación de arginina da citrulina por acción de una dehidrolasa. Esta prueba se debe realizar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso se produce en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6,0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador a color violeta. Esta prueba se utiliza tanto en la identificación de bacilos gramnegativos como de bacilos y cocos grampositivos.

2.4.4.3.13. *Lipasa*. Se basa en la capacidad que tienen ciertas bacterias de descomponer las grasas en ácidos grasos y glicerol, por acción de la enzima lipasa.

2.4.4.3.14. *Lecitinasa*. La prueba de la lecitinasa pone de manifiesto la producción de dicha enzima por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la lecitina, sustancia orgánica nitrogenada y fosfatada, contenida principalmente en la yema de huevo.

2.4.4.3.15. *Utilización de citrato*. Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono.

2.4.4.3.16. *Utilización de malonato*. Pone de manifiesto la capacidad que poseen determinadas bacterias de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente liberación del catión, que en presencia de iones agua produce alcalinidad. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción tampón produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. Se utiliza en la diferenciación de especies entre las *Enterobacteriaceae*. La mayoría de las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* utilizan malonato de sodio.

2.4.4.3.17. *Prueba de CAMP*. Sirve principalmente para determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la β -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso. En esta prueba la hemólisis producida por algunos microorganismos se inhibe por la β -hemolisina de *S. aureus* (por ejemplo, la producción de fosfolipasa D de *Arcanobacterium haemolyticum* o la fosfolipasa E de *Rhodococcus* spp.)

2.4.5. Pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias

2.4.5.1. *Optoquina*. El clorhidrato de etilhidroxicupreína (optoquina) inhibe a muy baja concentración (5 $\mu\text{g/ml}$ o menos) el crecimiento de *S.*

pneumoniae, mientras que no afecta al crecimiento de otros *Streptococcus* alfa-hemolíticos.

2.4.5.2. *Bacitracina*. Esta prueba puede utilizarse como diagnóstico presuntivo en la identificación de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A de Lancefield, ya que, a diferencia de la mayoría de los estreptococos, suelen ser sensibles a bajas concentraciones de bacitracina.

2.4.5.3. *Solubilidad en bilis*. Se basa en la capacidad de determinadas especies bacterianas de lisarse en presencia de sales biliares, las más utilizadas de las cuales son el taurocolato y el desoxicolato de sodio. Ambas provocan un descenso de la tensión superficial, que, unido a la actuación de enzimas autolíticas, destruyen la célula. El efecto de esta enzima autolítica se pone de manifiesto sobre colonias de *S. pneumoniae* crecidas en medios sólidos, en las que se aprecia una umbilicación central, y también en colonias mucoides.

2.4.5.4. *Crecimiento en caldo hipersalino*. Determina la capacidad de algunos microorganismos de desarrollarse en medios de cultivo con una concentración de cloruro sódico del 6,5%.

2.5. SISTEMAS COMERCIALES MULTIPRUEBAS

Existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipruebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todas exigen unas condiciones precisas en cuanto al inóculo, modo de inoculación, incubación y lectura que, de no seguirse, pueden dar lugar a errores. Estos sistemas pueden ser manuales o estar automatizados.

2.5.1. Sistemas comerciales manuales o galerías multipruebas. Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. Para codificar el dígito de un trío de pruebas se establece el siguiente sistema:

- Si una prueba es negativa se asigna un valor 0 (cero) a la prueba.
- Si la primera prueba es positiva se asigna un valor de 1.
- Si la segunda prueba es positiva se asigna un valor de 2.
- Si la tercera prueba es positiva se asigna un valor de 4.

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a qué bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc.

2.5.2. Sistemas comerciales automatizados. Hay en el mercado galerías multipuebas, como las descritas en el apartado anterior pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un índice alto de fiabilidad, la identificación del microorganismo. Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.

3. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

3.1. INTRODUCCIÓN

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes *estables*, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia.

Posteriormente, y de forma simultánea a los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación, se han ido utilizando genes cuya secuencia permite una mayor precisión o una diferenciación intra-especie en grupos, biovariedades, genovariedades o similar.

Inicialmente, la identificación bacteriana basada en el análisis de las secuencias se hallaba limitada a determinados centros o laboratorios. En la actualidad y como consecuencia de la automatización,

simplificación del proceso y de la reducción de su coste, estas técnicas se han introducido en un mayor número de laboratorios. Este avance ha supuesto que en agosto de 2010 en las listas aprobadas de nomenclatura bacteriana el número de descripciones de nuevas especies alcance la cifra de 10.000 (<http://www.bacterio.cict.fr/number.html#total>).

3.2. GENES EMPLEADOS COMO DIANAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Se han utilizado una amplia variedad de genes como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones suficiente para realizar una identificación precisa. Sin embargo, en otras situaciones, la alta homología genética en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite utilizar el ARNr 16S como para la identificación a nivel de especie (o incluso de género). En estos casos, puede recurrirse a otros genes dianas.

3.2.1. ARNr 16S (*rrs*). El ARNr 16S es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosómico ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Análogo del ARNr 18S en eucariotas, ambos se denominan ARNr SSU (*small subunit*). La conservación del gen ARNr 16S se observó por primera vez en el género *Bacillus*. Posteriormente, en la década de los ochenta se comenzó a explorar el papel taxonómico de este gen y a definir sus capacidades, estableciendo en los microorganismos procariontes dos dominios (Archaea y Eubacteria). Posteriormente la última edición del Manual Bergey establece taxonómicamente dos dominios (Archaea y Bacteria). Hasta 2003, se contabilizaron 1115 géneros y 6185 especies de Bacteria y 79 géneros y 281 especies de Archaea. Cada mes suelen describirse alrededor de 70 especies nuevas.

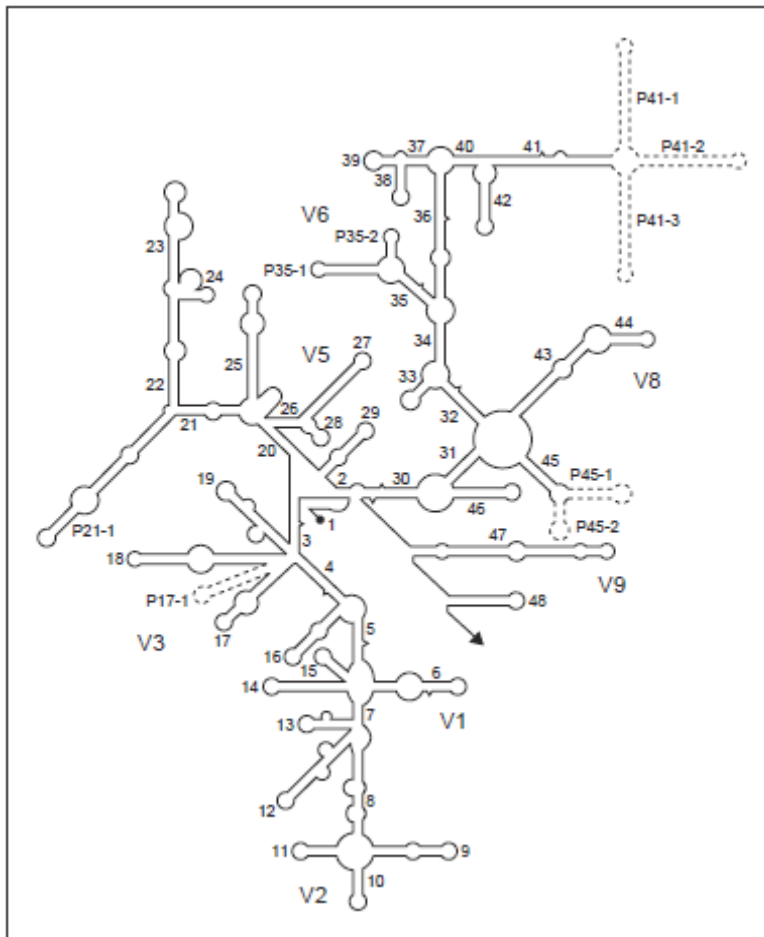
De distribución universal y componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Se caracteriza por la presencia de regiones variables especie-específicas. Las mutaciones en otros genes son mejor toleradas que en el ARNr 16S al afectar a estructuras no tan esenciales y únicas como él. Se desconoce la tasa de cambio en la secuencia del ARNr 16S, si bien su análisis indica una distancia evolutiva o de relación entre los microorganismos. No obstante, esta tasa de cambio difiere entre los diferentes grupos taxonómicos, entre el tiempo de evolución y entre las diferentes zonas de este gen. Así, se conoce que existen unas zonas de variabilidad que presentan acumulación de mutaciones, y que estas zonas son diferentes según las especies. Por el contrario, también se pueden encontrar los oligonucleótidos firma o secuencias específicas cortas comunes para los miembros de un mismo grupo filogenético.

Aunque el ARNr 16S constituye la diana de acción para algunos antimicrobianos y diferentes mutaciones conducen a la resistencia fenotípica, este hecho no invalida su utilización para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. De igual forma se puede utilizar el término ARNr 16S o la del gen codificante ADNr 16S, pero la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) recomienda la utilización del primero.

La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb, y se compone de 9 zonas variables V1-V9 y zonas conservadas (Figura 1). Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo inter-específico para diferenciar y establecer medidas

estadísticas válidas. Los cebadores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del gen. Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa. Generalmente, el análisis del ARNr 16S no es adecuado para estudios epidemiológicos o para la detección de factores de virulencia, al no presentar suficiente variabilidad génica. Una excepción descrita lo constituye la microheterogeneidad encontrada en *Neisseria meningitidis*, con aplicación epidemiológica.

Figura 1. Estructura secundaria del ARNr 16S. Las hélices, comunes a todos los seres vivos y denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48 en orden de aparición a partir del extremo 5'. Las hélices específicas de procariontes se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras



Tomado de Rodicio M, Mendoza MC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 Apr;22(4):238-45. Reproducido con permiso de Elsevier España.

El análisis de la secuencia del ARNr 16S constituye una herramienta muy útil en el estudio de la diversidad bacteriana en muestras clínicas y ambientales, por lo que se ha estudiado en un gran número de especies bacterianas. Aunque las secuencias disponibles en las bases de datos presentan un tamaño variable, suelen analizarse entre 500 y 1.500 pb. Actualmente, GenBank es la base de datos con mayor información ya que contiene más de 2 millones de secuencias depositadas del gen ARNr 16S. Es también interesante considerar cuando es necesario analizar la secuencia completa o cuando una secuencia de menor tamaño va a proporcionar información suficiente. Para diferenciar taxones específicos, establecer diferencias entre cepas o para describir nuevas especies, es necesario el análisis de la secuencia completa del ARNr 16S. Por el contrario, para la mayoría de los aislamientos clínicos, la secuencia de 500 pb proporciona una identificación adecuada (a menor coste), aumentando la posibilidad de encontrar diferencias cuanto mayor es el fragmento secuenciado (más diversidad por kilobase secuenciada). Hay que tener en cuenta, que las relaciones filogenéticas y los dendrogramas generados pueden ser similares, pero no idénticos en función del tamaño del fragmento del 16S analizado.

3.2.2. ARNr 16S-23S y ARNr 23S. También se han utilizado otras zonas del ARNr para la identificación y estudio de relaciones filogenéticas. Entre ellas las regiones del espacio intergénico del ARNr 16S-23S (ITS). Estas ITS se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos *rrn* (10 en *Bacillus subtilis*, 10 en *Clostridium perfringens*, 1 en *Mycobacterium* spp., 1-2 en *Mycoplasma* spp., etc). Las ITS presentan un tamaño variable entre diferentes especies (60-pb en *Thermoproteus tenax* a 1529-pb en *Bartonella elizabethae*). Este polimorfismo en el tamaño, también se presenta en cepas pertenecientes a una misma especie, como sucede en *S. aureus* (303-551-pb) y *Haemophilus influenzae* (478-723-pb). Además, estas variaciones en el tamaño de las ITS se producen por el número y tipo de genes ARNr que contienen, como sucede en la mayoría de bacterias gramnegativas que contienen ARNr^{Ala} y ARNr^{Ile}, mientras que otros contienen solo ARNr^{Glu} (*H. influenzae*, *Aeromonas hydrophila*). Por el contrario, bacterias grampositivas contienen ARNr^{Ala} o ARNr^{Ile} o ambos, o ningún gen ARNr. El análisis de las secuencias de las ITS ha demostrado una estructura en mosaico en diferentes especies (*H. parainfluenzae*, *C. difficile*, entre otros), con la presencia o ausencia de bloques de ~100-pb en las diferentes copias existentes en el genoma. En la identificación molecular de *Bacillus anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, la presencia de polimorfismos o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) en las posiciones 75 y 121 del ARNr^{Ile} incluido en la ITS completan la identificación de estas especies tan estrechamente relacionadas.

Este elevado grado de diversidad en las ITS en diferentes géneros, especies y cepas constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y/o tipificación.

Aunque en muchos casos se considera que la secuenciación de la fracción 23S puede ser una buena alternativa en los casos en los que la fracción 16S no proporciona resultados concluyentes, presenta una serie de inconvenientes que han sido evaluados por algunos autores. Además de incrementarse el coste, existen dificultades para la amplificación de fragmentos más grandes de forma rutinaria con propósitos taxonómicos. Un problema añadido es la existencia de abundantes secuencias de inserción (IS), que sin embargo pueden ser fácilmente localizadas y eliminadas mediante análisis comparativo, por lo que puede ser utilizado en la actualidad como un método auxiliar útil con fines taxonómicos y filogenéticos.

3.2.3. *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa).

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos. En bacterias es responsable de la síntesis del ARNm, ARNr y ARNt. La parte central de la RNAP (400kDa) está compuesta de 5 subunidades: el dímero α_2 , β , β' y ω .

La subunidad β , codificada por el gen *rpoB*, es el principal responsable de la actividad catalítica de la RNAP. Debido a su distribución universal en las bacterias se sugirió su aplicación como un cronómetro molecular de alta potencia. En 1993 y utilizando *S. aureus* se inició la secuenciación del gen *rpoB* con el objetivo de identificar molecularmente bacterias con repercusión clínica. Se presenta en monocopia, con alguna excepción, y tiene un tamaño variable según las especies desde 3.411 pb en *S. aureus* a 4.185 pb en *N. meningitidis*.

Las secuencias del *rpoB* presentan en numerosas ocasiones mayor calidad que las del ARNr 16S al ser secuencias que se han incluido más recientemente en las bases de datos. Su traslado a secuencias de aminoácidos, permiten detectar los errores de secuenciación que producen los codones de finalización erróneos. Además, la secuencia de aminoácidos deducida permite establecer agrupamientos de especies bacterianas.

Otro factor importante, es que existe mayor correlación en la similitud de la secuencia del *rpoB* con el criterio de inclusión en la misma especie de la hibridación ADN-ADN (DDH <70%). Este criterio no se cumple fácilmente para valores de similitudes del ARNr 16S superiores al 99%. Otra circunstancia favorable del análisis del *rpoB* es su aplicación como instrumento de genotipificación y de filogenia. Este hecho es consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se producen son silentes (tercera posición del codón) y que por su función de gen *housekeeping* probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética. No obstante en algunos casos, como en *Pseudomonas stutzeri*, se

ha demostrado el intercambio horizontal intraespecie de fragmentos génicos.

El gen *rpoB* contiene regiones conservadas y regiones alternas variables. Los cebadores de amplio espectro se diseñan sobre las regiones conservadas y suele incluirse una región interna variable. A diferencia del ARNr 16S, no se pueden utilizar cebadores universales para su amplificación. Sin embargo, se puede realizar un diseño de cebadores de amplio espectro que amplifique diferentes órdenes pertenecientes a un mismo *phylum* bacteriano.

La comparación de las secuencias del gen completo o de sus fragmentos del gen *rpoB* se realiza principalmente a través de las bases de datos del *GenBank* o de *BIBI*. Una secuencia parcial (300-750 pb) es suficiente para la identificación de aislamientos clínicos, mientras que para las nuevas especies se secuencia el gen completo. Se ha comprobado que el análisis del fragmento hipervariable (posiciones 2300-3300 pb) se correlaciona positivamente con el análisis del gen completo.

El gen *rpoB* constituye uno de los pocos genes candidatos útiles en la identificación bacteriana en los análisis taxonómicos y filogenéticos de cepas de origen humano, animal y ambiental. El gen *rpoB* permite la identificación a nivel de género, especie y en ocasiones a nivel de subespecie. Aunque no siempre, es también útil para diferenciar serovariedades biovariedades como sucede en *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

3.2.4. *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa). Es el gen codificante de la subunidad β de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del ADN bacteriano. De distribución universal, la presencia en monocopia de *gyrB* permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido-lácticas. Es un marcador de gran utilidad en la sistemática bacteriana al presentar una tasa de sustituciones sinónimas o silentes que se estima en al menos cuatro veces mayor que la del ARNr 16S.

La ADN girasa cataliza la interconversión de los isómeros topológicos del ADN. Está formada por dos monómeros de cada subunidad GyrA y GyrB, codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Interviene en el proceso de transcripción del ADN a través de su actividad de superenrollamiento, durante el que la subunidad β suministra la energía necesaria para la acción catalítica de la subunidad α por hidrólisis de ATP. Las reacciones que catalizan incluyen la formación de estructuras anudadas en ADN circular, en cadena sencilla y en doble cadena cerrada. La ADN girasa constituye la principal diana de las quinolonas, antimicrobianos que se unen al complejo ADN/ADN-girasa, inhibiendo la etapa de superenrollamiento negativo previo a la replicación. Sustituciones

aminoacídicas acontecidas principalmente en la subunidad α de la topoisomerasa II y su homóloga la topoisomerasa IV, conducen a fenotipos de resistencia a fluoroquinolonas.

El gen *gyrB* es un buen cronómetro molecular para realizar estudios filogenéticos en numerosos géneros, permitiendo establecer diferencias inter e intraespecie. Actualmente, constituye un marcador molecular relevante en la investigación de especies relacionadas, aventajando al ARNr 16S o a las regiones espaciadoras del ADN.

Por último, existe una gran variedad de genes con fragmentos conservados y regiones variables que se utilizan en numerosos grupos de bacterias, *hps65* (micobacterias), *recA* (genovariedades de *B. cepacia* complex), *hsp60* (codifica para la chaperonina 1, y se encuentra altamente conservado en numerosas bacterias, arqueas y eucariotas) y que constituyen una buena alternativa para estudios taxonómicos, evolutivos, de ecología y filogenia.

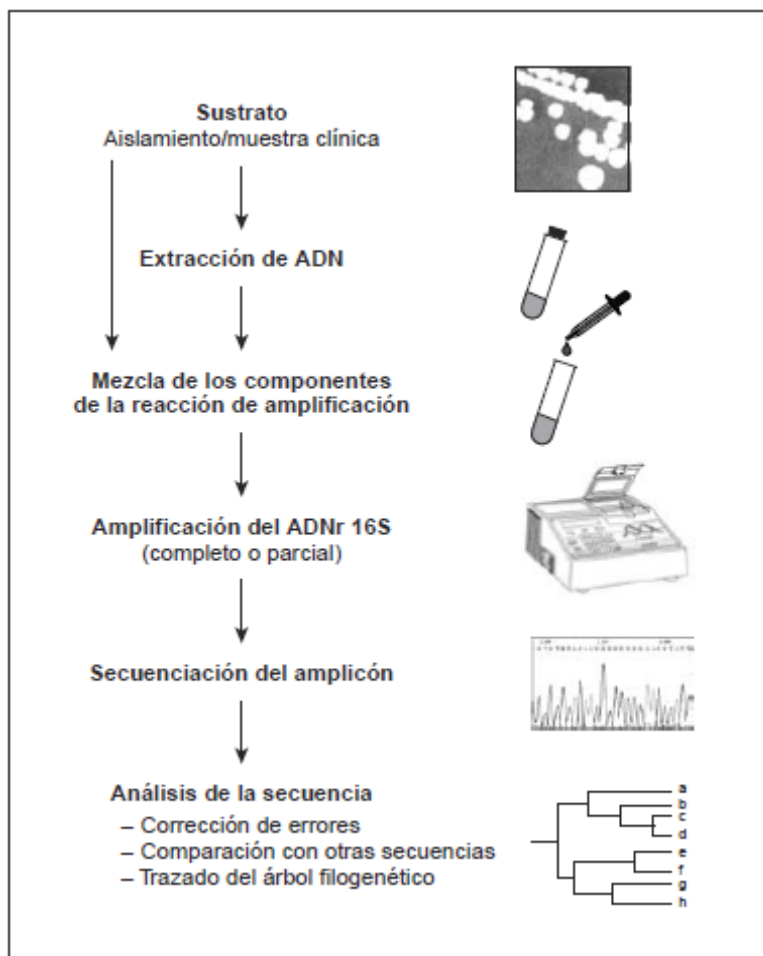
3.3. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA.

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes mencionados se basa en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y la amplificación. A continuación se describen las etapas metodológicas (Figura 2) a considerar en la identificación molecular.

3.3.1. Extracción del ADN cromosómico. Dependiendo de la rapidez en el diagnóstico y/o dificultad en el crecimiento del patógeno (bajo inóculo, lento crecimiento, requerimiento de medios sintéticos complejos, etc.), se podrán aplicar estas técnicas directamente sobre muestras clínicas o sobre el cultivo bacteriano. El ADN genómico se extraerá a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra clínica o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo de bacteria se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción cromosómica.

3.3.2. Amplificación. En un termociclador, este ADN se utilizará como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1.500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Con cebadores universales o de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, se amplificaría teóricamente el gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Ninguno de los cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garantice la amplificación de todos los procarionotes.

Figura 2. Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.



Tomado de Rodicio M, Mendoza MC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004 Apr;22(4):238-45. Reproducido con permiso de Elsevier España.

En estudios taxonómicos de determinados géneros o especies, con frecuencia se prefiere realizar un diseño de cebadores para los diferentes genes diana que presentan una mayor especificidad en el género o especie en cuestión. El diseño de nuevos cebadores se realiza en regiones conservadas para un género o una especie determinado.

Para confirmar una amplificación óptima, es imprescindible la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa. Debe observarse una sola banda (perteneciente a un único amplicón) con el tamaño adecuado. En el caso de amplificarse un amplicón con el tamaño deseado y otro con diferente tamaño, pueden utilizarse diferentes opciones: extracción del amplicón deseado del gel de agarosa, modificación de las condiciones de PCR o utilización de nuevos cebadores.

Los amplicones suelen purificarse con sistemas comerciales, ya sea el producto de PCR o la banda de electroforesis incluida en el gel. Aunque estos sistemas eliminan el exceso de cebadores y nucleótidos, debe someterse a una nueva electroforesis de confirmación.

3.3.3. Secuenciación del amplicón

El gran avance de los métodos de secuenciación ha permitido el conocimiento de un volumen

extraordinario de secuencias, obteniéndose con mayor rapidez y calidad. La secuenciación es un proceso análogo a la PCR, que utiliza el ADN como molde pero que los cebadores directo y reverso actúan en reacciones independientes. Estos cebadores pueden ser los mismos cebadores de amplificación u otros diseñados para esta etapa del ensayo. A diferencia de la PCR, no se genera un nuevo molde, sino que se reutiliza en los ciclos programados (25-35). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores y bases no marcadas, que se irán incorporando aleatoriamente a la síntesis. Los terminadores finalizan la síntesis de la secuencia, por lo que al final se obtiene una mezcla de productos de ADN de diferentes tamaños. Cada base (adenina, timina, guanina y citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe a diferente longitud de onda, detectándose posteriormente.

Los terminadores no incorporados se eliminan mediante la purificación del producto y el tamaño de cada uno se determina mediante electroforesis capilar. Según se va conociendo el tamaño y el terminador de cada fragmento (separados en gel o por elución) se determina la secuencia de bases representadas cada una por un color diferente y se editan de forma manual o automática. Las cadenas

de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria). Según el modelo de secuenciador, el tipo de capilar utilizado, y las variables en la secuenciación, es posible simplificar el proceso, reducir el tiempo de ensayo y el coste y aumentar el tamaño de la secuencia a analizar (500-900 bases).

3.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La observación del electroferograma (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores entre el electroferograma y la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, ó posiciones ambiguas (N). Para resolver estas situaciones se reedita visualmente el electroferograma y se corrige, y/o se alinean y ensamblan las secuencias directa y reversa en una secuencia consenso. Solamente aquellas secuencias que presentan <1% de indeterminaciones (~15 posiciones N, purinas R, pirimidinas Y) se consideran para el análisis. En ocasiones se hace necesaria la repetición del ensayo debido a que el microorganismo inicial no se encontraba en cultivo puro, por baja concentración del extracto cromosómico o del producto de PCR, etc.

En el caso del análisis del ARNr 16S, el operón ribosómico (conjunto de genes que se transcriben a partir de una misma región promotora) en el genoma bacteriano se presenta en diferente número de copias (1-15), permaneciendo en cierto grado constante a nivel de familia, género y especie. Entre las diferentes copias del ARNr 16S perteneciente a una misma cepa, se detecta una variabilidad intragénica o microheterogeneidad, que hacen que determinadas posiciones del electroferograma sea ocupado por dos nucleótidos diferentes. En la mayoría de los casos, esta variación alélica en las copias del ARNr 16S para una misma cepa es de 1 o 2 polimorfismos y no conduce a la identificación de especies diferentes. Una solución de consenso que refleja este polimorfismo intracelular (no la presencia de diferentes fenotipos y/o genotipos), es la asignación según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como sigue: R (GA), Y (TC), W (AT), M (AC), S (GC) ó K (GT) entre las más frecuentes.

A continuación, la secuencia consenso se introduce en bases de datos *online* de acceso público o privado, con el objetivo de identificar la cepa problema mediante la comparación con otras secuencias depositadas en estas bases. Actualmente, la base de datos que presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes, y tipo y número de secuencias depositadas es la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias. Además, GenBank contiene una sección de taxonomía (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) que incluye

información y secuencias sobre más de 160.000 organismos. Otras bases de datos ampliamente utilizadas en el análisis de secuencias del ARNr 16S son:

- BIBI *Bioinformatic Bacterial Identification* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>), programa que automatiza y simplifica las identificaciones bacterianas utilizando diferentes genes y diferentes niveles de exigencia en la identificación
- *Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)
- *Smart Gene IDNS* (<http://www.smartgene.ch>)
- *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms* (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>)
- *Ribosomal Data-base Project* (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

- Además existen bases de datos de acceso privado como MicroSeq 500 (Applied Biosystems; Foster City, E.E.U.U.) que contiene secuencias de 527-pb del ARNr 16S de más de 1,434 especies o subespecies de 235 géneros.

Otras utilidades que ofrecen estas bases de datos son la construcción de árboles filogenéticos, el diseño de cebadores, el análisis de polimorfismos o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), etc... Gran parte de ellos están disponibles en la página http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/softw_are.html

3.5. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La introducción de la secuencia problema y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabaja proporciona un informe constituido por varias secciones. En el caso del programa BLAST del GenBank, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o *query* frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (*identity*). En el caso de desear más información sobre el microorganismo(s) con el cuál muestra mayor identidad, es necesario posicionarse en la parte superior del alineamiento, donde aparece indicado el número de acceso del GenBank y puede accederse directamente a PubMed.

Es necesario advertir que la comparación de secuencias se ve afectada por el tamaño de las secuencias analizadas y el tipo de alineamiento utilizado, por lo que se valorara conjuntamente con el porcentaje de similitud o de su contrario. Existen diferentes criterios en el porcentaje de similitud del ARNr 16S para la pertenencia o no a una misma especie, desde ≤0,5% a 2%. En ocasiones el criterio depende del género y/o especie en estudio. De esta forma, genogrupos con características fenotípicas exclusivas y <1% de diferencias en la secuencia del ARNr 16S se han reasignado en nuevas especies.

Existen criterios para la interpretación de los resultados disponibles en las guías del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Una actitud de consenso es aceptar que una similitud del $\geq 98,5\%$ define una especie, y tasas del $\geq 95\%$ al 99% definen un género. Sin embargo definir la especie o el género a través de un valor para el ARNr 16S puede no ser apropiado para todos los géneros.

La microheterogeneidad dentro de una misma especie para la secuencia del ARNr 16S, diferencias de unas pocas bases o $< 0,5\%$, - serovariedades, variación intraespecie, subespecie -, permite en algunos casos distinguir un fenotipo o aspecto de virulencia importante, una especificidad de nicho, y/o

realizar estudios epidemiológicos o de seguimiento. Un ejemplo lo constituye la secuenciación del gen *emm* (codifica la proteína M) en *Streptococcus pyogenes* ya que las diferencias indican los distintos serotipos.

Se considera que el gen *rpoB* es el gen más adecuado para la identificación y discriminación filogenética a nivel de especies y subespecies, analizando la secuencia situada entre las posiciones 2300-3300. Según el tamaño del fragmento del *rpoB* se establecen diferentes puntos de corte para la asignación de especie: 300-600 pb se corresponde con $\geq 94\%$; 600-825 pb una similitud $\geq 96\%$ (Tabla 1).

Tabla 1. Recomendaciones para la utilización del análisis del ARNr 16S y del gen *rpoB* en la identificación bacteriana.

Categoría	Recomendaciones
Cepas a secuenciar	Cepas con escasa descripción Cepas con baja frecuencia de aislamiento Cepas con fenotipos atípicos Cepas de difícil identificación fenotípica Cepas de crecimiento lento o fastidioso Nuevos patógenos Bacterias de difícil cultivo
Análisis del ARNr 16S	Mínimo: $>98,5\%$ similitud Ideal: 1.300 a 1.500 pb secuenciadas $<1\%$ posiciones ambiguas
Criterio para la identificación de especie	Mínimo: $>98,5\%$ similitud Ideal: $>99\%$ similitud Comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que posee estudios de homología de ADN. Para diferencias $<0,5\%$ a la especie más cercana, considerar otras propiedades (fenotipo)
Criterio para la identificación de género	Rango de similitud $95\%-100\%$
Criterio para la asignación de familia	Similitud $< 95\%$
Análisis retrospectivo de la identificación fenotípica	Morfología de la colonia Tinción Gram Catalasa/Oxidasa Perfil bioquímico Requerimientos nutricionales
Análisis del <i>rpoB</i>	Fragmento hipervariable 2300-3300 pb
Criterio para la identificación de especie	Según tamaño del fragmento secuenciado 300-600 pb: una similitud $\geq 94\%$ 600-825 pb: una similitud $\geq 96\%$
Criterio para la identificación de género	Distinto género: una similitud $<85,5\%$
Criterio para la identificación de nueva especie/subespecie bacteriana	Nueva especie: una similitud $>97,7\%$ Nueva subespecie: una similitud $98,2\%$

Frecuentemente, las comparaciones entre las diferentes secuencias se muestran mediante los alineamientos lineales y dendrogramas. Esta opción es proporcionada por BLAST, BIBI y otros programas como PAUP (<http://paup.csit.fsu.edu/>) o Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.htm>). En la realización de los dendrogramas se utilizan diferentes algoritmos: el método NJ (*neighbor-joining*), el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) y en ocasiones el WPGMA (*weighted pair group method with arithmetic averages*). Los principales agrupamientos se mantienen si las cepas se hallan muy relacionadas. Si la relación es más débil, la apariencia del dendrograma se modifica según el programa utilizado. Otro factor que afecta a la comparación en el dendrograma es la selección del *outgroup* (será una cepa relacionada pero fuera del grupo comparado, frente a la cual se realiza la primera comparación). Si el *outgroup* no es adecuado, las diferencias entre los grupos del dendrograma se pueden minimizar.

En muchos de los análisis filogenéticos realizados se observa, que los árboles realizados con las secuencias del *rpoB* son más robustos que los obtenidos con las secuencias del ARNr 16S (menores valores de *bootstraps*), permitiendo identificar diferentes *clusters* en los géneros *Mycobacterium*, *Acinetobacter* y otros.

3.6. INDICACIONES DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

En la práctica de la microbiología clínica se producen una serie de circunstancias en las que es útil la identificación bacteriana mediante métodos moleculares. Entre ellas están la dificultad en el aislamiento, el crecimiento lento, la baja actividad en las pruebas bioquímicas, ausencia o baja efectividad de técnicas serológicas, etc. Estas situaciones y la necesidad de obtener resultados reproducibles e intercambiables entre laboratorios confieren a las técnicas moleculares, y en especial al ARNr 16S y al *rpoB*, un gran protagonismo.

3.6.1. Identificación de cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento, o fenotípicamente atípicas. En estas circunstancias la práctica clínica se ve beneficiada por la identificación mediante ARNr 16S, aventajando en rapidez y exactitud a una amplia variedad de sistemas como los perfiles de ácidos grasos celulares, la utilización de fuentes de carbono y otras identificaciones convencionales.

3.6.2. Identificación de cepas de difícil identificación fenotípica o de crecimiento fastidioso. Tal es el caso de la dificultad para diferenciar fenotípicamente las especies de *Nocardia* y de *Mycobacterium*. Sin embargo, esta identificación no es completa para algunas especies de micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias del grupo tuberculosis; *M. chelonae* y *M. abscessus*; *M. avium* y *M. paratuberculosis*), por lo que entre otros genes se recurre al *rpoB* de gran

utilidad en la identificación de especies pertenecientes a grupos muy homogéneos.

3.6.3. Descripción de nuevos patógenos . La hibridación ADN-ADN se considera el *gold standard* en la propuesta de nuevas especies y la definitiva asignación taxonómica de una cepa. En base a la cinética de reasociación del ADN-ADN se cuantifica la definición genética de especies cuando existe $\geq 70\%$ de homología ADN-ADN y $\leq 5^{\circ}\text{C}$ en la ΔT_m para la estabilidad de las moléculas del heteroduplex. Sin embargo, el elevado tiempo necesario para la realización de la técnica, el trabajo invertido y su elevado coste hace que cada vez menos laboratorios realicen esta técnica. Y así la mayoría de los estudios que describen las nuevas especies se basan en las secuencias SSU y otros datos polifásicos.

Ningún otro gen como el ARNr 16S ha mostrado su amplia aplicabilidad en todos los grupos taxonómicos. Si el objetivo a alcanzar es la identificación de una bacteria desconocida sin existir conocimiento previo, el ARNr 16S es la mejor elección. El análisis del ARNr 16S constituye el eje principal sobre el que se estructuran las últimas ediciones del libro de referencia en taxonomía bacteriana *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Muchas de las nuevas especies de micobacterias (>60) de las 148 existentes han sido descritas gracias a la utilización de este gen y otros adicionales, y ha reasignado en nuevos grupos a las micobacterias de crecimiento lento y rápido.

Para la descripción de una nueva especie, se recomienda la presencia de diferencias fenotípicas claras y en la secuencia diferencias de >1 pb/100 bases. Si estas diferencias son >5%, se podría considerar la existencia de un nuevo género. Se estima que entre un 10%-20% de los aislamientos no coinciden con los microorganismos descritos y que puede tratarse de un género o especie nueva, pero en cepas obtenidas en la práctica clínica esta frecuencia es muy inferior.

La creciente relevancia del análisis del *rpoB* se manifiesta en dos situaciones: 1) el contenido bacteriano GC puede estimarse matemáticamente por el contenido GC del gen *rpoB* y 2) la similitud que presentan las secuencias *rpoB* de dos especies bacterianas se correlaciona de forma muy significativa con sus correspondientes valores de hibridación ADN-ADN (DDH) y con su identidad media en nucleótidos (ANI).

3.6.4. Identificación de bacterias difíciles de cultivar. La utilización de cebadores universales para el ARNr 16S en la muestra clínica es un paso que permite aumentar la concentración de ADN en bacterias difíciles de cultivar o con complejos requerimientos de cultivo, secuenciando después el amplicón, y constituye una estrategia eficiente si se detecta un solo microorganismo. De esta forma se ha podido constatar la presencia de *Bartonella quintana* y *Coxiella burnetii* como principales agentes etiológicos en endocarditis con cultivo negativo. En el caso de que la muestra posea un origen no estéril o proceda del medio ambiente, esta estrategia no es

eficiente. También es útil cuando existe tratamiento antimicrobiano y su cultivo es negativo. En situaciones de adherencia, diversidad o microorganismos desconocidos, el análisis del ARNr 16S, continúa siendo útil, como sucede en infecciones periodontales y biofilms, donde se combina el cebador directo universal y el reverso específico para espiroquetas. En el estudio de estas comunidades bacterianas, el *rpoB* también puede desempeñar un importante papel al presentarse en monocopia frente a la heterogeneidad en las copias del ARNr 16S, obteniéndose menor ambigüedad en la secuencia del *rpoB*.

3.7. DESVENTAJAS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Distintas causas originan una incorrecta asignación de género y especie cuando se realiza una identificación mediante el análisis de la secuencia y su alineamiento con otras secuencias.

3.7.1. Calidad disminuida de las secuencias depositadas en la base de datos y errónea asignación de especies. En la identificación molecular existe una fuerte dependencia con la precisión de las secuencias depositadas y la idoneidad en la asignación de especie de esas cepas. Se produce cuando cepas tipos o de colecciones certificadas están incorrectamente identificadas. En otras ocasiones, la nomenclatura no ha sido actualizada como en el caso de los géneros polifiléticos. También puede suceder que cepas genéticamente diferentes (>2% de variabilidad) estén incluidas en la misma especie, o que haya una presencia elevada de un número de indeterminaciones, o la incorrecta asignación de especie por falta de pruebas fenotípicas o errores. Gran parte de estos errores podrían minimizarse utilizando sistemas de revisión, tal como realizan bases de datos como el RINDOM o el MicroSeq.

3.7.2. Ausencia o baja correlación entre la identificación genotípica y fenotípica. En ocasiones surgen dudas respecto a la correlación entre las identificaciones fenotípicas y genotípicas, dificultando la asignación de especie mediante el ARNr 16S. Esto sucede cuando se encuentran genotipos idénticos o similares y diferentes fenotipos. Así ha sucedido con *M. tuberculosis* y *M. bovis* o *M. africanum*; *Bordetella pertussis* con *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; con las diferentes especies de *Brucella*, etc.

En otras situaciones, existen especies distintas con diferencias fenotípicas pero una gran homología en las secuencias del ARNr 16S como ocurre con *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* o *S. pneumoniae* y *S. mitis*. Por el contrario, se dan casos en los que los microorganismos presentan secuencias con un elevado número de diferencias y sin embargo, pertenecen a la misma especie o genotipo (*Clostridium tetani* y *C. innocuum*).

Estas distintas consideraciones se ponen claramente de manifiesto cuando se observa que las diferencias genéticas en el ARNr 16S de los géneros de *Enterobacteriaceae* son menores que para

algunas subespecies de *Streptococcus* y mucho menores que para muchas especies de *Clostridium*.

En el caso de discrepancias entre el fenotipo y el genotipo de una cepa, ambos se deben estudiar de nuevo. Confirmados los resultados, se considera que el genotipo se impone sobre el fenotipo.

3.7.3. Baja resolución en la identificación mediante ARNr 16S

En ocasiones el ARNr 16S presenta una baja capacidad de discriminación para algunos géneros y especies debido a una reciente divergencia, y es necesario complementar la identificación con el estudio de otros genes o con pruebas fenotípicas (Tabla 2). Así sucede con diferentes especies de los géneros *Bacillus* (*B. cereus* y *B. thuringiensis*; *B. globisporus* y *B. psychrophilus*), en los géneros *Brucella*, *Achromobacter*, *Strenotrophomonas* y *Actinomyces*, en el complejo *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus*, en las micobacterias de crecimiento rápido, y en la familia *Enterobacteriaceae* (especialmente en *Enterobacter* y *Pantoea*). Situación opuesta se produce por la heterogeneidad intragenómica en el ARNr 16S en el género *Aeromonas*. En *A. veronii* existen más de 6 copias de ARNr 16S que difieren en >1,5% entre ellas.

Es necesario recordar que muchas especies o subespecies que no pueden identificarse mediante el ARNr 16S, lo son mediante el análisis del *rpoB*

3.7.4. Presencia de electroferogramas o cromatogramas de ADN mixtos. La utilización del ARNr 16S como herramienta de diagnóstico está limitada a infecciones monobacterianas ya que en las polimicrobianas se obtendría un electroferograma mixto. En estas situaciones, con frecuencia, se haya implicada una bacteria anaerobia y la concordancia entre cultivo y secuenciación es baja. Se han descrito diferentes estrategias para resolver esta circunstancia:

- electroforesis en gel en gradiente desnaturizante ó “denaturing gradient gel electrophoresis” (DGGE);
- amplificaciones independientes para grampositivos y para gramnegativos;
- pirosecuenciación;
- utilización de un algoritmo en el programa informático RipSeq (iSentio) que separa las señales ambiguas de los cromatogramas mixtos.

La identificación bacteriana proporcionada por el análisis del ARNr 16S es más certera, sólida y reproducible que los análisis fenotípicos, resolviendo aproximadamente el 90% de las identificaciones. Sin embargo, no constituye una herramienta infalible. La elaboración de recomendaciones en su análisis según los géneros y especies a identificar, las bases de datos con mayor calidad de las secuencias depositadas, la aplicación complementaria o en sustitución de otros genes *housekeeping* como dianas, proporcionará en un futuro inmediato plataformas más eficientes en la identificación molecular bacteriana.

Tabla 2. Ejemplos de géneros y especies bacterianas con menor resolución en la identificación por ARNr 16S y propuestas de genes alternativos

Género	Especie	Gen(es) alternativos
<i>Aeromonas</i>	<i>A. veronii</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. trota</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. bestiarum</i>	<i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>cpn60</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. globisporus</i> , <i>B. psychrophilus</i>	ARNr 23S, <i>gyrB</i> , Espacio intergénico ARNr 16S-23S <i>lef</i> , <i>rpoB</i>
<i>Bordetella</i>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. holmesii</i>	IS481, <i>ptxA-Pr</i> , <i>outer</i> <i>membrane porin</i> , <i>recA</i> , IS1001
<i>Brucella</i>	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i> y otros	<i>rpoB</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. cocovenenans</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. thailandensis</i> <i>B. cepacia</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. stabilis</i>	ARNr 23S, espacio intergénico ARNr 16S-23S, <i>fliC</i> , <i>cluster</i> génico de secreción de tipo III (TTS) <i>recA</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	<i>mapA</i> <i>ceuE</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>C. ulcerans</i> , <i>C. kutscheri</i> , <i>C. afermentans</i>	<i>rpoB</i>
Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp./ <i>E. coli</i> enteroinvasivo (EIEC)	<i>ipaH</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sinensis</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S. infantarius</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S.</i> <i>oligofermentans</i> , etc	<i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> , <i>sodA</i> , <i>groEL</i> , <i>recN</i>

Especialmente el análisis del *rpoB* va a contribuir a una identificación bacteriana más eficiente (género, especie, subespecie), detectando y reclasificando nuevos organismos, y mejorando la resolución filogenética del ARNr 16S.

3.8. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MICROBIANA

Recientemente, la aparición de la técnica de PCR en multiplex acoplada a un análisis de la temperatura de *melting* (SeptiFast, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) identifica de forma temprana a algunos agentes etiológicos bacterianos y fúngicos de la sepsis a partir de muestra directa. La región amplificada es el espacio intergénico del 16S-23S ARNr bacteriano o del 18S-5,8S fúngico. La no detección de todos los potenciales patógenos y la necesidad de cultivo para la determinación del perfil de sensibilidad a antimicrobianos, no permite a esta técnica sustituir la realización de los hemocultivos. Otras desventajas añadidas al restringido espectro de especies detectadas son: falsos positivos con bacteremias o fungemias transitorias, fuerte dependencia de la concentración bacteriana, alto coste y carga de trabajo. En el caso de existir discrepancias entre la detección por ambos métodos diagnósticos, se proponen algoritmos de decisión útiles. Una ventaja importante de esta técnica es que la administración de antimicrobianos al paciente

interfiere sólo ligeramente en la detección del patógeno.

De forma adicional han surgido plataformas de identificación de patógenos que modifican o sustituyen la secuenciación tradicional, como sucede con la pirosecuenciación o la espectrofotometría de masas, respectivamente. Mediante plataformas de amplificación-pirosecuenciación se realiza la identificación bacteriana o fúngica mediante PCR de 3 regiones variables del ARNr 16S (V1-V3, o V1, V2 y V6) y del ARNr 18S, respectivamente, en hemocultivos (BlackLight Sepsis Kit, BlackBio, Madrid, Spain; Pyromark ID, Quiagen GmbH, Hilden, Germany). Se obtienen 3 amplicones con un tamaño inferior a 500 pb, susceptibles de determinar su composición en nucleótidos mediante la emisión de luz por la liberación de pirofosfatos (subproductos de la extensión por polimerización de la cadena de ADN). Sucesivas innovaciones de este método en la amplificación respecto al tipo de muestra clínica y a la determinación de diferentes fragmentos génicos correspondientes a los distintos factores de patogenicidad, resistencia, etc., aumentan las posibilidades de esta plataforma.

Las plataformas de amplificación-espectrofotometría de masas (PCR/ESI-MS) permiten la detección universal de uno o varios patógenos (bacterias, virus, hongos y protozoos) presentes en una amplia variedad de muestras (ambientales, clínicas, alimentarias o en cultivos) del

siguiente modo. Tras extracción y una PCR de amplificación con parejas de cebadores de amplio espectro, se obtienen uno o varios productos de PCR que corresponden a regiones genómicas de identificación de los distintos dominios microbianos en relación con la complejidad de la muestra problema. Estos productos se desalan y son ionizados y aerosolizados hacia un espectrofotómetro de masas. Se generan señales espectrales que son procesadas para determinar su masa y su composición en bases. Estos resultados son considerados con los iniciadores de amplificación utilizados en la estrategia T.I.G.E.R “*Triangulation Identification for the Genetic Evaluation of Risks*” (Ibis T5000, Alcimed, Paris, France) entrando la información en una base de datos genómica que asigna la determinación de especie. Ventajas indicadas son: no requieren cultivo o conocer con anticipación el producto analizado; es eficiente en muestras polimicrobianas; en el caso de nuevos patógenos no caracterizados permite la asignación a géneros o familias bacterianas o víricas; y también permite realizar la detección de genes de virulencia, de resistencia y la tipificación.

Recientemente ha aparecido una nueva plataforma comercial, conocida como PLEX-ID (Abbott), basada en esta metodología, que permite el análisis directo e identificación de microorganismos sobre muestras, incluidos los hemocultivos (BAC Spectrum Assay). Ha demostrado buenos resultados incluso en bacteriemias polimicrobianas, con independencia de que sean microorganismos aerobios, anaerobios, cultivables, lentos crecedores o incultivables. Destaca como aspecto importante que podría incluso utilizarse como un método cuantitativo.

4. MÉTODOS PROTEÓMICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

4.1. INTRODUCCIÓN

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas. Dependiendo del objetivo del estudio se pueden agrupar las técnicas de proteómica en los siguientes grupos:

- Técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas. Entre ellas destacan la electroforesis bidimensional, DIGE (electroforesis diferencial en gel), ICAT (marcaje isotópico diferencial) y MudPIT (tecnología de identificación de proteínas multidimensional).
- Técnicas usadas para analizar individualmente las proteínas. Con este objetivo se utilizan distintos tipos de espectrometría de masas. Con ellas se obtiene la huella peptídica que es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada. Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Dependiendo del enzima que se

utilice para fragmentar la proteína se obtienen diferentes huellas peptídicas. Estas son características de cada proteína. Actualmente hay numerosas bases de datos que recogen las huellas peptídicas de multitud de proteínas conocidas. Estas bases de datos se pueden rastrear usando programas bioinformáticos para buscar la huella peptídica que corresponda con la de aquella proteína que se esté estudiando y por tanto poder identificarla.

- Técnicas que se usan para estudiar interacciones entre proteínas, como los sistemas “*yeast two hybrids*” de alto rendimiento o la técnica “*Phage Display*”. Esta última permite averiguar con qué proteínas interacciona una proteína problema o sonda. Esta técnica consiste en la expresión en la superficie de un fago de las proteínas que se quieren analizar.

En la actualidad el reto principal de la proteómica es su automatización y la integración de las tecnologías mencionadas. Este es un reto cuya respuesta saldrá, principalmente de la bioinformática. De entre todas las herramientas que se emplean en la proteómica, en este documento se va a abordar únicamente la espectrometría de masas, con especial mención a las técnicas empleadas para la identificación de microorganismos.

4.2. FUNDAMENTO Y VARIANTES TÉCNICAS

4.2.1. Espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga (m/z). Un ión es un átomo o molécula cargada eléctricamente debido al exceso o falta de electrones. Dado que la mayoría de los iones formados poseen una sola carga, la relación “ m/z ” es equivalente a “ m ”.

En el espectrómetro de masas se produce la separación de las especies iónicas de la muestra, en función de su masa. El espectro de masas de cada compuesto se denomina “huella química” y es una representación gráfica de los fragmentos obtenidos, por orden creciente de masa frente a su abundancia relativa.

4.2.2. Componentes del espectrómetro de masas. Los tres componentes básicos de un espectrómetro de masas son los siguientes:

- **Fuente de ionización.** Es el elemento del espectrómetro que ioniza el material que va ser analizado. Las técnicas para la ionización, el proceso físico o químico mediante el cual se producen iones, han sido determinantes para establecer qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masas. La ionización del electrón (EI) y la ionización molecular se utilizan para los gases y los vapores. Dos técnicas, usadas a menudo con líquidos y muestras biológicas sólidas, incluyen la ionización por electroespray (ESI desarrollado por Fenn) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI desarrollado por Karas y Hillenkamp).

- **Analizador de masas.** Utiliza un campo eléctrico o magnético para acelerar los iones y separarlos en función de su relación masa/carga (m/z). Actualmente existen diferentes métodos para "filtrar" los iones respecto a su relación masa/carga, como el cuadrupolo o como el analizador de tiempo-de-vuelo (*time of flight*, TOF) mediante el cual la determinación de la masa en una región de alto vacío se realiza mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector.

- **Detector.** Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido es el espectro de masas o "huella química". Típicamente, se utiliza un cierto tipo de multiplicador de electrones (electromultiplicador).

4.2.3. Variantes de la espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica ideada a principios del siglo XX. Durante muchos años, las aplicaciones de esta técnica se vieron limitadas a compuestos (analitos) de bajo peso molecular, termoestables y fácilmente volatilizables.

En la década de los 70 se describen los primeros experimentos con éxito donde las moléculas termolábiles eran transformadas sin descomposición alguna y en un único paso a iones gaseosos. Estas técnicas de volatilización/ionización se denominan "técnicas de desorción". En estos casos al analito no volátil convenientemente depositado sobre una superficie metálica en alto vacío, es bombardeado con un haz de átomos neutros acelerados (FAB), o con un haz de átomos iónicos acelerados (LSIMS), o es expuesto a la acción de un fuerte campo eléctrico que induce su volatilización/ionización por efecto túnel (FD), o es expuesto a la acción de un plasma (PD) o a la acción de un láser (LD). Si bien estos métodos de ionización ampliaron el uso de la técnica a moléculas termolábiles y a macromoléculas, prácticamente su límite de aplicación es para analitos de peso molecular por debajo de 700-800 Da.

La introducción de nuevos métodos de ionización, que no requieren de la volatilización previa de la muestra, fue el elemento principal que permitió la extensión de la espectrometría de masas al campo de las biomoléculas. Fue a finales de la década de los 80 tras el éxito conseguido por Tanaka (Premio Nobel de Química 2002), mediante el uso de matrices metálicas (*soft laser desorption*, SLD) cuando Karas y Hillenkamp simultáneamente describen la detección del ion gaseoso intacto de proteínas con el uso de las matrices orgánicas fotosensibles. Dio lugar al desarrollo del método de volatilización/ionización suave, que hoy se conoce como "*matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*" MALDI.

Desde su implementación práctica, el método de ionización MALDI se ha usado con éxito para el análisis por espectrometría de masas de biomacromoléculas (ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos, proteínas, péptidos, lípidos, hidratos de

carbono, compuestos glicoconjugados, etc.) y polímeros sintéticos.

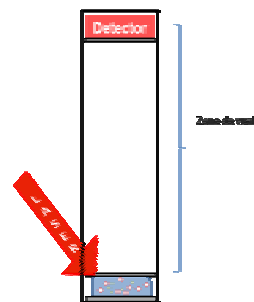
También existen actualmente otros métodos como ESI (*ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry*), SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*), DIOS (*Direct Ionisation on Silicon*) y además acoplamiento MS/MS (*Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry*).

4.2.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF. La espectrometría de masas MALDI-TOF se denomina MALDI por sus siglas en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization* (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por el analizador *time of flight* (tiempo de vuelo) que se integra típicamente con fuentes de ionización maldi.

Destacan como más importantes las siguientes características:

- Para obtener iones de forma adecuada es necesario que la muestra este embebida en una matriz orgánica
- Como fuente de ionización emplea un laser. Se generan iones tras bombardear con fotones (laser) la muestra. Se producen rayos UV de 337nm.
- La separación de los iones se produce según el "tiempo de vuelo".
- El espectro se genera mayoritariamente por iones univalentes.
- El tiempo de obtención del espectro es aprox. de un minuto para 10^{-12} g de un compuesto de masa/carga (m/z) de 1.000 Daltons (Figura 3).

Figura 3. Representación de un sistema MALDI-TOF



El proceso se puede resumir en los siguientes pasos:

- La muestra se mezcla con una matriz en exceso sobre una superficie de metal (tarjeta metálica), de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente.
- Se irradia esta preparación con un láser, en condiciones de alto vacío. La matriz absorbe esta energía y la transfiere a la muestra, provocando su ionización.
- El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa.
- La muestra ionizada y vaporizada crea una densa nube de gas entre dos electrodos. El campo eléctrico formado se emplea para acelerar la muestra hasta el detector.

- Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, viajan más rápido y llegan primero al detector.
- En el detector se genera el perfil o huella química específico de esa muestra.

En este tipo de espectrometría es de suma importancia la matriz ya que funciona como un transmisor, transfiriendo la energía necesaria para la ionización, del láser a las moléculas de la muestra. La mezcla muestra-matriz debe cristalizar de forma homogénea para garantizar una resolución óptima del espectro.

4.2.5. Aplicaciones de la espectrometría de masas. Las técnicas de espectrometría de masas se han utilizado y se siguen utilizando para un gran número de aplicaciones, como puede ser la medida exacta de pesos moleculares, monitorización de reacciones bioquímicas (reacciones enzimáticas, modificaciones químicas, digestión de proteínas), secuenciación de aminoácidos, secuenciación de oligonucleótidos, o determinación de estructura de proteínas.

Una aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF de gran interés en microbiología es la identificación de microorganismos. La identificación bacteriana basada en el perfil de proteínas obtenido mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF fue ya propuesta hace varias décadas. Sin embargo, sólo recientemente ha empezado a usarse como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana. En un principio se realizaron estudios parciales sobre su eficacia para la identificación de determinados microorganismos en condiciones controladas. Actualmente, cada vez aparecen más trabajos que han estudiado su eficacia en la identificación de aislamientos clínicos de bacterias grampositivas y gramnegativas de diversos orígenes directamente desde los medios de cultivo habituales y sin condiciones especiales, como método de rutina.

4.2.6. Plataformas comerciales de espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana. Desde la descripción original del sistema, se han desarrollado varios sistemas que son capaces de realizar la identificación de bacterias enteras, sin necesidad de largos procedimientos previos (extracción proteínas, digestión, purificación, etc.).

Se basan en la detección de proteínas ribosómicas S y L (2.000 a 20.000 Da). Se asume que el 80-90% de las señales del espectro de la bacteria son proteínas ribosómicas. Las características principales de estos sistemas son las siguientes:

- Sin procedimiento previo de extracción. Se utiliza directamente una colonia bacteriana.
- Comparan perfil o huella espectral desconocida frente a las de bacterias conocidas.
- Comparación de espectros generados con bases de datos previas.
- Rapidez de la técnica (aprox. 90 microorganismos / hora)
- Identificación a nivel de género y especie, en ocasiones subespecies.

- Es importante emplear el mismo protocolo estandarizado para obtener los perfiles y poderlos comparar con una base de datos previa.

A continuación se describen con más detalle tres ejemplos de sistemas comerciales que emplean espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana: MicrobeLynx™ de Waters Corporation, MALDI Biotyper™ de Bruker Daltonics y AXIMA@SARAMIS™ de Shimadzu & Anagnostec (Tabla 3). Cada técnica recomienda sus propios protocolos para la preparación de la muestra y tiene asociada una base de datos distinta, junto con un *software* para la adquisición de los espectros y comparación con la base de datos.

El primer sistema desarrollado para la identificación bacteriana fue MicrobeLynx System. Participaron en su creación la Universidad de Manchester, la Unidad de la Agencia de Protección de la Salud con Servicio de Identificación Molecular y la empresa Waters Corporation. Apareció como una técnica que precisaba pruebas preliminares ya que requería una matriz diferente para microorganismos grampositivos y gramnegativos, conllevaba una mínima preparación de la muestra y un tiempo de secado (1 h) antes de añadir matriz. Precisaba una lectura mínima de 4 pocillos de la tarjeta por muestra a identificar. La versión comercial empleada proporcionaba escasa reproducibilidad de la técnica ya que existían diferencias bajo distintas condiciones de cultivo.

Los sistemas más extendidos en la actualidad son MALDI Biotyper y AXIMA@SARAMIS (Tabla 3). Utilizan una técnica rápida y sencilla que no precisa pruebas preliminares, con mínima preparación de la muestra y lectura e interpretación inmediata. Las bases de datos están en constante actualización con más de 3.500 entradas. Realizan la identificación de bacterias (grampositivas, gramnegativas, anaerobios, no-fermentadores, micobacterias), levaduras y hongos. Ambas tienen la posibilidad de incluir nuevas referencias de cepas por el usuario. Permite el análisis simultáneo de 48 ó 96 muestras en una hora dando los primeros resultados en minutos. Destaca la reproducibilidad de la técnica. Al basarse en la medida de proteínas ribosómicas presentes de forma abundante no presenta diferencias en el espectro obtenido bajo distintas condiciones de cultivo. Se pueden usar para diagnóstico clínico por su marcado IVD y CE.

Los dos sistemas presentan un procedimiento diferente en el análisis del espectro. En el sistema MALDI Biotyper, la base de datos está formada por entradas que corresponden al espectro promedio (de al menos 24 espectros de alta calidad) de un microorganismo concreto (género, especie y cepa). Figuran cepas de varias colecciones ya que la compañía tiene colaboraciones por todo el mundo. Por el contrario, en el sistema SARAMIS, para la generación de un superespectro se necesitan al menos de 15 a 20 aislados diferentes representativos de una especie de diferentes

localizaciones (hospitales, centros de referencia y cultivos de cepas de colecciones).

Tabla 3. Comparación de sistemas comerciales de espectrometría de masas MALDI-TOF

	Casa comercial		
	Waters Corporation	Bruker	Shimadzu
Software y base de datos	Microbe Lynx System -MMU (Manchester Metropolitan University)	Maldi Biotyper (Bruker Daltonics)	SARAMIS (AnagnosTec GmbH)
Espectrómetro de masas	Micro MX	Microflex Bruker	Axima
Identificación	Bacterias aerobias /anaerobias	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos
Análisis de espectro		Espectro promedio	Superespectro
Proteínas	500 – 15.000 Da	2.000 – 20.000 Da	2.000 – 20.000 Da
Preparación de la muestra	Si Secado de 1 h	No Secado inmediato	No Secado inmediato
Matriz	Gram(+): solución saturada 3 mg/ml de 5-Cl-2-mercaptobenzotizol (CMBT) disuelto en agua:metanol: acetonitrilo (1:1:1) con 0,1% ácido fórmico y 0,01M 18-crown-6-éter Gram(-): el CMBT se sustituye por 14 mg/ml de α -ciano-4-hidroxi-cinnamico (α CHCA)	Solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinnamico en 50% acetonitrilo-2,5% ácido trifluoroacético Añadir 1 μ l	2,5 ácido dihidroxi-benzoico disuelto en una mezcla de agua:etanol:acetonitrilo (1:1:1) mix o de agua: acetonitrilo (1:1) con 0,03% de ácido trifluoroacético Añadir 0,3- 1 μ l
Rapidez	96 muestras / 1,5 h	96 muestras / 1 h	380 / 5 h
Reproducibilidad	Escasa (varía según medio de cultivo). 4 pocillos por muestra	Elevada (no varía con el medio de cultivo)	Elevada
Transferencia de resultados al SIL*	?	SI	SI
Nº pocillos en tarjeta	96 pocillos	96 pocillos	48 pocillos
*SIL: sistema informático del laboratorio			

4.3. PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

4.3.1. Calibración. Diariamente es conveniente realizar la calibración para confirmar la corrección de los parámetros del equipo, los cuales son una condición previa para obtener espectros de buena calidad. Para la calibración se utiliza un patrón estándar, en el caso de disponer en el laboratorio de un espectrómetro de masas de la marca Bruker, se denomina *Bruker bacterial test standard* (bts), el cual contiene una mezcla de proteínas conocidas.

4.3.2. Tratamiento previo de los microorganismos. Para poder obtener un buen espectro de masas por MALDI-TOF que permita la identificación del microorganismo debe aislarse el microorganismo en las mejores condiciones. Para ello deben observarse una serie de precauciones

con relación al procesamiento y tratamiento previo de los microorganismos.

Los microorganismos se pueden obtener a partir de un cultivo en medio sólido o líquido. En cualquier caso se debe tratar de cultivos puros, con independencia de que los medios sean o no selectivos, de no más de 18-24 horas de incubación para evitar esporas (*Bacillus* spp.), productos metabólicos (*Arthrobacter* spp.) o autólisis (*Streptococcus* spp.).

Para conseguir mejores resultados en la identificación de algunos microorganismos, se emplea un método de extracción con etanol/ ácido fórmico/ acetonitrilo que rompe las células y libera las proteínas. La composición de la solución de extracción es independiente de la especie bacteriana

con la que se esté trabajando, aunque en casos especiales, como las micobacterias, se precisan incubaciones prolongadas de inactivación previas a esta extracción.

Básicamente los métodos de extracción que se utilizan consisten en resuspender una colonia en agua (grado de pureza HPLC) y etanol absoluto, centrifugar y resuspender el *pellet* en una mezcla de ácido fórmico al 70%/ acetonitrilo (1:1). En el caso de partir de un cultivo en medio líquido se centrifuga y se procede de igual manera con el *pellet* resultante.

4.3.3. Transferencia a la tarjeta y adición de la matriz. Para inocular la tarjeta metálica, se transfiere una colonia (o parte de ella) del microorganismo crecido en una placa al correspondiente punto (círculo) de la tarjeta de metal realizando una fina extensión con una punta de pipeta, pincho de plástico o palillo de madera. Se necesita muy poco material. Con un poco de material visible es suficiente para realizar la medición. En el caso de haber realizado la extracción, se empleará 1 μ l del sobrenadante final y se dejará secar a temperatura ambiente.

Debido a que la relación cantidad microorganismo por microlitro de matriz va influir de manera muy importante en la obtención de un buen resultado, es conveniente conseguir estandarizar el inóculo mediante la práctica del usuario tanto manual como visual. Se aconseja que en las primeras ocasiones de utilización de esta técnica se depositen cantidades cada vez más pequeñas del microorganismo en varios pocillos y comprobar en cuál de ellos se obtiene mejor resultado. Se aconseja disponer de una cantidad casi inapreciable muy bien extendida en la placa metálica del MALDI-TOF ya que es mejor usar poco material que demasiado.

Respecto a la matriz es conveniente mantener tapado el tubo que la contiene mientras se va dispensando para evitar su evaporación y la formación de cristales. Si se van a realizar varias filas, cuando se haya realizado la extensión de una fila, se añade la matriz y se cierra el tubo de la matriz mientras se extiende la segunda fila para evitar la evaporación de la matriz.

Una vez añadida la matriz a la tarjeta es importante dejar secar en reposo a temperatura ambiente para que cristalice de forma óptima. Si en el momento que se introduce la tarjeta en el espectrómetro no están completamente secas todas las muestras se provoca un retraso en el inicio de la lectura debido a que son más difíciles de alcanzar las condiciones necesarias de vacío en el equipo por la humedad introducida.

4.3.4. Análisis. Una vez que se han preparado las muestras en la tarjeta para su análisis (matriz ya cristalizada), se abre la tapa cuando el equipo lo indique y se introduce correctamente la tarjeta. Una vez programada la sesión de lectura o nuevo proyecto, la lectura comienza de forma automática cuando se alcanzan las condiciones óptimas de vacío.

Las medidas se realizan en un espectrómetro de masas MALDI-TOF asociado a un *software* de

captura de espectro, en el que se define un nuevo proyecto cada vez que utiliza. El protocolo de trabajo del *software* de obtención del espectro debe proporcionar la adquisición óptima de la muestra por acumulación de entre 240- 500 disparos en diferentes lugares de la extensión en la tarjeta metálica de la muestra. Se obtiene el espectro entre 2-20kD de forma automática. Este espectro representa de manera predominante a las proteínas ribosómicas S y L (citosólicas, conservadas, abundantes y de carga positiva, esto último favorece su medición).

Los sistemas comerciales más extendidos están diseñados para dar un resultado completo incluyendo un control de calidad automático del espectro obtenido en cada punto de la tarjeta. Por ejemplo, en el programa FlexControl de Bruker se indica con un código de colores si ha obtenido buen espectro (verde/naranja/rojo) El espectro obtenido para la muestra problema se compara de manera automática con todos los espectros de la base de datos del *software* específico de identificación. Tras comparar el perfil se visualiza en la pantalla del ordenador el informe con el resultado de la identificación.

4.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

El objetivo final de las técnicas de espectrometría de masas aplicadas a la identificación bacteriana, es el poder determinar el género y especie del microorganismo. Es imprescindible que este resultado sea correcto debido a sus implicaciones clínicas.

Las plataformas comerciales de espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana informan al usuario del grado de confianza de los resultados de la identificación para cada muestra. En concreto, el *software* MALDI BioTyper versión 2.0 analiza (mediante un algoritmo basado en la comparación de los patrones espectrales) los picos obtenidos y tras la comparación con los picos de la base de datos obtiene un *score* logarítmico cuyo valor (determinado empíricamente para este *software*) en base al grado de identidad o de similitud, permite definir especie: ≥ 2 ; $<2 \geq 1,7$: género, $<1,7$ ausencia de identificación, respectivamente. Por su parte, en el *software* Saramis se expresa como porcentaje de similitud.

En el momento que se obtiene un resultado de identificación en el rango de aceptable por parte de la técnica comercial, entraría en juego la formación del microbiólogo para validar esa identificación. Es importante tener en cuenta la naturaleza de la colección de aislamientos que se propone estudiar y ser críticos con los resultados que se obtienen. Una vez validada la identificación se puede transferir el resultado al Sistema Informático del Laboratorio (SIL).

Si por el contrario, se obtiene como resultado "No identificado" puede haber dos posibles explicaciones. En primer lugar el espectro obtenido no es bueno y al compararlo con la base de datos no encuentra similitudes. Y la segunda sería que a pesar de haber

obtenido un buen espectro, este microorganismo no está presente en la base de datos y no puede identificarlo. La solución es distinta según uno u otro caso. Por este motivo es importante comprobar primero (si no se ha estado presente cuando se realizó la adquisición de forma automática del espectro) la calidad del espectro que está asociado a la muestra problema. Si no presenta un "buen espectro" (aquel que presenta abundantes picos, bien definidos, estrechos, con intensidades elevadas) se aconseja repetir el análisis variando la cantidad de muestra depositada en la tarjeta metálica o realizar previamente la extracción con etanol/ ácido fórmico. Si presenta un "buen espectro" y no ha sido capaz de identificar el microorganismo, probablemente se trata de una variante/ especie no presente en la base de datos. Repetir el análisis no mejora los resultados. Si se cree conveniente se puede incorporar por el usuario una nueva entrada a la base de datos.

4.5. INDICACIONES

Las técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF se han utilizado para la identificación de un gran número de especies bacterianas. Son técnicas que identifican de manera predominante a las proteínas ribosómicas, por tanto dan información general sobre el género y especie bacteriana, sin presentar diferencias en el espectro obtenido bajo distintas condiciones de cultivo. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos.

Al aplicar estas técnicas al estudio de microorganismos aislados en la rutina del laboratorio de microbiología, hay que tener en cuenta que la rentabilidad de la técnica variará en función del momento y flujo de trabajo del mismo. Integrar en la rutina del laboratorio de microbiología la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de microorganismos tendría como objetivo la información rápida y fiable de resultados de identificación, añadir valor clínico a los resultados microbiológicos y la optimización de recursos en el ciclo diagnóstico.

A la hora de decidir para qué microorganismos sería interesante emplear la espectrometría de masas MALDI-TOF MS para su identificación, en sustitución de métodos convencionales de identificación en el laboratorio existen varias alternativas. Desde emplearla únicamente como alternativa para las bacterias no identificadas por otros sistemas fenotípicos que requieren identificación molecular a creer que podría reemplazar a la tinción de Gram en un futuro próximo existe un amplio abanico de posibilidades. Por ejemplo, utilizar espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores (por ejemplo en fibrosis quística) y microorganismos no incluidos en sistemas automáticos (*Haemophilus* spp, *Neisseria* spp, *Campylobacter* spp, etc ...), microorganismos

anaerobios, micobacterias de crecimiento rápido, colonias obtenidas en medios cromogénicos con dificultades para su discriminación, microorganismos que no requieran estudios de sensibilidad o que si los requieran pero que se dispone de sistemas con paneles/tarjetas de identificación y sensibilidad separadas, etc.

Otra aplicación muy interesante de la espectrometría de masas MALDI-TOF es el análisis de muestras clínicas sin cultivo en placa previamente. Por ejemplo frascos positivos de hemocultivos y líquidos orgánicos. Se abordará este tema en último apartado de este procedimiento.

4.6. VENTAJAS, INCONVENIENTES Y LIMITACIONES

Como ventajas de la técnica de MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología destaca por su alta tasa de identificación, rapidez, ya que obtiene resultados fiables en menos de un minuto por muestra y no precisa pre-selección, facilidad por su preparación simple y uniforme, robusta y fiable bajo condiciones variables y con bajo coste en reactivos. También proporciona ventajas en la gestión del paciente como la administración de antibióticos más eficaces, reducción en los tiempos de hospitalización y disminución en gasto sanitario por paciente.

Como inconvenientes en la metodología mencionar que es crucial mantener el vacío que el espectrómetro requiere para trabajar y que sufre demoras en el tiempo de análisis si se incumplen los procedimientos (no dejar secar completamente la muestra, no cerrar siempre la tapa, etc.), requiere calibraciones y controles de calidad frecuentes, y es imprescindible un periodo de formación para los usuarios. Respecto a los inconvenientes relacionados con los reactivos el principal es que la matriz ya resuspendida no es estable más de 15 días aproximadamente porque cristaliza en el vial.

Las principales limitaciones de la técnica actualmente se clasifican en cuatro puntos:

- La relación cantidad de microorganismo por microlitro de matriz influye de manera muy importante en la obtención de un buen resultado por tanto es conveniente conseguir estandarizar el inóculo. Para los experimentos de espectrometría de masas MALDI-TOF se requiere para preparar la muestra y efectuar el análisis volúmenes de solución de la matriz (fotosensibilizador) del orden del microlitro, siendo la relación de concentración entre el analito y la matriz) del orden de 1:1000 a 1:100000 mol/mol.
- La identificación es independiente de que los medios de cultivo sean o no selectivos. Pero sí es importante la antigüedad del cultivo. Se recomienda un cultivo de no más de 18-24 horas de incubación, particularmente en bacterias que forman esporas (*Bacillus* spp.), bacterias que acumulan productos metabólicos (*Arthrobacter* spp.) o bacterias que sufren autólisis a medida que los cultivos envejecen (*Streptococcus* spp.). En el caso particular de microorganismos

anaerobios es fundamental mantener las condiciones de anaerobiosis hasta el mismo momento en que se inocula la tarjeta metálica. En cualquier caso se debe tratar de cultivos puros. Con cultivos mixtos (en medio sólido o líquido) no se obtienen resultados fiables.

- Pueden existir errores en la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF entre los microorganismos pertenecientes al grupo de los estreptococos *viridans* y neumococo, resultando adecuado para enterococos y estreptococos beta-hemolíticos. Parece que no se encontrará fácilmente una solución a esta limitación debido a la propia naturaleza de estos microorganismos en particular, con gran similitud entre las distintas especies. Se recomienda confirmar con una prueba alternativa la identificación de *S. pneumoniae*.
- Existe un amplio número de referencias en las bases de datos comerciales empleadas para establecer la comparación e identificación de los microorganismos, pero sigue siendo limitado. A través de colaboraciones entre las compañías comerciales y los hospitales de varios países se irán ampliando estas bases de datos con un mayor número de cepas que representen a más especies bien caracterizadas. Con este objetivo de ampliar las bases de datos, sería necesario un esfuerzo en el ámbito de la identificación de micobacterias, nocardias, patógenos oportunistas ambientales, etc.

4.7. CONTROL DE CALIDAD

4.7.1. Validación de plataformas comerciales. Se ha demostrado la robustez del sistema Maldi-biotyper y del sistema Saramis. Se obtienen los mismos resultados para las mismas especies pero cultivadas de distintas fuentes, medición por diferentes operadores, medidas en distintos instrumentos. La identificación es independiente del medio y del tiempo de crecimiento. Puede haber pequeños cambios en el espectro pero el listado de picos es estable y la identificación se basa en señales estables y específicas, por tanto no influyen en la identificación.

Para validar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados, se han usado diferentes procedimientos y mecanismos de control para asegurar la calidad de la identificación de los microorganismos con las plataformas comerciales. El resultado de la identificación se ha comparado con los resultados obtenidos por otros métodos, como fenotípicos o secuenciación del ADNr 16S. Adicionalmente, las bases de datos para la identificación de microorganismos se evalúan de forma rutinaria mediante comparaciones interlaboratorio.

4.7.2. Calibración y verificación rutinaria. La calibración es conveniente realizarla diariamente para confirmar la corrección de los parámetros del equipo, los cuales son una condición previa para obtener espectros de calidad. Como se indicó anteriormente, en la plataforma comercial de Bruker se utiliza un patrón estándar, el *bacterial test*

standard (BTS), el cual contiene una mezcla de proteínas conocidas. La correcta calibración de los picos se selecciona automáticamente. Hay que asegurarse de que la desviación máxima no es superior a 300 ppm.

Como verificación, en la primera utilización del día de una tarjeta metálica concreta se recomienda realizar una medida del BTS, programado en la sesión como una muestra adicional. En el resultado de la identificación debe obtenerse *E. coli* con Score superior a 2.2. En caso contrario se debe calibrar de nuevo el equipo.

4.7.3. Mantenimiento. El espectrómetro de masas requiere algunas consideraciones para su correcto funcionamiento, como por ejemplo:

- Debe estar siempre encendido ya que tiene que mantener el vacío en todo momento.
- La puerta o dispositivo que permite la conexión entre el sistema y el ambiente exterior hay que manejarla con cuidado. Para su perfecto sellado hay que limpiar la junta de goma de la tapa todos los días. Simplemente se puede realizar pasando un dedo por la superficie de la junta, teniendo la precaución de no realizarlo con guantes en la mano.
- Una vez que se abre la puerta, se accede al dispositivo o cajón porta-tarjetas. Debe estar siempre dentro del equipo y sin permitir que se pueda abrir la tapa. Cuando más tiempo este abierto, más tardará en empezar a realizar la lectura el equipo.
- Las tarjetas metálicas se pueden reutilizar si se realiza una limpieza exhaustiva de la misma. Si por el contrario, quedara algún mínimo resto podría dar lugar a errores y falsas identificaciones. Las distintas casas comerciales tienen su procedimiento de limpieza de la tarjeta. Sin entrar en detalle de los pasos, indicar que se requiere etanol al 70% y trifluoroacético al 80%.

4.8. OTRAS APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

4.8.1. Análisis de muestras clínicas. Una aplicación del MALDI-TOF muy interesante es el análisis de muestras clínicas sin cultivo previo. A día de hoy existe un requerimiento indispensable para este análisis que consiste en que sean muestras con un alto número de microorganismos. Por tanto, se limita a la detección de microorganismos en muestras clínicas identificadas como positivas por otro procedimiento adicional, como hemocultivos y orinas. También precisa de un paso previo de extracción para la eliminación del “background” que podría interferir con la espectrometría de masas (por ejemplo, células, proteínas de la matriz). Por todo esto, a día de hoy las posibles muestras a analizar serían las orinas patógenas, los hemocultivos positivos y los cultivos crecidos de líquidos orgánicos.

Como limitación destaca que para muestras polimicrobianas hay un menor rendimiento. Como solución, algunos autores proponen realizar el análisis de las muestras de hemocultivos en las que

se observan varias bacterias en la tinción de Gram empleando bases de datos específicas para bacilos gramnegativos y para cocos grampositivos. Sin embargo, también se necesitaría un algoritmo mejorado que diferenciara entre mezcla de microorganismos, como por ejemplo el nuevo *software* MALDI Biotyper versión 3.0.

Un reto futuro para la espectrometría de masas MALDI-TOF es la identificación de microorganismos en muestras directas tras su recogida sin paso previo de cultivo o incubación. Debido a los bajos niveles de microorganismos presentes se necesitarían desarrollar métodos de enriquecimiento, como pueden ser una combinación de filtración en membrana, separación magnética selectiva y concentración. Entonces, se dispondría de una técnica rápida, sensible y selectiva para la detección de microorganismos.

4.8.2. Resistencia a antimicrobianos y detección de genes de virulencia de los microorganismos.

Determinar la resistencia a los antimicrobianos o identificar a los microorganismos que expresan genes de virulencia podría ser una aplicación futura de la espectrometría de masas MALDI-TOF. Las compañías están estudiando esta posibilidad debido a la gran demanda de los usuarios y puede que llegue a ser utilizada en la rutina del laboratorio de microbiología, incluso reemplazando a las pruebas de determinación de sensibilidad antibiótica.

En el ámbito de la investigación ya se han identificado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF microorganismos resistentes a los antimicrobianos como *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* con heteroresistencia a glicopéptidos y *E. coli* resistente a ampicilina y también genes de virulencia como la leucocidina de Pantone Valentine (LPV) de *S. aureus*.

En el campo del análisis proteómico con MALDI-TOF/TOF de microorganismos, fuera del ámbito de la identificación, se han encontrado diferencias en el subproteoma entre *E. coli* sensible o resistente a piperacilina/ tazobactam.

4.8.3. Epidemiología. Se han publicado recientemente varios artículos relativos a la posible diferenciación de microorganismos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF a nivel de especie de *Vibrio*, *Pantoea* o *Staphylococcus*, de subespecie en *Francisella tularensis* y de genomovares del complejo *B. cepacia*

Probablemente, aunque el poder de discriminación de otras técnicas empleadas en estudios epidemiológicos como la electroforesis de campo pulsado (PFGE) no pueda ser alcanzada por la resolución conseguida con la espectrometría de masas MALDI-TOF a nivel de subespecie, el perfil peptídico podría ser válido para realizar un cribado rutinario y reducir la necesidad de utilizar métodos adicionales más laboriosos y costosos.

Para que la técnica de la espectrometría de masas MALDI-TOF pueda ser utilizada en diagnóstico en el área de la epidemiología debería cumplir ciertos requisitos como por ejemplo:

- Introducir un procedimiento operativo estandarizado
- Aplicar aproximaciones bioinformáticas apropiadas
- Diseñar métodos robustos de preparación, medida y análisis
- Establecer bases de datos de alta calidad, ya sean comerciales o propias.

5. BIBLIOGRAFÍA

5.1. BIBLIOGRAFÍA. MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1. Barrow GI, Feltham RKA. Cowan, Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. 3TH Ed. Cambridge. Cambridge University Press, 1993.
2. Gobernado M, López-Hontangas JL. Identificación bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(Supl 2):54-60.
3. Isenberg HD, Ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC. ASM Press, 2004.
4. MacFaddin JF, editor. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
5. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8TH Ed. Washington DC: ASM Press, 2003.
6. Prats G, *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Barcelona 2006.

5.2. BIBLIOGRAFÍA. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*. 2009; 17:37-45.
2. Bosshard PP, Abels S, Zbinden S, Bottger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41:4134-4140.
3. Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Bottger EC. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1359-1366.
4. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 ; 47:1-13.
5. Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 840-862.
6. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral GP, and Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3623-3630.
7. Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, Hofstadler ST. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nature Reviews Microbiology* 2008; 6: 553-558.
8. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:1018-1028.
9. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003; 41:763-766.

10. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region.. *Microbiol* 1996; 142:3-16.
 11. Janda JM, Abbott SL. ARNr 16S gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2761-2764.
 12. Hunt DE, Klpac-Ceraj, V, Acinas SG, Gautier C, Betilsson S. et al. Evaluation os 23s rRNA PCR primers for use in phylogenetic Studies of bacterialdiversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:2221-5
 13. Kommedal O, Karlsen B, Saebø O. Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *Clin Microbiol.* 2008;46:3766-3771.
 14. Millar BC, Xu J, Moore JE. Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1575-80.
 15. MM18A. Interpretive Criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline. CLSI document, 2008.
 16. Pei A, Nossa, CW,Chokshi,P, Blaser MJ, Yang L, Rosmarin,DM, Pei,Z. Diversity of 23s rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Plos ONE* 2009;4; e5437.
 17. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial infection. *Clin Chem.* 2009; 55:856-66
 18. Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *CID* 2007; 44: 1108-1114.
 19. Rodicio M, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 238-245.
 20. Rowland GC, Aboshkiwa M, Coleman G. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and otherb eubacteria. *Biochem Soc Trans* 1993; 21, 40S.
 21. Sadeghifard N, Gürtler V, Beer M, Seviour RJ. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA space region suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl. Environ Microbiol* 2006; 72:7311-7323.
 22. Stackebrandy E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006; 33:6258-6264.
 23. Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2009; 76: 217-225.
 24. Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:319–354.
 25. von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2405-2410
 26. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 908-934.
 27. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, et al. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care.* 2010;14.
 28. Yañez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic análisis of member of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Sys Evol Microbiol* 2003; 53:875-883.
- 5.3. BIBLIOGRAFÍA. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS
 1. Anhalt JP. Identification of bacteria ussing mass spectrometry. *Anal Chem* 1975; 47:219-225.
 2. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34:467-470.
 3. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48:1549-1554.
 4. Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389:1633-8.
 5. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1169-75.
 6. Dieckmann R, Strauch E, Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 2010;109:199-211.
 7. dos Santos KV, Diniz CG, Veloso Lde C, et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Res Microbiol* 2010; 161:268-275.
 8. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74:5487-91.
 9. Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:941-945.
 10. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001; 20:157–171.
 11. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2110-2115.
 12. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:1542-8.
 13. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. 2004; 76:5769–5776.
 14. Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* 2005; 62:273-284.
 15. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004; 4:221-242.

16. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Plos One* 2009; 4(11):e8041
17. Lynn EC, Chung MC, Tsai WC, Han CC. Identification of Enterobacteriaceae bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999; 13:2022–2027.
18. Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 255:233-239.
19. Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6292–307.
20. Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non-fermenting bacteria *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1946-1954.
21. Miñán A, Bosch A, Lasch P, et al. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst* 2009; 134:1138-1148.
22. Rezzonico F, Vogel G, Duffy B, Tonolla M. Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:4497-4509.
23. Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Spletstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:1061-1069.
24. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:543–551.
25. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:444-447.
26. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2005 ; 71:58-64.
27. Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:900-907.

<http://www.bdal.com/solutions/clinical/microorganism-id/learn-more.html> <http://www.bdal.de/products/system-solutions/maldi-biotyper.html>
<http://www.maldibiotyper.com/>

- Web de Saramis
<http://www.anagnostec.eu/products-services/saramis.html>

Páginas web referentes a espectrometría de masas:

- Web de I-mass <http://www.i-mass.com/> y <http://www.i-mass.com/guide/tutorial.html>
- Web de la *American Society for Mass Spectrometry: What is Mass Spectrometry*
<http://www.asms.org/whatisms/index.html>
- Web de Bruker

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 13

PNT-ID-01a. PRUEBA DE LA CATALASA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Se utiliza en la caracterización inicial de la mayoría de las bacterias. La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Son excepción *Streptococcus* spp y *Enterococcus* spp.

2. FUNDAMENTO

Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, y como resultado se liberan burbujas de gas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Solución de peróxido de hidrógeno (guardar en nevera a 2-8°C y no exponer a la luz):

- Al 30% para *Neisseria* spp.
- Al 15% para anaerobios
- Al 3% para el resto de bacterias

Nota: al 30% puede servir para todas las bacterias pero es más peligroso, por el riesgo de quemaduras al entrar en contacto con piel y mucosas.

Asas desechables
Portas

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

a) Depositar una colonia en un porta, preferiblemente de un medio sin sangre (si el medio es agar sangre no debe tocarse el agar). Para bacterias anaerobias exponer las colonias al aire 30' antes de realizar la prueba.

b) Añadir una gota del reactivo.

c) Lectura en 10-20 segundos (si es necesario, usar lupa)

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Prueba positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Prueba negativa: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Positivo: formación de burbujas

Negativo: no formación de burbujas o muy escasa producción tras 20"

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las colonias procedentes de cultivos en agar sangre pueden dar falsos positivos. Tampoco se recomienda realizar esta prueba a partir de colonias crecidas en agar Mueller-Hinton.

Realizar la prueba con cultivos de 24 h. El enzima está presente sólo en cultivos viables. Los cultivos viejos pueden dar resultados falsos negativos. No invertir el orden de adición del reactivo sobre la colonia pues se pueden producir falsos negativos. No mezclar reactivo y colonia.

Algunas cepas de *Aerococcus* spp. y *Enterococcus* spp. pueden producir una reacción catalasa lenta o pseudocatalasa. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden dar la prueba de catalasa negativa por este método.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; 2004. pp. 3.17.10
2. Piau C, Jehan J, Leclercq R, Daurel C. Catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain with point mutations in the *katA* gene. J Clin Microbiol 2008; 46:2060-2061.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 13

PNT-ID-01b. PRUEBA DE LA OXIDASA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Prueba utilizada para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromo-oxidasa.

La prueba se usa en la caracterización inicial de bacterias gramnegativas.

2. FUNDAMENTO

En presencia de oxígeno atmosférico la enzima intracelular citocromooxidasa oxida el reactivo fenilendiamina y forma un compuesto color púrpura (indofenol)

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad
- Manual de instrucciones del producto

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Tiras de papel absorbente con una zona reactiva que contiene dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1µmol;1-naftol 1,0 µmol.

Asas ó bastones de plástico desechables

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Depositar una colonia en la zona reactiva de la tira y frotar con el asa.

Interpretar el resultado al cabo de 10-30".

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Prueba positiva: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Prueba negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: se colorea de azul a violeta azulado (no leer después de 60"). Puede producirse una reacción positiva lenta a los 30-60" y es característica de *Pasteurella* spp.

- Negativo: color rosado o sin cambio de color.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Es preferible utilizar cultivos frescos (18-24 horas), aunque algunas bacterias requieren de subcultivos para producir una reacción positiva.

Utilizar cultivos que no provengan de medios con azúcares y con pH ácido o con colorantes.

Para *Micrococcus* y *Haemophilus* spp. se utiliza el test modificado con el reactivo al 6% de tetradimetilfenilendiamina en dimetilsulfóxido.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, Ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.3.2-13.
2. Faller A, Schleifer KH. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci. J Clin Microbiol 1981; 13:1031-1035.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 13

PNT-ID-01c. PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

La prueba de oxidación-fermentación (Hugh y Leifson), determina el tipo de metabolismo, oxidativo o fermentativo, que utilizan las bacterias al actuar sobre un hidrato de carbono. Se utiliza para la diferenciación de géneros, principalmente de bacilos gramnegativos.

2. FUNDAMENTO

En la vía oxidativa, el aceptor final de electrones debe ser el oxígeno y por consiguiente el proceso es aerobio y produce poca acidez; mientras que en la vía fermentativa, el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico y el proceso es anaerobio, originando mucha acidez.

La acidez se detecta por la presencia de un indicador de pH (azul de bromotimol), que hace virar el medio de verde a amarillo. Los microorganismos oxidativos producen ácido en la zona de contacto con el aire, pero no lo hacen en profundidad. Los microorganismos fermentativos producen mucho ácido en todo el tubo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Se utilizan tubos con medio de Hugh-Leifson, un medio semisólido, que contiene peptona a baja concentración (0,2%), glucosa (1%) y azul de bromotimol como indicador de pH.

Vaselina o aceite de parafina estéril.
Asas desechables.

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Para cada bacteria en estudio se utilizan dos tubos de oxidación/fermentación (O/F) con medio de Hugh-Leifson

Se siembran ambos en picadura y se cubre uno de ellos con vaselina o aceite de parafina estéril.

Incubar a 35±2°C en atmósfera ambiente.

Lectura: a las 24-48 h, aunque a veces es necesaria una incubación de hasta 14 días.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Bacilos gramnegativos:

- Positivo: fermentación *Escherichia coli* ATCC 25922. Oxidación *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Negativo: *Acinetobacter lwoffii*. ATCC 17925

Cocos grampositivos:

- Positivo: fermentación *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Oxidación *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

- Negativo: Medio basal sin carbohidrato.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Si la vía es oxidativa, solamente el tubo si cubrir con parafina (tubo abierto) vira ligeramente en la parte superior a amarillo (A), más tarde se extenderá por todo el tubo, y nunca con producción de gas.

Si la vía es fermentativa hay un viraje intenso a amarillo que comienza en la parte inferior de los dos tubos con o sin producción de gas. Se acidifica todo el medio. Sólo en la vía fermentativa puede producirse gas, viéndose el medio con grietas, burbujas o despegado del fondo.

Un resultado negativo se muestra como color verde (V)

Interpretación	Tubo abierto	Tubo cerrado
Sólo existe oxidación (aerobio estricto)	A	V
Existe oxidación y fermentación (anaerobio facultativo) o puede fermentar en presencia de oxígeno (aerotolerante)	A	A
Sólo puede utilizar el azúcar son oxígeno (anaerobio estricto)	V	A

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Algunas bacterias no crecen en el medio de Hugh-Leifson. Puede repetirse la prueba añadiendo a cada tubo 2% de suero o 0,1% de extracto de levadura.

El cambio de color producido por bacterias oxidativas comienza en la superficie del medio y puede no ser aparente hasta varios días por lo que podría dar lugar a una reacción falsamente negativa.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. MacFaddin JF, editor. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000; p. 4.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 13

PNT-ID-01d. PRUEBA DE LA COAGULASA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Se utiliza para la diferenciación de especies del género *Staphylococcus* debido a la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa.

2. FUNDAMENTO

La coagulasa es un enzima que convierte el fibrinogeno en fibrina. Existe en dos formas: clumping factor o coagulasa unida a la pared celular y coagulasa libre o enzima extracelular que solo se produce cuando la bacteria se cultiva en caldo. La primera se detecta mediante la prueba de la coagulasa en porta y ambas mediante la prueba de la coagulasa en tubo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad
- Manual de instrucciones del producto

4. MUESTRAS

Colonias de cocos grampositivos en racimos catalasa positiva crecidas en medio de cultivo sólido.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

1. Prueba de la coagulasa en porta

Plasma-coagulasa en porta con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), disponible comercialmente.

Asas desechables

Agua destilada estéril

2. Prueba de la coagulasa en tubo

Plasma-coagulasa en tubo con EDTA, disponible comercialmente

Asas desechables

Pipetas desechables

Tubos estériles pequeños (10 x 75 mm)

Agua destilada estéril

Estufa 35±2°C.

Estufa 22-25°C

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Seguir las instrucciones del fabricante para rehidratar el plasma.

Prueba en porta: colocar una gota de agua destilada sobre un porta. Emulsionar suavemente la colonia en estudio en la gota de agua hasta obtener una suspensión cargada homogénea. Agregar una gota de plasma reconstituido junto a la gota de la suspensión bacteriana. Mezclar bien con el asa e inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado, observando la formación inmediata de un precipitado.

Prueba en tubo: colocar asépticamente 0,5 ml de plasma reconstituido en el fondo de un tubo estéril. Añadir 0,5 ml de cultivo de 24 horas (o suspensión en agua destilada de un cultivo en placa). Mezclar por rotación el tubo, evitando agitar el contenido.

Incubar a 35±2°C y observar cada hora hasta 4 horas y luego a las 24 horas, la formación de un coágulo visible.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Control negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Coagulasa en porta:

- Positivo: aglutinación visible en 10". Negativo: no aglutinación visible en 10".

Coagulasa en tubo:

- Positivo: cualquier formación de coágulo. Observar los tubos en incubación a 35±2°C cada hora durante 4 h (si esto no fuera posible incubar 24 h a 22-25°C). Anotar el resultado.

- Negativo: no formación de coágulo. Si es negativo a las 4 h reincubar a 22-25°C hasta 24h.

Nota: No dejar a 35°C más de 4h ya que la fibrinolisis de *S. aureus* puede lisar el coágulo.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Es necesario realizar la prueba en cultivos puros.

Puede ocurrir autoaglutinación con la prueba en porta.

Es necesario utilizar agua destilada y no solución salina ya que algunas cepas de *Staphylococcus* son sensibles a la sal. No se debe hacer la prueba con colonias crecidas en agar-Chapman.

No utilizar plasma citratado ya que puede aglutinar cualquier bacteria que utilice el citrato.

La incubación prolongada a 35±2°C puede dar falsos negativos debido a la producción de estafiloquinasa.

En la prueba en tubo las lecturas que solo se hacen a las 24 h pueden dar resultados falsos negativos.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) pueden ser deficientes en "clumping factor" y pueden dar falsos negativos.

S. intermedius y *S. hyicus* pueden dar positiva la prueba en tubo (ambas son Voges-Proskauer negativo (no producen acetoina) y *S. intermedius*

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 13

además da positiva la prueba de la pirrolidonil-
arilamidasa (PYR).

S. lugdunensis y *S. schleiferi* dan positiva la prueba
en porta (ambos son PYR positivo).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; 2004. p. 3.17.13.
2. Lally R, Woolfrey B. Clumping factor defective methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1984; 3:151-152.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 13

PNT-ID-01e. PRUEBA DE LA ADNasa

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Se utiliza para diferenciar microorganismos en base a la actividad de desoxirribonucleasa (ADNasa).

Esta prueba se utiliza principalmente en la diferenciación de estafilococos que producen grandes cantidades de ADNasa extracelular. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* dan reacciones positivas con esta prueba, pero hay algunas cepas de SARM que dan la prueba negativas. Subespecies de *S. scheiferi* son ADNasa positiva y también algunas cepas de *S. intermedius*. Otras bacterias como *Serratia* spp. también producen desoxirribonucleasa.

2. FUNDAMENTO

La ADNasa es un enzima que hidroliza el ácido desoxirribonucleico (ADN) y libera oligonucleótidos y fosfato. Hay muchos medios de cultivo con y sin indicadores para detectar este enzima. El primero que se utilizó lo describió Jeffries et al. en 1957 (ver composición en el apartado 4).

En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno, aminoácidos, y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

El ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (ADNasa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico a una concentración 1N.

El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta una transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y produce una opacidad en el medio de cultivo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Placas con medio de agar ADNasa

Composición del medio (en gramos por litro): tripteína 20 g; ácido desoxirribonucleico 2 g; cloruro de sodio 5 g; agar 15 g.

Preparación del medio: suspender 42 gramos de polvo en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición para disolución completa. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir en placas de Petri estériles. El pH final debe ser 7,3 ± 0,2.

Almacenamiento: medio deshidratado a 10-35 °C y medio preparado a 2-8 °C.

Asas de plástico desechables

Ácido clorhídrico 1N (3,6%)

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO:

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, inocular una zona del medio de cultivo en la placa con varias colonias (en botón) y numerar. Se pueden inocular hasta cuatro botones distintos por placa.

Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas

- a 35±2°C. para *Staphylococcus* spp. y *Moraxella* spp.
- a 25±2°C para *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.
- 25-30±2°C para bacilos gramnegativos no fermentadores.

Inundar la placa con ácido clorhídrico 1N. Dejar que el ácido penetre en toda la superficie del medio durante 2 minutos y leer el resultado

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

Cepas para control de calidad:

- Positivo: *S. aureus* ATCC 25923 o *Serratia marcescens* ATCC 13880 o *M. catarrhalis* ATCC 25240
- Negativo *E. coli* ATCC 25922 o *S. epidermidis* ATCC 12228.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: los organismos inoculados estarán rodeados de zonas transparentes de ADN despolimerizado, mientras que el medio más alejado del botón de inoculación tendrá un aspecto opaco y blancuzco debido al ADN polimerizado.
- Negativo: el medio se observa opaco.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se requieren pruebas adicionales para identificar estos microorganismos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.17.38
2. MacFaddin JD. Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1985; vol. 1, pp. 275-284.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 13

PNT-ID-01f. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Diferenciación presuntiva de *Streptococcus pneumoniae* de otras especies de *Streptococcus* alfa-hemolíticas en función de la sensibilidad a la optoquina.

2. FUNDAMENTO

Se utilizan discos de papel absorbente impregnados con 5 µg de etilhidroxipreína (optoquina) para demostrar la sensibilidad del *S. pneumoniae* con fines de identificación. Esta especie es sensible a la optoquina mientras que otras especies de estreptococos alfa-hemolíticos son resistentes a este compuesto.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias de estreptococos alfa-hemolíticas crecidas en medio de agar sangre o en medio CNA en cultivo reciente (18-24 h), y con morfología sugestiva de *S. pneumoniae*.

Muestra de hemocultivo en el que se observan cocos grampositivos en cadenas y en diplos.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Discos de optoquina de 5 µg (de 6 mm o 10 mm de diámetro)

Pinzas estériles

Asas de plástico desechables

Placas de agar con 5% de sangre de carnero.

Regla calibrada en mm

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Sembrar en agar con 5% de sangre de carnero y colocar el disco de optoquina en el centro con pinzas estériles presionando para que el disco quede adherido al agar.

Incubar a 35 ± 2°C, 5% CO₂ 18-24h.

Medir halo de inhibición

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

Cepas control positivo *S. pneumoniae* ATCC 49619 y negativo *Streptococcus mitis* ATCC 6249

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: ≥14 mm con discos de 6 mm y ≥16 mm con discos de 10 mm.

- Negativo: sin halo de inhibición.

- Intermedio o dudoso: 7-14 mm con discos de 6 mm y de 10-16 mm con discos de 10 mm. En estos casos se debe realizar una prueba complementaria de identificación, como la prueba de la solubilidad en bilis.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La incubación en CO₂ disminuye el halo de inhibición pero es requisito indispensable la incubación en esta atmósfera para no obtener falsos sensibles con especies de estreptococos diferentes a *S. pneumoniae*.

Existen cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina.

Los halos de inhibición generalmente son mayores en cepas capsuladas. Un porcentaje elevado de cepas no capsuladas tienen sensibilidad intermedia.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.17.38.

2. Nuñez S, Sá-Leão R, de Lencastre H. Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing healthy children in Portugal. J Clin Microbiol 2008; 46:321-324.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 9 de 13

PNT-ID-01g. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Diferenciación presuntiva de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos beta-hemolíticos del grupo A de Lancefield) de otras especies de *Streptococcus* beta-hemolíticas en función de la sensibilidad a la bacitracina.

2. FUNDAMENTO

Se utilizan discos de papel absorbente impregnados con 0,04 U de bacitracina para demostrar la sensibilidad de *S. pyogenes* con fines de identificación. *S. pyogenes* se muestra sensible a la bacitracina mientras que otros estreptococos beta-hemolíticos son generalmente resistentes a la bacitracina.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias de estreptococos beta-hemolíticas crecidas en medio de agar sangre o en medio CNA en cultivo reciente (18-24 h).

Muestra de hemocultivo en el que se observan cocos grampositivos en cadenas.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Disco de 0,04 U de bacitracina

Pinzas estériles

Asas de plástico desechables

Placas de agar con 5% de sangre de carnero

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Sembrar en agar con 5% de sangre de carnero y colocar el disco en el centro con pinzas estériles presionando para que el disco quede adherido al agar.

Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 18-24h.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

Cepas control positivo *S. pyogenes* ATCC 19615 y negativo *S. aureus* ATCC 25923.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Cualquier zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco, aunque sea pequeña, indicará sensibilidad a la optoquina y, por tanto, la especie es *S. pyogenes*.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Hay un pequeño porcentaje de cepas de *S. pyogenes* resistentes a la bacitracina.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.17.38.

2. Pérez-Trallero E, García C, Orden B, Marimón JM, Montes M. Dissemination of an emm28 erythromycin, clindamycin and bacitracin resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:123-126.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 10 de 13

PNT-ID-01h. PRUEBA DE LA UREASA

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar la urea debido a la producción de la enzima ureasa.

2. FUNDAMENTO

La ureasa es una enzima que poseen algunas bacterias que pueden hidrolizar la urea con producción de amoníaco de acuerdo a la siguiente reacción química:



El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciéndose alcalinización y aumento del pH del medio que se detecta por la presencia de un indicador de pH en el medio.

Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado. La prueba también se utiliza para diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de *Moraxella* spp. *Helicobacter pylori* y *Brucella* spp. también hidrolizan la urea. Esta prueba puede ayudar en la identificación de *Cryptococcus* spp. que da un resultado positivo después de incubación prolongada.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen (con el medio en pico de flauta) son los dos medios más comúnmente usados en los laboratorios para la detección de la ureasa (ambos disponibles comercialmente).

Asas desechables

Tubos estériles

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo con una asa cargada con el cultivo puro bacteriano o estriar la superficie del agar inclinado. Incubar a 35±2°C de 4 a 48h.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

Control positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 8427; control negativo: *E.coli* ATCC 25922.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las bacterias que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 a 3 h. Las especies que hidrolizan más lentamente pueden requerir hasta 2 o más días.

Una coloración rosa fucsia tanto en el caldo como en el agar indica alcalinización e hidrólisis de urea (prueba positiva) mientras que si no se produce hidrólisis, no hay cambio del color original (color amarillo pálido), y la prueba es negativa.

Los degradadores lentos producen coloración parcial en el medio sólido (generalmente en el pico del tubo), y los rápidos producen coloración en todo el tubo

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se debe calentar el medio de cultivo porque la urea se descompone fácilmente.

Esta es una prueba para la identificación presuntiva de los géneros anteriormente indicados pero se requieren pruebas adicionales para la identificación final de estos microorganismos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. MacFaddin JF, editor. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000; pp. 451-453.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 11 de 13

PNT-ID-01i. PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Prueba usada específicamente para diferenciar *S. pneumoniae* (soluble en bilis) de otros *Streptococcus* alfa-hemolíticos (no solubles en bilis).

2. FUNDAMENTO

S. pneumoniae posee un enzima autolítico intracelular, una amidasa, que lisa la pared celular durante la división. Al añadir sales biliares (desoxicolato de sodio) se activa este enzima y se produce la autólisis del microorganismo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias de cocos grampositivos catalasa negativa alfa-hemolíticas crecidas en medio de agar sangre o agar chocolate.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Método en placa: solución de desoxicolato de sodio en agua al 10%. Ajustar a pH 7,0

Método en tubo: solución de desoxicolato de sodio en agua al 2%. Ajustar a pH 7,0

Asas de plástico desechables

Tubos de plástico o cristal

Tubos con escala de turbidez de MacFarland o método equivalente

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Método en placa: seleccionar colonias sospechosas, grandes o mucoides de un cultivo fresco en agar sangre o agar chocolate y añadir una gota de desoxicolato al 10% directamente sobre la colonia. Mantener la placa a temperatura ambiente (25°C a 27°C) colocada en posición invertida (el agar hacia arriba) o en estufa a 35± 2°C durante 15 minutos aproximadamente o hasta que se seque el reactivo.

Método en tubo: preparar una suspensión en 0,5ml de solución salina estéril con colonias sospechosas de un cultivo fresco en agar sangre o chocolate. La suspensión deberá ser turbia, similar a una turbidez estándar de 0,5 o 1,0 en la escala de McFarland.

Dividir esta suspensión en 2 tubos en cantidades iguales (0,25ml por tubo). Añadir 0,25 ml de solución salina a uno de los tubos y 0,25 ml de desoxicolato de sodio al 2% al otro. Agitarlos e incubarlos a 35± 2°C durante 30'-2 h. Examinar los tubos periódicamente para detectar lisis de las células en el tubo que contiene sales biliares.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Seguir las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC).

Control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619

Control negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para el método en placa, observar la desaparición de las colonias o la lisis de las mismas (prueba positiva, *Streptococcus pneumoniae*). Las colonias de estreptococos no solubles en la bilis permanecerán sin afectar (prueba negativa).

Para el método en tubo, cuando la suspensión en presencia de sales biliares se aclara, las cepas son solubles en bilis (prueba positiva, *S. pneumoniae*). La turbidez en el tubo control con solución salina debe permanecer igual. Si la suspensión queda turbia tanto en el medio con sales biliares como en el medio con solución salina, la prueba es negativa (insoluble en bilis o resistente a la bilis).

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba no debe realizarse con cultivos viejos ya que la actividad enzimática podría perderse.

10. BIBLIOGRAFÍA

- MacFaddin JF, editor. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins 2000; pp. 27-34.
- Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.17.6.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 12 de 13

PNT-ID-01j. PRUEBA DE LA ONPG (β-GALACTOSIDASA)

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Demostrar la producción de la enzima beta-galactosidasa en las bacterias al utilizar el compuesto ortonitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG). Se utiliza para diferenciar enterobacterias que fermentan la lactosa de las que no la fermentan. También se utiliza para diferenciar *Neisseria lactamica* de otras especies de *Neisseria*.

2. FUNDAMENTO

La fermentación de la lactosa requiere dos enzimas; mientras que la permeasa facilita la penetración de la molécula de lactosa dentro de la célula bacteriana, la beta-galactosidasa hidroliza la lactosa para formar galactosa y glucosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas; sin embargo hay bacterias que tienen beta-galactosidasa pero no permeasa. El ortonitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) es un compuesto incoloro estructuralmente similar a la lactosa. En presencia de beta-galactosidasa, el ONPG se rompe en galactosa y ortonitrofenil, un compuesto color amarillo. Por tanto, las bacterias que dan positiva la prueba de fermentación de lactosa, también dan positiva la prueba de la ONPG. Si la prueba de fermentación de lactosa es negativa, la prueba de la ONPG será positiva si es una bacteria fermentadora lenta de la lactosa.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio sólido.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Solución de ONPG (o discos de ONPG disponibles comercialmente, que se utilizarán de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

A. Solución de ONPG

Disolver 80 mg de ONPG en 15 ml de agua destilada a 37°C, agregar 5 ml del buffer fosfato, ajustar a pH 7,0 y esterilizar por filtración. La solución es estable durante 6 meses. Rotular la solución y guardar refrigerada (4 a 8°C), en recipientes de color caramelo o envueltos en papel de aluminio.

B. Buffer fosfato de sodio 1M (pH 7,0)

Disolver 6,9 g de NaHPO₄.H₂O en 45 ml de agua destilada. Agregar 3 ml de una solución de NaOH al 30% y ajustar el pH a 7,0. Llevar el volumen a 50 ml con agua destilada y guardar a 4°C.

Asas desechables

Tubos estériles

Solución salina estéril.

6. PROCESAMIENTO

6.1. PROCEDIMIENTO

Inocular con el microorganismo los tubos con 0,5 ml de solución salina estéril y añadir 2 gotas de la solución de ONPG o bien inocular con el microorganismo tubos con 0,5 ml de solución salina estéril con un disco de ONPG. Incubar a 35 ± 2°C. Leer a las 4 h y si la prueba es negativa leer a las 24 h.

6.2. CONTROL DE CALIDAD

Prueba positiva: *Escherichia coli* ATCC 25922.
Neisseria lactamica ATCC 23970

Prueba negativa: *Proteus mirabilis* ATCC 49565.
Neisseria meningitidis ATCC 53415

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Positivo: color amarillo.

- Negativo: incoloro o amarillo muy pálido.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La solución de ONPG preparada debe ser incolora antes de su empleo. Las bacterias crecidas a partir de medios que contienen glucosa presentan menor reactividad que las crecidas en medios con lactosa. La glucosa inhibe la β-galactosidasa.

No utilizar esta prueba con bacterias que producen pigmento amarillo.

A veces se puede favorecer la liberación de la enzima agregando una gota de tolueno, dejando reposar unos minutos a 37°C y agregando posteriormente el ONPG.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology 2004; pp. 3.3.2.3-3.2.13
2. MacFaddin JF, editor. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000; pp. 363-367.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana	PNT-ID-01	
		Edición N° 01	Página 13 de 13

PNT-ID-01k. PRUEBA DEL CAMP

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína que produce un efecto sinérgico con la beta-hemolisina de *S. aureus*.

2. FUNDAMENTO

Algunos microorganismos sintetizan una proteína que produce un efecto sinérgico con la beta-hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos. Si ambos microorganismos se siembran próximos en un medio de agar sangre, se producirá un fenómeno lítico en el punto de intersección de los dos microorganismos.

La proteína se denominó factor CAMP por las iniciales de los nombres de los autores que descubrieron este fenómeno con la proteína B de *Streptococcus agalactiae*, y esta prueba permite identificar presuntivamente este microorganismo.

Alternativas:

- CAMP-Test inverso: la hemólisis de algunos microorganismos se inhibe por la beta-hemolisina de *S. aureus*.
- Determinar la producción de fosfolipasa D que inhibe la reacción de la prueba del CAMP en la especie *Arcanobacterium haemolyticum*.
- Determinar la producción de fosfolipasa E que inhibe la reacción de la prueba del CAMP en la especie *Rhodococcus equi*.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

Colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo sólido.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

Agar sangre de carnero (5%)
S. aureus ATCC 25923
Asas de plástico desechables

6. PROCESAMIENTO

6.1 PROCEDIMIENTO

- a. Sembrar la cepa *S. aureus* ATCC 25923 en línea recta sobre un medio de agar sangre
- b. Inocular la bacteria a estudiar perpendicularmente a la línea del estafilococo pero sin tocarla
- c. Rotular la placa
- d. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 5% CO_2 24-48 h

6.2. CONTROL DE CALIDAD

- Positivo: *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
- Inverso: *Arcanobacterium haemolyticum* ATCC 9345.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Resultado positivo: formación de una punta de flecha de beta-hemólisis en la intersección de las dos bacterias.
- Resultado positivo inverso: formación de una punta de flecha sin hemólisis.
- Resultado negativo: ausencia de formación de una punta de flecha.

8. RESPONSABILIDADES

Personal técnico: realización de la técnica, control y conservación de las muestras y reactivos.

Personal facultativo: supervisión de la técnica, resolución de problemas y consultas. Validación de resultados.

9. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba del CAMP es una prueba de identificación presuntiva que debe acompañarse de otras pruebas para la identificación definitiva de los microorganismos a los que se aplica.

Se debe utilizar sangre de carnero. La utilización de otro tipo de sangre puede dar resultados falsos negativos

Listeria ivanovii solo da una reacción positiva si se utiliza *Rhodococcus equi* en vez de *S. aureus*.

Algunas cepas de *S. pyogenes* pueden dar una reacción positiva.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Gase K, Ferretti JJ, Primeaux C, McShan WM. Identification, cloning, and expression of the cyclic AMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci. *Infect. Immun* 1999; 67:4725-4731.
2. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology 2004; Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos moleculares de identificación bacteriana	PNT-ID-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción de la metodología necesaria para el análisis del ARNr 16S y de otros genes utilizados como diana en la identificación molecular bacteriana.

Este procedimiento, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, es aplicable a la mayoría de aislamientos bacterianos de origen clínico. Sin embargo, puede suceder que según la especie bacteriana o el aislamiento en cuestión, sea necesario realizar modificaciones.

2. FUNDAMENTO

La técnica de identificación mediante el ARNr 16S se basa en la utilización de cebadores universales diseñados en diferentes zonas conservadas en bacterias, que permiten amplificar regiones variables características de género y de especie. En ocasiones para el estudio del ARNr 16S o de otros genes útiles en la identificación a nivel de género, especie, subespecie, genovariedades, serotipos, etc, es necesaria la utilización de cebadores específicos. Tras la obtención de un único producto de PCR (amplión) se realizará la secuenciación con idénticos o distintos cebadores de la amplificación.

La comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en diferentes bases de datos y su interpretación, permite la identificar el microorganismo.

El procedimiento consta de las siguientes etapas:

- Extracción del ADN cromosómico
- Amplificación del ARNr 16S (*rrs*) u otros genes diana
- Reacción de secuenciación
- Análisis de las secuencias

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad.
- Manuales de funcionamiento correspondientes a los aparatos utilizados en este procedimiento.
- Bibliografía correspondiente a cada gen diana para la identificación molecular y al género/especie bacteriano/a a estudiar.

4. MUESTRAS

Cultivo bacteriano puro crecido en medios de agar sangre, en medios generales o en medios enriquecidos. Es necesaria la ausencia de contaminación.

En las ocasiones que se requiera, esta técnica puede aplicarse sobre muestra directa sin realizar cultivo previo. Según la universalidad o especificidad de los cebadores utilizados, será necesario o no proceder a partir de muestra clínica con origen estéril o con la presencia de una infección monomicrobiana.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de cultivo de agar sangre o medios sintéticos de crecimiento
- Medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB)
- Agua destilada estéril
- Dinucleótidos (ddNTPs)

- *Taq polimerasa* (comprobar que el Mg²⁺ esté incorporado a la solución tampón). Pueden sustituirse los ddNTPs, la *taq*, el Mg²⁺, y el buffer por reactivos comerciales que incluyen a todos estos reactivos, como por ejemplo, el PureTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (Amersham BioSciences)
- Cebadores (directo y reverso)
- Agarosa
- Bromuro de etidio, concentración 0,5 mg/L. Alternativas menos tóxicas [GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, a concentración 0,3ml/L (Biotium)]
- Marcador de peso molecular X (0,07-12,2 kpb) y/o de 100 bp
- EDTA
- Azul de bromofenol (necesario para el aumento de la densidad en la carga del producto de PCR en el gel de electroforesis e indicador de la posición del frente)
- Lisozima
- Proteinasa K
- ARNasa
- SDS
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de potasio
- Ácido acético glacial
- Fenol
- Cloroformo
- Cloroformo-alcohol isoamílico
- Acetato amónico
- Etanol absoluto
- Sistema comercializado de extracción de ADN cromosómico. [*QIAamp DNA Mini Kit*, (Quiagen)] o similares
- Sistema comercializado de purificación del producto de PCR o de la banda de agarosa. [*GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences)], [*ExoSAP-IT* (usb, Affymetrix)] o similares
- Reactivos de secuenciación, *BigDye Terminator* (Applied Biosystems), o el correspondiente al secuenciador utilizado.

6. APARATOS Y MATERIALES

6.1. APARATOS

- Termociclador de tubos eppendorf de 0,5 o 0,2 ml
- Vortex
- Microcentrífuga para tubos eppendorf
- Balanza electrónica
- Fuente y cubeta de electroforesis. Molde, peine
- Analizador de imágenes o en su defecto, transiluminador de luz ultravioleta y cámara de fotos
- Termobloque o baño de ebullición
- Secuenciador ABI Prism 377(Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) o similar

6.2. MATERIALES

- Asas bacteriológicas
- Tubos eppendorf de 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml
- Pipetas de volumen variable y puntas estériles
- Gradillas o soporte de tubos eppendorf
- Guantes de nitrilo

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos moleculares de identificación bacteriana	PNT-ID-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 6

7. PROCESAMIENTO

Se recomienda introducir en todas las etapas un control interno positivo (bacteria con 100% de similitud con cepa de referencia ATCC o similar) y un control interno negativo (agua destilada estéril).

7.1. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO

Opción 1. Purificación del ADN

Realizar el método según procedimiento indicado en la referencia de Sambrook y cols, 2001. Un método alternativo y sencillo (Ausubel y cols, 1991) consiste en:

- Suspensión del cultivo bacteriano en 300 µl de agua destilada, al que se añaden 300 µl de cloroformo.
- Agitación en vórtex hasta su homogeneización.
- Incubación de la suspensión durante 20 min a 80°C
- Introducir en congelador durante 20 min a -20°C
- Centrifugar a 13.000 rpm 3 min, obteniendo una solución con dos fases
- Traspasar la fase superior a un eppendorf limpio constituyendo el extracto de ADN que se utilizará para realiza la PCR posterior

Opción 2. Lisis de la colonia

- Añadir un asa de siembra del cultivo a 500 µl de H₂O destilada estéril contenidos en un tubo eppendorf de 1,5 ml (rotulado con número de aislado)
- Homogeneizar mediante vórtex
- Introducir vial en baño de ebullición o termobloque durante 10 min a 100°C
- Centrifugar 5 min a 13.000 rpm
- Recoger sobrenadante

Opción 3. Sistemas comerciales

Existe una gran variedad de sistemas comercializados de extracción de ADN cromosómico de amplio espectro o específico, según el tipo de microorganismo o muestra clínica de origen. Como el sistema *QIAamp DNA Mini Kit*, (Quiagen)] o similares. Estos métodos permiten la cuantificación posterior del ADN purificado.

7.2. AMPLIFICACIÓN DEL ARNr 16S (*rrs*) U OTROS GENES DIANA

7.2.1. Preparación de la pre-mezcla de PCR: para minimizar la oportunidad de que los iniciadores se

acoplen al ADN molde y prevenir que la ADN polimerasa empiece a trabajar antes del primer paso de desnaturalización es conveniente mantener los viales en hielo mientras se incorporan los ingredientes de la reacción. Para un volumen final de reacción de 25 µL /muestra, se pipetearán en un microtubo para PCR las cantidades de cada uno de los componentes de la tabla 1, multiplicadas por el número de muestras a analizar (incluyendo el control positivo y negativo) mas dos. Distribuir la pre-mezcla de PCR en tantos microtubos como muestras a analizar (incluyendo los controles positivos y negativos) a razón de (25-X) µL por microtubo, donde X son los µL de dilución de ADN molde sobre los que se realizará el ensayo. Dispensar en un último microtubo 25 µL (control negativo).

7.2.2. Reacción de PCR: las condiciones de amplificación del fragmento correspondiente al ARNr 16S se indican a continuación. Para otros genes consultar referencias indicadas en las tablas 2 y 3.

	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min.	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	30
Hibridación	58°C	45 seg	
Elongación	72°C	1 min.	
Elongación final	72°C	10 min.	1
Conservación	4°C	indefinidc	1

Terminada la reacción, transferir 3 µL del producto de amplificación a un nuevo microtubo y añadir 1 µL de buffer de carga 6x. Reservar el resto del producto de PCR a -20°C. Preparar el marcador de peso molecular de marcador X, 100 pb y de 50 bp el en la misma proporción de muestra y buffer de carga (5:1).Tinción y visualización de los productos amplificados.

Tabla 1. Componentes de la pre-mezcla de PCR

Reactivos	Concentración comercial más frecuente	Cantidad para 25 µL de reacción	Concentración final
Agua destilada o desionizada estéril	–	(16,5 – X) µL ¹	–
Buffer estándar de PCR	10X	2,5 µL	10 mM Tris-HCl + 50 mM KCl
MgCl ₂	15 mM	2,5 µL	1,5 mM
Mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 mM	0,5 µL	200 µM de cada dNTP
Cebador ²	5 µM	1 µL	100 nM
ADN Taq polimerasa	5 u/µL	1 µL	5 unidades ³
Volumen Final	–	(25 – X) µL	–

¹ X = µL de ADN molde; ² Secuencias en las tablas 2 y 3; ³ Una unidad se define como la cantidad de enzima que es capaz de incorporar 10 nmol de dNTP en un material ácido-insoluble en 30 minutos a 75°C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos moleculares de identificación bacteriana	PNT-ID-02	
		Edición Nº 01	Página 4 de 6

Tabla 2. Cebadores de amplio espectro en la amplificación y secuenciación del ARNr 16S

Gen / Código cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
ARNr 16S		
536F (A,S)	CAGCAGCCGCGGTAATAC	Fenollar y cols, 2006
Rp2 (A,S)	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
M13d (A, S)	GTAAAACGACGGCCAG	
M13r (A, s)	CAGGAAACAGCTATGAC	
ARNr 16S		
5F(A,S)	TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC	Simmon y cols, 2006
1194R (A,S)	ACGTCATCCCCACCTTCCTC	
810R (A, S)	GGCGTGGACTTCCAGGGTATCT	
ARNr 16S		
BAK11w (A,S)	AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Bosshard y cols, 2004
BAK2 (A)	GGACTAC(C/T/A)AGGGTATCTAAT	
ARNr 16S		
16SFa (A,S)	GCTCAGATTGAACGCTGG	Harris y cols, 2003
16SFb (A,S)	GCTCAGGAYGAACGCTGG	
16SR (A,S)	TACTGCTGCCTCCCGTA	
ARNr 16S		
E8F (A,S)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Baker y cols, 2003
E9F (A,S)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	
E334F (A,S)	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC	
E341F (A, S)	CCTACGGGIGGCIGCA	
E786F (A, S)	GATTAGATACCCTGGTAG	
E533R (A, S)	TIACCGIIICTICTGGCAC	
E926R (A, S)	CCGICIATTIITTTIAGTTT	
E939R (A, S)	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC	
E1115R (A, S)	AGGGTTGCGCTCGTTG	
E1541R (A, S)	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	
ARNr 16S		
8s_20 (A,S)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Bosshard y cols, 2002
536a_18 (A,S)	GTATTCCGCGGCTGCTG	
ARN 16S		
fD1 (A,S)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Drancourt y cols, 2000
Rp2 (A,S)	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	

F:iniciador; R: inverso; (A,S): amplificación, secuenciación;
R=A/G; W=A/T; S=C/G; Y=C/T; K=G/T; N=A/G/C/T.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos moleculares de identificación bacteriana	PNT-ID-02	
		Edición Nº 01	Página 5 de 6

Tabla 3. Cebadores de amplio espectro en la amplificación y secuenciación de otras dianas moleculares.

Gen / Código cebador	Género/Especie Secuencia 5'-3'	Referencia
rpoB 2413F (A,S) 3272R (A,S)	<i>γ Proteobacteria</i> GCITTYATGCCITGGAAAYGG TCRTCRTAIGGCATRTCCTC	Adékambi y cols, 2009
rpoB +1Rb (A) 4134RB (A) Secuenciación	<i>Brucella</i> spp. ATGGCTCAGACCCATTCTTTC TTATTCTGCCGCGTCCGGAA RBseq 1-9	Marianelli y cols, 2004
rpoB C2700 (A,S) C3130 (A,S)	<i>Corynebacterium</i> spp. CGWATGAACATYGGBCAGGT TCCATYTCRCCRAARCGCTG	Khamis y cols, 2004
rpoB CM7 (A,S) Cm31b (A,S)	<i>Enterobacteriaceae</i> AACCAGTTCGCGTTGGCCTGG CCTGAACAACACGCTCGGA	Fenollar y cols, 2006
gyrB gyrB3F (A, S) gyrB7F (S) gyrB9R (S) gyrB14R (A, S)	<i>Aeromonas</i> spp. TCCGGCGGTCTGCACGGCGT GGGGTCTACTGCTTCACCAA ACCTTGACGGAGATAACGGC CCTTGACCGAAATGACCGCC TTGTCCGGGTTGTACTIONGCTC	Yañez y cols, 2003

7.2.2. Purificación de los productos amplificados:

Aplicación de sistemas comercializados de purificación del producto de PCR o de la banda de agarosa [*GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences)], [*ExoSAP-IT* (usb, Affymetrix)] o similares.

7.3. SECUENCIACIÓN DEL ARNr 16S (*rrs*) Y OTROS GENES DIANA

Las condiciones de secuenciación y amplificación se optimizarán en cada laboratorio para cada juego de cebadores. Para la secuenciación de cada gen diana, se prepara la pre-mezcla de secuenciación con el primer directo y se prepara la pre-mezcla de secuenciación con el primer reverso. Los componentes de la pre-mezcla de la PCR de secuenciación se indican en tabla 4.

Tabla 4. Pre-mezcla de componentes de la PCR de secuenciación

Reactivos	Concentración comercial más frecuente	Cantidad para 10µL de reacción
Agua destilada o desionizada estéril	–	(6,5 – X) µL ¹
Buffer mix de secuenciación		1 µL
Mix de secuenciación		1,5 µL
Cebador ²	5 µM	1 µL
Volumen Final	–	10 µL

¹ X = µL de PCR molde, 2-3 µL según intensidad de ADN. ² Secuencias en la tabla 2.

Tabla 5. Secuenciación del producto de PCR

	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min.	1
Desnaturalización	96°C	10 seg.	
Secuenciación	55°C	4min 5 seg	25
Conservación	4°C	indefinido	1

Finalizada la reacción de secuenciación se procederá según las indicaciones correspondientes del fabricante del secuenciador automático.

7.4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Se edita el electroferograma o cromatograma de la secuencia obtenida, y se analiza visualmente la presencia de ruido, ambigüedades, y limpieza de las señales. Optimizada la secuencia, a continuación se alinea con otras secuencias depositadas en bases de datos de acceso público: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), le BIBI (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>), Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>), Ribosomal Data-base Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>); o privado como el MicroSeq.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Métodos moleculares de identificación bacteriana	PNT-ID-02	
		Edición Nº 01	Página 6 de 6

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

En la comparación de secuencias se consideran factores como la tasa de similitud (o coincidencia en los nucleótidos), el tamaño de las secuencias analizadas, y la información disponible sobre la cepa/especie con las que la cepa problema a identificar presenta mayor similitud. También se considerarán la información epidemiológica del paciente y la concordancia con pruebas fenotípicas. La definición del género o especie a través de un valor para el ARNr 16S u otros genes puede no ser apropiada para todos los géneros o especies, por lo que existen diferentes criterios en el porcentaje de similitud del ARNr 16S para la pertenencia o no a una misma especie. Una actitud de consenso es aceptar que una similitud del $\geq 99\%$ define una especie, y tasas del $\geq 95\%$ al $\geq 99\%$ definen un género.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. Los ensayos están basados en distintos principios técnicos que han ido evolucionando con el tiempo, la experiencia adquirida y las recomendaciones nacionales e internacionales.

La provisión de la información epidemiológica del paciente y las pruebas fenotípicas realizadas y su consideración con los resultados de la identificación molecular, minimiza los errores de identificación.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se presentan con estas pruebas son fundamentalmente la utilización de bases de datos con algunas secuencias de baja calidad o con bacterias incorrectamente identificadas, las modificaciones en la asignación de género y/o especie, la descripción de nuevos géneros o nuevas especies, la baja frecuencia de aislamientos de determinados patógenos de descripción reciente, y la baja disponibilidad de secuencias para realizar la comparación de un microorganismo o de un gen determinado.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol. 2009; 17:37-45.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struth L.. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1991. Supplement 13:241-245.
- Baker GC, JJ Smith, and Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol. Methods 2003; 55:541-555.
- Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, Böttger EC, Zbinden R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2004. 42:2065-2073
- Bosshard PP, Zbinden R, Altwegg M. Paenibacillus turicensis sp. nov., a novel bacterium harbouring heterogeneities between 16S rRNA genes. Int J Syst Evol Microbiol. 2002. 52:2241-2249.
- Drancourt M, C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, JP Gayral, D. Raoult . 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol 2000; 38:3623-3630.
- Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. J Clin Microbiol. 2006; 44:1018-1028.
- Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. J Med Microbiol. 2003. 52:685-691
- Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of Corynebacterium species. J Clin Microbiol. 2004; 42:3925-3931
- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in Brucella spp J Clin Microbiol. 2004 Dec;42: 5439-5443.
- Sambrook J, Russell DW . 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
- Simmon KE, Croft AC, Petti CA. Application of SmartGene IDNS Software to Partial 16S rRNA Gene Sequences for a Diverse Group of Bacteria in a Clinical Laboratory. J Clin Microbiol. 2006; 44:4400-4406.
- Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D., Figueras MJ , Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53:875-883.

Servicio de Microbiología	Métodos de identificación bacteriana mediante espectrometría de masas	PNT-ID-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción del método empleado para la identificación bacteriana por espectrometría de masas (MALDI-TOF, proteómica).

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas MALDI-TOF se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por el analizador Time of Flight (tiempo de vuelo) que se integra típicamente con fuentes de ionización MALDI. Permite la tipificación bacteriana a nivel de género y especie (y en determinados casos también subespecie). Mediante esta técnica se obtiene un espectro de masa compuesto por los diferentes picos (m/z) obtenidos tras la ionización y desorción de los péptidos y pequeñas proteínas característicos de cada especie bacteriana. El espectro con un rango entre 2.000-20.000 Da, representa de manera predominante a las proteínas ribosómicas (conservadas y abundantes).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el laboratorio
- www.bdal.com/products.html
- www.bruker.es
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49:543-551.

4. MUESTRAS

4.1. COLONIAS O CULTIVOS LÍQUIDOS

Los microorganismos se pueden obtener a partir de un cultivo en medio sólido o líquido. En cualquier caso se debe tratar de cultivos puros, con independencia de que los medios sean o no selectivos, de no más de 18-24 horas de incubación. En el caso de tener el microorganismo crecido en una placa de agar, se empleará una colonia o parte de ella.

Para conseguir mejores resultados en la identificación de algunos microorganismos, se emplea un método de extracción con etanol/ ácido fórmico/ acetonitrilo para romper las células.

En cada laboratorio de microbiología se siguen criterios propios para la selección de las cepas que requieren identificación mediante este método.

4.2. MUESTRAS CLÍNICAS

Es posible la identificación directa desde hemocultivo positivo y desde orina patológica. Precisa de un paso previo de extracción y en algunos casos de concentración.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (liofilizado, -20°C)
- Acetonitrilo

- Ácido tri-fluoro-acético
- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- Ácido fórmico al 70%
- Ácido tri-fluoro-acético al 80%
- Agua destilada estéril (Agua grado HPLC)

6. APARATOS Y MATERIALES

6.1. APARATO

- Espectrómetro de masas MALDI-TOF. Incluye tarjetas metálicas de aplicación de muestras.
- Ordenador con *software* de captura de espectro y con *software* de análisis del espectro para obtener la identificación.

6.2. MATERIALES

- Tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad.
- Micropipetas calibradas de 10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l.
- Puntas de pipeta de 200 μ l
- Asas de siembra estériles desechables
- Vórtex: Heidolph. Reax. Top
- Microcentrífuga (Mikro 20-Hettich) (MICR-IS-7)
- Gradillas para tubos de PCR
- Colectores plásticos para material desechable

7. PROCESAMIENTO

Se pueden utilizar células bacterianas enteras (colonia), células lisadas, extractos bacterianos crudos y muestras clínicas directas (sangre, orina).

Las macromoléculas (proteínas) a analizar, provenientes de la muestra respectiva se fijan sobre una placa de acero y se tratan con una matriz (ácido α ciano 4-hidroxicinámico) disuelta con una mezcla de solventes orgánicos volátiles: acetonitrilo y ácido tri-fluoroacético. La muestra (co-cristalizada junto con la matriz) es irradiada con un láser pulsado (de nitrógeno y UV, 337 nm). La energía del láser es absorbida por la matriz cuyo resultado es la ionización de los péptidos cuya disipación produce la co-evaporación (desorción) de la muestra. Los iones (cargados positivamente, la desorción está asociada a una transferencia de protones) son dirigidos a un analizador (TOF, *time of flight*) mediante un campo eléctrico y el cociente *m/z* (*masa/carga*) de cada ión se determina según el tiempo que éste tarda en llegar al detector ("tiempo de vuelo"). El resultado consiste en un espectro de masa en el cual se grafica el cociente masa/carga (abscisas) vs. intensidad (ordenadas). Esta "huella peptídica" es característica de cada proteína y permite identificarla de forma inequívoca al compararla con los espectros de masa incluidos en las bases de datos del MALDI-TOF.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El *software* analiza, mediante un algoritmo, los picos obtenidos y tras su comparación con los picos de la base de datos obtiene una identificación. Indica el grado de confianza de los resultados de la identificación para cada muestra.

Servicio de Microbiología	Métodos de identificación bacteriana mediante espectrometría de masas	PNT-ID-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La cantidad de la muestra en la placa de análisis debe ser discreta y su distribución fina y homogénea para obtener cristales pequeños y uniformes de modo que los impactos del láser sean parejos en toda la muestra. Una vez añadida la matriz a la tarjeta es importante dejar secar en reposo a temperatura ambiente para que cristalice de forma óptima.

Respecto al equipo, es crucial mantener siempre el vacío que el espectrómetro requiere para trabajar. Requiere calibraciones y controles de calidad frecuentes.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Relación microorganismo/ matriz: va influir de manera muy importante en la obtención de un buen resultado por tanto es conveniente conseguir estandarizar el inóculo.
- Condiciones de cultivo: deben ser cultivos puros. Se recomienda emplear cultivos frescos particularmente en bacterias que forman esporas (*Bacillus* spp.), bacterias que acumulan productos metabólicos (*Arthrobacter* spp.) o bacterias que sufren autólisis a medida que los cultivos envejecen (*Streptococcus* spp.).

- Pueden existir errores en la identificación por MALDI-TOF entre los microorganismos pertenecientes al grupo de los estreptococos del grupo viridans y neumococo.

- Número limitado de referencias en la base de datos empleada para establecer la comparación e identificación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:1549-1554.
2. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:1169-1175.
3. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2110-2115.
4. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2009; 4: e8041.