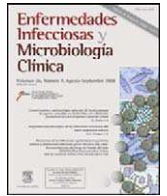


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología

Germán Bou^{a,*}, Ana Fernández-Olmos^b, Celia García^c, Juan Antonio Sáez-Nieto^d y Sylvia Valdezate^d

^a Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario, La Coruña, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

^d Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de marzo de 2011

Aceptado el 28 de marzo de 2011

On-line el 17 de junio de 2011

Palabras clave:

Identificación microbiana

Pruebas bioquímicas

16SrRNA

MALDI-TOF

R E S U M E N

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.

Dentro de la práctica rutinaria diaria, el laboratorio de microbiología aplica técnicas fenotípicas que permiten lograr este objetivo. Sin embargo, muestran algunas limitaciones que se observan de manera más evidente para algún tipo de microorganismo.

Los métodos moleculares permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal. 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.

Recientemente los métodos basados en proteómica han irrumpido de manera importante en el campo del diagnóstico microbiológico y sin duda va a tener un gran impacto en la organización futura de los servicios de microbiología.

Este manuscrito revisa de manera concisa los aspectos más reseñables de los tres métodos de identificación bacteriana arriba descritos que se usan en el laboratorio de microbiología.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Bacterial identification methods in the microbiology laboratory

A B S T R A C T

In order to identify the agent responsible of the infectious process and understanding the pathogenic/pathological implications, clinical course, and to implement an effective antimicrobial therapy, a mainstay in the practice of clinical microbiology is the allocation of species to a microbial isolation.

In daily routine practice microbiology laboratory phenotypic techniques are applied to achieve this goal. However, they have some limitations that are seen more clearly for some kinds of microorganism.

Molecular methods can circumvent some of these limitations, although its implementation is not universal. This is due to higher costs and the level of expertise required for the implementation, so molecular methods are often centralized in reference laboratories and centers.

Recently, proteomics-based methods made an important breakthrough in the field of diagnostic microbiology and will undoubtedly have a major impact on the future organization of the microbiology services.

This paper is a short review of the most noteworthy aspects of the three bacterial identification methods described above used in microbiology laboratories.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Microbial identification

Biochemical test

16S rRNA

MALDI-TOF

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: german.bou.arevalo@sergas.es (G. Bou).

Introducción

Se presenta una revisión que trata de mostrar de manera somera y lo más concisa posible una actualización de la metodología que se usa de manera habitual en el laboratorio de microbiología clínica, con el fin de identificar el agente etiológico responsable de un cuadro infeccioso.

Esta revisión profundiza en tres tipos de metodología: los métodos fenotípicos, moleculares y otros que han irrumpido recientemente en el laboratorio, y que están basados en métodos proteómicos.

Cada uno de los tres métodos tomados en el momento adecuado aportan soluciones de gran valor al microbiólogo clínico en su práctica clínica diaria.

Métodos fenotípicos

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 asequibles¹.

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.

Dentro de esta batería de pruebas bioquímicas se destacarían las:

Características microscópicas

Características macroscópicas: morfología y hemólisis; Cultivo: Medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición.

Pruebas bioquímicas, diferenciando^{1,2}

1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; 2) otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h tal y como la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; 3) pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes, y 4) pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo hipersalino.

Destacar que existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipruebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, de inoculación, de incubación y de lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores. Estos sistemas pueden ser manuales y automatizados. Entre ellos:

Sistemas comerciales manuales o galerías multipruebas

Se trata de celdillas aisladas con 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 cualquiera es negativa, se le asigna un valor de 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, no tenemos más que buscar el código numérico y comprobar a qué bacteria pertenece. Estos son algunos de los sistemas disponibles en el mercado:

API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc.

Sistemas comerciales automatizados

Hay en el mercado galerías multipruebas, 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.

Estos son algunos de los sistemas en paneles comerciales más extendidos disponibles en el mercado: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.

Métodos moleculares

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica —no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros— se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos.

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa³. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros.

En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan a continuación del ARNr 16S.

El ARNr 16S (*rrs*)

Es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De distribución universal, componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Aunque el ARNr 16S constituye la diana de acción para algunos antimicrobianos, produciéndose mutaciones que conducen a la resistencia fenotípica, no se invalida la utilización del ARNr 16S para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.

16S-23S ARNr

Espacio intergénico del 16S-23S ARNr (ITS)⁴. Estas ITS se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos *rrs*. Este elevado grado de diversidad observado en las ITS en diferentes géneros, diferentes especies, diferentes cepas, y en una misma cepa producido por variaciones en el número, tamaño y composición de las ITS del 16S-23S ARNr, constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y/o tipificación.

ARNr 23S

Puede ser una buena alternativa en los casos en los que la fracción 16S no proporciona resultados concluyentes⁵. Un aumento en el coste y alguna dificultad técnica en la amplificación de fragmentos más grandes pueden limitar su uso, aunque ser utilizado en la actualidad como un método auxiliar útil con fines taxonómicos y filogenéticos.

rpoB (subunidad β de la ARN polimerasa)⁶

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. Con una distribución universal en bacterias, sugirió su aplicación como un cronómetro molecular de alta potencia. El uso de este marcador ofrece algunas ventajas respecto a los marcadores moleculares precedentes, entre ellas, las secuencias del *rpoB* presentan en numerosas ocasiones mayor calidad que las del ARNr 16S, al ser secuencias de reciente obtención; también otro factor importante y favorable, 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%). Criterio que no fácilmente se cumple para valores de similitudes del ARNr 16S superiores al 99%; y por último, otra circunstancia favorable del análisis del *rpoB* es su aplicación como instrumento de genotipificación y de filogenia. Consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se producen son silentes (tercera posición del codón), y que por su función *housekeeping* probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética.

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.

Tabla 1

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

Categoría	Recomendaciones
Cepas por 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 2.300-3.300 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 la identificación de género	Distinto género: una similitud < 85,5%
Criterio de identificación de nueva especie/subespecie bacteriana	Nueva especie: una similitud > 97,7% Nueva subespecies: una similitud 98,2%

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 lácticas⁷. 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.

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

Análisis de secuencias y criterios para la interpretación de resultados

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del 16S ARNr u otros genes mencionados arriba, se basan 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 sí serán factores críticos la extracción del ADN cromosómico y la amplificación, procesos técnicos que deberán tenerse en cuenta en toda metodología de identificación molecular en el laboratorio de microbiología. Tras la secuenciación del amplicón, la observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias.

Algunas veces se suceden errores entre el electroferograma y la secuencia (por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o

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) son consideradas en el análisis.

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) o 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 nuestra cepa mediante la comparación con las 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 16S ARNr son: el 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, se puede emplear la base de datos de acceso privado MicroSeq 500 (Applied Biosystems; Foster City, EE.UU.) que contiene las secuencias 527-pb del ARNr 16S de con más de 1.434 especies o subespecies con 235 géneros. Otras utilidades ofrecidas por estas bases de datos son como la construcción de árboles filogenéticos, diseño de cebadores, análisis de polimorfismos o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), etc. Gran parte de ellos disponibles en la página <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>.

En relación a los criterios para la interpretación de resultados, la introducción de nuestra secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual trabajemos, nos proporcionará un informe constituido por varias secciones. En el caso de la opción BLAST del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en la primera sección observaremos que 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 nuestra secuencia problema o *query* frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicándonos el número y porcentaje de bases idénticas o *identity*. En el caso de desear más información sobre el microorganismo(s)

con el cuál muestra mayor identidad, nos posicionáramos en la parte superior del alineamiento, donde aparece indicado el número de acceso del GenBank. Si nos interesa la publicación donde se describe la secuencia con la que se compara, nos colocamos sobre el número en azul ubicado en el epígrafe PubMed.

Considerar, 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 $\leq 0,5$ al 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. Una actitud de consenso es aceptar que una similitud del $\geq 98,5\%$ define una especie, y tasas del ≥ 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* codificante de la proteína M en *Streptococcus pyogenes* en el cual diferencias indican los distintos serotipos.

Se considera que el gen *rpoB* es el gen más adecuado para la identificación y discriminación filogenético a nivel de especies y subespecies, analizando la secuencia situada entre las posiciones 2300-3300. Según el tamaño del fragmento del *rpoB* se establece 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).

Frecuentemente, las comparaciones entre las diferentes secuencias se muestran mediante los alineamientos lineales y dendrogramas. Esta opción es proporcionada por BLAST, BIBI, y otros softwares PAUP (<http://paup.csit.fsu.edu/>), 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*). Similares entre sí, 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 pueden ser minimizadas.

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*) permitiéndonos identificar diferentes clusters en los géneros de *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, y otros.

Indicaciones de la identificación molecular

En la práctica de la microbiología clínica se producen una serie de circunstancias en la identificación bacteriana como son: dificultades en el aislamiento, crecimiento lento o en medios de cultivo *in vitro* complejos, baja actividad en las pruebas bioquímicas, ausencia o baja efectividad de técnicas serológicas, etc. Estas situaciones, entre otras como la obtención de resultados reproducibles e intercambiables entre laboratorios, confieren a las técnicas

moleculares, y en especial al ARNr 16S y al *rpoB*, un protagonismo que a continuación describimos³:

Identificación de cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento, o fenotípicamente atípicas

Identificación de cepas de difícil identificación fenotípica o crecimiento fastidioso. Como sucede con la dificultad para diferenciar fenotípicamente las especies de *Nocardia* y de *Mycobacterium*. Sin embargo, esta identificación no es completa para algunas especies de micobacterias.

Descripción de nuevos patógenos

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, con un uso más extensivo.

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. La primera, es que el contenido bacteriano GC puede estimarse matemáticamente por el contenido GC del gen *rpoB*. La segunda situación es que la similitud presentada en 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).

Identificación de bacterias de difícil cultivo

Como ejemplo, se ha aplicado exitosamente y se ha podido constatar, la presencia de *Bartonella quintana* y *Coxiella burnetii* como principales agentes etiológicos en endocarditis con cultivo negativo⁸. Pero en el caso de que la muestra posea un origen no estéril o del medio ambiente, y se presente flora mixta, esta estrategia no es eficiente.

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.

Calidad disminuida de las secuencias depositadas en la base de datos y errónea asignación de especies

Ya que 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.

Ausente o baja correlación entre la identificación genotípica y fenotípica

Esto sucede cuando nos encontramos con genotipos idénticos o similares y diferentes fenotipos o especies con significación clínica distinta. Esto sucede con: *Mycobacterium 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*; *Streptococcus pneumoniae* y *S. mitis*. Por el contrario, se dan circunstancias en 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*). En el caso de discrepancias entre el fenotipo y el genotipo de una cepa, ambos son estudiados de nuevo, y confirmando los resultados, se considera que el genotipo se impone sobre el fenotipo.

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. Así sucede con diferentes especies de los géneros *Bacillus* (*B. cereus* y *B. thuringiensis*; *B. globisporus* y *B. psychrophilus*), en *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* encontramos > 6 copias de ARNr 16S que difieren en > 1,5% entre ellas. Recordar, que muchas de aquellas especies o subespecies que no pueden identificarse mediante el ARNr 16S, lo son mediante el análisis del *rpoB*.

Presencia de electroferogramas o cromatogramas de ADN mixtos

La utilización del ARNr 16S como herramienta de diagnóstico se ha limitado a infecciones monobacterianas, ya que en infecciones polimicrobianas obtendríamos un electroferograma mixto. En estas situaciones, con frecuencia, se halla implicado 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 desnaturalizante o «denaturing gradient gel electrophoresis»; amplificaciones independientes para gram-positivos y para gram-negativos; pirosecuenciación; o la utilización de un algoritmo en el programa informático RipSeq (iSento), 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, va a proporcionarnos en un futuro inmediato plataformas más eficientes en la identificación molecular bacteriana. 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 filogenético del ARNr 16S.

Nuevas tecnologías en la identificación molecular microbiana

Recientemente, la aparición de la técnica de PCR-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 directa⁹. 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.

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 tres regiones variables del ARNr 16S (V1-V3, o V1, V2 y V6) y del ARNr 18S, respectivamente en hemocultivos (BlackLight Sepsis Kit, BlackBio, Madrid, España; Pyromark ID, Quiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se obtienen tres 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)¹⁰ 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 TIGER «*Triangulation Identification for the Genetic Evaluation of Risks*» (Ibis T5000, Alci-med, Paris, France) entrando la información en una base de datos genómica que asigna la determinación de especie. Ventajas indicadas son: no requieren cultivo o conocen 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.

Métodos basados en proteómica

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.

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)¹¹. 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 ».

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.

Los tres componentes básicos de un espectrómetro de masas son los siguientes:

1. 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.
2. Analizador de masas. Utiliza un campo eléctrico o magnético para acelerar los iones y separarlos en función de su relación masa/carga (m/z).
3. 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*».

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 esté embebida en una matriz orgánica.
- Como fuente de ionización emplea un láser. Se generan iones tras bombardear con fotones (láser) la muestra. Se producen rayos UV de 337 nm.
- La separación de los iones se produce según el «tiempo de vuelo».
- El tiempo de obtención del espectro es aproximadamente de un minuto para 10^{-12} g de un compuesto de masa/carga (m/z) de 1.000 daltons.

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 décadas¹¹. Sin embargo, sólo recientemente ha empezado a usarse como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana¹². En un principio se efectuaron estudios parciales sobre su efectividad para la identificación de determinados microorganismos en condiciones controladas¹³. Actualmente, cada vez aparecen más trabajos que han estudiado su efectividad 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 rutina¹⁴.

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,...).

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 ribosomales.

Las características principales de estos sistemas son las siguientes:

Tabla 2
Sistemas comerciales que emplean espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana

	Sistemas comerciales MALDI-TOF MS			
Software y base de datos	Microbe Lynx System (Waters Corporation y Manchester Metropolitan University)	Maldi Biotyper (Bruker Daltonics)	SARAMIS (Anagnostec GmbH)	MS-ID (BioMérieux)
Espectrómetro de masas	Micro MX (Waters Corporation)	Microflex (Bruker)	Axima (Shimadzu)	Vitek MS (BioMérieux)
Identificación	Bacterias aero/anaerobias	Bacterias, levaduras y filamentosos	Bacterias, levaduras y filamentosos	Bacterias, levaduras y filamentosos
Rango	500-15.000 Da	2.000-20.000 Da	2.000-20.000 Da	2.000-20.000 Da
Requiere preparación de la muestra	Sí	No	No	No
N.º pocillos en tarjeta	96 pocillos	96 pocillos	48 pocillos	48 pocillos ×4
Reproducibilidad	Escasa (según medio de cultivo)	Elevada	Elevada	Elevada
Transferencia de resultados al sistema informático del laboratorio	No	Sí	Sí	Sí

- 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 (aproximadamente 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.

En la *tabla 2* 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, AXIMA@SARAMIS™ de Shimadzu & Anagnostec. y MS-ID de bioMérieux.

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 los picos obtenidos y tras la comparación con los picos de la base de datos obtiene un *score* logarítmico cuyo valor 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 obtenemos un resultado de identificación en el rango de aceptable por parte de la técnica comercial, entraría en juego nuestra formación como microbiólogos para validar esa identificación. Es importante tener en cuenta la naturaleza de la colección de aislamientos que nos proponemos 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.

Si por el contrario, obtenemos como resultado «no identificado» puede tener dos posibles explicaciones: en primer lugar el espec-

tro 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.

Ventajas, inconvenientes y limitaciones

La utilización de la espectrometría de masas MALDI-TOF presenta ventajas e inconvenientes.

Como «ventajas» en el laboratorio de microbiología la técnica 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 eficientes, 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 período 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 va influir 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. Si es importante la antigüedad del cultivo. Se recomienda 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 pneumococo, resultando adecuado para enterococos y estreptococos 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 un test alternativo las identificaciones 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.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2004. p. 3213-323.
2. MacFaddin JF, editor. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3.^a ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
3. Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:840-62.
4. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol*. 1996;142:3-16.
5. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation of 23 s rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:2221-5.
6. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O, on behalf of the Norwegian Study Group of *Acinetobacter*. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:738-44.
7. Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of member of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2003;53:875-83.
8. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:1-13.
9. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki 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:R159. Epub 2010 Aug 24.
10. Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino Ivy C, et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2921-32.
11. Anhalt JP. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*. 1975;47:219-25.
12. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2001;20:157-71.
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. *Anal Chem*. 2004;76:5769-76.
14. 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;49:543-51.