

MÈTODES D'IDENTIFICACIÓ BACTERIANA AL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA

Departament de Microbiologia i Ecologia

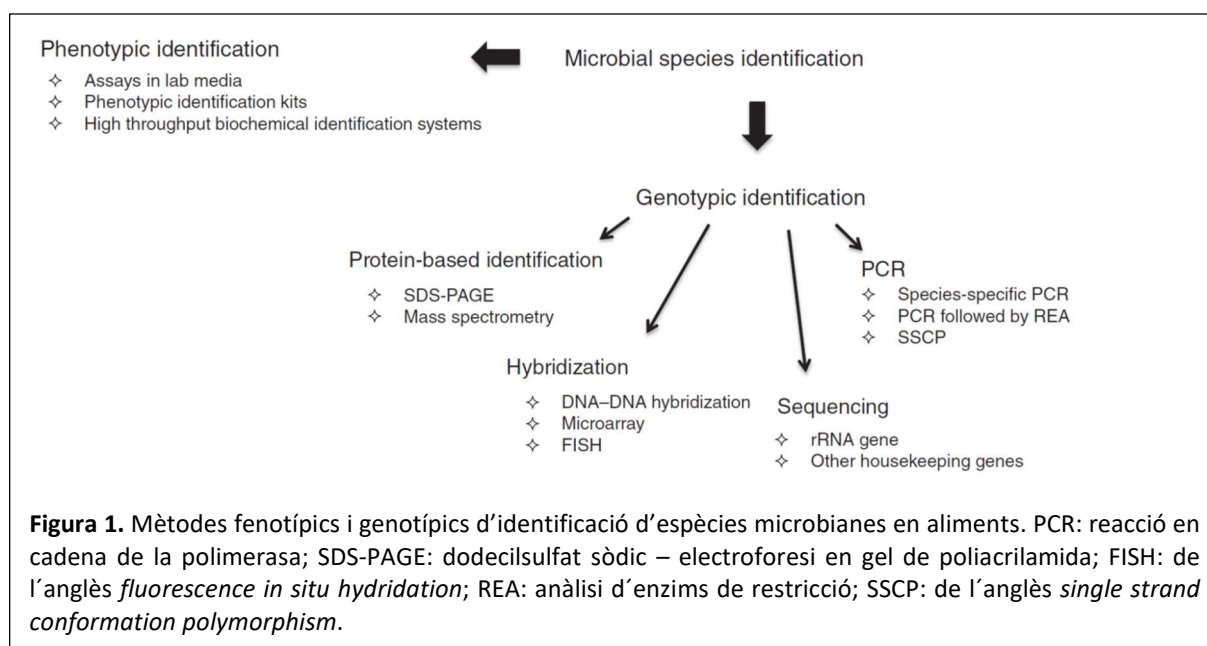
María Consuelo Pina Pérez
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

1. INTRODUCCIÓ

Una de les tasques fonamentals del laboratori de microbiologia és l'aplicació d'una metodologia precisa que permeta identificar els microorganismes implicats en processos clínics associats a infeccions o els que tenen relació amb l'ésser humà.

Amb l'objectiu d'identificar l'agent etiològic responsable del procés infecciós, i per tal de conèixer-ne les implicacions patogèniques i patològiques, i l'evolució clínica, així com aplicar una teràpia antimicrobiana eficaç, un element fonamental en la pràctica de la microbiologia clínica és l'assignació d'espècie a un aïllat microbià.

Rutinàriament, el laboratori de microbiologia aplica tècniques fenotípiques que permeten aconseguir els objectius exposats (figura 1). Aquests mètodes estan consolidats als laboratoris de microbiologia i en la pràctica rutinària diària mostren algunes limitacions que s'observen específicament, i d'una manera més evident, per a algun tipus de microorganismes. Els mètodes moleculars permeten superar algunes d'aquestes limitacions, però la seua implantació no és universal en tots els laboratoris, ja que presenten un cost més elevat i requereixen un cert grau d'especialització, raó per la qual solen estar centralitzats en laboratoris o centres de referència. Més endavant, l'abaratiment dels costos en permetrà un ús més generalitzat als laboratoris de microbiologia.



D'altra banda, en el treball diari d'aquests laboratoris es necessiten solucions ràpides i eficaçes per a identificar els microorganismes d'interès mèdic. Per això, en els últims anys hem assistit a un creixement important en l'oferta de mètodes moleculars ràpids aplicats al diagnòstic microbiològic. En general, escurcen els temps de resposta dels anomenats mètodes convencionals, ja que no depenen del cultiu. En canvi, solen tenir un cost superior, ja que requereixen un equip instrumental i personal qualificat no disponibles en tots els laboratoris. Així mateix, la identificació molecular no és sempre accessible d'una manera immediata i en general s'utilitza conjuntament amb la identificació tradicional. Cadascun dels dos mètodes, presos en el moment adequat, aporta solucions de gran valor al microbiòleg clínic.

Recentment, els mètodes basats en proteòmica han irromput amb força en el camp del diagnòstic microbiològic i han suposat un canvi profund en la manera de treballar als laboratoris de microbiologia. La proteòmica no és una ciència nova; la seua capacitat de resoldre problemes biològics i d'ajudar a entendre el funcionament del món microbià data de fa uns quants anys. No obstant això, és notori que la seua implantació recent suposa una vertadera revolució en el diagnòstic microbiològic, procés que sense dubte tindrà un gran impacte en l'organització futura dels serveis de microbiologia.

En aquest document es presenten tres maneres diferents d'abordar la identificació bacteriana: i) mètodes fenotípics o "tradicionals", ii) mètodes moleculars, i iii) mètodes basats en proteòmica. Tot i no ser els únics, són els més importants i els que més impacte tenen o tindran en el treball diari del microbiòleg clínic.

2. MÈTODES FENOTÍPICS D'IDENTIFICACIÓ BACTERIANA

2.1. INTRODUCCIÓ

Actualment, la identificació bacteriana es du a terme per mitjà de mètodes convencionals, basats en les característiques fenotípiques, ja que la seua aplicació i cost els fa més assequibles. D'altra banda, els mètodes genotípics se solen reservar als bacteris que no es poden identificar amb mètodes convencionals.

Els esquemes tradicionals d'identificació fenotípica es basen en les característiques "observables" dels bacteris, com la morfologia, el desenvolupament i les propietats bioquímiques i metabòliques. El cultiu, quan és factible, continua sent el mètode d'elecció: permet aïllar el microorganisme implicat, identificar-lo i estudiar-ne la sensibilitat als antimicrobians, i facilita l'aplicació de marcadors epidemiològics. En el cultiu és essencial la correcta elecció del medi de creixement i les condicions d'incubació.

En el procés d'identificació bacteriana tradicional, l'experiència del microbiòleg és fonamental per a l'elecció d'una prova o una bateria de proves seqüencials, en funció de la fiabilitat d'aquestes, del gènere o de l'espècie bacteriana que es pretén identificar, de l'origen de l'aïllat bacterià i del seu cost. Els laboratoris han d'elaborar i dur a terme un procés d'identificació normalitzat en la seua activitat diària, que utilitze d'una manera seqüencial o simultània un conjunt de proves amb el propòsit final d'identificar el microorganisme a nivell de gènere i espècie, i que incloga la major part dels bacteris des del punt de vista infecciosos.

2.2. OBJECTIUS I UTILITAT DELS MÈTODES FENOTÍPICS D'IDENTIFICACIÓ

Aquest apartat revisa les tècniques d'identificació fenotípica dels principals bacteris que poden trobar-se en les mostres clíniques i pretén ser una guia detallada del procés d'identificació. En aquest document, però, no inclouem microorganismes amb característiques especials, com ara micobacteris, anaerobis, rickètsies, clamídies, micoplasmes i espiroquetes.

Aquestes tècniques són dependents del cultiu bacterià i no són aplicables per a la identificació de bacteris directament de les mostres.

Els mètodes d'identificació fenotípica no poden proporcionar en cap cas una certesa absoluta. Únicament indiquen quin és el gènere o l'espècie més probable a què el bacteri identificat pot pertànyer.

2.3. FONAMENTS DE LA IDENTIFICACIÓ FENOTÍPICA

La identificació fenotípica bacteriana es basa fonamentalment en la comparació de les característiques fenotípiques de bacteris desconeguts amb bacteris de cultius tipus. La fiabilitat de la identificació està en proporció directa al nombre de característiques semblants. En microbiologia clínica, l'experiència i l'associació entre el microorganisme i el lloc d'infecció és de gran ajuda en la identificació preliminar.

En el procés d'identificació bacteriana tradicional s'estableixen tres nivells de processament:

- a) Totes les característiques fenotípiques conegudes són importants i cal tenir-les presents quan es comença el procés d'identificació, però en principi se seleccionen les que es consideren proves primàries, que són ràpides i senzilles de realitzar, com la morfologia en la tinció Gram o altres tincions, el creixement en diferents atmosferes d'incubació, el creixement en diversos tipus de medis de cultius, oxidasa i catalasa. Utilitzant aquestes poques proves, generalment és possible situar els bacteris, provisionalment, en un dels principals grups d'importància mèdica. A continuació es poden seleccionar altres mètodes amb un poder de discriminació més gran, ja que molts microorganismes poden presentar un aspecte molt semblant en l'examen macroscòpic i microscòpic.

- b) El segon nivell d'identificació ha d'especificar el gènere a què pertany el microorganisme. Tant en aquest nivell com en l'anterior, la hipòtesi sobre la probable identitat d'un microorganisme recolza en les característiques del cultiu (per exemple, atmosfera), i en proves primàries, amb les quals es poden determinar el gènere, el grup de gèneres o en algun cas la família a què pertany un aïllat. Les proves primàries són Gram, morfologia, catalasa, oxidasa, oxidació-fermentació, fermentació de glucosa, producció d'espores, creixement en aerobiosi i anaerobiosi i mobilitat. També han de tenir en compte les dades clíniques. Això dependrà, en gran mesura, d'un patró estable de característiques fenotípiques i de l'experiència del microbiòleg.
- c) Finalment, la conclusió ha de fer-se amb la identificació a nivell d'espècie. L'ús de certes proves bioquímiques permet identificar, amb un alt grau de precisió, la majoria dels bacteris clínicament significatius.

Si la identificació no es pot fer utilitzant aquest primer esquema, es pot utilitzar una bateria de proves més àmplia, com les que inclouen diferents sistemes comercials. El resultat es compara amb proves estandarditzades o amb perfils numèrics d'identificació.

L'inconvenient d'aquest procés és que resultats erronis en les proves primàries poden conduir a una identificació errada, amb la consegüent pèrdua de temps i recursos, i també la possibilitat de portar a un resultat erroni.

2.4. IDENTIFICACIÓ

2.4.1. Característiques microscòpiques

L'estudi microscòpic en fresc, i després de tinció, revela la forma, la manera d'agrupar-se, l'estructura i la mida de les cèl·lules. Les tincions són el primer pas, i ocasionalment l'únic, per a la identificació bacteriana.

Les tincions més utilitzades i imprescindibles són tinció amb blau de metilè i la tinció de Gram. Aquesta darrera és, sovint, la primera i única eina de la qual ens servim per a fer un diagnòstic provisional en el procés d'identificació de la major part dels bacteris, tenint en compte també el tipus de mostra i el diagnòstic presumptiu del procés infecciós.

Aquests són alguns dels termes utilitzats per a preparacions tenyides:

- tinció: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- forma: cocs, bacils, coccobacils, filamentosos, bacils corbs, etc.
- càpsula: present o absent
- endòspores: ovals, esfèriques, terminals, subterminals
- mida: curts, llargs, etc.
- vores laterals: inflades, paral·leles, còncaues, irregulars
- extrems: arrodonits, punxeguts
- disposició: parells, cadenes, tètrades, raïms, etc.
- formes irregulars: variació en forma i mida, ramificats, fusiformes, etc.

En alguns casos, la informació derivada de les tincions es pot comunicar immediatament al clínic, i és de gran rellevància i utilitat, com en tincions del líquid cefalorraquidi en el diagnòstic de meningitis; tincions

de frotis uretrals en les infeccions de transmissió sexual, diagnòstic d'infeccions per *Nocardia* spp. i altres actinomicetals, etc.

2.4.2. Característiques macroscòpiques

2.4.2.1. Morfologia

La morfologia de les colònies és fonamental per a la identificació preliminar i la diferenciació dels microorganismes. Per a l'observació morfològica és preferible examinar colònies de cultius frescos crescudes en medis no selectius. En aquest pas de la identificació és molt important l'aïllament dels bacteris en cultiu pur, ja que aquest hauria d'estar compost per un sol tipus de microorganisme i procediria d'una única cèl·lula. Les colònies d'una única espècie, quan creixen en medis específics i en condicions idònies, es descriuen per les seues característiques de mida, forma, consistència i, a vegades, color.

La grandària de les colònies bacterianes és generalment uniforme dins d'una mateixa espècie. Per exemple, les colònies d'estreptococs són menys grans que les colònies d'estafilococs i enterobacteris. La forma està determinada per les vores i el gruix de la colònia. La vora pot ser llisa o rugosa i irregular; la colònia, inflada o plana. La textura de la colònia és també important. Pot variar de seca a viscosa, amb superfície llisa o granular. Alguns microorganismes produeixen una colònia pigmentada, fet que pot ajudar en el procés d'identificació (exemple: *Pseudomonas aeruginosa*, pigment verd; *Serratia marcescens*, pigment roig), si bé en una mateixa espècie pot haver-hi soques no pigmentades.

2.4.2.2. Hemòlisi

Alguns bacteris produeixen hemolisines que causen la lisi de les hematies en medis de cultiu que contenen sang. Aquesta hemòlisi pot ser beta (zona clara al voltant de la colònia) o alfa (halo de color verdós al voltant de la colònia).

2.4.3. Cultiu

2.4.3.1. Medis de cultiu

En els medis de cultiu, els bacteris es multipliquen i cal esperar almenys 18-24 hores per a visualitzar-les. En termes generals, tots els bacteris tenen uns requeriments nutricionals imprescindibles per al creixement. Necessiten una font d'energia, una font de carboni, una font de nitrogen, algunes sals, oligoelements i aigua. Tots els medis de cultiu han de complir com a mínim aquests requisits, però moltes vegades es necessiten també altres substàncies addicionals, com ara vitamines, factors o aminoàcids essencials.

En els serveis de microbiologia clínica s'utilitzen medis de cultiu líquids i sòlids. En els medis líquids, les substàncies es troben dissoltes. Els medis sòlids solen consistir en una base d'agar, polímer d'origen vegetal que es manté en fase líquida a altes temperatures i forma un gel en refredar-se, el qual manté una alta humitat i conté els elements nutricionals necessaris. El cultiu sobre medis sòlids permet disposar fàcilment de les colònies bacterianes. D'altra banda, en medis líquids, el creixement sol ser major perquè la disponibilitat de nutrients també és major. L'ús d'un medi o d'un altre depèn del tipus de mostra i del patogen que es busca. Segons la capacitat que tenen per a permetre el creixement microbià, els medis es classifiquen en bàsics o generals d'enriquiment, selectius i diferencials. També cal esmentar els medis cromogènics.

- a. **Medis bàsics.** Són medis rics en nutrients que permeten el creixement de la gran majoria dels bacteris. S'utilitzen en la sembra primària de les mostres clíniques. Un dels medis més utilitzats als laboratoris és l'agar sang.
- b. **Medis d'enriquiment.** Es fan servir per a recuperar bacteris exigents en requeriments nutricionals. S'utilitzen per a bacteris que no creixen en medis bàsics. Els més utilitzats solen ser medis líquids com el brou de tioglicolat o el brou de cervell-cor (BHI, *Brain Heart Infusion*).
- c. **Medis selectius.** Contenen substàncies com clorur sòdic a dosis elevades, citrat sòdic, cristall violeta, sals biliars o antibiòtics i antisèptics, que fomenten el creixement d'alguns bacteris i eviten el d'altres. Són de gran utilitat per a l'aïllament bacterià a partir d'una població bacteriana mixta.
- d. **Medis diferencials.** S'utilitzen per a posar de manifest característiques distintives de les colònies (fruit de reaccions enzimàtiques, presència/absència de determinats components produïts pels bacteris, utilització o no de components presents en el medi, entre altres). Són medis que distingeixen entre distints grups bacterians, quasi sempre segons el color que adopten les colònies bacterianes en el medi. Per exemple, l'agar MacConkey és un medi sòlid que permet el creixement de bacils gramnegatius fermentadors i no fermentadors de lactosa. Els primers agafen una coloració rosada que els diferencia dels segons. Els medis diferencials, a més, poden posar de manifest mesclades i contaminacions en els cultius.
- e. **Medis cromogènics.** Incorporen substàncies cromogèniques per detectar diferents enzims produïts pels microorganismes. Quan el bacteri produeix l'enzim, hidrolitza el substrat i s'allibera un compost cromogènic que adquireix un color intens, que acoloreix la colònia. Aquests enzims poder ser específics d'un gènere, d'una espècie o d'un grup reduït d'espècies. En alguns casos, la identificació presumptiva dels bacteris aïllats tenen una especificitat tan elevada que, en la pràctica, podria fer innecessària la realització de proves confirmatòries.

Moltes vegades, els medis de cultiu entren en més d'una categoria de les anteriors. No és infreqüent l'ús de medis d'enriquiment que són, alhora, selectius per a alguns microorganismes. També es fan servir medis que són diferencials i selectius al mateix temps, com ara l'agar manitol, selectiu per a bacteris del gènere *Staphylococcus* i diferencial per a *Staphylococcus aureus* (fermenta el manitol i les colònies apareixen de color groc sobre l'agar com a resultat de l'acidificació del medi). Els medis amb capacitat simultània de seleccionar i diferenciar microorganismes ofereixen grans avantatges en el diagnòstic microbiològic perquè estalvien temps i orienten decisivament cap al resultat definitiu. En l'actualitat, la major part dels medis es poden adquirir comercialment deshidratats (en pols) o com a plaques i tubs amb els medis ja preparats.

2.4.3.2. Requisits de creixement

- a. **Atmosfera.** Els bacteris es classifiquen en funció dels requeriments atmosfèrics:
 - **Aerobis estrictes**, que creixen només en presència d'oxigen.
 - **Anaerobis estrictes**, que només creixen en absència d'oxigen.
 - **Facultatius**, que creixen tant en aerobiosi com en anaerobiosi.
 - **Microaeròfil**, que creixen millor en una atmosfera amb reduïda concentració d'oxigen.
 - **Capnòfil**, que requereixen CO₂ addicional per a créixer.
- b. **Temperatura.** Els bacteris es classifiquen també atenent la temperatura necessària per a créixer:
 - **Psicròfil**, poden créixer a baixes temperatures entre 2-5 °C (òptim 10-30 °C).
 - **Mesòfil**, creixen a temperatures entre 10-45 °C (òptim 30-40 °C).
 - **Termòfil**, creixen molt poc a 37 °C (òptim 50-60 °C).

La majoria dels bacteris trobats en les mostres clíniques son mesòfils.

- c. **Nutrició.** L'estudi dels requeriments nutricionals d'un microorganisme s'utilitza en la identificació. Aquest és el cas de la capacitat per a créixer en medis ordinaris, com en medis amb l'addició de sang, sèrum o glucosa. També per la necessitat de factors específics de creixement com el factor X (hemina) i el factor V (NAD), en el cas d'*Haemophilus* spp.

2.4.4. Proves bioquímiques

Les proves bioquímiques permeten determinar les característiques metabòliques dels bacteris objecte d'identificació. Algunes d'aquestes proves són tècniques ràpides, ja que avaluen la presència d'un enzim preformat, i la seua lectura varia des d'alguns segons fins a unes poques hores. Altres proves requereixen per a la seua lectura el creixement del microorganisme amb una incubació prèvia de 18 a 48 hores; a aquest grup pertanyen la majoria de les proves que detecten components metabòlics, o les que determinen la sensibilitat d'un microorganisme a una substància donada després del cultiu en medis d'identificació que contenen el substrat a metabolitzar. Tanmateix, algunes d'aquestes proves es poden fer ràpidament després d'una incubació de 2-6 hores; en general, es tracta de reaccions enzimàtiques cromogèniques o proves convencionals modificades (hi ha discos o tauletes comercialitzades amb substrats cromogènics per a ús individualitzat).

2.4.4.1. Proves que es fan en la identificació preliminar, amb lectura immediata

- **Catalasa.** La catalasa és un enzim present en la majoria dels microorganismes que posseeixen citocroms. Els bacteris que sintetitzen catalasa hidrolitzen el peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen gasós, que s'allibera en forma de bombolles. El principal objectiu d'aquesta prova és separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. i *Enterococcus* spp. (negativa).
- **Oxidasa.** Aquesta prova serveix per a determinar la presència d'enzims oxidases. La reacció de l'oxidasa és deguda a la presència d'un sistema citocromooxidasa que activa l'oxidació del citocrom, el qual es reduït per l'oxigen molecular i es produeix aigua o peròxid d'hidrogen, segons l'espècie bacteriana. L'oxigen actua, per tant, com acceptor final d'electrons en la cadena transportadora d'electrons. En general, el sistema citocromooxidasa només es troba en els bacteris aerobis, en alguns anaerobis facultatius i, excepcionalment, en algun microaeròfil (*Vibrio fetus*), però els bacteris anaerobis no presenten activitat oxidasa. Així mateix, la presència d'oxidasa va lligada a la producció de catalasa, ja que aquesta degrada el peròxid d'hidrogen que es produeix com a conseqüència de la reducció de l'oxigen i l'acumulació del qual és tòxica.

2.4.4.2. Proves ràpides, amb lectura en menys de 6 h

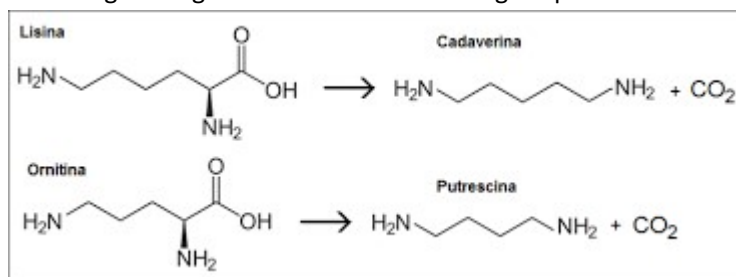
- **Hidròlisi de l'hipurat.** Demuestra la capacitat d'alguns bacteris per a hidrolitzar l'hipurat de sodi a àcid benzoic i glicina, per l'acció del enzim hipuricasa. Com a indicador de la reacció s'utilitza ninhidrina. Aquesta prova es fa servir en la identificació de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* i *Streptococcus agalactiae*.
- **β -galactosidasa (ONPG).** Aquesta prova demostra la presència de l'enzim β -galactosidasa. Hi ha bacteris que malgrat posseir enzims que hidrolitzen la lactosa (β -galactosidasa), no poden actuar sobre aquesta perquè els falten els enzims extracel·lulars apropiats (permeases). Per conèixer si un microorganisme és productor de β -galactosidasa, s'hi afegeix el compost orgànic O-nitrofenil- β -D-galactopiranòsid (ONPG), que és incolor. Si el bacteri posseeix els enzims hidrolitzants (β -galactosidasa), el compost es transforma en ortonitrofenol, un derivat cromogènic de color groc. Tots els bacteris fermentadors lents de la lactosa són β -galactosidasa positius.

- **Aminopeptidasa: PYR.** La L-pirrolidonil-β-naftilamida serveix com a substrat per a la detecció de pirrolidonil-peptidasa. S'utilitza principalment en la identificació de *Streptococcus pyogenes* i *Enterococcus* spp. També en la diferenciació de *Staphylococcus lugdunensis* d'altres estafilococs coagulasa negativa.
- **LAP.** S'utilitza per a la detecció de l'enzim leucina-aminopeptidasa (LAP) i és una de les proves per a la identificació de cocs grampositius catalasa negativa; diferencia específicament els gèneres *Aerococcus* i *Leuconostoc* de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Pediococcus*.
- **Ureasa.** Determina la capacitat d'un organisme de desdoblar la urea i formar dues molècules d'amoniac per acció de l'enzim ureasa. Aquesta activitat enzimàtica és característica de totes les espècies de *Proteus* i s'usa sobretot per a diferenciar aquest gènere d'altres enterobacteris que donen negatiu o *positiu retardat*. La prova també s'utilitza per a diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de *Moraxella* spp., *Helicobacter pylori* i *Brucella* spp., que també hidrolitzen la urea. Aquesta prova pot ajudar a identificar *Cryptococcus* spp., que dona un resultat positiu després d'una incubació prolongada.
- **Indole.** Mitjançant aquesta prova es detecta l'alliberament d'indole en un cultiu bacterià. Aquest alliberament és degut a la degradació de l'aminoàcid triptòfan mitjançant l'enzim triptofanasa.

2.4.4.3. Proves lentes, amb lectura de 18 a 48 h

- **Oxidació-fermentació.** Mitjançant aquesta prova es determina si l'ús dels hidrats de carboni per part d'un microorganisme es realitza per via oxidativa (procés aeròbic, presència d'oxigen) o per via fermentativa (procés anaeròbic, absència d'oxigen).
- **Reducció de nitrats.** Serveix per a determinar la capacitat d'un organisme de reduir el nitrat en nitrits. S'utilitza per a assignar bacteris a la família *Enterobacteriaceae*, en la diferenciació de *Moraxella catarrhalis* del gènere *Neisseria* i en la identificació de bacils grampositius aerobis.
- **Roig de metil.** El roig de metil és un indicador de pH. Actua entre pH 4,2 i 6,3 i varia de roig (pH 4,2) a groc (pH 6,3). Amb aquesta prova es comprova la capacitat d'un microorganisme de produir i mantenir estables els productes terminals àcids de la fermentació de la glucosa per la via de la fermentació acidomixta. S'utilitza com a part de la identificació a nivell d'espècie dels bacils entèrics gramnegatius.
- **Voges-Proskauer.** Permet observar si el microorganisme fermenta la glucosa per la via butanodiòlica. Si és així, es forma un producte intermedi (acetoïna) que forma un complex de color rogenc amb l'α-naftol. S'utilitza en la identificació a nivell d'espècie de bacils entèrics gramnegatius, *Aeromonas* spp. i *Vibrio* spp.
- **Agar ferro de Kliger.** El medi de Kliger conté com a hidrats de carboni la glucosa i la lactosa. Existeix un altre medi, el *triple sucre-ferro (de l'anglès, sugar iron)* (TSI) que posseeix un tercer hidrat de carboni, la sacarosa. Mitjançant aquesta prova es pot determinar:
 - La capacitat d'un microorganisme de metabolitzar un hidrat de carboni específic (en aquest cas glucosa, lactosa, o tots dos) incorporat en un medi de creixement bàsic.
 - Producció o no de gasos: CO₂ i H₂ com a productes finals del metabolisme dels hidrats de carboni.
 - Producció d'àcid sulfhídric (SH₂)
- **Fermentació de sucres.** Els bacteris anaerobis o anaerobis facultatius sovint fermenten carbohidrats a àcids orgànics i gas (H₂ o CO₂). Aquests poden detectar-se incloent en el medi un indicador de pH.

- **Hidròlisi de l'esculina.** Hi ha microorganismes amb capacitat d'hidrolitzar l'esculina en esculetina i glucosa. L'esculetina reacciona amb una sal de ferro i forma un compost castany fosc o negre. El citrat fèrric actua com a indicador de la hidròlisi de l'esculina. Si s'afegeix bilis al medi s'inhibeix el creixement de la major part de microorganismes del gènere *Streptococcus* però no de l'espècie *Streptococcus bovis*, i tampoc inhibeix el creixement de microorganismes dels gèneres *Enterococcus* i *Listeria*.
- **Coagulasa.** Permet determinar la capacitat de coagular el plasma per l'acció de l'enzim coagulasa. S'utilitza per a diferenciar *S. aureus* (coagulasa positiu) d'altres espècies de *Staphylococcus*. La prova de la coagulasa en tub es pot llegir després d'incubació de 4 hores, però si és negativa ha d'incubar-se fins a 24 h.
- **Fenilalanina-desaminasa.** Aquesta prova determina la capacitat d'un microorganisme per a desaminar l'aminoàcid fenilalanina en àcid fenilpirúvic per l'activitat enzimàtica de la fenilalanina-desaminasa, amb la consegüent acidesa resultant. Aquesta activitat enzimàtica és característica de totes les espècies dels gèneres *Proteus*, *Providis* i *Morganella* per això s'utilitza per a separar aquests tres gèneres d'altres gèneres d'enterobacteris.
- **DNasa.** Es basa en la capacitat que posseeixen certs bacteris per a hidrolitzar enzimàticament el DNA i produir una mescla de mono- i polinucleòtids.
- **Hidròlisi de la gelatina.** Aquesta prova mostra la capacitat de certs microorganismes per a hidrolitzar la gelatina a pèptids i aminoàcids, mitjançant l'acció d'enzims específics anomenats gelatinases.
- **Descarboxilasa.** La descarboxilació és un procés en què les descarboxilases ataquen l'extrem carboxil dels aminoàcids i es forma l'amina corresponent. Els tres aminoàcids que s'assagen en la identificació d'enterobacteris són arginina, lisina i ornitina. La descarboxilació de lisina i ornitina dona cadaverina i putrescina (diamines), mentre que la descarboxilació de l'arginina dona citrulina per acció d'una deshidrolasa. Aquesta prova s'ha de dur a terme amb un tub control que conté el medi base sense aminoàcid. Com que la descarboxilació és una reacció anaeròbica, s'ha de cobrir el medi amb una capa d'oli mineral estèril. El procés té lloc en dues etapes: per fermentació de la glucosa es produeix, en primer lloc, una acidificació del medi (pH < 6,0), amb l'aparició de color groc; l'acidificació és necessària perquè es done la descarboxilació. Aquest últim procés dona lloc a la formació de les amines que eleven el pH amb el consegüent viratge de l'indicador a color violeta. Aquesta prova es fa servir tant en la identificació de bacils gramnegatius com de bacils i cocs grampositius.



- **Lipasa.** Es basa en la capacitat que tenen certs bacteris de descompondre els greixos en àcids grassos i glicerol, per l'acció de l'enzim lipasa.
- **Lecitinasa.** La prova de la lecitinasa posa de manifest la producció d'aquets enzims per determinats microorganismes, capaços d'actuar sobre la lecitina, substància orgànica nitrogenada i fosfatada, continguda principalment en el rovell d'ou.
- **Utilització de citrat.** Aquesta prova serveix per a determinar si un microorganisme és capaç d'utilitzar citrat com a única font de carboni i compostos amoniacals com a única font de nitrogen en el seu metabolisme, i provocar una alcalinització del medi. Entre els

enterobacteris aquestes característiques es donen en els gèneres següents: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* i algunes espècies de *Salmonella*. No obstant això, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* i *Salmonella paratyphi* són incapaços de créixer utilitzant citrat com a única font de carboni.

- **Utilització de malonat.** Posa de manifest la capacitat que posseeixen alguns bacteris d'utilitzar el malonat de sodi com a única font de carboni, amb el consegüent alliberament del catió, que en presència d'ions aigua produeix alcalinitat. Només els microorganismes que poden utilitzar simultàniament malonat de sodi com a font de carboni i sulfat d'amoni com a font de nitrogen, són capaços d'exercir una acció amortidora i produir hidròxid de sodi. L'augment de l'alcalinitat resultant fa que el blau de bromotimol canvie de verd a blau. Els microorganismes malonat negatius que fermenten glucosa fan que l'indicador canvie de verd a groc. Es fa servir en la diferenciació d'espècies entre els *Enterobacteriaceae*. La majoria de les espècies d'*Enterobacter* i *Klebsiella* utilitzen malonat de sodi.
- **Prova de CAMP.** Serveix principalment per a determinar la capacitat d'un microorganisme per a produir una proteïna coneguda com a factor CAMP. La proteïna causa un efecte sinèrgic amb la β -hemolisina de *S. aureus* sobre eritròcits ovins i bovins, que s'observa com un fenomen lític en la intersecció dels dos microorganismes quan se sembren pròxims. Com a alternativa es pot utilitzar el CAMP invers. En aquesta prova, l'hemòlisi provocada per alguns microorganismes és inhibida per la β -hemolisina de *S. aureus* (per exemple, la producció de fosfolipasa D d'*Arcanobacterium haemolyticum* o la fosfolipasa E de *Rhodococcus* spp.).

2.4.5. Proves basades en la resistència a certes substàncies

- **Optoquina.** El clorhidrat d'etilhidroxipreïna (optoquina) inhibeix a molt baixa concentració (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o menys) el creixement de *S. pneumoniae*, mentre que no afecta el creixement d'altres *Streptococcus* alfa-hemolítics.
- **Bacitracina.** Aquesta prova pot utilitzar-se com a diagnòstic presumptiu en la identificació de *Streptococcus* beta-hemolític del grup A de Lancefield, ja que, a diferència de la majoria dels estreptococs, solen ser sensibles a baixes concentracions de bacitracina.
- **Solubilitat en bilis.** Es basa en la capacitat d'algunes espècies bacterianes de lissar-se en presència de sals biliars, les més utilitzades de les quals són el taurocolat i el desoxicolat de sodi. Ambdues provoquen un descens de la tensió superficial que, unit a l'actuació d'enzims autolítics, destrueixen la cèl·lula. L'efecte d'aquest enzim autolític es posa de manifest sobre colònies de *S. pneumoniae* crescudes en medis sòlids, en les quals s'aprecia una umbilicació central, i també en colònies mucoides.
- **Creixement en brou hipersalí.** Determina la capacitat d'alguns microorganismes de desenvolupar-se en medis de cultiu amb una concentració de clorur sòdic del 6,5%.

2.5. SISTEMES COMERCIALS MULTIPROVES

En el mercat hi ha nombrosos sistemes o equips multiproves a fi d'aconseguir una major rapidesa en la identificació d'alguns bacteris. Tots exigeixen unes condicions precises quant a l'inòcul, manera d'inoculació, incubació i lectura que, si no s'aconsegueixen, poden originar errors. Aquests sistemes poden ser manuals o estar automatitzats.

2.5.1. Sistemes comercials manuals o galeries multiproves

Es tracta de cel·les aïllades amb un substrat liofilitzat que s'inocula individualment i que permeten realitzar simultàniament entre 10 i 50 proves bioquímiques. Els resultats de les proves s'expressen

numèricament (els resultats s'agrupen de tres en tres, de manera que el resultat de cada trio de proves queda reduït a un dígit). Cada espècie està definida per un codi numèric, resultat de la codificació de les reaccions a les proves que s'hagen utilitzat. Per codificar el dígit d'un trio de proves s'estableix el sistema següent:

- Si una prova és negativa s'assigna un valor 0 a la prova.
- Si la primera prova és positiva se li assigna el valor 1.
- Si la segona prova és positiva se li assigna el valor 2.
- Si la tercera prova és positiva se li assigna el valor 4.

El codi numèric s'obté sumant els valors de les tres proves. Els límits inferior i superior del codi són 0 i 7, respectivament. Davant un microorganisme problema, es busca el codi numèric i es comprova a quin bacteri pertany. Alguns dels sistemes comercials disponibles en el mercat són API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems i MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc.

2.5.2. Sistemes comercials automatitzats

En el mercat hi ha galeries multiproves, com les descrites en l'apartat anterior, però la inoculació, incubació i lectura s'efectuen d'una manera automatitzada. També hi ha panells en què a més de trobar-se els substrats per al desenvolupament de proves bioquímiques, contenen diversos antimicrobians a diferents concentracions, amb la qual cosa es realitza simultàniament la identificació i l'antibiograma del microorganisme objecte d'estudi. Hi ha diferents panells per a diferents grups de microorganismes. La inoculació i la lectura d'aquests panells se sol fer automàticament i les dades obtingudes s'incorporen en un ordinador, el qual proporciona, amb un índex alt de fiabilitat, la identificació del microorganisme. Alguns dels sistemes de panells comercials disponibles d'ús més estès són MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.

2.6. BIBLIOGRAFIA

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*. 3a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
5. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003.
6. Prats G, *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Barcelona 2006.

3. MÈTODES MOLECULARS D'IDENTIFICACIÓ BACTERIANA

3.1. INTRODUCCIÓ

En vista dels problemes inherents que presenten els sistemes d'identificació fenotípics (no totes les soques d'una mateixa espècie mostren característiques homogènies; una mateixa soca pot generar diferents patrons en assajos repetits, i també hi ha les limitacions en les bases de dades, entre altres), els mètodes moleculars s'han erigit com a procediments complementaris, alternatius o fins i tot de referència als fenotípics. En la dècada dels 80 va començar la cerca de candidats que, sent gens estables, permetien establir relacions filogenètics entre els bacteris, com els gens que codifiquen per a les subunitats ribosòmiques 5S, 16S, 23S i els seus espais intergènics. En la taxonomia bacteriana, l'anàlisi de la seqüència gènica de l'rRNA 16S és l'eina més àmpliament utilitzada. Aquest marcador *housekeeping* està present en tots els bacteris. Es presenta com una família de multigens o operons la funció dels quals no es modifica amb el temps i actua com un marcador eficient d'evolució. A més, té la mida adequada per a fer l'anàlisi. L'rRNA 16S, a més de ser útil per a la detecció de bacteris, proporciona informació útil i ràpida sobre la seua identificació i filogènia mitjançant la comparació amb bases de dades públiques que contenen un ampli nombre de seqüències bacterianes. Així doncs, la identificació mitjançant l'rRNA 16S es fonamenta en la seua seqüència.

Posteriorment, i de forma simultània als avanços tecnològics en les tècniques de seqüenciament, s'han anat utilitzant gens amb una seqüència que permet més precisió o una diferenciació intraespècie en grups, biovarietats, genovarietats o similar.

Inicialment, la identificació bacteriana basada en l'anàlisi de les seqüències estava limitada a determinats centres o laboratoris. En l'actualitat, i com a conseqüència de l'automatització, la simplificació i la reducció del cost del procés, aquestes tècniques s'han introduït en més laboratoris. Aquest avanç ha suposat que a l'agost de 2010 en les llistes aprovades de nomenclatura bacteriana el nombre de descripcions de noves espècies arribava a 10.000.

3.2. GENS USATS COM A DIANES MOLECULARS PER A IDENTIFICAR BACTERIS

S'ha fet servir una àmplia varietat de gens com a dianes moleculars en els estudis taxonòmics o de filogènia en els diferents gèneres i espècies bacterianes, en els quals l'anàlisi de l'rRNA 16S constitueix el marcador inicial i, en nombroses situacions, suficient per a fer una identificació precisa. No obstant això, en altres situacions, l'alta homologia genètica en alguns gèneres bacterians o un recent canvi en la seua assignació taxonòmica, no permet utilitzar l'rRNA 16S per a la identificació a nivell d'espècie (o fins i tot de gènere). En aquests casos, es pot recórrer a altres gens dianes. (Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>)

3.2.1. rRNA 16(rrs)

L'rRNA 16S és un poliribonucleòtid codificat pel gen *rrs* o DNA ribosòmic rRNA 16S (DNA 16S) inclòs en la subunitat 30S del ribosoma bacterià. Anàleg de l'rRNA 18S en eucariotes, tots dos s'anomenen rRNA SSU (*small subunit*). La conservació del gen rRNA 16S es va observar per primera vegada en el gènere *Bacillus*. Posteriorment, en la dècada dels vuitanta es va començar a explorar el paper taxonòmic d'aquest gen i a definir les seues capacitats, i es van establir en els microorganismes procariotes dos dominis (*Archaea* i *Eubacteria*). Posteriorment, l'última edició del Manual Bergey estableix taxonòmicament dos dominis (*Archaea* i *Bacteria*). Fins a 2003, es van comptabilitzar 1115 gèneres i 6185 espècies de *Bacteria* i 79 gèneres i 281 espècies d'*Archaea*. Cada mes se solen descriure unes 70 espècies noves.

De distribució universal i component crític en la funció cel·lular, l'rRNA 16S actua com un cronòmetre molecular, ja que presenta un alt grau de conservació. Es caracteritza per la presència de regions variables específiques d'espècie. Les mutacions en altres gens són més ben tolerades que en l'rRNA 16S perquè afecten estructures no tan essencials i úniques com ell. Es desconeix la taxa de canvi en la seqüència de l'rRNA 16S, si bé la seua anàlisi indica una distància evolutiva o de relació entre els microorganismes. No obstant això, aquesta taxa de canvi difereix entre els diversos grups taxonòmics, entre el temps d'evolució i entre les diferents zones d'aquest gen. Així, se sap que hi ha unes zones de variabilitat que presenten acumulació de mutacions, i que aquestes zones són diferents segons les espècies. Per contra, també es poden trobar els oligonucleòtids signatura o seqüències específiques curtes comunes per als membres d'un mateix grup filogenètic.

Encara que l'rRNA 16S constitueix la diana d'acció per a alguns antimicrobians i diferents mutacions condueixen a la resistència fenotípica, aquest fet no invalida la seua utilització per a la identificació bacteriana o l'assignació de gènere i espècie. Igualment es pot utilitzar el terme rRNA 16S o la del gen codificant rDNA 16S, però la Societat Americana de Microbiologia (ASM) recomana la utilització del primer.

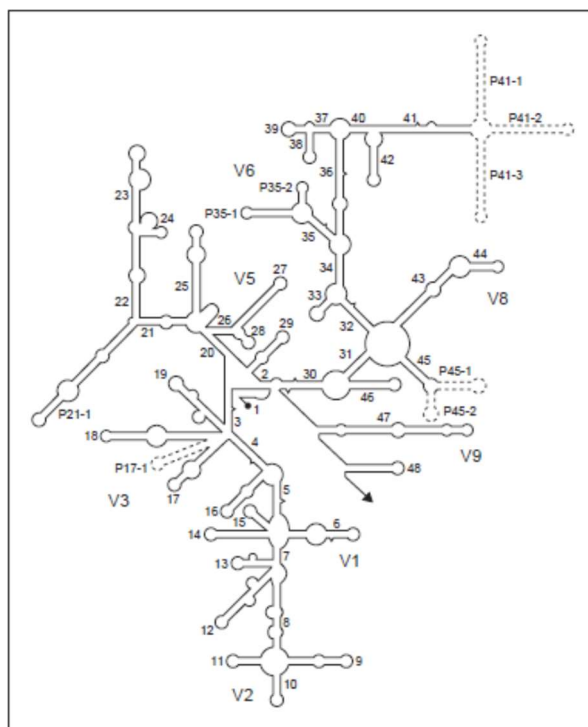


Figura 2. Estructura secundària de l'rRNA 16S. Les hèlixs, comunes a tots els éssers vius i anomenades hèlixs universals, es numeren de la 1 a la 48 en ordre d'aparició a partir de l'extrem 5'. Les hèlixs específiques de procariotes s'indiquen amb Pa-b, on *a* és el número de l'hèlix universal precedent i *b* el número de sèrie. Les regions relativament conservades es presenten en negreta. Les regions variables, en línies fines, es designen V1-V9, tenint en compte que V4 és exclusiva d'eucariotes. Les regions que es mostren en línies discontinües només estan presents en un nombre limitat d'estructures (Rodicio & Mendoza, 2004, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(4):238-45)

La seqüència del gen rRNA 16S presenta aproximadament 1.500 pb i es compon de 9 zones variables V1-V9 i zones conservades (figura 2). Aquesta mida proporciona prou polimorfisme interespecífic per a diferenciar i establir mesures estadístiques vàlides. Els engraixadors universals triats són complementaris a les zones conservades de l'inici del gen, en la zona de 540 pb, i al final del gen. Les zones variables, compreses entre aquestes zones conservades, són les regions utilitzades per a realitzar una taxonomia comparativa. Generalment, l'anàlisi de l'rRNA 16S no és adequat per a estudis epidemiològics o per a la detecció de factors

de virulència, ja que no presenten prou variabilitat gènica. Una excepció descrita és la microheterogeneïtat oposada en *Neisseria meningitidis*, amb aplicació epidemiològica.

L'anàlisi de la seqüència de l'rRNA 16S constitueix una eina molt útil en l'estudi de la diversitat bacteriana en mostres clíniques i ambientals, per això s'ha estudiat en un gran nombre d'espècies bacterianes. Encara que les seqüències disponibles en les bases de dades presenten una mida variable, solen analitzar-se entre 500 i 1.500 pb. Actualment, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) és la base de dades amb més informació, ja que conté més de 2 milions de seqüències depositades del gen rRNA 16S. És també interessant considerar quan és necessari analitzar la seqüència completa o quan una seqüència menys petita proporcionarà informació suficient. Per a diferenciar tàxons específics, establir diferències entre soques o descriure noves espècies, és necessari l'anàlisi de la seqüència completa de l'rRNA 16S. En canvi, per a la majoria dels aïllats clínics, la seqüència de 500 pb proporciona una identificació adequada (a menor cost), i la possibilitat de trobar diferències augmenta com més gran és el fragment seqüenciat (més diversitat per quilobase seqüenciada). Cal tenir en compte que les relacions filogenètiques i els dendrogrames generats poden ser similars, però no idèntics en funció de la mida del fragment del 16S analitzat.

3.2.2. rRNA 16S-23S i rRNA 23S

També s'han utilitzat altres zones de l'rRNA per a identificar i estudiar relacions filogenètiques. Entre altres, les regions de l'espai intergènic de l'rRNA 16S-23S (ITS). Aquestes ITS es presenten en una quantitat variable en funció del nombre d'operons rRNA o al·lels *rrn* (10 en *Bacillus subtilis*, 10 en *Clostridium perfringens*, 1 en *Mycobacterium* spp., 1-2 en *Mycoplasma* spp., etc.). Les ITS presenten una mida variable entre diferents espècies (de 60-pb en *Thermoproteus tenax* a 1529-pb en *Bartonella elizabethae*). Aquest polimorfisme en la mida també es presenta en soques pertanyents a una mateixa espècie, com passa en *S. aureus* (303-551-pb) i *Haemophilus influenzae* (478-723-pb). A més, aquestes variacions en la mida de les ITS són degudes al nombre i tipus de gens tRNA que contenen, com passa en la major part de bacteris gramnegatius que contenen tRNA^{Ala} i tRNA^{Ile}, mentre que altres contenen només tRNA^{Glu} (*H. influenzae*, *Aeromonas hydrophila*). Per contra, bacteris grampositius contenen tRNA^{Ala} o tRNA^{Ile} o tots dos, o cap gen tRNA. L'anàlisi de les seqüències de les ITS ha demostrat una estructura en mosaic en diferents espècies (*H. parainfluenzae*, *C. difficile*, entre altres), amb la presència o absència de blocs d'unes 100pb en les diferents còpies existents en el genoma. En la identificació molecular de *Bacillus anthracis*, *B. cereus* i *B. thuringiensis*, la presència de polimorfismes o SNP (*single nucleotide polymorphisms*) en les posicions 75 i 121 del tRNA^{Ile} inclòs en la ITS completen la identificació d'aquestes espècies tan estretament relacionades.

Aquest elevat grau de diversitat en les ITS en diferents gèneres, espècies i soques constitueix la base per a utilitzar-les en identificació, filogènia i/o tipificació.

Tot i que es considera que la seqüenciació de la fracció 23S pot ser una bona alternativa en els casos en què la fracció 16S no proporciona resultats concloents, té una sèrie d'inconvenients que han sigut avaluats per alguns autors. A més d'incrementar-se el cost, hi ha dificultats per a amplificar fragments més grans d'una manera rutinària amb propòsits taxonòmics. Un problema afegit és l'existència d'abundants seqüències d'inserció (IS), que no obstant això poden ser fàcilment localitzades i eliminades mitjançant anàlisi comparativa, per tant pot ser utilitzat avui com un mètode auxiliar útil amb fins taxonòmics i filogenètics.

3.2.3. rpoB (subunitat β de l'RNA-polimerasa)

L'RNA-polimerasa (RNAP) és un enzim imprescindible en el procés de transcripció i constitueix la diana final de les diferents rutes que controlen l'expressió gènica en els organismes vius. En els bacteris és responsable de la síntesi de l'mRNA, rRNA i tRNA. La part central de l'RNAP (400 kDa) està composta de 5 subunitats: el dímer α_2 , β , β' i ω .

La subunitat β , codificada pel gen *rpoB*, és el principal responsable de l'activitat catalítica de l'RNAP. A causa de la seua distribució universal en els bacteris, es va suggerir aplicar-la com un cronòmetre molecular d'alta potència. En 1993 i utilitzant *S. aureus*, es va iniciar la seqüenciació del gen *rpoB* amb l'objectiu d'identificar molecularment bacteris amb repercussió clínica. Es presenta en monocòpia, amb alguna excepció, i té una mida variable, segons les espècies, des de 3.411 pb en *S. aureus* fins a 4.185 pb en *N. meningitidis*.

Les seqüències de l'*rpoB* són moltes vegades de més qualitat que les de l'rRNA 16S perquè s'han inclòs més recentment en les bases de dades. El seu trasllat a seqüències d'aminoàcids permet detectar els errors de seqüenciació que produeixen els codons de finalització erronis. A més, la seqüència d'aminoàcids deduïda permet establir agrupaments d'espècies bacterianes.

Un altre factor important és que hi ha una correlació més gran en la similitud de la seqüència de l'*rpoB* amb el criteri d'inclusió en la mateixa espècie de la hibridació DNA-DNA (DDH <70%). Aquest criteri no es compleix fàcilment per a valors de similituds de l'rRNA 16S superiors al 99%. Una altra circumstància favorable de l'anàlisi de l'*rpoB* és la seua aplicació com a instrument de genotipificació i filogènia. Aquest fet és conseqüència que les substitucions nucleotídiques que tenen lloc són silents (tercera posició del codó) i per la seua funció de gen *housekeeping* probablement no està sotmès a transferència horitzontal genètica. No obstant això, en alguns casos, com en *Pseudomonas stutzeri*, s'ha demostrat l'intercanvi horitzontal entre espècies de fragments gènics.

El gen *rpoB* conté regions conservades i regions alternes variables. Els encebadors d'ample espectre es dissenyen sobre les regions conservades i s'hi sol incloure una regió interna variable. A diferència de l'rRNA 16S, no es poden utilitzar encebadors universals per a la seua amplificació. Tanmateix, es pot dissenyar un encebador d'ampli espectre que amplifiqui diferents ordres pertanyents a un mateix fílum bacterià.

La comparació de les seqüències del gen complet o dels seus fragments del gen *rpoB* es fa principalment mitjançant les bases de dades del GenBank o de BIBI. Una seqüència parcial (300- 750 pb) és suficient per a identificar aïllats clínics, mentre que per a les noves espècies se seqüencia el gen complet. S'ha comprovat que l'anàlisi del fragment hipervariable (posicions 2300-3300 pb) es correlaciona positivament amb l'anàlisi del gen complet.

El gen *rpoB* constitueix un dels pocs gens candidats útils en la identificació bacteriana en les anàlisis taxonòmiques i filogenètiques de soques d'origen humà, animal i ambiental. El gen *rpoB* permet la identificació de gènere, espècie i a vegades subespècie. Encara que no sempre, és també útil per a diferenciar serovarietats biovarietats com passa en *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

3.2.4. *gyrB* (subunitat β de la DNA-girasa)

És el gen codificador de la subunitat β de la DNA-girasa o topoisomerasa II i està implicat en la replicació del DNA bacterià. De distribució universal, la presència en monocòpia de *gyrB* permet la discriminació i identificació d'espècies fortament relacionades pertanyents als gèneres *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, i també enterobacteris, micobacteris i bacteris acidolàctics. És un marcador de gran utilitat en la sistemàtica bacteriana, ja que presenta una taxa de substitucions sinònimes o silents que s'estima en almenys quatre vegades superior a la de l'rRNA 16S.

La DNA-girasa catalitza la interconversió dels isòmers topològics del DNA. Està formada per dos monòmers de cada subunitat *GyrA* i *GyrB*, codificats pels gens *gyrA* i *gyrB*, respectivament. Intervé en el procés de transcripció del DNA a través de la seua activitat de superplegament, durant el qual la subunitat β subministra l'energia necessària per a l'acció catalítica de la subunitat α per hidròlisi d'ATP. Les reaccions que catalitzen inclouen la formació d'estructures nuades en DNA circular, en cadena senzilla i en doble cadena

tancada. La DNA-girasa constitueix la principal diana de les quinolones, antimicrobians que s'uneixen al complex DNA/DNA-girasa i inhibeix l'etapa de superplegament negatiu previ a la replicació. Substitucions aminoacídiques esdevingudes principalment en la subunitat α de la topoisomerasa II i la seua homòloga la topoisomerasa IV, porten a fenotips de resistència a fluoroquinolones.

El gen *gyrB* és un bon cronòmetre molecular per a fer estudis filogenètics en nombrosos gèneres i permet establir diferències inter- i intraespècie. Actualment, constitueix un marcador molecular rellevant en la investigació d'espècies relacionades i avantatja l'rRNA 16S o les regions espaciadores del DNA.

Finalment, hi ha una gran varietat de gens amb fragments conservats i regions variables que s'utilitzen en nombrosos grups de bacteris, *hps65* (micobacteris), *recA* (genovarietats de *B. cepacia complex*), *hsp60* (codifica per a la xaperonina 1, i es troba altament conservat en nombrosos bacteris, arqueges i eucariotes), i constitueixen una bona alternativa per a estudis taxonòmics, evolutius, d'ecologia i filogenia.

3.3. FONAMENT DE LES TÈCNiques D'IDENTIFICACIÓ MOLECULAR BACTERIANA

Les tècniques d'identificació molecular en bacteris mitjançant l'anàlisi de l'rRNA 16S, o altres gens esmentats, es basa en l'amplificació genòmica i en la seqüenciació d'aquests gens o dels seus fragments. El medi de cultiu o les condicions d'incubació no són factors determinants, però sí que són factors crítics la tècnica d'extracció del DNA cromosòmic i l'amplificació. A continuació es descriuen les etapes metodològiques (figura 3) que cal considerar en la identificació molecular.



Figura 3. Etapes del procés d'identificació bacteriana mitjançant seqüenciació de l'rDNA 16S

3.3.1. Extracció del DNA cromosòmic

Depenent de la rapidesa en el diagnòstic o la dificultat en el creixement del patògen (inòcul baix, creixement lent, requeriment de medis sintètics complexos, etc.) es podran aplicar aquestes tècniques directament sobre mostres clíniques o sobre el cultiu bacterià. El DNA genòmic s'extrau a partir de les cèl·lules

totals mitjançant diferents mètodes estàndard o sistemes comercials amb versatilitat en el cas de tractar-se d'una mostra alimentària o ambiental. Segons el tipus de bacteri es poden aplicar modificacions que simplifiquen o optimitzen l'extracció cromosòmica.

3.3.2. Amplificació

En un termociclador, aquets ADN s'utilitzarà com a motle per a l'amplificació per recció en cadena de la polimerasa (PCR) d'una seqüència de l'rRNA 16S amb un rang de mida entre 500 – 1.500 pb (o d'una altra mida si s'analitzen altres gèneres). Amb encebadors universals o d'ample espectre complementaris a les regions conservades, s'amplificaria teòricament el gen de l'rRNA 16S en tots els bacteris. Cap dels encebadors utilitzats en l'actualitat es considera totalment universal, per això no es pot fer una recomanació específica d'encebadors que garantisca l'amplificació de tots els procariotes.

En estudis taxonòmics de certs gèneres o espècies, sovint es prefereix fer un disseny d'encebadors per als diferents gens diana que presenten més especificitat amb el gènere o l'espècie en qüestió. El disseny de nous encebadors es realitza en regions conservades per a un gènere o una espècie determinada.

Per a confirmar una amplificació òptima, és imprescindible l'electroforesi del producte de PCR en gel d'agarosa. S'ha d'observar una sola banda (pertanyent a un únic amplicó) amb la mida adequada. En cas d'amplificar-se un amplicó amb la mida desitjada, i un altre de mida diferent, es podrien utilitzar diverses opcions: extracció de l'amplicó desitjat del gel d'agarosa, modificació de les condicions de PCR o utilització de nous encebadors.

Els amplicons solen purificar-se amb sistemes comercials, sia el producte de PCR sia la banda d'electroforesi inclosa en el gel. Encara que aquests sistemes eliminen l'excés d'encebadors i nucleòtids, s'ha de sotmetre a una nova electroforesi de confirmació.

3.3.3. Seqüenciació de l'amplicó

El gran avanç dels mètodes de seqüenciació ha permet el coneixement d'un volum extraordinari de seqüències amb una major rapidesa i qualitat. La seqüenciació és un procés anàleg a la PCR, que utilitza el DNA com a motle i en què els encebadors directe i revers actuen en reaccions independents. Aquests encebadors poden ser els mateixos encebadors d'amplificació o altres de dissenyats per a aquesta etapa de l'assaig. A diferència de la PCR, no es genera un nou motle, sinó que es reutilitza en els cicles programats (25-35). S'hi afegeixen bases marcades amb fluorocroms o terminadors i bases no marcades, que s'aniran incorporant aleatòriament a la síntesi. Els terminadors finalitzen la síntesi de la seqüència, per tant al final s'obté una mescla de productes de DNA de diferents mides. Cada base (adenina, timina, guanina i citosina) es marca amb un fluorocrom diferent que absorbeix a diferent longitud d'ona, i posteriorment es detecta.

Els terminadors no incorporats s'eliminen mitjançant la purificació del producte i la mida de cadascun es determina per mitjà d'electroforesi capil·lar. A mesura que es va coneixent la mida i el terminador de cada fragment (separats en gel o per elució), es determina la seqüència de bases representades cadascuna per un color diferent i s'editen de forma manual o automàtica. Les cadenes de DNA se seqüencien independentment i es generen la seqüència directa i la inversa (complementària). Segons el model de seqüenciador, el tipus de capil·lar utilitzat i les variables en la seqüenciació, és possible simplificar el procés, reduir el temps d'assaig i el cost, i augmentar la mida de la seqüència a analitzar (500 – 900 bases).

3.4. ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

L'observació de l'electroforograma (seqüències de bases oferides pels seqüenciadors) constitueix el primer pas de l'anàlisi de les seqüències. Algunes vegades hi ha errors entre l'electroforograma i la seqüència; per exemple, assignació de dues T havent-n'hi 3, o posicions ambigües (N). Per resoldre aquestes situacions es reedita visualment l'electroforograma i es corregeix, i/o s'alineen i assemblen les seqüències directa i inversa en una seqüència consens. Només les seqüències que presenten < 1% d'indeterminacions (~ 15 posicions N, purines R, pirimidines Y) es consideren per a l'anàlisi. A vegades es fa necessària la repetició de l'assaig perquè el microorganisme inicial no es trobava en cultiu pur, per baixa concentració de l'extracte cromosòmic o del producte de PCR, etc.

En el cas de l'anàlisi de l'rRNA 16S, l'operó ribosòmic (conjunt de gens que es transcriuen a partir d'una mateixa regió promotora) en el genoma bacterià es presenta en diferent nombre de còpies (1-15), i es manté més o menys constant a nivell de família, gènere i espècie. Entre les diferents còpies de l'rRNA 16S pertanyent a una mateixa soca, es detecta una variabilitat intragènica o microheterogenicitat, que fan que certes posicions de l'electroforograma continuen ocupades per dos nucleòtids diferents. En la majoria dels casos, aquesta variació al·lèlica en les còpies de l'rRNA 16S per a una mateixa soca és d'1 o 2 polímers i no condueix a la identificació d'espècies diferents. Una solució de consens que reflecteix aquest polimorfisme intracel·lular (no la presència de diferents fenotípics i/o genotípics) és l'assignació segons la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC) com segueix: R (GA), Y (TC), W (AT), M (AC), S (GC) o K (GT) entre les més freqüents.

A continuació, la seqüència consens s'introdueix en bases de dades en línia d'accés públic o privat, amb l'objectiu d'identificar la soca problema mitjançant la comparació amb altres seqüències depositades en aquestes bases. Actualment, la base de dades que presenta més consultes per ser més versàtil en organismes, orígens, gens, i tipus i nombre de seqüències depositades és la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) amb programes com BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) per a l'alineament de seqüències. A més, GenBank conté una secció de taxonomia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) que inclou informació i seqüències sobre més de 160.000 organismes. Altres bases de dades àmpliament utilitzades en l'anàlisi de seqüències de l'rRNA 16S són:

- BIBI Bioinformatic Bacterial Identification (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>), programa que automatitza i simplifica les identificacions bacterianes utilitzant diferents gens i nivells d'exigència en la identificació.
- 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/>).
- A més hi ha bases de dades d'accés privat com MicroSeq 500 (Applied Biosystems; Foster City, EEUU) que conté seqüències de 527-pb de l'rRNA 16S de més de 1.434 espècies o subespècies de 235 gèneres.

Altres utilitats que ofereixen aquestes bases de dades són la construcció d'arbres filogenètics, el disseny d'encebadors, l'anàlisi de polimorfismes o SNP (*single nucleòtid polymorphisms*), etc. Gran part d'aquestes estan disponibles en la pàgina <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>.

3.5. CRITERIS PER A LA INTERPRETACIÓ DE RESULTATS

La introducció de la seqüència problema i la comparació amb altres de disponibles en la base de dades amb què es treballa, proporciona un informe constituït per diverses seccions. En el cas del programa BLAST del Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en la primera secció apareix un gràfic que indica el nivell i la mida dels fragments alineats, seguit d'una llista en ordre decreixent de les seqüències de microorganismes amb els quals es mostra la identitat (% de coincidència). En la secció següent, es troba cada alineament de la seqüència problema o *query* enfront de cada seqüència d'un altre microorganisme, amb indicació del nombre i el percentatge de bases idèntiques (*identity*). Si es desitja més informació sobre el microorganisme o microorganismes amb què mostra més identitat, cal posicionar-se a la part superior de l'alineament, on s'indica el número d'accés del Genbank i es pot accedir directament a PubMed.

Cal advertir que la comparació de seqüències es veu afectada per la mida de les seqüències analitzades i el tipus d'alineament utilitzat, per tant es valorarà conjuntament amb el percentatge de similitud, o el seu contrari. Hi ha diferents criteris en el percentatge de similitud de l'rRNA 16S per a la pertinença o no a una mateixa espècie, des de $\leq 0,5\%$ a 2% . A vegades el criteri depèn del gènere o l'espècie en estudi. D'aquesta manera, genogrups amb característiques fenotípiques exclusives i $<1\%$ de diferències en la seqüència de l'rRNA 16S, s'han reassignat en noves espècies. Hi ha criteris per a la interpretació dels resultats disponibles en les guies del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Una actitud de consens és acceptar que una similitud del $\geq 98,5\%$ defineix una espècie, i taxes del $\geq 95\%$ al 99% defineixen un gènere. No obstant això, definir l'espècie o el gènere mitjançant un valor per a l'rRNA 16S pot no ser apropiat per a tots els gèneres.

La microheterogenicitat dins d'una mateixa espècie per a la seqüència de l'rRNA 16S, diferències d'unes poques bases o $<0,5\%$, -serovarietats, variació intraespècie, subespècie-, permeten en alguns casos distingir un fenotip o aspecte de virulència important, una especificitat de nínxol o fer estudis epidemiològics o de seguiment. N'és un exemple la seqüenciació del gen *emm* (codifica la proteïna M) en *Streptococcus pyogenes*, ja que les diferències indiquen els distints serotips.

Es considera que el gen *rpoB* és el gen més adequat per a la identificació i discriminació filogenètica a nivell d'espècies i subespècies, analitzant la seqüència situada entre les posicions 2300-3300. Segons la mida del fragment de l'*rpoB* s'estableixen diferents punts de tall per a l'assignació d'espècie: 300-600 pb es correspon amb $\geq 94\%$; 600-825 pb una similitud $\geq 96\%$ (taula 1).

Sovint, les comparacions entre les diferents seqüències es mostren mitjançant els alineaments lineals i dendrogrames. Aquesta opció és proporcionada per BLAST, BIBI i altres programes com PAUP (<http://paup.csit.fsu.edu/>) o Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.htm>). En la realització dels dendrogrames es fan servir diferents algorismes: el mètode NJ (*neighborjoining*), el mètode UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) i a vegades el WPGMA (*weighted pair group method with arithmetic averages*). Els principals agrupaments es mantenen si les soques es troben molt relacionades. Si la relació és més feble, l'aparença del dendrograma es modifica segons el programa utilitzat. Un altre factor que afecta la comparació en el dendrograma és la selecció de l'*outgroup* (serà una soca relacionada però fora del grup comparat, enfront de la qual es fa la primera comparació). Si l'*outgroup* no és adequat, les diferències entre els grups del dendrograma es poden minimitzar.

En moltes de les anàlisis filogenètiques dutes a terme s'observa que els arbres elaborats amb les seqüències de l'*rpoB* són més robustos que els arbres obtinguts amb les seqüències de l'rRNA 16S (menors valors de *bootstraps*), i permeten identificar diferents clústers en els gèneres *Mycobacterium*, *Acinetobacter* i altres.

Taula 1. Recomanacions per a la utilització de l'anàlisi de l'rRNA 16S i del gen rpoB en la identificació bacteriana.

Categoria	Recomanacions
Soques a seqüenciar	Soques amb descripció escassa Soques amb freqüència d'aïllament baixa Soques amb fenotips atípics Soques de difícil identificació fenotípica Soques de creixement lent o enutjós Patògens nous Bacteris de difícil cultiu
Anàlisi de l'rRNA 16S	Mínim > 98,5% similitud Ideal 1300 a 1500 pb seqüenciades <1% posicions ambigües
Crteri per a la identificació d'espècie	Mínim:>98,5% similitud Ideal: :>99% similitud Comparació amb la seqüència tipus o soca de referència que posseeix estudis d'homologia de DNA. Per a diferències <0,5% a l'espècie més pròxima, cal considerar altres propietats (fenotip)
Crteri per a la identificació de gènere	Rang de similitud 95%-100%
Crteri per a l'assignació de família	Similitud >95%
Anàlisi retrospectiva de la identificació fenotípica	Morfologia de la colònia Tinció Gram Catalasa/oxidasa Perfil bioquímic Requeriments nutricionals
Anàlisi de l'rpoB	Fragment hipervariable 2300-3300 pb
Crteri per a la identificació d'espècie	Segons la mida del fragment seqüenciat 300-600 pb: una similitud ≥94% 600-825 pb: una similitud ≥96%
Crteri per a la identificació de gènere	Gènere diferent: una similitud <85,5%
Crteri per a la identificació de nova espècie/subespècie bacteriana	Nova espècie: una similitud >97,7% Nova subespècie: una similitud 98,2%

3.6. INDICACIONS DE LA IDENTIFICACIÓ MOLECULAR

En la pràctica de la microbiologia clínica es donen una sèrie de circumstàncies en què és útil la identificació bacteriana mitjançant mètodes moleculars. Entre altres hi ha la dificultat en l'aïllament, el creixement lent, la baixa activitat en les proves bioquímiques, l'absència o baixa efectivitat de tècniques serològiques, etc. Aquestes situacions i la necessitat d'obtenir resultats reproduïbles i intercanviables entre laboratoris confereixen a les tècniques moleculars, i especialment a l'rRNA 16S i a l'rpoB, un gran protagonisme.

3.6.1. Identificació de soques amb descripció escassa, amb baixa freqüència d'aïllament o fenotípicament atípiques

En aquestes circumstàncies, la pràctica clínica es veu beneficiada per la identificació mitjançant rRNA 16S, que avantatja en rapidesa i exactitud una àmplia varietat de sistemes, com ara els perfils d'àcids grassos cel·lulars, la utilització de fonts de carboni i altres identificacions convencionals.

3.6.2. Identificació de soques de difícil identificació fenotípica o de creixement enutjós

Aquest és el cas de la dificultat per a diferenciar fenotípicament les espècies de *Nocardia* i de *Mycobacterium*. Tanmateix, aquesta identificació no és completa per a algunes espècies de micobacteris (*Mycobacterium tuberculosis* i altres micobacteris del grup tuberculosi; *M. chelonae* i *M. abscessus*; *M. avium* i *M. paratuberculosis*), per això entre altres gens es recorre a l'*rpoB*, de gran utilitat en la identificació d'espècies pertanyents a grups molt homogenis.

3.6.3. Descripció de patògens nous

La hibridació DNA-DNA es considera l'estàndard de referència en la proposta de noves espècies i la definitiva assignació taxonòmica d'una soca. Sobre la base de la cinètica de reassociació del DNA-DNA es quantifica la definició genètica d'espècies quan hi ha $\geq 70\%$ d'homologia DNA-DNA i $\leq 5^\circ\text{C}$ en la ΔT_m per a l'estabilitat de les molècules de l'heterodúplex. No obstant això, l'elevat temps necessari per a la realització de la tècnica, el treball invertit i l'elevat cost fa que cada vegada menys laboratoris practiquen aquesta tècnica. I així la major part dels estudis que descriuen les noves espècies es basen en les seqüències SSU i altres dades polifàsiques.

No hi ha cap altre gen com l'rRNA 16S que haja mostrat una aplicabilitat tan àmplia en tots els grups taxonòmics. Si l'objectiu és la identificació d'un bacteri desconegut sense haver-n'hi un coneixement previ, l'rRNA 16S és la millor elecció. L'anàlisi de l'rRNA 16S constitueix l'eix principal sobre el qual s'estructuren les últimes edicions del llibre de referència en taxonomia bacteriana *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Moltes de les noves espècies de micobacteris (>60) de les 148 existents han sigut descrites gràcies a la utilització d'aquest gen i d'altres d'addicionals, i ha reassignat en nous grups els micobacteris de creixement lent i ràpid.

Per descriure una nova espècie es recomana la presència de diferències fenotípiques clares i diferències en la seqüència de >1 pb/100 bases. Si aquestes diferències són >5%, es podria considerar l'existència d'un gènere nou. S'estima que entre un 10%-20% dels aïllats no coincideixen amb els microorganismes descrits i que es pot tractar d'un gènere o d'una espècie nous, però en soques obtingudes en la pràctica clínica aquesta freqüència és molt inferior.

La creixent rellevància de l'anàlisi de l'*rpoB* es manifesta en dues situacions: 1) el contingut bacterià GC pot estimar-se matemàticament pel contingut GC del gen *rpoB*, i 2) la similitud que presenten les seqüències *rpoB* de dues espècies bacterianes es correlaciona d'una manera molt significativa amb els corresponents valors d'hibridació DNA-DNA (DDH) i amb la seua identitat mitjana en nucleòtids (ANI).

3.6.4. Identificació de bacteris difícils de cultivar

L'ús d'encebadors universals per a l'rRNA 16S en la mostra clínica és un pas que permet augmentar la concentració de DNA en bacteris difícils de cultivar o amb complexos requeriments de cultiu, seqüenciant després l'amplicó, i constitueix una estratègia eficient si es detecta un sol microorganisme. D'aquesta manera s'ha pogut constatar la presència de *Bartonella quintana* i *Coxiella burnetii* com a principals agents etiològics en endocarditis amb cultiu negatiu. Si la mostra posseeix un origen no estèril o procedeix del medi ambient, aquesta estratègia no és eficient. També és útil quan hi ha tractament antimicrobià i el seu cultiu

és negatiu. En situacions d'adherència, diversitat o microorganismes desconeguts, l'anàlisi de l'rRNA 16S continua sent útil, com passa en infeccions periodontals i biofilms, on es combina l'encebador directe universal i el revers específic per a espiroquetes. En l'estudi d'aquestes comunitats bacterianes, l'rpoB també hi pot tenir un important paper, ja que es presenta en monocòpia enfront de l'heterogeneïtat en les còpies de l'rRNA 16S, i s'obté menor ambigüitat en la seqüència de l'rpoB.

3.7. DESAVANTATGES DE LA IDENTIFICACIÓ MOLECULAR

Distintes causes originen una incorrecta assignació de gènere i espècie quan es du a terme una identificació mitjançant l'anàlisi de la seqüència i l'alineament amb altres seqüències.

3.7.1. Qualitat disminuïda de les seqüències en la base de dades i errònia assignació d'espècies

En la identificació molecular hi ha una forta dependència amb la precisió de les seqüències depositades i la idoneïtat en l'assignació d'espècie d'aquestes soques. Es dona quan soques tipus o de col·leccions certificades estan incorrectament identificades. Altres vegades, la nomenclatura no ha sigut actualitzada com en el cas dels gèneres polifilètics. També pot ocórrer que soques genèticament diferents (>2% de variabilitat) estiguen incloses en la mateixa espècie, o que hi haja una presència elevada d'un nombre d'indeterminacions, o la incorrecta assignació d'espècie per falta de proves fenotípiques o errors. Gran part d'aquests errors podrien minimitzar-se utilitzant sistemes de revisió, tal com ho fan algunes bases de dades com el RINDOM o el MicroSeq.

3.7.2. Absència o baixa correlació entre la identificació genotípica i fenotípica

A vegades sorgeixen dubtes respecte a la correlació entre les identifications fenotípiques i genotípiques, que dificulten l'assignació d'espècie mitjançant l'rRNA 16S. Això passa quan es troben genotips idèntics o semblants i diferents fenotips. Així ha passat amb *M. tuberculosis* i *M. bovis* o *M. africanum*; *Bordetella pertussis* amb *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*; amb les diferents espècies de *Brucella*, etc.

En altres situacions, hi ha espècies distintes amb diferències fenotípiques, però una gran homologia en les seqüències de l'rRNA 16S com ocorre amb *Escherichia coli* i *Shigella dysenteriae* o *S. pneumoniae* i *S. mitis*. En canvi, es donen casos en què els microorganismes presenten seqüències amb un elevat nombre de diferències i, malgrat això, pertanyen a la mateixa espècie o genotip (*Clostridium tetani* i *C. innocuum*).

Aquestes diferents consideracions es posen clarament de manifest quan s'observa que les diferències genètiques en l'rRNA 16S dels gèneres d'*Enterobacteriaceae* són menors que per a algunes subespècies de *Streptococcus* i molt menors que per a moltes espècies de *Clostridium*.

En el cas de discrepàncies entre el fenotip i el genotip d'una soca, tots dos s'han de tornar a estudiar. Confirmats els resultats, es considera que el genotip s'imposa sobre el fenotip.

3.7.3. Baixa resolució en la identificació mitjançant l'rRNA 16S

A vegades l'rRNA 16S presenta una baixa capacitat de discriminació per a alguns gèneres i espècies a causa d'una recent divergència, i es fa necessari complementar la identificació amb l'estudi d'altres gens o amb proves fenotípiques (taula 2). Això passa amb diferents espècies dels gèneres *Bacillus* (*B. cereus* i *B. thuringiensis*; *B. globisporus* i *B. psychrophilus*), en els gèneres *Brucella*, *Achromobacter*, *Strenotrophomonas* i *Actinomyces*, en el complex *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus*, en els micobacteris de creixement ràpid, i en la família *Enterobacteriaceae* (especialment en *Enterobacter* i *Pantoea*). Situació oposada es produeix per l'heterogeneïtat intragenòmica en l'rRNA 16S en el gènere *Aeromonas*. En *A. veronii* hi ha més de 6 còpies d'rRNA 16S que difereixen en >1,5% entre si.

Taula 2. Exemples de gèneres i espècies bacterians amb menor resolució en la identificació per rRNA 16S i propostes de gens alternatius

Gènere	Espècie	Gens alternatius
Aeromonas	<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>
Bacillus	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. globisporus</i> , <i>B. psychrophilus</i>	<i>rRNA 23S</i> , <i>gyrB</i> , Espai intergènic <i>rRNA</i> <i>16S-23S</i> <i>lef</i> , <i>rpoB</i>
Bordetella	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. holmesii</i>	<i>IS481</i> , <i>ptxA-Pr</i> , <i>outer</i> <i>membrane porin</i> , <i>recA</i> , <i>IS1001</i>
Brucella	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i> y otros	<i>rpoB</i>
Burkholderia	<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>	<i>rRNA 23S</i> , espai intergènic <i>rRNA 16S-23S</i> , <i>fliC</i> , cluster gènic de secreció de tipus III (<i>TTS</i>) <i>recA</i>
Campylobacter	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	<i>mapA</i> <i>ceuE</i>
Corynebacterium	<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 spp./</i> <i>E. coli enteroinvasivo (EIEC)</i>	<i>ipaH</i>
Streptococcus	<i>S. sinensis</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S.</i> <i>infantarius</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S.</i> <i>pseudopneumoniae</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S.</i> <i>cristatus</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S.</i> <i>mitis</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S.</i> <i>oralis</i> , <i>S. oligofermentans</i> , etc	<i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> , <i>sodA</i> , <i>groEL</i> , <i>recN</i>

Cal recordar que moltes espècies o subespècies que no es poden identificar mitjançant l'rRNA 16S, s'identifiquen amb l'anàlisi de l'rpoB.

3.7.4. Presència d'electroforogrames o cromatogrames de DNA mixtos

La utilització de l'rRNA 16S com a eina de diagnòstic està limitada a infeccions monobacterianes, ja que en les polimicrobianes s'obté un electroforograma mixt. En aquestes situacions, sovint hi ha implicada un bacteri anaerobi, i la concordança entre cultiu i seqüenciació és baixa. S'han descrit diferents estratègies per a resoldre aquesta circumstància:

- electroforesi en gel en gradient desnaturalitzant o *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE);

- amplificacions independents per a grampositius i per a gramnegatius;
- piroseqüenciació;
- utilització d'un algorisme en el programa informàtic RipSeq (iSentio) que separa els senyals ambigus dels cromatogrames mixtos.

La identificació bacteriana proporcionada per l'anàlisi de l'rRNA 16S és més precisa, sòlida i reproducible que les anàlisis fenotípiques, i resol aproximadament el 90% de les identificacions. Però no constitueix una eina infal·lible. L'elaboració de recomanacions en l'anàlisi segons els gèneres i les espècies a identificar, les bases de dades amb major qualitat de les seqüències depositades, l'aplicació complementària o en substitució d'altres gens *housekeeping* com a dianes, proporcionarà en un futur immediat plataformes més eficients en la identificació molecular bacteriana.

Especialment, l'anàlisi de l'rpoB contribuirà a una identificació bacteriana més eficient (gènere, espècie, subespècie), amb la detecció i reclassificació de nous organismes, i la millora de la resolució filogenètica de l'rRNA 16S.

3.8. NOVES TECNOLOGIES EN LA IDENTIFICACIÓ MOLECULAR MICROBIANA

Recentment, la tècnica de PCR en *multiplex* acoblada a una anàlisi de la temperatura de *melting* (SeptiFast, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) fa una identificació primerenca d'alguns agents etiològics bacterians i fúngics de la sèpsia a partir d'una mostra directa. La regió amplificada és l'espai intergènic del 16S-23S rRNA bacterià o del 18S-5,8S fúngic. La no detecció de tots els potencials patògens i la necessitat de cultiu per a la determinació del perfil de sensibilitat a antimicrobians, no permet a aquesta tècnica substituir la realització dels hemocultius. Altres desavantatges afegits al restringit espectre d'espècies detectades són: falsos positius amb bacterièmies o fungèmies transitòries, forta dependència de la concentració bacteriana, alt cost i càrrega de treball. En cas d'haver-hi discrepàncies entre la detecció pels dos mètodes diagnòstics, es proposen algorismes de decisió útils. Un avantatge important d'aquesta tècnica és que l'administració d'antimicrobians al pacient interfereix només lleugerament en la detecció del patògen.

Adicionalment han sorgit plataformes d'identificació de patògens que modifiquen o substitueixen la seqüenciació tradicional, com passa amb la piroseqüenciació o l'espectrofotometria de masses, respectivament. Mitjançant plataformes d'amplificació-piroseqüenciació es fa la identificació bacteriana o fúngica mitjançant PCR de tres regions variables de l'rRNA 16S (V1-V3, o V1, V2 i V6) i de l'rRNA 18S, respectivament, en hemocultius (BlackLight Sèpsia Kit, BlackBio, Madrid, Spain; Pyromark ANEU, Quiagen GmbH, Hilden, Germany). S'obtenen tres amplicons amb una mida inferior a 500 pb, susceptibles de determinar-ne la composició en nucleòtids mitjançant l'emissió de llum per l'alliberament de pirofosfats (subproductes de l'extensió per polimerització de la cadena de DNA). Innovacions successives d'aquest mètode en l'amplificació respecte al tipus de mostra clínica i a la determinació de diferents fragments gènics corresponents als diversos factors de patogenicitat, resistència, etc., augmenten les possibilitats d'aquesta plataforma.

Les plataformes d'amplificació-espectrofotometria de masses (PCR/ESI-MS) permeten la detecció universal d'un o diversos patògens (bacteris, virus, fongs i protozous) presents en una àmplia varietat de mostres (ambientals, clíniques, alimentàries o en cultius) de la manera següent. Després de l'extracció i una PCR d'amplificació amb parells d'encebadors d'ample espectre, s'obtenen un o diversos productes de PCR que corresponen a regions genòmiques d'identificació dels diferents dominis microbians en relació amb la complexitat de la mostra problema. Aquests productes es dessalen i són ionitzats i dirigits en forma d'aerosol cap a un espectrofotòmetre de masses. Es generen senyals espectrals que són processats per determinar-ne la massa i la composició en bases. Aquests resultats són considerats amb els iniciadors d'amplificació utilitzats en l'estratègia TIGER (*Triangulation Identification for the Genetic Evaluation of Risks*; Ibis T5000, Alcedo),

París) i la informació entra en una base de dades genòmica que assigna la determinació d'espècie. Avantatges indicats són: no requereixen cultiu o conèixer amb anticipació el producte analitzat; és eficient en mostres polimicrobianes; en el cas de nous patògens no caracteritzats, permet l'assignació a gèneres o famílies bacterianes o víriques; i també permet detectar gens de virulència, de resistència i la tipificació.

Recentment ha aparegut una nova plataforma comercial, coneguda com a PLEX-ID (Abbott), basada en aquesta metodologia, que permet l'anàlisi directa i la identificació de microorganismes sobre mostres, incloent-hi els hemocultius (BAC Spectrum Assay). Ha demostrat bons resultats fins i tot en bacterièmies polimicrobianes, amb independència que siguin microorganismes aerobis, anaerobis, cultivables, de creixement lent o incultivables. Com a aspecte important destaca que fins i tot es podria fer servir com un mètode quantitatiu.

3.9. BIBLIOGRAFIA

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, Carlouz 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. "rRNA 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 broadrange 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 rRNA 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 DNAdependent 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. Stackebrandt E, Ebers J. "Taxonomic paràmetres 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.

4. MÈTODES PROTEÒMICS D'IDENTIFICACIÓ BACTERIANA

4.1. INTRODUCCIÓ

La proteòmica és l'estudi i la caracterització del conjunt de proteïnes expressades per un genoma (proteoma). Les tècniques de proteòmica aborden l'estudi d'aquest conjunt de proteïnes i les més usades es basen en l'electroforesi i en l'espectrometria de masses. Segons l'objectiu de l'estudi, les tècniques de proteòmica es poden agrupar en els grups següents:

- *Tècniques emprades per a analitzar globalment el proteoma i separar-ne les proteïnes.* Entre altre destaquen l'electroforesi bidimensional, DIGE (electroforesi diferencial en gel), ICAT (marcatge isotòpic diferencial) i MudPIT (tecnologia d'identificació de proteïnes multidimensional).
- *Tècniques usades per a analitzar individualment les proteïnes.* Amb aquest objectiu s'utilitzen diversos tipus d'espectrometria de masses. Amb aquests s'obté la petjada peptídica, que és el conjunt de fragments peptídics que s'obtenen després de tractar una proteïna concreta amb una proteasa determinada. Les proteases són enzims que trenquen els enllaços peptídics de les proteïnes. Depenent de l'enzim que s'utilitza per a fragmentar la proteïna s'obtenen diferents petjades peptídiques. Aquestes són les característiques de cada proteïna. Actualment hi ha nombroses bases de dades que recullen les petjades peptídiques de multitud de proteïnes conegudes. Aquestes bases de dades es poden rastrejar usant programes bioinformàtics per a buscar la petjada peptídica que corresponga amb la d'aquella proteïna que s'estudie i per tant poder identificar-la.
- *Tècniques que s'utilitzen per a estudiar interaccions entre proteïnes,* com els sistemes *yeast two hybrids* d'alt rendiment o la tècnica *Phage Display*. Aquesta última permet esbrinar amb quines proteïnes interacciona una proteïna problema o sonda. Aquesta tècnica consisteix en l'expressió en la superfície d'un fag de les proteïnes que es volen analitzar.

En l'actualitat, el repte principal de la proteòmica és l'automatització i la integració de les tecnologies esmentades. Aquest és un repte la resposta al qual eixirà principalment de la bioinformàtica. Entre totes les eines que es fan servir en la proteòmica, en aquest document s'abordarà només l'espectrometria de masses, amb una atenció especial a les tècniques emprades per a identificar microorganismes.

4.2. FONAMENT I VARIANTS TÈCNIQUES

4.2.1. Espectrometria de masses

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica que permet analitzar amb gran precisió la composició de diferents elements químics gràcies a la mesura d'ions derivats de molècules que són separats en funció de la relació massa/càrrega (m/z). Un ió és un àtom o una molècula carregada elèctricament per l'excés o la falta d'electrons. Atès que la major part dels ions formats posseeixen una sola càrrega, la relació m/z és equivalent a m .

En l'espectròmetre de masses té lloc la separació de les espècies iòniques de la mostra segons la massa. L'espectre de masses de cada compost s'anomena "petjada química" i és una representació gràfica dels fragments obtinguts per ordre creixent de massa enfront de l'abundància relativa.

4.2.2. Components de l'espectròmetre de masses

Els tres components bàsics d'un espectròmetre de masses són els que segueixen:

- **Font d'ionització.** És l'element de l'espectròmetre que ionitza el material que és analitzat. Les tècniques d'ionització, el procés físic o químic mitjançant el qual es produeixen ions, han sigut determinants per a establir quin tipus de mostres es poden analitzar per espectrometria de masses.

La ionització de l'electró (EI) i la ionització molecular s'utilitzen per als gasos i els vapors. Dues tècniques, usades sovint amb líquids i mostres biològiques sòlides, inclouen la ionització per electroesprai (ESI desenvolupada per Fenn) i la desorció/ionització per làser assistida per matriu (MALDI desenvolupat per Karas i Hillenkamp).

- **Analitzador de masses.** Utilitza un camp elèctric o magnètic per a accelerar els ions i separar-los en funció de la relació massa/càrrega (m/z). Actualment hi ha diferents mètodes per a “filtrar” els ions segons aquesta relació, com el quadrupol o com l'analitzador de temps de vol (*time of flight*, TOF), mitjançant la massa en una regió d'alt buit es determina mitjançant una mesura molt precisa del període de temps des de l'acceleració dels ions en la font fins que impacten amb el detector.
- **Detector.** Els ions que arriben al detector produeixen un senyal elèctric que és processat, ampliat i enviat a un ordinador. El registre obtingut és l'espectre de masses o “petjada química”. Normalment es fa servir un cert tipus de multiplicador d'electrons (multiplicador d'electrons).

4.2.3. Variants de l'espectrometria de masses

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica ideada al començament del segle xx. Durant molts anys, les aplicacions d'aquesta tècnica es van veure limitades a compostos (analits) de baix pes molecular, termostables i fàcilment volatilitzables.

En la dècada dels 70 es van descriure els primers experiments amb èxit, en els quals les molècules termolàbils eren transformades, sense descompondre's i en un únic pas, en ions gasosos. Aquestes tècniques de volatilització/ionització reben el nom de “tècniques de desorció”. En aquests casos, l'analit no volàtil, convenientment depositat sobre una superfície metàl·lica en alt buit, és bombardejat amb un feix d'àtoms neutres accelerats (FAB) o un feix d'àtoms iònics accelerats (LSIMS), o és exposat a l'acció d'un plasma (PD) o a l'acció d'un làser (LD). Si bé aquests mètodes d'ionització ampliaren l'ús de la tècnica a molècules termolàbils i a macromolècules, pràcticament el seu límit d'aplicació és per a analits de pes molecular per davall de 700-800 Da.

La introducció de nous mètodes d'ionització que no requereixen la volatilització prèvia de la mostra fou l'element principal que va permetre l'extensió de l'espectrometria de masses al camp de les biomolècules. Va ser al final de la dècada dels 80, després de l'èxit aconseguit per Tanaka (premi Nobel de Química 2002), mitjançant l'ús de matrius metàl·liques (*soft laser desorption*, SLD), que Karas i Hillenkamp van descriure simultàniament la detecció de l'ió gasós intacte de proteïnes amb l'ús de les matrius orgàniques fotosensibles. Això va donar lloc al desenvolupament del mètode de volatilització/ionització suau que avui es coneix com a *matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry* MALDI.

Des de la seua implantació pràctica, el mètode d'ionització MALDI s'ha usat amb èxit per a l'anàlisi per espectrometria de masses de biomacromolècules (àcids nucleics, nucleòtids, nucleòsids, proteïnes, pèptids, lípids, hidrats de carboni, compostos glicoconjugats, etc.) i polímers sintètics. Actualment també hi ha altres mètodes com ara l'ESI (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry), la SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization), la DIOS (Direct Ionisation on Silicon) i a més l'acoblament MS/MS (Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry).

4.2.4. Espectrometria de masses MALDI-TOF

L'espectrometria de masses MALDI-TOF s'anomena MALDI per les seues sigles en anglés *matrix-assisted laser desorption/ionization* (desorció/ionització per làser assistida per matriu) i TOF per l'analitzador *time of flight* (temps de vol) que s'integra generalment amb fonts d'ionització MALDI.

Aquestes en són les característiques més importants:

- Per a obtenir ions d'una manera adequada cal que la mostra estiga embeguda en una matriu orgànica.
- Com a font d'ionització emprava un làser: es generen ions després de bombardejar la mostra amb fotons (làser). Es produeixen raigs UV de 337 nm.
- La separació dels ions té lloc segons el "temps de vol".
- L'espectre es genera sobretot per ions univalents.
- El temps d'obtenció de l'espectre és aproximadament d'un minut per a 10^{-12} g d'un compost de massa/càrrega (m/z) de 1.000 daltons (figura 4).

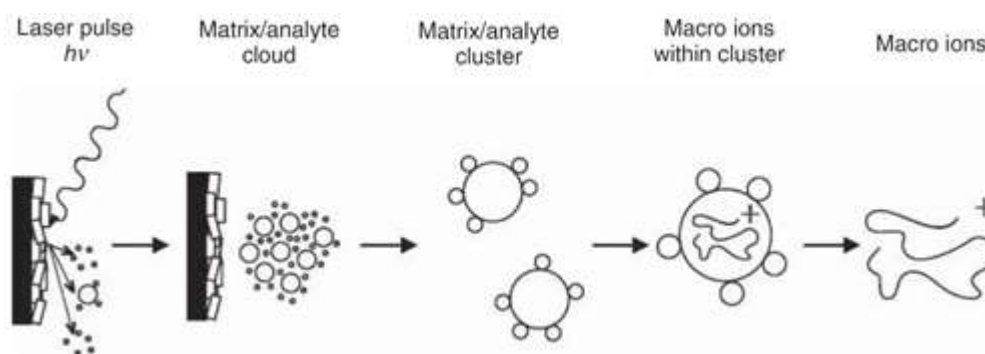


Figura 4. Principi d'ionització/desorció en MALDI/MS. La matriu (núvol analitzat) és desorbida de la matriu microcristal·lina/mostra preparada mitjançant un làser polsat. La transferència de protó des dels ions de la matriu es considera la primera causa de la subsegüent generació d'ions de l'analit.

El procés es pot resumir en els passos següents:

- La mostra es mescla amb una matriu en excés sobre una superfície de metall (targeta metàl·lica), de manera que ambdues cocrystal·litzen quan s'evapora el solvent.
- Aquesta preparació és irradiada amb un làser en condicions d'alt buit. La matriu absorbeix aquesta energia i la transfereix a la mostra, que pateix ionització.
- L'àrea irradiada, d'unes poques micres, es calfa i provoca la desorció dels ions de fase sòlida a fase gasosa.
- La mostra ionitzada i vaporitzada crea un dens núvol de gas entre dos elèctrodes. El camp elèctric format s'empra per a accelerar la mostra fins al detector.
- Els ions més lleugers experimenten més acceleració, viatgen més ràpid i arriben primer al detector.
- En el detector es genera el perfil o petjada química específic d'aquesta mostra.

En aquest tipus d'espectrometria és de summa importància la matriu, ja que funciona com un transmissor que transfereix l'energia necessària per a la ionització del làser a les molècules de la mostra. La mescla mostra-matriu ha de cristal·litzar homogèniament per a garantir una resolució òptima de l'espectre.

4.2.5. Aplicacions de l'espectrometria de masses

Les tècniques d'espectrometria de masses s'han utilitzat i es continuen utilitzant per a un gran nombre d'aplicacions, com ara la mesura exacta de pesos moleculars, el monitoratge de reaccions bioquímiques (reaccions enzimàtiques, modificacions químiques, digestió de proteïnes), la seqüenciació d'aminoàcids, la seqüenciació d'oligonucleòtids o la determinació de l'estructura de proteïnes.

Una aplicació de l'espectrometria de masses MALDI-TOF de gran interès en microbiologia és la identificació de microorganismes. La identificació bacteriana basada en el perfil de proteïnes obtingut mitjançant l'espectrometria de masses MALDI-TOF ja va ser proposada fa diverses dècades. No obstant això, només recentment ha començat a fer-se servir com un mètode ràpid i fiable per a la identificació bacteriana. Al principi es van elaborar estudis parcials sobre la seua eficàcia per a la identificació de certs microorganismes en condicions controlades. Actualment, cada vegada es publiquen més treballs sobre l'eficàcia en la identificació d'aïllats clínics de bacteris grampositius i gramnegatius de diversos orígens directament des dels medis de cultiu habituals i sense condicions especials, com a mètode de rutina.

4.2.6. Plataformes comercials d'espectrometria de masses MALDI-TOF per a la identificació microbiana

Des de la descripció original del sistema, s'han desenvolupat diversos sistemes capaços d'identificar bacteris sencers, sense necessitat de llargs procediments previs (extracció de proteïnes, digestió, purificació, etc.).

Es basen en la detecció de proteïnes ribosòmiques S i L (2.000 a 20.000 Da). S'assumeix que el 80-90% dels senyals de l'espectre del bacteri són proteïnes ribosòmiques. Les característiques principals d'aquests sistemes són les que segueixen:

- No hi ha cap procediment previ d'extracció; s'utilitza directament una colònia bacteriana.
- Comparen el perfil o petjada espectral desconeguda amb les de bacteris coneguts.
- Comparació d'espectres generats amb bases de dades prèvies.
- Rapidesa de la tècnica (aprox. 90 microorganismes/hora).
- Identificació a nivell de gènere i espècie, a vegades subespècies.
- És important emprar el mateix protocol estandarditzat per a obtenir els perfils i poder-los comparar amb una base de dades prèvia.

A continuació es descriuen amb més detall tres exemples de sistemes comercials que empen espectrometria de masses MALDI-TOF per a la identificació microbiana: MicrobeLynx™ de Waters Corporation, MALDI Biotyper™ de Bruker Daltonics i AXIMA@SARAMIS™ de Shimadzu & Anagnostec (taula 3). Cada tècnica recomana uns protocols propis per a la preparació de la mostra i té associada una base de dades diferent, juntament amb un programari per a l'adquisició dels espectres i la comparació amb la base de dades.

El primer sistema desenvolupat per a la identificació bacteriana va ser MicrobeLynx System, en la creació del qual van participar la Universitat de Manchester, la Unitat de l'Agència de Protecció de la Salut amb Servei d'Identificació Molecular i l'empresa Waters Corporation. Aquest sistema va aparèixer com una tècnica que requeria proves preliminars, ja que necessitava una matriu diferent per a microorganismes grampositius i gramnegatius, comportava una mínima preparació de la mostra i un temps d'assecatge (1 h) abans d'afegir la matriu. Requeria una lectura mínima de 4 pouets de la targeta per mostra a identificar. La versió comercial utilitzada proporcionava una escassa reproductibilitat de la tècnica, ja que hi havia diferències segons les condicions de cultiu.

Taula 3. Comparació de sistemes comercials d'espectrometria de masses MALDI-TOF

	Casa comercial		
	Waters Corporation	Bruker	Shimadzu
Programari i base de dades	Microbe Lynx System -MMU (Manchester Metropolitan University)	Maldi Biotyper (Bruker Daltonics)	SARAMIS (AnagnosTec GmbH)
Espectròmetre de masses	Micro MX	Microflex Bruker	Axima
Identificació	Bacteris aerobis /anaerobis	Bacteris, llevats i fongs filamentosos	Bacteris, llevats i fongs filamentosos
Anàlisi d'espectre		Espectre mitjà	Superespectre
Proteïnes	500 - 15.000 Da	2.000 - 20.000 Da	2.000 - 20.000 Da
Preparació de la mostra	Sí Assecatge d'1 h	No Assecatge immediat	No Assecatge immediat
Matriu	<u>Gram(+)</u> : solució saturada 3 mg/mL de 5-Cl-2-mercaptobenzotizol (CMBT) dissolt en aigua:metanol: acetoneitril (1:1:1) amb 0,1% àcid fòrmic i 0,01 M 18-crown-6- èter <u>Gram(-)</u> : el CMBT se substitueix per 14 mg/mL de α -ciano-4-hidroxi-cinnàmic (α CHCA)	Solució saturada d'àcid α -ciano-4-hidroxi-cinnàmic en 50% acetoneitril- 2,5% àcid trifluoroacètic Afegir 1 μ L	2,5 àcid dihidroxibenzoic dissolt en una mescla d'aigua:etanol:acetoneitril (1:1:1) mix o d'aigua: acetoneitril (1:1) amb 0,03% d'àcid trifluoroacètic Afegir 0,3- 1 μ L
Rapidesa	96 mostres / 1,5 h	96 mostres / 1 h	380 mostres / 5 h
Reproducibilitat	Escassa (varia segons el medi de cultiu). 4 pouets per mostra	Elevada (no varia amb el medi de cultiu)	Elevada
Transferència de resultats al SIL*	?	Sí	Sí
Nre. de pouets en targeta	96 pouets	96 pouets	48 pouets

*SIL: sistema informàtic del laboratori

Els sistemes més estesos actualment són MALDI Biotyper i AXIMA@SARAMIS (taula 3). Utilitzen una tècnica ràpida i senzilla que no requereix proves preliminars, amb una mínima preparació de la mostra i lectura i interpretació immediata. Les bases de dades estan en constant actualització, amb més de 3.500 entrades. Identifiquen bacteris (grampositius, gramnegatius, anaerobis, no fermentadors, micobacteris), llevats i fongs. Tots dos donen a l'usuari la possibilitat d'incloure noves referències de soques. Permet l'anàlisi simultània de 48 o 96 mostres en una hora i donen els primers resultats en minuts. Destaca la reproductibilitat de la tècnica. Atès que es basen en la mesura de proteïnes ribosòmiques presents abundantment, no presenta diferències en l'espectre obtingut en diferents condicions de cultiu. Es poden usar per a diagnòstic clínic pel seu marcat IVD i CE.

Els dos sistemes presenten un procediment diferent en l'anàlisi de l'espectre. En el sistema MALDI Biotyper, la base de dades està formada per entrades que corresponen a l'espectre mitjà (almenys de 24 espectres d'alta qualitat) d'un microorganisme concret (gènere, espècie i soca). Inclou soques de diverses col·leccions, ja que la companyia té col·laboracions arreu del món. En canvi, en el sistema SARAMIS, la

generació d'un superespectre requereix almenys 15 a 20 aïllats diferents representatius d'una espècie de diferents localitzacions (hospitals, centres de referència i cultius de soques de col·leccions).

4.3. PROCEDIMENT DE TREBALL

4.3.1. Calibratge

Diàriament és convenient fer el calibratge de l'equip per confirmar la correcció dels paràmetres, els quals són condició prèvia per a obtenir espectres de bona qualitat. Per al calibratge s'utilitza un patró estàndard; si es disposa al laboratori d'un espectròmetre de masses de la marca Bruker, s'anomena *Bruker bacterial test Standard* (bts), que conté una mescla de proteïnes conegudes.

4.3.2. Tractament previ dels microorganismes

Per a poder obtenir un bon espectre de masses per MADI-TOF que permeti identificar el microorganisme, aquest s'ha d'aïllar en les millors condicions. Amb aquesta finalitat cal observar una sèrie de precaucions en relació amb el processament i el tractament previ dels microorganismes.

Els microorganismes es poden obtenir a partir d'un cultiu en medi sòlid o líquid. En tot cas, han de ser cultius purs, independentment que els medis siguin o no selectius, de no més de 18-24 hores d'incubació per a evitar espores (*Bacillus* spp.), productes metabòlics (*Arthrobacter* spp.) o autòlisi (*Streptococcus* spp.).

Per a aconseguir més bons resultats en la identificació d'alguns microorganismes, es fa servir un mètode d'extracció amb etanol/àcid fòrmic/acetoneitril que trenca les cèl·lules i allibera les proteïnes. La composició de la solució d'extracció és independent de l'espècie bacteriana amb què es treballa, si bé en casos especials, com els micobacteris, es requereixen incubacions prolongades d'inactivació prèvies a l'extracció.

Bàsicament, els mètodes d'extracció que s'utilitzen consisteixen en ressuspèndre una colònia en aigua (grau de puresa HPLC) i etanol absolut, centrifugar i ressuspèndre el *pellet* en una mescla d'àcid fòrmic al 70% acetoneitril (1:1). Si es parteix d'un cultiu en medi líquid, se centrifuga i es procedeix igual amb el *pellet* resultant.

4.3.3. Transferència a la targeta i addició de la matriu

Per a inocular la targeta metàl·lica, es transfereix una colònia (o una part d'aquesta) del microorganisme crescut en una placa al punt (cercle) corresponent de la targeta de metall en forma d'extensió prima feta amb la punta d'una pipeta, un punxó de plàstic o un escuradents de fusta. Es necessita molt poc de material. Amb una mica de material visible n'hi ha prou per a realitzar la mesura. En el cas d'haver fet l'extracció, s'utilitzarà 1 µL del sobrenadant final i es deixarà assecat a temperatura ambient.

Atès que la relació quantitat de microorganisme per microlitre (µL) de matriu influeix bastant en l'obtenció d'un bon resultat, és convenient aconseguir estandarditzar l'inòcul amb la pràctica de l'usuari, tant manual com visual. S'aconsella que les primeres vegades en què es fa servir aquesta tècnica es depositen quantitats cada vegada més petites del microorganisme en diversos pouets i comprovar en quin s'obté millor resultat. S'aconsella agafar-ne una quantitat quasi inapreciable molt ben estesa en la placa metàl·lica del MALDI-TOF, ja que és millor usar poc material que en excés.

Respecte a la matriu, és convenient mantenir tapat el tub que la conté mentre es va dispensant per evitar que s'evapore i es formen cristalls. Si es fan diverses files, quan s'haja fet l'extensió d'una fila, s'hi afegeix la matriu i es tanca el seu tub mentre s'estén la segona fila, per tal d'evitar l'evaporació de la matriu.

Una vegada afegida la matriu a la targeta és important deixar assecat en repòs a temperatura ambient perquè la cristallització siga òptima. Si en el moment en què s'introdueix la targeta en l'espectròmetre no

estan completament seques totes les mostres, es provoca un retard en l'inici de la lectura ja que són més difícils d'aconseguir les condicions necessàries de buit en l'equip per la humitat introduïda.

4.3.4. Anàlisi

Una vegada preparades les mostres en la targeta per a analitzar-les (matriu ja cristal·litzada), s'obri la tapa quan l'equip ho indique i s'introdueix correctament la targeta. Després de programar la sessió de lectura o nou projecte, la lectura comença automàticament quan s'assoleixen les condicions òptimes de buit.

Les mesures es duen a terme en un espectròmetre de masses MALDI-TOF associat a un programari de captura d'espectre, en el qual es defineix un nou projecte cada vegada. El protocol de treball del programari d'obtenció de l'espectre ha de proporcionar l'adquisició òptima de la mostra per acumulació de 240-500 disparaments en diferents llocs de l'extensió en la targeta metàl·lica de la mostra. S'obté l'espectre entre 2-20 kD d'una manera automàtica. Aquest espectre representa sobretot les proteïnes ribosòmiques S i L (citosòliques, conservades, abundants i de càrrega positiva; això últim n'afavoreix el mesurament).

Els sistemes comercials més estesos estan dissenyats per a donar un resultat complet, incloent-hi un control de qualitat automàtic de l'espectre obtingut en cada punt de la targeta. Per exemple, en el programa FlexControl de Bruker s'indica amb un codi de colors si ha obtingut un bon espectre (verd/taronja/roig). L'espectre obtingut per a la mostra problema es compara automàticament amb tots els espectres de la base de dades del programari específic d'identificació. Després de comparar el perfil es visualitza en la pantalla de l'ordinador l'informe amb el resultat de la identificació.

4.4. INTERPRETACIÓ DE RESULTATS

L'objectiu final de les tècniques d'espectrometria de masses aplicades a la identificació bacteriana és determinar el gènere i l'espècie del microorganisme. És imprescindible que aquest resultat siga correcte per les implicacions clíniques que té.

Les plataformes comercials d'espectrometria de masses MALDI-TOF per a identificació microbiana informen l'usuari del grau de confiança dels resultats de la identificació per a cada mostra. En concret, el programari MALDI BioTyper versió 2.0 analitza (mitjançant un algorisme basat en la comparació dels patrons espectrals) els pics obtinguts i després de la comparació amb els pics de la base de dades obté un *score* logarítmic el valor del qual (determinat empíricament per a aquest programari sobre la base del grau d'identitat o de similitud) permet definir espècie (≥ 2), gènere ($<2 \geq 1,7$) o absència d'identificació ($<1,7$), respectivament. D'altra banda, en el programari Saramis s'expressa com a percentatge de similitud.

En el moment que la tècnica comercial obté un resultat d'identificació en el rang acceptable, entra en joc la formació del microbiòleg per a validar la identificació. És important tenir en compte la naturalesa de la col·lecció d'aïllats que es proposa estudiar i ser crítics amb els resultats que s'obtenen. Una vegada validada la identificació, es pot transferir el resultat al sistema informàtic del laboratori (SIL).

Altrament, si s'obté com a resultat "no identificat", pot haver-hi dues possibles explicacions. En primer lloc, l'espectre obtingut no és bo i en comparar-lo amb la base de dades no troba similituds. I la segona explicació seria que, malgrat haver obtingut un bon espectre, aquest microorganisme no està present en la base de dades i no el pot identificar. La solució és diferent segons un cas o l'altre. Per aquest motiu és important comprovar primerament (si no s'ha estat present quan es va fer l'adquisició automàtica de l'espectre) la qualitat de l'espectre associat a la mostra problema. Si no presenta un "bon espectre" (el que presenta abundants pics, ben definits, estrets, amb intensitats elevades), s'aconsella repetir l'anàlisi variant la quantitat de mostra depositada en la targeta metàl·lica o fer prèviament l'extracció amb etanol/àcid fòrmic. Si presenta un "bon espectre" i no ha sigut capaç d'identificar el microorganisme, probablement es

tracta d'una variant o espècie no present en la base de dades. Repetir l'anàlisi no millora els resultats. Si es creu convenient, l'usuari pot incorporar una nova entrada a la base de dades.

4.5. INDICACIONS

Les tècniques d'espectrometria de masses MALDI-TOF s'han utilitzat per a identificar un gran nombre d'espècies bacterianes. Són tècniques que identifiquen predominantment les proteïnes ribosòmiques, per tant donen informació general sobre el gènere i l'espècie bacteriana, sense presentar diferències en l'espectre obtingut en diferents condicions de cultiu. En general, els resultats han demostrat ser prou discriminadoris, amb una reproductibilitat excel·lent i fàcils d'interpretar quan s'estudien col·leccions de microorganismes.

En aplicar aquestes tècniques a l'estudi de microorganismes aïllats en la rutina del laboratori de microbiologia, cal tenir en compte que el rendiment de la tècnica variarà en funció del moment i del flux de treball. Integrar en la rutina del laboratori de microbiologia la tècnica d'espectrometria de masses MALDI-TOF per a identificar microorganismes tindria com a objectiu la informació ràpida i fiable de resultats d'identificació, afegir valor clínic als resultats microbiològics i l'optimització de recursos en el cicle diagnòstic.

A l'hora de decidir per a quins microorganismes seria interessant emprar l'espectrometria de masses MALDI-TOF MS, en substitució de mètodes convencionals d'identificació al laboratori, hi ha diverses alternatives. Des d'emprar-la només com a alternativa per als bacteris no identificats per altres sistemes fenotípics que requereixen identificació molecular, fins a creure que podria reemplaçar la tinció de Gram en un futur pròxim hi ha un ampli ventall de possibilitats. Per exemple, utilitzar espectrometria de masses MALDI-TOF per a identificar bacils gramnegatius no fermentadors (per exemple, en fibrosi quística) i microorganismes no inclosos en sistemes automàtics (*Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Campylobacter* spp., etc.), microorganismes anaerobis, micobacteris de creixement ràpid, colònies obtingudes en medis cromogènics amb dificultats per a discriminar-los, microorganismes que no requereixen estudis de sensibilitat o sí que en requereixen però es disposa de sistemes amb panells/targetes d'identificació i sensibilitat separades, etc.

Una altra aplicació molt interessant de l'espectrometria de masses MALDI-TOF és l'anàlisi de mostres clíniques sense cultiu en placa prèviament. Per exemple, flascons positius d'hemocultius i líquids orgànics. Aquest tema l'abordarem en l'últim apartat d'aquest procediment.

4.6. AVANTATGES, INCONVENIENTS I LIMITACIONS

Com a avantatges de la tècnica de MALDI-TOF al laboratori de microbiologia destaca la seua alta taxa d'identificació i la rapidesa, ja que obté resultats fiables en menys d'un minut per mostra i no requereix preselecció; la facilitat, perquè la preparació és simple i uniforme, robusta i fiable en condicions variables i amb un baix cost en reactius. També proporciona avantatges en la gestió del pacient, com l'administració d'antibiòtics més eficaços, la reducció en els temps d'hospitalització i la disminució en despeses sanitàries per pacient.

Com a inconvenients en la metodologia, cal esmentar que és crucial mantenir el buit que l'espectròmetre requereix per a treballar i que pateix demores en el temps d'anàlisi si s'incompleixen els procediments (no deixar assecat completament la mostra, no tancar sempre la tapa, etc.), requereix calibratges i controls de qualitat freqüents, i és imprescindible un període de formació per als usuaris. Respecte als inconvenients relacionats amb els reactius, l'aspecte principal és que la matriu ja ressuspesa no és estable més de 15 dies aproximadament, perquè cristal·litza en el vial.

Actualment, les limitacions més importants de la tècnica **es classifiquen en quatre punts:**

- La relació quantitat de microorganisme per microlitre de matriu influeix molt en l'obtenció d'un bon resultat, per tant és convenient aconseguir estandarditzar l'inòcul. Per a preparar la mostra i efectuar-ne l'anàlisi en els experiments d'espectrometria de masses MALDI-TOF, es requereixen volums de solució de la matriu (fotosensibilitzador) de l'ordre del microlitre, i la relació de concentració entre l'anali i la matriu és de l'ordre de 1.1000 a 1.100000 mol/mol.
- La identificació és independent del fet que els medis de cultiu siguin o no selectius. Però sí que és important l'antiguitat del cultiu. Es recomana un cultiu de no més de 18-24 hores d'incubació, particularment en bacteris que formen espores (*Bacillus* spp.), bacteris que acumulen productes metabòlics (*Arthrobacter* spp.) o bacteris que pateixen autòlisi a mesura que els cultius envelleixen (*Streptococcus* spp.). En el cas particular de microorganismes anaerobis és fonamental mantenir les condicions d'anaerobiosi fins al mateix moment en què s'inocula la targeta metàl·lica. En tot cas, han de ser cultius purs. Amb cultius mixtos (en medi sòlid o líquid) no s'obtenen resultats fiables.
- Pot haver-hi errors en la identificació per espectrometria de masses MALDI-TOF entre els microorganismes pertanyents al grup dels estreptococs *viridans* i pneumococs, i resulta adequat per a enterococs i estreptococs beta-hemolítics. Sembla que no es trobarà fàcilment una solució a aquesta limitació a causa de la mateixa naturalesa d'aquests microorganismes en particular, amb gran similitud entre les diferents espècies. Es recomana confirmar amb una prova alternativa la identificació de *S. pneumoniae*.
- Existeix un ampli nombre de referències en les bases de dades comercials utilitzades per a establir la comparació i identificació dels microorganismes, però continua sent limitat. Per mitjà de col·laboracions entre les companyies comercials i els hospitals de diversos països s'aniran ampliant aquestes bases de dades amb un major nombre de soques que representen més espècies ben caracteritzades. Amb aquest objectiu d'ampliar les bases de dades, caldria un esforç en l'àmbit de la identificació de micobacteris, nocàrdies, patògens oportunistes ambientals, etc.

4.7. CONTROL DE QUALITAT

4.7.1. Validació de plataformes comercials

S'ha demostrat la robustesa del sistema Maldibiotyper i del sistema Saramis. S'obtenen els mateixos resultats per a les mateixes espècies, però cultivades de diferents fonts, mesurades per diferents operadors i en diferents instruments. La identificació és independent del medi i del temps de creixement. Pot haver-hi petits canvis en l'espectre, però la llista de pics és estable i la identificació es basa en senyals estables i específics, per tant no influeixen en la identificació.

Per a validar la fiabilitat i reproductibilitat dels resultats, s'han fet servir diferents procediments i mecanismes de control que assegurin la qualitat de la identificació dels microorganismes amb les plataformes comercials. El resultat de la identificació s'ha comparat amb els resultats obtinguts per altres mètodes, com els fenotípics o de seqüenciació de l'rDNA 16S. Addicionalment, les bases de dades per a la identificació de microorganismes s'avaluen rutinàriament amb comparacions entre laboratoris.

4.7.2. Calibratge i validació rutinària

El calibratge és convenient fer-lo diàriament per confirmar la correcció dels paràmetres de l'equip, que són una condició prèvia per a obtenir espectres de qualitat. Com s'ha indicat més amunt, en la plataforma comercial de Bruker s'utilitza un patró estàndard, el *bacterial test standard* (BTS), que conté una mescla de proteïnes conegudes. El calibratge correcte dels pics se selecciona automàticament. Cal assegurar-se que la desviació màxima no siga superior a 300 ppm.

Com a verificació, la primera vegada que s'usa cada dia una targeta metàl·lica concreta, es recomana fer una mesura del BTS, programat en la sessió com una mostra addicional. En el resultat de la identificació s'ha d'obtenir *E. coli* amb score superior a 2,2. Altrament, cal tornar a calibrar l'equip.

4.7.3. Manteniment

Heus ací algunes consideracions perquè l'espectròmetre de masses funcione correctament:

- Ha d'estar sempre encès, ja que sempre s'hi ha de mantenir el buit.
- La porta o dispositiu que permet la connexió entre el sistema i l'ambient exterior cal manipular-la amb cura. Per a segellar-la bé cal netejar la junta de goma de la tapa cada dia, per exemple passant un dit per la superfície de la junta, amb la precaució de no fer-ho amb guants a la mà.
- Una vegada que s'obri la porta, s'accedeix al dispositiu o calaix portatargetes. Ha d'estar sempre dins de l'equip i amb la tapa tancada. Com més temps estiga obert, més tardarà l'equip a començar la lectura.
- Les targetes metàl·liques es poden reutilitzar si se'n fa una neteja exhaustiva. En canvi, si hi queda algun residu podria originar errors i falses identificacions. Cada casa comercial té un procediment de neteja de la targeta. Sense entrar-hi en detalls, es requereix etanol al 70% i trifluoroacètic al 80%.

4.8. ALTRES APLICACIONS DE L'ESPECTROMETRIA DE MASSES MALDI-TOF

4.8.1. Anàlisi de mostres clíniques

Una aplicació del MALDI-TOF molt interessant és l'anàlisi de mostres clíniques sense cultiu previ. Avui dia el requisit indispensable per a fer aquesta anàlisi és que siguin mostres amb un alt nombre de microorganismes. Per tant, es limita a la detecció de microorganismes en mostres clíniques identificades com a positives per un altre procediment addicional, com hemocultius i orines. També cal un pas previ d'extracció per a eliminar el *background* que podria interferir amb l'espectrometria de masses (per exemple, cèl·lules o proteïnes de la matriu). Per tot això, actualment les possibles mostres a analitzar serien les orines patògenes, els hemocultius positius i els cultius crescuts de líquids orgànics.

Com a limitació destaca que per a mostres polimicrobianes el rendiment és menor. Com a solució, alguns autors proposen fer l'anàlisi de les mostres d'hemocultius en què s'observen diversos bacteris en la tinció de Gram emprant bases de dades específiques per a bacils gramnegatius i per a cocs grampositius. No obstant això, també es necessitaria un algorisme millorat que diferenciara entre mescla de microorganismes, com per exemple el nou programari MALDI Biotyper versió 3.0.

Un repte futur per a l'espectrometria de masses MALDI-TOF és la identificació de microorganismes en mostres directes després de recollir-les sense pas previ de cultiu o incubació. A causa dels baixos nivells de microorganismes presents, caldria desenvolupar mètodes d'enriquiment, com ara una combinació de filtració en membrana, separació magnètica selectiva i concentració. Llavors, es disposaria d'una tècnica ràpida, sensible i selectiva per a detectar microorganismes.

4.8.2. Resistència a antimicrobians i detecció de gens de virulència dels microorganismes

Determinar la resistència als antimicrobians o identificar els microorganismes que expressen gens de virulència podria ser una aplicació futura de l'espectrometria de masses MALDI-TOF. Les companyies estudien aquesta possibilitat a causa de la gran demanda dels usuaris i potser arribarà a ser utilitzada en la rutina del laboratori de microbiologia, fins i tot reemplaçant les proves de determinació de sensibilitat antibiòtica.

En l'àmbit de la investigació ja s'han identificat mitjançant espectrometria de masses MALDI-TOF microorganismes resistents als antimicrobians com *S. aureus* resistent a meticil·lina, *S. aureus* amb heteroresistència a glicopèptids i *E. coli* resistent a ampicil·lina i també gens de virulència com la leucocidina de Panton Valentine (LPV) de *S. aureus*.

En el camp de l'anàlisi proteòmica amb MALDI-TOF de microorganismes, fora de l'àmbit de la identificació, s'han trobat diferències en el subproteoma entre *E. coli* sensible o resistent a piperacil·lina/tazobactam.

4.8.3. Epidemiologia

Recentment s'han publicat diversos articles relatius a la possible diferenciació de microorganismes mitjançant espectrometria de masses MALDI-TOF a nivell d'espècie de *Vibrio*, *Pantoea* o *Staphylococcus*, de subespècie en *Francisella tularensis* i de genomovars del complex *B. cepacia*. Probablement, encara que el poder de discriminació d'altres tècniques emprades en estudis epidemiològics, com l'electroforesi de camp premut (PFGE), no arriba a la resolució aconseguida amb l'espectrometria de masses MALDI-TOF a nivell de subespècie, el perfil peptídic podria ser vàlid per a fer un precibratge rutinari i reduir la necessitat d'utilitzar mètodes addicionals més laboriosos i costosos.

Perquè la tècnica de l'espectrometria de masses MALDI-TOF pugui ser utilitzada en diagnòstic en l'àrea de l'epidemiologia hauria de complir certs requisits, com per exemple:

- Introduir un procediment operatiu estandarditzat.
- Aplicar aproximacions bioinformàtiques apropiades.
- Dissenyar mètodes robustos de preparació, mesura i anàlisi.
- Establir bases de dades d'alta qualitat, tant comercials com pròpies.

4.9. BIBLIOGRAFIA

1. Anhalt JP. "Identification of bacteria using 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, Splettstoesser W. "Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and costeffective 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.