

TEMA 45: *Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación.*

Esquema:

1. Introducción.
2. Técnicas para la identificación bacteriana.
3. Criterios fenotípicos.
 - 3.1. Morfología microscópica.
 - 3.2. Morfología macroscópica.
 - 3.3. Ensayos bioquímicos.
 - 3.3.1. Enzimas vinculadas con la respiración.
 - 3.3.2. Requerimientos de oxígeno.
 - 3.3.3. Producción de ácido y/o gas.
 - 3.3.4. Detección de enzimas y vías metabólicas.
 - 3.3.5. Utilización de una fuente única de carbono.
 - 3.3.6. Utilización de compuestos nitrogenados.
 - 3.3.7. Descomposición de aminoácidos.
 - 3.3.8. Ensayos combinados.
 - 3.3.9. Detección de exoenzimas.
 - 3.3.10. Test de crecimiento o inhibición
 - 3.4. Sistemas multitest y automáticos.
4. Determinación del serotipo bacteriano.
5. Métodos genotípicos.
 - 5.1. Métodos moleculares basados en ácidos nucleicos.
 - 5.1.1. Métodos de hibridación.
 - 5.1.2. Métodos de amplificación génica.
 - 5.1.3. Digestión enzimática de ácidos nucleicos.
 - 5.2. Métodos moleculares no basados en ácidos nucleicos.
 - 5.2.1. Cromatografía.
 - 5.2.2. Electroforesis.
6. Diagnóstico serológico.
 - 6.1. Tipos de anticuerpos estudiados.
 - 6.2. Métodos serológicos
 - 6.2.1. Técnicas de aglutinación.
 - 6.2.2. Enzimoinmunoensayo (EIA).
7. Conclusiones.
8. Bibliografía.

1. INTRODUCCIÓN.

La identificación en Microbiología consiste en la asignación de una bacteria ó microorganismo a un taxón según una clasificación establecida. Permite llegar a determinar la especie, o incluso la cepa de una bacteria aislada previamente en una muestra. Para ello se determinan las características fenotípicas y/o genotípicas del microorganismo y se comparan éstas con las diferentes categorías de la clasificación considerada.

Constituye un procedimiento imprescindible en la investigación a la hora de establecer los taxones a los que pertenece una bacteria recientemente descubierta o que se ha encontrado en un material vivo o inanimado. Es asimismo primordial para la tipificación de las especies patógenas que producen infecciones en el hombre y en los animales. El diagnóstico bacteriológico de las especies de interés clínico permite conocer la etiología de la enfermedad infecciosa e instaurar un tratamiento antibiótico adecuado.

2. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.

En todos los casos es preciso el previo aislamiento del germen en la muestra, para proceder posteriormente a su identificación. Los pasos a seguir para la identificación de una bacteria son:

1. *Conseguir un cultivo puro* (axénico) del microorganismo a partir de la muestra: El mejor método es usar medios sólidos selectivos o diferenciales, ya que cada bacteria que crezca forma una colonia que es una cepa pura.
2. *Observación microscópica de la bacteria aislada.* Para ello se suele recurrir a una tinción de Gram, y así ya se clasifica como Gram positivo ó Gram negativo, a la vez que se determina su forma (cocácea, bacilar, etc.). También es importante determinar la agrupación y la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés.
3. *Aspecto del crecimiento* en los diferentes medios. Se observa la morfología de las colonias, producción de pigmentos, etc.
4. *Realización de diversas pruebas de identificación.* Las más usuales son pruebas bioquímicas para determinar la actividad enzimática y los metabolitos producidos por la bacteria.

Se dividen en:

- *Pruebas primarias.* Determinan la familia o grupo de géneros, y a veces se puede llegar al género. Algunas de ellas son: Observación microscópica y aspecto de colonias (vistas), catalasa, oxidasa, prueba OF (oxidación-fermentación), esporas, anaerobiosis, movilidad, etc.
- *Pruebas secundarias y terciarias.* Se utilizan después de las primarias, para intentar determinar la especie. Incluyen diversas pruebas bioquímicas y enzimáticas (indol, ureasa, coagulasa, etc.).

5. *Determinación del serotipo de la bacteria.* Está indicada para una identificación más rápida, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes.

Sin embargo algunos microorganismos no pueden observarse al microscopio y otros no crecen en los medios de cultivo, por lo que hay que recurrir a otros métodos. Éstos incluyen las técnicas genotípicas (moleculares) y el diagnóstico indirecto ó serológico, llamado así porque se realiza sobre el suero del paciente (no confundir con la determinación del serotipo).

La identificación genotípica consiste en la detección de secuencias específicas de especie en los ácidos nucleicos del microorganismo, ADN o ARN. La presencia de genes específicos se interpreta como identificación definitiva. Constituyen las tendencias más avanzadas en identificación, junto con los últimos avances en diagnóstico serológico y en automatización.

Las pruebas bioquímicas y serológicas de identificación se pueden realizar de modo manual, si bien existen hoy en día pruebas automatizadas que permiten el análisis de un gran número de muestras y permiten establecer en menos tiempo un diagnóstico bacteriológico.

3. CRITERIOS FENOTÍPICOS.

Las técnicas fenotípicas constituyen los tres primeros pasos en la identificación descritos en el apartado anterior y se basan en detectar los caracteres expresados por la bacteria. Además de la observación microscópica y macroscópica de los microorganismos, se realizan las llamadas *pruebas bioquímicas*, que engloban tres tipos de estudios:

- Enzimas del metabolismo bacteriano.
- Requerimientos nutricionales.
- Pruebas de resistencia antibiótica de los microorganismos.

Constituyen las técnicas clásicas de identificación, en contraposición a las modernas técnicas moleculares y serológicas.

3.1. Morfología microscópica.

Casi todas las bacterias son similares en morfología y sólo se pueden establecer algunos grandes grupos (Ej: cocos Gram positivos), por lo que no es un criterio definitivo para el diagnóstico.

Se suele recurrir a la tinción de Gram o al examen en fresco. Algunas bacterias se pueden identificar presuntivamente porque tienen formas muy peculiares. Por ejemplo *Fusobacterium* es un bacilo Gram negativo fusiforme (muy alargado y fino con los extremos puntiagudos). *Campylobacter* y *Helicobacter* son bacilos Gram negativos en forma de ese. *Bacillus* y *Clostridium* son bacilos Gram positivos con forma de caja.

De todas formas, la tinción de Gram presenta diversos inconvenientes. Las características de tinción cambian con la antigüedad del cultivo, e incluso la tinción de la bacteria "in vivo" difiere a veces de la del cultivo. Igualmente, algunas bacterias no presentan una forma constante (pleomorfismo).

3.2. Morfología macroscópica.

Las bacterias crecen en los medios de cultivo sólidos dando colonias que son clones de células provenientes de una bacteria originaria.

El aspecto de las colonias es de gran ayuda en la identificación. Cada bacteria crece diferente, formando colonias de distinto color, forma, tamaño, textura, olor, brillo, etc. Existen colonias más o menos elevadas, con bordes enteros, estrellados, etc. Igualmente, algunas bacterias producen pigmentos que tiñen el medio.

La morfología colonial tampoco es definitiva, pero dirige el diagnóstico hacia un grupo más o menos amplio de microorganismos. Hay colonias muy características, casi exclusivas de determinadas bacterias. Por ejemplo, *Proteus* se extiende ampliamente por la placa formando un velo muy característico, los neumococos crecen en agar sangre dando colonias con dos bordes que le dan aspecto de pequeñas monedas, etc.

3.3. Ensayos bioquímicos.

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas sencillas que ponen de manifiesto una característica bioquímica, como la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o vía metabólica, crecimiento a una temperatura dada, crecimiento en presencia de inhibidores, etc.

La realización de una prueba bioquímica implica:

- 1) Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o inhibidor y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación.
- 2) Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática.

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (18-24 hrs. de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura adecuados. Existe una gran variedad de pruebas bioquímicas. A continuación describiremos las más frecuentes, agrupadas según el tipo de ensayo.

3.3.1. Enzimas vinculadas con la respiración.

- a) *Citocromo oxidasa* (o simplemente, *oxidasa*). Es un enzima de la cadena de transporte de electrones del metabolismo respiratorio de algunas bacterias.

Para detectarla se utiliza un soporte (disco de papel o bastoncillo) que lleva incorporado el sustrato correspondiente (Ej: oxalato de paraaminodimetilanilina). Se impregna dicho soporte con una colonia y se esperan unos minutos. Si el sustrato es degradado, la prueba es positiva y se forma un color violeta característico.

Permite diferenciar los bacilos Gram negativos del grupo de las enterobacterias (oxidasa negativos) del género *Pseudomonas* (también bacilo Gram negativo, pero oxidasa positivo).

- b) *Catalasa*. Descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno molecular; las bacterias lo usan como sistema de defensa frente a peróxidos y superóxidos que son productos tóxicos generados en la

respiración. La detección se basa en añadir una gota de agua oxigenada sobre la colonia problema. Si la reacción es positiva, se produce un burbujeo de oxígeno. También puede depositarse la colonia sobre un porta y añadir el reactivo. Nunca debe realizarse esta prueba en agar sangre, porque los eritrocitos también poseen catalasa y dan resultados falsamente positivos.

La prueba de la catalasa diferencia dos grandes grupos de cocos Gram positivos, estreptococos (catalasa negativos) y estafilococos (catalasa positivos).

3.3.2. Requerimientos de oxígeno.

- a) *Prueba OF (test de Hugh-Leifson)*. Permite evidenciar la acción de las bacterias sobre los carbohidratos. El medio de Hugh-Leifson es una base a la que, tras esterilizar, se añade un azúcar, normalmente glucosa esterilizada por filtración. Por ello, si decimos que una bacteria es oxidante o fermentadora, se entiende con respecto al metabolismo de la glucosa.

Se realiza en dos tubos con medio semisólido que inicialmente son de color verde. Se inoculan por picadura en el centro del tubo y uno de ellos se recubre con parafina líquida estéril (que impide el contacto del medio con el oxígeno atmosférico).

El indicador es azul de bromotimol, que en medio ácido (el metabolismo de los azúcares produce ácidos, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) es de color amarillo. Si el microorganismo es únicamente oxidante (*Pseudomonas*, etc.), después de incubar sólo estará amarillo el medio sin cubrir con parafina, si es oxidante y fermentador (caso de las enterobacterias), en ambos tubos el color virará a amarillo y si sólo puede utilizar el azúcar cuando no hay oxígeno sería fermentador (tubo con parafina amarillo). Si la bacteria no oxida ni fermenta el azúcar añadido, los tubos no viran.

- b) *Crecimiento en tioglicolato*. Determina el efecto del oxígeno sobre el crecimiento microbiano. Se usa un tubo con medio semisólido que contiene tioglicolato para reducir el potencial redox del medio (sólo hay oxígeno en la superficie y no en el resto).

El tubo es inoculado por picadura y se incuba hasta crecimiento. Si el microorganismo es aerobio estricto crecerá en la parte de arriba del

tubo, si es anaerobio estricto no crecerá en la parte más alta del tubo y si es anaerobio facultativo crecerá por todo el medio.

3.3.3. Producción de ácido y/o gas.

Las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H_2 o CO_2). Estos pueden detectarse sembrando en tubos de caldo que lleven incorporados un indicador de pH y una *campana Durham*, que es un pequeño tubo abierto en uno de sus extremos. Si hay producción de ácido el indicador vira, y si se produce gas, éste se deposita en la campana formando burbujas.

3.3.4. Detección de enzimas y vías metabólicas.

a) *Rojo de metilo y Voges Proskauer*. Ambos utilizan el medio líquido de Clark y Lubs, y forman parte del test IMVIC para enterobacterias, junto con el indol y el citrato.

La prueba del rojo de metilo es positiva para las bacterias que fermentan la glucosa a ácido láctico, acético, ó fórmico. En este caso el indicador añadido al medio vira a color rojo ($pH < 4,3$). Si es negativa, el viraje es amarillo.

El Voges-Proskauer (VP) es una prueba para poner de manifiesto la fermentación butilenglicólica, mediante la cual algunas bacterias metabolizan el ácido pirúvico (procedente de la degradación de glucosa) a acetoína (acetilmetilcarbinol). Al añadir el reactivo VP (alfanaftol y creatina en medio alcalino) al medio de cultivo, la acetoína formada previamente se convierte en diacetilo, de color rojo característico.

b) *O.N.P.G.* Permite ver si las bacterias fermentan la lactosa. En tal caso el ONPG (ortonitrofenil- galactósido) incoloro, se desdobra en galactosa y nitrofenol (amarillo).

Según esto, las bacterias se dividen en fermentadoras ó no. Las fermentadoras tienen los enzimas permeasa (que permite la entrada de lactosa en la bacteria) y β -galactosidasa (que desdobra la lactosa en glucosa y galactosa). Las no fermentadoras carecen de ellos. También hay fermentadoras lentas (carecen de permeasa).

c) *Hidrólisis del hipurato*. La hipuricasa que poseen algunas bacterias hidroliza el hipurato de sodio, lo que produce glicina y ácido benzoico.

Una suspensión de bacterias se añade a una solución de hipurato y se incuba 2 horas, añadiendo entonces el reactivo (ninhidrina). La aparición de una coloración azul-violeta indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato.

Se usa para diferenciar especies de *Campylobacter* y de *Streptococcus*.

3.3.5. Utilización de una fuente única de carbono.

La prueba más conocida es la del *citrato*. Es uno de los test del IMVIC usado para diferenciar especies de enterobacterias capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons, que es un agar inclinado en tubo con citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente, y azul de bromotimol como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán crecer y liberarán iones amonio, lo cual añadido a la eliminación del citrato (ácido) alcaliniza el medio y origina el viraje del indicador, de verde a azul.

Como ejemplo de enterobacterias citrato positivas podemos citar *Klebsiella*, de citrato negativas *Escherichia coli*.

3.3.6. Utilización de compuestos nitrogenados.

Se estudia la *reducción de nitratos*. Hay dos pruebas:

- *Reducción de nitrato a nitrito*. Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de electrones en la respiración, con reducción final a nitritos. Las bacterias se inoculan en medios con nitrato potásico y el nitrito formado puede detectarse añadiendo alfa-naftilamina y ácido sulfanílico, produciéndose un color rosa-rojo. Las enterobacterias y *Pseudomonas* son usualmente positivos.
- *Reducción total de nitrato hasta nitrógeno gaseoso* (desnitrificación). Si al añadir zinc en polvo al medio anterior no aparece color rojo es que no queda nitrato porque se ha reducido a gas (desnitrificación).

3.3.7. Descomposición de aminoácidos.

a) *Prueba del indol*. Es un test de la batería IMVIC para enterobacterias, que detecta la producción de indol a partir de triptófano. Utiliza el

reactivo de *Ehrlich* o *Kovacs* (a base de paradimetilaminobenzaldehído), que se añade al medio líquido y da un anillo de color rojo con el indol. Es típica de *E. coli*.

- b) *Producción de ácido sulfhídrico* (SH_2) a partir de aminoácidos azufrados. Se usan medios en tubo con sales de hierro o plomo, que con SH_2 forman sulfuros de estos metales, lo cual se evidencia como un precipitado negro en el lugar de crecimiento. Se usa el agar acetato de plomo, y también en medios combinados como el TSI ó Kligler (se detallan más adelante).
- c) *Fenilalanina desaminasa*. Algunas bacterias desaminan la fenilalanina a ácido fenilpirúvico, que con FeCl_3 en solución ácida produce un color verdoso.
- d) *Descarboxilación de aminoácidos*. Diversas especies de enterobacterias tienen descarboxilasas, que transforman los aminoácidos en aminas, las cuales en condiciones anaerobias alcalinizan el medio.

Las bacterias se inoculan en medios que contienen lisina, ornitina o arginina y un indicador de pH (púrpura de bromocresol, que vira a violeta en medio alcalino).

- e) *Urea*. Muchas bacterias poseen ureasa, que desdobra la urea en amoníaco, agua y anhídrido carbónico. De esta manera se protegen de sus efectos tóxicos.

Las bacterias se inoculan en agar urea que es un medio inclinado con urea y rojo de fenol como indicador. La formación de amoníaco alcaliniza el medio y el indicador vira de amarillo a un rosa intenso. Se usa en la identificación de algunas especies como *Proteus*, *Helicobacter pylori* y para la caracterización rápida de *Brucella* (vira en poco más de una hora).

3.3.8. Ensayos combinados.

- a) *TSI (Triple Azúcar Hierro) y Kligler*. Se usan para diferenciar especies de enterobacterias. Determinan la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico, y también permite estudiar la producción de gases y de SH_2 .

El medio de Kligler es inclinado e incorpora lactosa al 1% y glucosa al 0,1% y un indicador (rojo de fenol). El TSI es similar, pero también lleva

sacarosa. Son de tonalidad rosada o salmón y se siembra a la vez en superficie y en profundidad (por picadura). Tras incubación se pueden obtener cinco respuestas:

1. Fermentación de la glucosa: Viraje al amarillo del fondo.
2. Fermentación de la lactosa: Viraje al amarillo de la superficie.
3. Fermentación de ambas: Viraje al amarillo de todo el tubo.
4. Producción del SH₂: Precipitado negro de sulfuro ferroso
5. Formación de gas en la fermentación de la glucosa (Burbujas o despegamiento del agar)

Si la bacteria fermenta la glucosa, como este azúcar se encuentra en pequeña cantidad, los ácidos formados en superficie (en presencia de oxígeno) son rápidamente neutralizados por las aminas volátiles producidas por la descarboxilación de los aminoácidos, no modificando el pH de la superficie ni su color. Sin embargo, en profundidad los ácidos formados en la fermentación anaerobia de la glucosa hacen variar el pH del fondo, cuyo color vira al amarillo. Si se produce, además, la fermentación rápida de la lactosa, que se encuentra en mayor cantidad, los ácidos modifican el pH de la superficie del medio, que vira a amarillo.

b) *Bilis esculina*. Los tubos de bilis esculina cambian de color pardo a negro cuando se inoculan con especies del género *Enterococcus*. Esto es porque los enterococos pueden crecer en presencia de bilis y además son capaces de hidrolizar la esculina a esculetina, que con sales de hierro da un compuesto negro.

3.3.9. Detección de exoenzimas

a) *Lecitinasas*. Actúa sobre la lecitina. Se utiliza el agar yema de huevo, que se inocula e incuba en anaerobiosis. Las colonias productoras de lecitinasas (Ej. *Clostridium*, estafilococos) forman una zona opaca a su alrededor.

b) *Prueba de la coagulasa*. Es la prueba principal para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivos) del resto de estafilococos (coagulasa negativos). La coagulasa es un enzima que coagula el plasma sanguíneo, por desnaturalización de la fibrina; se considera un factor de virulencia porque induce la agregación del plasma alrededor de la bacteria, dificultando así la fagocitosis y la acción del complemento.

Se añade una suspensión de bacterias a un tubo pequeño con plasma y se incuba a 37° C. Se observa la coagulación entre las 4 y 24 h.

- c) *Fosfatasa*. Se usa el agar PP (fosfato de fenolftaleína). Si la bacteria tiene fosfatasa, el enlace fosfato se hidroliza y se libera fenolftaleína (indicador de pH), que en contacto con vapores de amoníaco, tiñe la placa de rosa.
- d) *Desoxirribonucleasas (DNA-asas)*. Algunas bacterias segregan nucleasas que hidrolizan el DNA. Para realizar la prueba, se hace una estría gruesa en una placa de medio que contenga DNA. Se revela después de incubar con HCl 0,1 N que precipita el DNA no hidrolizado. Es positiva cuando aparece un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, que indica que se ha degradado el DNA en esa zona.
- e) *Hemolisinas*. Producen hemólisis (destrucción de los hematíes), lo cual se observa en agar sangre, que es un medio de cultivo muy utilizado en clínica. Se distinguen tres tipos de hemólisis:
- Hemólisis completa o β -hemólisis. Las bacterias lisan completamente los hematíes formando halos claros alrededor de las colonias (Ej: *Streptococcus pyogenes*).
 - Hemólisis parcial ó α -hemólisis. Los glóbulos rojos sólo se destruyen parcialmente. Se forman halos traslúcidos verdosos, caso de los estreptococos tipo *viridans*.
 - No hemólisis (hemólisis gamma). Las bacterias no lisan los eritrocitos.

3.3.10. Test de crecimiento o inhibición.

- a) *Temperatura*. Se ve la temperatura a la que puede crecer el microorganismo, si es termófila, etc.
- b) *Crecimiento en medio salinos*. Los estafilococos pueden crecer en agar *Chapman* (con manitol y ClNa al 7,5%). También algunos vibrios halófilos crecen en medios muy salinos.
- c) *Pruebas de resistencia antibiótica*.
Se ve la resistencia y sensibilidad de la bacteria frente a diversos antimicrobianos. Pueden usarse discos de papel impregnados con los antibióticos, colocados sobre una placa previamente inoculada con la cepa problema. Si se produce halo de inhibición del crecimiento la bacteria es sensible al antibiótico.

Test específicos.

El *test de la optoquina* se usa en la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, que es el único estreptococo sensible a esta sustancia. Para realizar la prueba se siembra la cepa problema sobre una placa de agar sangre, sobre la que se coloca un disco impregnado de optoquina. Si tras la incubación se produce un halo de inhibición es muy probable que se trate de *S.pneumoniae*. No obstante puede confirmarse la identificación con la solubilidad en bilis, ya que. *S. pneumoniae* es el único estreptococo que se lisa en ésta.

El test de bacitracina es similar, pero está indicado para *Streptococcus pyogenes*.

3.4. Sistemas multitest y automáticos.

A la determinación de la especie se puede llegar mediante las pruebas manuales que hemos visto, pero a veces pueden ser largos y complejos, ya que algunas bacterias requieren muchas pruebas para su identificación. Así, una enterobacteria necesita unos 15 ensayos distintos para poder determinar su especie.

Por ello, existen baterías comerciales de pruebas agrupadas para cada tipo de microorganismo. Estos sistemas tienen varias ventajas:

- Proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano.
- Simplifican la interpretación de resultados utilizando valores numéricos.
- Proveen los reactivos listos para su uso.
- Algunas son totalmente automatizables.

Antes de aplicar estos sistemas ha de establecer el tipo de microorganismo mediante el Gram y las características de aislamiento, para así aplicar la batería adecuada.

Las baterías automatizadas de identificación suelen consistir en unas placas o tarjetas que contienen una serie de cúpulas independientes cada una con los reactivos necesarios para una o más pruebas bioquímicas. Las cúpulas contienen sustratos deshidratados o pequeños medio listos para sembrar.

En todas las cúpulas se deposita una suspensión de la bacteria problema (así se reconstituyen también los medios deshidratados) y tras 24 de incubación se interpretan los resultados mediante los esquemas de identificación, normalmente de tipo numérico. Los sistemas más

avanzados están asociados a programas informáticos y aparatos robotizados que por si solos identifican el aislamiento.

Los sistemas comerciales más comúnmente usados son:

- ENTEROTUBE II® (Becton Dickinson). Es un sistema para la identificación de enterobacterias. Consiste en un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente en una etapa y permiten la detección de 15 características bioquímicas.
- API 20 E® (Biomérieux). Es un sistema estandarizado para la identificación de Bacterias Gram negativas. Consiste en una plantilla con medios de cultivo deshidratados a los que se agrega una suspensión bacteriana. Permite la realización de 23 pruebas bioquímicas a partir de una única colonia bacteriana. También existe un API 10®, con menos pruebas, y plantillas específicas para estafilococos, *Neisseria* y *Hemophyllus*, *Listeria* y levaduras (*Candida*).
- La casa Pasteur dispone también de sistemas similares a los anteriores, así como para levaduras de importancia clínica (*Fungiscreen 4H*)®).
- Bactest®. Es un sistema totalmente automatizado. Un dispensador robotizado siembra la suspensión problema sobre unas placas con los medios deshidratados. Tras incubación, la placa se introduce en un sistema analizador que lee los resultados obtenidos y realiza la identificación mediante un programa informático acoplado.

4. DETERMINACIÓN DEL SEROTIPO BACTERIANO.

Se recurre al uso de antisueros comerciales específicos en reacciones de aglutinación o precipitación sobre la colonia aislada.

Los antígenos bacterianos pueden ser capsulares (antígenos K), somáticos (O), que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram negativos, y flagelares (H). Los antisueros se identifican con esas letras y el número o letra del antígeno correspondiente.

En una primera identificación se usan sueros polivalentes (mezcla de antisueros para una misma bacteria) y posteriormente, sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno. Existen antisueros para tipificación de: *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, *Haemophilus*, etc.

5. MÉTODOS GENOTÍPICOS.

Los métodos genotípicos de identificación se basan en el estudio del material genético de los microorganismos, no en sus características externas. Son más complicados y costosos que los fenotípicos y tienen el inconveniente (a diferencia de las técnicas fenotípicas clásicas) de que no es posible recuperar la cepa usada. No obstante tienen muchas ventajas:

- Ofrecen una capacidad de discriminación mucho mayor y son de utilidad en la precisión del diagnóstico cuando la visualización y el cultivo no son suficientemente resolutivos.
- Permiten un diagnóstico preciso cuando el patógeno no crece en el cultivo o se encuentra en bajas concentraciones.
- Son mucho más rápidas porque no necesitan que crezca el patógeno.
- Además de la identificación, se pueden usar en Taxonomía, ya que permiten establecer relaciones filogenéticas.

5.1. Métodos moleculares basados en ácidos nucleicos

La secuencia de nucleótidos del DNA o RNA es una característica propia y específica de cada especie, por lo que se considera como una huella dactilar. Las técnicas moleculares basadas en los ácidos nucleicos son de tres tipos:

- Métodos de hibridación de ácidos nucleicos.
- Técnicas de amplificación génica.
- Métodos de digestión enzimática.

5.1.1. Métodos de hibridación.

Se basan en la homología de los ácidos nucleicos. Cada cadena de ácido puede unirse específicamente a su homóloga debido a la complementariedad de sus bases (adenina con timina y guanina con citosina).

Para ello hay que disponer de una sonda, que es una secuencia de DNA homóloga a otra secuencia específica de la bacteria a detectar. La sonda se marca previamente para su posterior detección uniéndola a una molécula fluorescente, radioactiva o enzimática.

Primero se desnaturaliza el DNA problema (diana) para separar sus dos hebras y se fija a un soporte sólido de nitrocelulosa, aplicando luego la sonda marcada. Si la muestra contiene la bacteria en cuestión, la sonda

se unirá a su diana. Tras eliminar la sonda no unida mediante lavado, se revela la presencia de marca a través de fluorescencia, radioactividad o actividad enzimática.

5.1.2. Métodos de amplificación génica.

Solucionan el problema de la baja sensibilidad de los métodos de hibridación. Éstos necesitan una cantidad grande de DNA diana para la detección. La principal técnica de amplificación es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que consigue generar millones de copias de la secuencia de DNA deseada.

Usa pequeños fragmentos de DNA (*primers*) homólogos a regiones adyacentes a la secuencia a amplificar. Los primers sirven de punto de inicio para la enzima Taq polimerasa que copia la secuencia de interés. A través de la repetición de ciclos de tres fases (unión de primers, polimerización y separación de cadenas hijas), se dobla la cantidad de ADN en cada ciclo.

Para fabricar los primers necesitamos conocer las secuencias adyacentes de los genes específicos de algunas especies.

En muchos casos se aplica la PCR como diagnóstico. Para ello, se aplica la muestra en el tubo de reacción y se observa si hay amplificación. Si es así, la bacteria problema se encuentra en la muestra. La detección del DNA amplificado se realiza mediante electroforesis con bromuro de etidio en gel de agarosa.

5.1.3. Digestión enzimática de ácidos nucleicos.

Se basan en la utilización de *endonucleasas de restricción* como reactivo. Éstas son enzimas que se encuentran de modo natural en diversas bacterias, que las usan como defensa frente a DNA extraño. Son capaces de detectar secuencias específicas en el DNA y provocar un corte de ambas cadenas en ese punto.

El DNA problema es expuesto a uno de estos enzimas, con lo que se producen cortes en lugares específicos. Los fragmentos se separan por electroforesis y se obtiene un patrón de restricción, que es una colección de bandas dispuestas de manera concreta para cada bacteria y para cada enzima. El patrón se puede comparar con estándares de especies conocidas para llegar así a la identificación.

5.2. Métodos moleculares no basados en ácidos nucleicos.

No son, aunque usan técnicas que se aplican en Biología Molecular. De todas formas, tienen menor poder de discriminación. Los principales son la cromatografía y la electroforesis.

5.2.1. Cromatografía.

Separa moléculas según el tamaño de las moléculas, carga iónica o solubilidad en determinados disolventes. Puede utilizarse para separar proteínas, ácidos grasos de membrana, ácidos micólicos de la pared de las micobacterias y otros.

Es de aplicación limitada en Microbiología y sólo se emplea para microorganismos difíciles de estudiar por otras técnicas. Por ejemplo, los anaerobios se pueden identificar por cromatografía de gases, viendo los perfiles de sus ácidos grasos de membrana.

5.2.2. Electroforesis.

Se utiliza para el análisis de proteínas bacterianas. La electroforesis estudia la migración de partículas cargadas sobre un soporte sobre el que se aplica un campo eléctrico. Cada proteína tiene una carga iónica distinta y por tanto migra de diferente manera.

La comparación de los perfiles de cada cepa con patrones estándar puede identificarlas. Pueden estudiarse el total de proteínas bacterianas o bien por separado proteínas de membrana, citosólicas, enzimas, etc. Tienen muchas limitaciones en el campo de la identificación por su complejidad para realizarla, dificultad de interpretación y la alta variabilidad de resultados dependiendo de las condiciones ambientales.

6. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

Se denomina también diagnóstico indirecto. Se basa en la detección en el suero sanguíneo del paciente de los anticuerpos (inmunoglobulinas) específicos para antígenos de un determinado microorganismo patógeno, lo cual permite identificar éste.

La principal ventaja es la posibilidad de detectar y caracterizar infecciones en las que el diagnóstico directo fenotípico o genotípico no es posible. Los test serológicos sirven además para determinar el grado de inmunidad, es decir si se poseen suficientes anticuerpos específicos para hacer frente a futuras infecciones (permiten comprobar por tanto la

eficacia de la vacunación, y si es necesario una nueva dosis de revacunación).

El principal inconveniente es la imposibilidad de diagnóstico si el paciente no desarrolla respuesta inmune, así como la imposibilidad en ocasiones de diferenciar infección activa de mero contacto o colonización sin trascendencia clínica. Por eso los resultados serológicos han de interpretarse con cuidado y complementarlos con otros métodos de diagnóstico.

6.1. Tipos de anticuerpos estudiados.

La serología investiga dos tipos fundamentales de inmunoglobulinas, IgM e IgG. Los anticuerpos IgM son los que primero se forman como respuesta a la entrada del germen, siendo posteriormente sustituidos por anticuerpos IgG, de mayor duración y con capacidad de memoria inmunológica.

Por ello, la detección de niveles altos de IgM específica para un germen indica contacto reciente con el mismo, mientras que títulos altos de IgG reflejan contacto más alejado en el tiempo. Las infecciones activas presentan niveles altos de IgM.

La detección de IgM tiene igualmente importancia en enfermedades con manifestaciones clínicas inespecíficas, muy difíciles de diagnosticar si no es con la serología. También es importante su determinación en recién nacidos. Hasta los tres meses de vida los niños poseen anticuerpos IgG procedentes de la madre sin que por ello hayan estado en contacto con el agente infeccioso en cuestión. La IgM no puede atravesar la placenta y, por tanto, siempre tiene origen en el niño.

6.2. Métodos serológicos.

Hay diversos métodos, por lo que la sensibilidad y especificidad varían según éstos y la bacteria a estudiar. Vamos a ver las técnicas principales

6.2.1. Técnicas de aglutinación.

La aglutinación se produce cuando los anticuerpos del suero problema detectan a sus antígenos específicos. Se forman entonces inmunocomplejos que producen la agregación de las células o partículas que lleven incorporado el antígeno, de modo que se producen

precipitados macroscópicamente visibles. Los anticuerpos que producen este fenómeno se denominan *aglutininas*.

Son técnicas muy sensibles, pero han de realizarse de modo manual, ya que son de difícil automatización. Los resultados obtenidos dependen de la cantidad y avidéz de los anticuerpos, tiempo de incubación y condiciones fisicoquímicas del ensayo. Por ello las pruebas han de incluir controles positivos y negativos que aseguren la fiabilidad de los resultados.

a) Aglutinación con bacterias completas.

Es una técnica sencilla que se realiza en portaobjetos, enfrentando el suero problema a suspensiones de bacterias conocidas. Si la prueba es positiva, las bacterias aglutinan.

Permite la determinación rápida de anticuerpos frente a bacterias de difícil cultivo, tales como *Brucella* y espiroquetas (*Treponema* y *Leptospira*).

b) Aglutinación de partículas.

Se usan partículas inertes de látex unidas a los antígenos específicos a buscar, que se enfrentan al suero problema. Si la prueba es positiva, las partículas se agregan y precipitan. También permite detectar antígenos si lo que va unido a las partículas de látex son los anticuerpos (que entonces no serían el problema, sino el reactivo).

c) Hemaglutinación.

Utiliza hematíes unidos a los antígenos. Si existen anticuerpos específicos, los eritrocitos floculan formando grumos detectables a simple vista. Es uno de los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos frente a *Treponema pallidum*.

6.2.2. Enzimoimmunoensayo (EIA).

Es la técnica inmunoanalítica más utilizada por su alta sensibilidad y por su fácil automatización. También se denomina ELISA (*Enzymum like Immuno Assay*), aunque este término está más desfasado.

Se caracteriza por usar un marcador enzimático, que cataliza una reacción que rinde un compuesto coloreado. Si el marcador es fluorescente, la técnica se denomina fluoroinmunoanálisis (FIA).

Hay numerosas variantes de esta técnica, pero vamos a ver la más usada para determinar anticuerpos:

1. Se usan antígenos adsorbidos en una matriz sólida (una microplaca de pocillos, un tubo, etc) que reaccionan con los anticuerpos problema del suero al incubar.
2. Se lava posteriormente con un sistema lavador-aspirador (o manualmente) con lo que se elimina lo no unido, y queda la fase sólida con el inmunocomplejo.
3. Se añade el *reactivo conjugado*, que es una antiinmunoglobulina unida a un enzima. La antiinmunoglobulina se unirá al anticuerpo del inmunocomplejo y se forma de esta manera un complejo tipo *sándwich* con una cierta cantidad de enzima.
4. Tras un nuevo lavado, se añade el sustrato del enzima, formándose un compuesto coloreado cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de anticuerpo problema, lo cual permite cuantificar éste o declarar la prueba positiva a partir de una determinada concentración.

Tiene el inconveniente de requerir instrumental avanzado y más costoso. Se han comercializado técnicas EIA para casi todos los microorganismos en los que es factible el diagnóstico serológico. Se utilizan por ejemplo en la detección de anticuerpos frente a los virus de la hepatitis, SIDA, rubéola, bacterias, etc.

Los resultados positivos deben ser confirmados por otro sistema más específico como el *Western-Blot*. Consiste en someter a electroforesis en gel las proteínas purificadas del microorganismo y se obtienen unas tiras que sirven como antígeno en fase sólida para la realización de un nuevo EIA.

7. CONCLUSIONES.

Este tema desarrolla los procedimientos de identificación de microorganismos, aplicados fundamentalmente a la Bacteriología. Se han estudiado con mayor detalle las clásicas técnicas fenotípicas, sin olvidar las últimas tendencias en identificación que apuntan hacia las técnicas moleculares y la automatización de métodos fenotípicos y serológicos.

Para ampliar conocimientos se puede estudiar con más detalle las características específicas de algunas técnicas moleculares, así como los fundamentos de la cromatografía y la electroforesis, el EIA y otras técnicas inmunoanalíticas avanzadas (FIA, etc.).

Igualmente el opositor puede ilustrar su exposición con ejemplos de esquemas de diagnóstico diferencial, agrupando las pruebas que permiten la identificación de un grupo bacteriano determinado. En tal caso, debe circunscribirse a los microorganismos de diagnóstico más sencillo y que necesitan pocas pruebas (estreptococos, estafilococos, etc.).

8. BIBLIOGRAFÍA.

Libros:

- Davis D.B. Dulbecco, N.H. y Ginsberg, H.S. 1997. Tratado de Microbiología 4ª ed. Editorial Masson.
- Prescott, L.M., Harley J.P. y Lein D.A. 2002. Microbiología 5ª ed. Mcgraw-Hill Interamericana.
- Henry, J.B. (1993). Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed. Ed. Salvat.

Internet:

- <http://edicion-micro.usal.es/web/identificacion/AyudaPruebas.html>
- <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioPruebasBioquimicas.htm>
- <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/>
- <http://www.danival.org>