

10-09-20

## Ensayo/ Métodos para el control bacteriano

---



## RESUMEN

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

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

Los métodos moleculares permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal. Este hecho se debe a un coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia.

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

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

## Introducción

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

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

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

## Métodos fenotípicos

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles<sup>1</sup>.

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

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

Dentro de esta batería de pruebas bioquímicas se destacarían las:

### Características microscópicas

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

### Pruebas bioquímicas, diferenciando<sup>1,2</sup>

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

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

#### Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas

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

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

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, no tenemos más que buscar el código numérico y comprobar a qué bacteria pertenece. Estos son algunos de los sistemas disponibles en el mercado:

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

#### Sistemas comerciales automatizados

Hay en el mercado galerías multipuebas, como las descritas en el apartado anterior pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática,

incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un índice alto de fiabilidad la identificación del microorganismo.

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

### Métodos moleculares

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

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa<sup>3</sup>. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan a continuación del ARNr 16S.

### El ARNr 16S (rrs)

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

## 16S-23S ARNr

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

## ARNr 23S

Puede ser una buena alternativa en los casos en los que la fracción 16s no proporciona resultados concluyentes<sup>5</sup>. Un aumento en el coste y alguna dificultad técnica en la amplificación de fragmentos más grandes pueden limitar su uso, aunque ser utilizado en la actualidad como un método auxiliar útil con fines taxonómicos y filogenéticos.

## RpoB (subunidad $\beta$ de la ARN polimerasa)<sup>6</sup>

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos. Con una distribución universal en bacterias, sugirió su aplicación como un cronómetro molecular de alta potencia. El uso de este marcador ofrece algunas ventajas respecto a los marcadores moleculares precedentes, entre ellas, las secuencias del rpoB presentan en numerosas ocasiones mayor calidad que las del ARNr 16S, al ser secuencias de reciente obtención; también otro factor importante y favorable, es que existe mayor correlación en la similitud de la secuencia del rpoB con el criterio de inclusión en la misma especie de la hibridación ADN-ADN (DDH < 70%). Criterio que no fácilmente se cumple para valores de similitudes del ARN 16S superiores al 99%; y por último, otra circunstancia favorable del análisis del rpoB es su aplicación como instrumento de genotipificación y de filogenia. Consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se producen son silentes (tercera posición del codón), y que por su función housekeeping probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética.

## GyrB (subunidad $\beta$ de la ADN girasa)

Es el gen codificante de la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del ADN bacteriano. De distribución universal, la presencia en monocopia de gyrB permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas<sup>7</sup>. Es un marcador de gran utilidad en la sistemática

bacteriana al presentar una tasa de sustituciones sinónimas o silentes que se estima en al menos cuatro veces mayor que la del ARNr 16S.

#### Análisis de secuencias y criterios para la interpretación de resultados

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del 16S ARNr u otros genes mencionados arriba, se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero sí serán factores críticos la extracción del ADN cromosómico y la amplificación, procesos técnicos que deberán tenerse en cuenta en toda metodología de identificación molecular en el laboratorio de microbiología. Tras la secuenciación del amplicón, la observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias.

Algunas veces se suceden errores entre el electroferograma y la secuencia (por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas, N). Para resolver estas situaciones se reedita visualmente el electroferograma y se corrige, y/o se alinean y ensamblan las secuencias directa y reversa en una secuencia consenso. Solamente aquellas secuencias que presentan < 1% de indeterminaciones (~15 posiciones, N, purinas R, pirimidinas Y) son consideradas en el análisis.