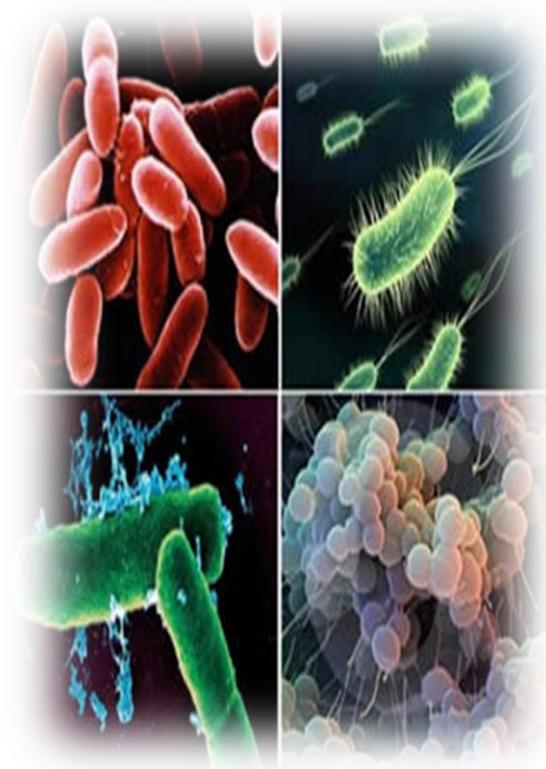




# Tema Métodos de identificación



Dra. Ana Carolina González Romero.  
Magister Scientiae en Microbiología Clínica.  
Ph.D Ciencias Médicas Fundamentales.

Noviembre 2020

# Identificación bacteriana

- Labor principal laboratorio de microbiología:
  - Identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones.
  - Conocer las implicaciones patológicas y la evolución clínica.
  - Aplicar una terapia antimicrobiana eficaz
  - Asignar una especie al aislamiento microbiano.



APLICACIÓN DE TÉCNICAS FENOTÍPICAS

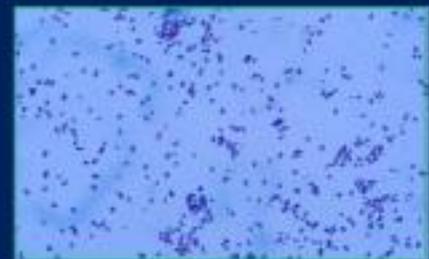
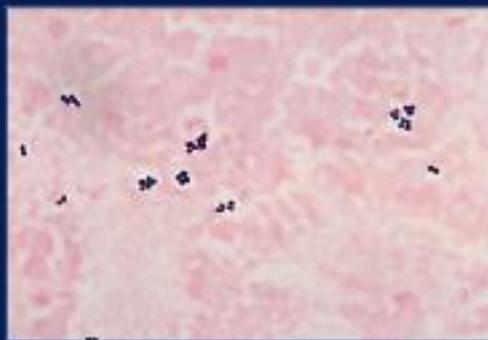
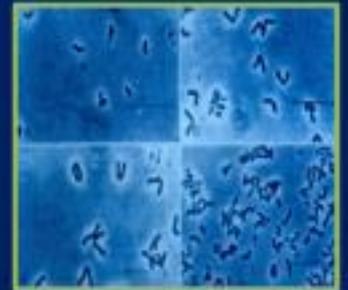


# Métodos para la identificación bacteriana



# Identificación fenotípica convencional

## Características microscópicas: Coloraciones



# Identificación fenotípica convencional

## Características culturales

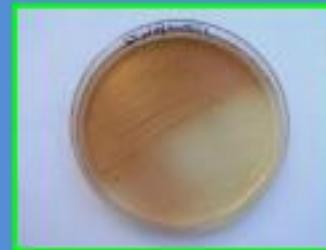
### Tamaño de colonia



### Hemólisis



### Pigmento



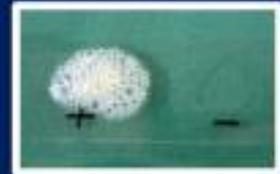
### Forma, Aspecto, Borde, Superficie



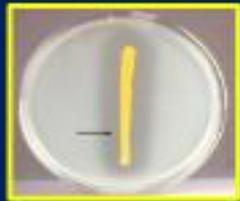
# Identificación fenotípica convencional

Pruebas de identificación preliminar: (lectura inmediata): catalasa, oxidasa

Pruebas rápidas (< 6h): hipurato, PYR, LAP, glicosidasas, ureasa, indol, FAL, tributirina, tripsina, coagulasa



Pruebas lentas (24-h a 4-5 días): TSI (F/O), reducción de  $\text{NO}_3$ , utilización de azúcares, Esculina, DNAsa, gelatinasa, CAMP, almidón, RM, VP, decarboxilasas, citrato, otras

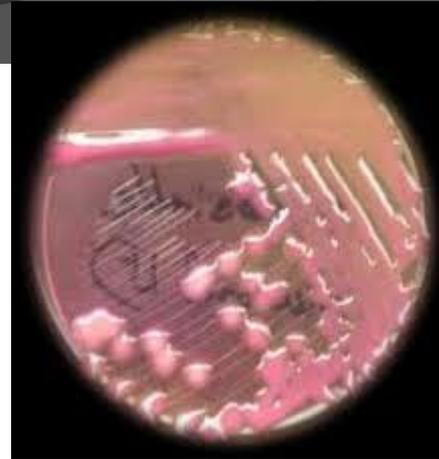
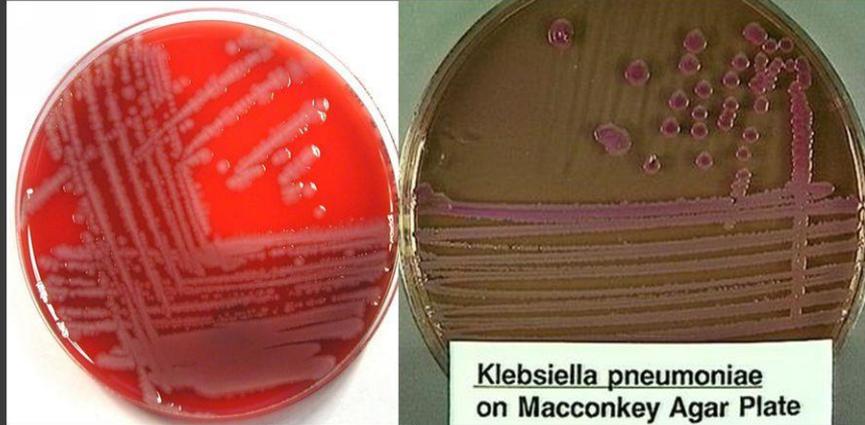


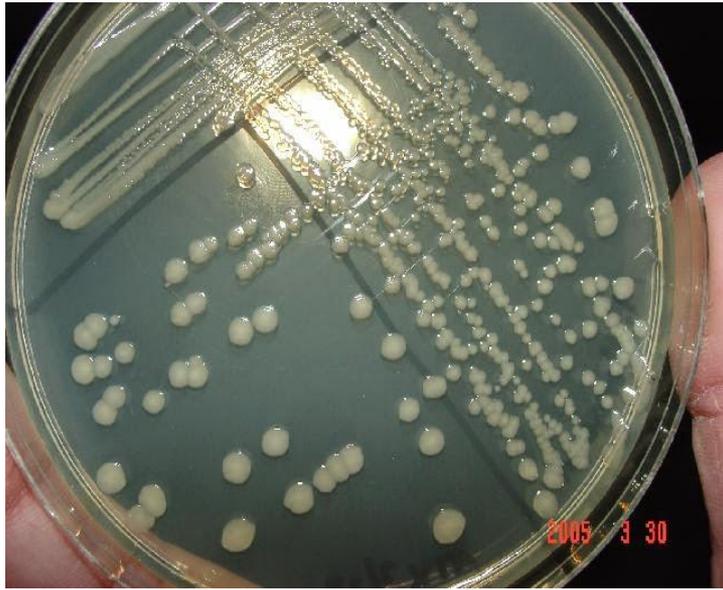
Pruebas basadas en caracteres de resistencia:  $\text{O}_{129}$ , Vancomicina, SPS, fosfomicina, desferrioxamina, colistina, bacitracina, optoquina

ID: 24 horas a 5-7 días

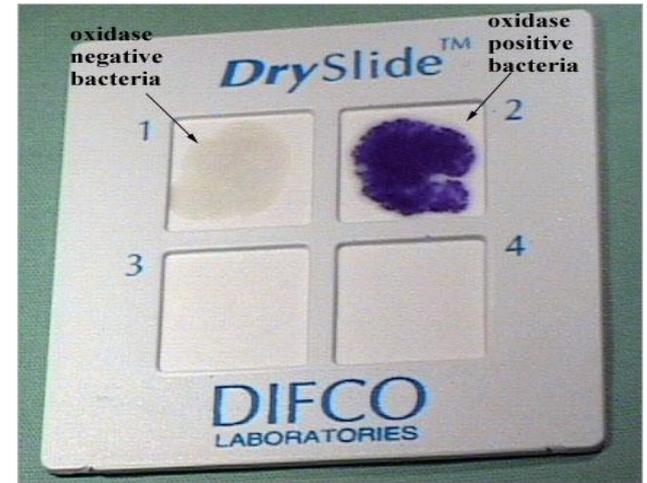


# *Klebsiella pneumoniae*





Prueba clave



## Pruebas bioquímicas

A/A +-



**KleibSELLA pneumoniae**

## Identificación de bacilos gramnegativos no exigentes (BGNNE)

Microorganismo	C. en MK	Oxi.	Lact	Gluc	Gas	H <sub>2</sub> S	Deam. Lis.	Deca. Lis.	Mot.	Ind.	Orn	Cit.	Urea	42 °C	O/F Gluc	O/F Xil	O/F Mal
<b>Enterobacterias</b>																	
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+				
<i>Enterobacter arogenes</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-				
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+				
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	+	+/-	+	+	-	+	+	-	-	+				
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-/+	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+	+				
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-				
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-				
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-				
<b>BGNNF</b>																	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	-	-	-			+	-				+	+/-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-	-	-			+	-				-	+/-	+	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	-	-	-	-			-			+		+	+/-	+	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	-	-	-	-	-			-			+		-	+/-	-	

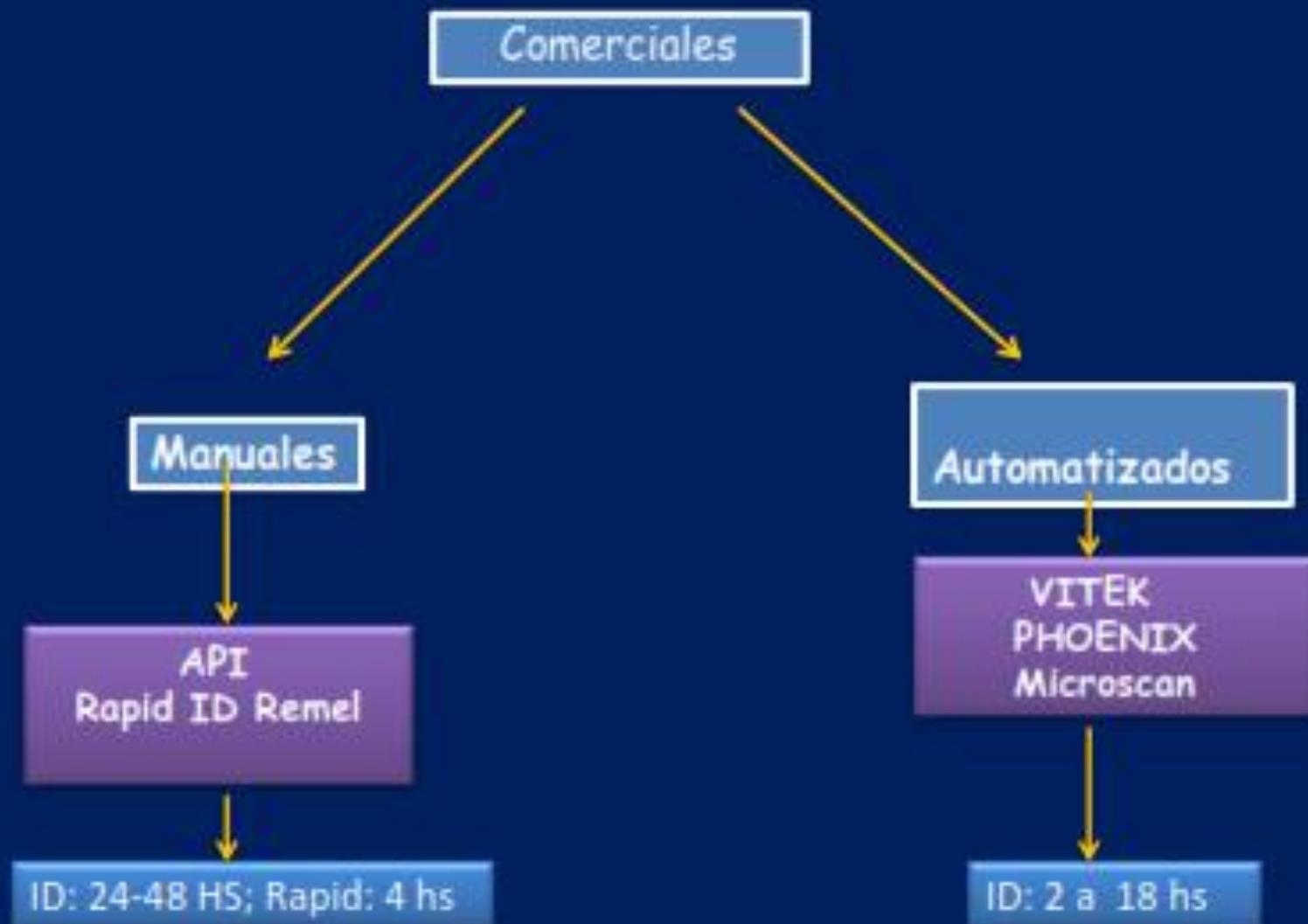
Fermentación de lactosa; Gluc: Fermentación de glucosa; Deam Lis: Deaminación de Lisina;

Deca Lis: Descarboxilación de Lisina; Mot: Motilidad; Ind: Producción de Indol; Orn: Descarboxilación de Orinitina; Cit: Utilización del citrato; 42 °C: Crecimiento a 42 °C; O/F: Oxidación/Fermentación; Xil: Fermentación de xilosa; Mal: Fermentación de maltosa;

BGNNF: Bacilos gramnegativos no fermentadores.

Tomado de: Koneman y col., 1999.

# Métodos fenotípicos de identificación



## API (Biomérieux)

- Tiras de plástico con 20 minitubos con un orificio en la parte superior para la inoculación y que contienen los sustratos deshidratados de 20 pruebas bioquímicas
- Se suministran dentro de sobres de aluminio sellado
- La suspensión bacteriana se prepara a partir de colonias aisladas inoculadas en solución salina estéril (NaCl al 0,85%)

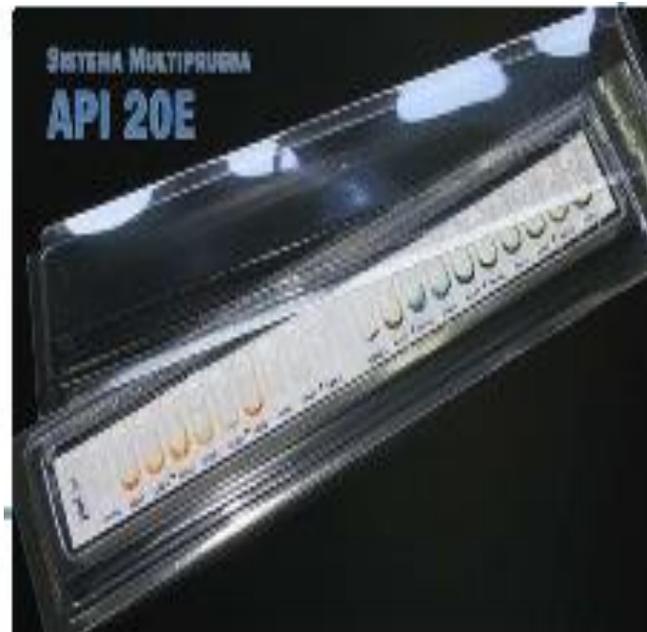


- Los tubos se rellenan con una pipeta estéril o con una jeringa y aguja, con cuidado de no formar burbujas que impiden el contacto entre el sustrato y la suspensión bacteriana
- Algunos tubos se llenan hasta la cúpula y a otros se les añade aceite de parafina para obtener condiciones de anaerobiosis



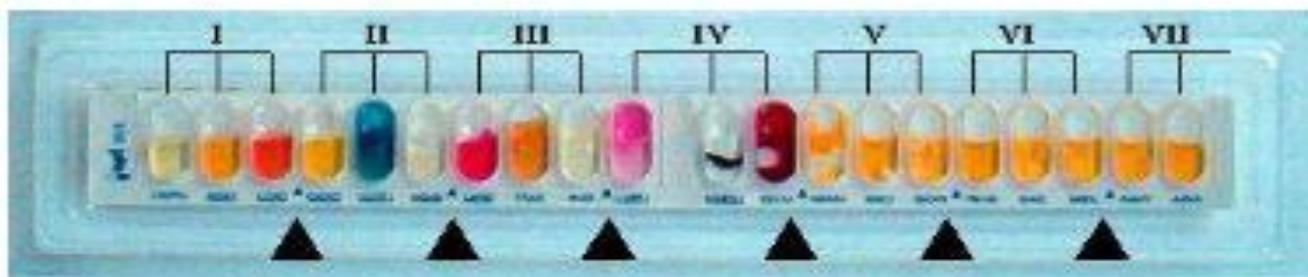
- Tras la inoculación se introducen en una bandeja de plástico con tapa para mantener la humedad durante la incubación; la bandeja tiene unos pocillos que se llenan con agua de grifo para mantener la humedad

- La tira se incuba de 18 a 24 horas a 37°C



## Lectura e interpretación de los resultados

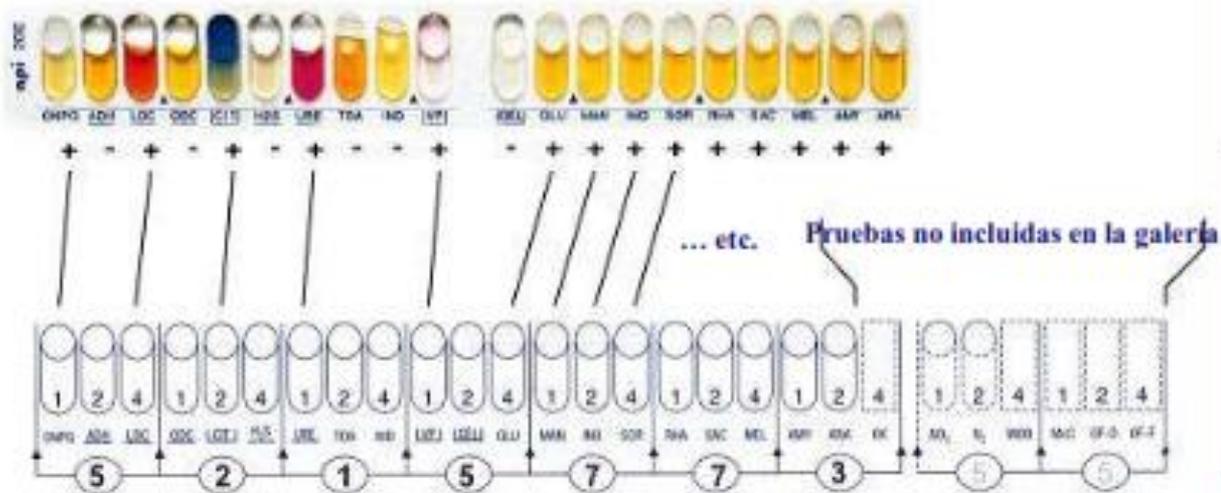
- Se convierte el código binario (+ – +) en un código octal



- Las pruebas se agrupan de tres en tres
- A cualquier prueba negativa, ocupe el lugar que ocupe, se le asigna el valor 0
- Si la primera prueba de un triplete es positiva se le asigna el valor 1
- Si es positiva la segunda se le asigna el valor 2
- Si es la tercera, se le asigna el valor 4

## Lectura e interpretación de los resultados

- Al final, las 20 pruebas se transforman en un número o código de 7 dígitos que constituye el **NÚMERO DE BIOTIPO**



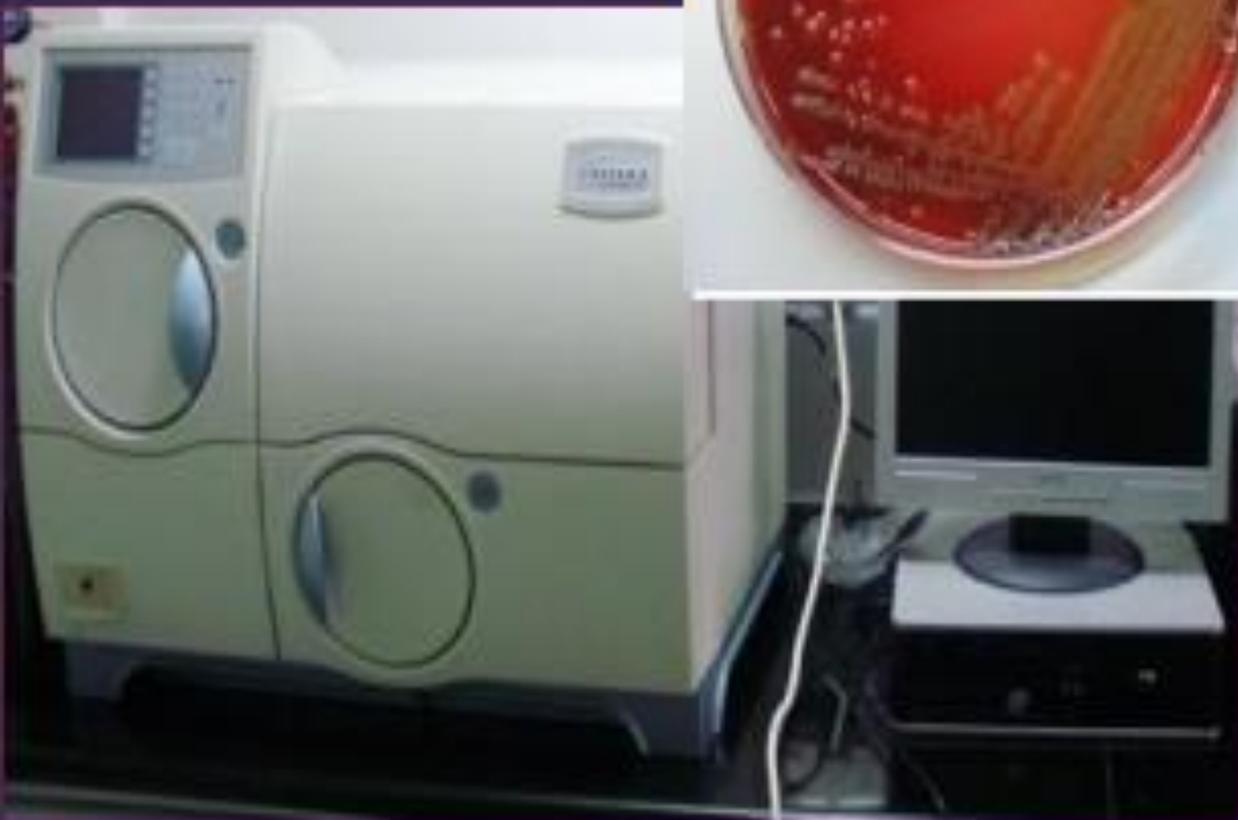
Código de la muestra: 5215773

IDENT.

*Klebsiella pneumoniae*  
o *Serratia liquefaciens*



# Identificación por sistemas comerciales automatizados



64 pocillos de ID

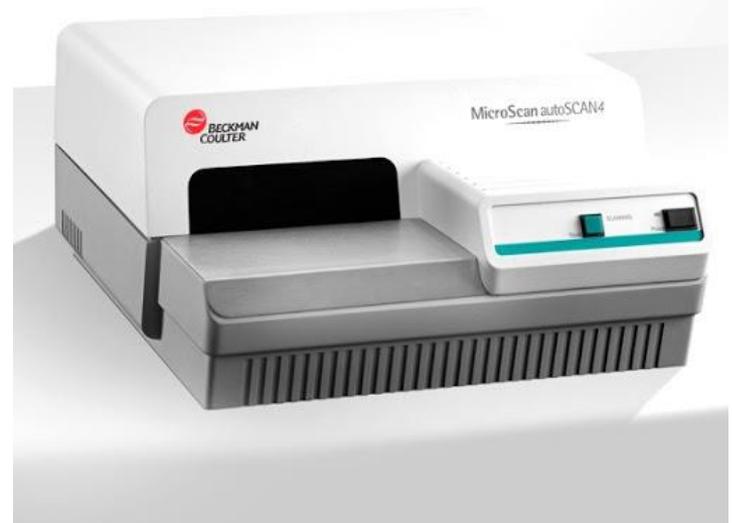


Los equipos automatizados, representan gran ayuda para los microbiólogos, pero **en ningún momento pueden sustituir al personal entrenado, capacitado y actualizado en esta área.**





Phoenix 100 - BioSystems



## Vitek (Biomérieux)

- Sistema automatizado e informatizado que permite la identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas incluyendo patógenos de orina, patógenos entéricos, levaduras, anaerobios, *Neisseria* y *Haemophilus*, e indica la susceptibilidad a antimicrobianos



# Vitek

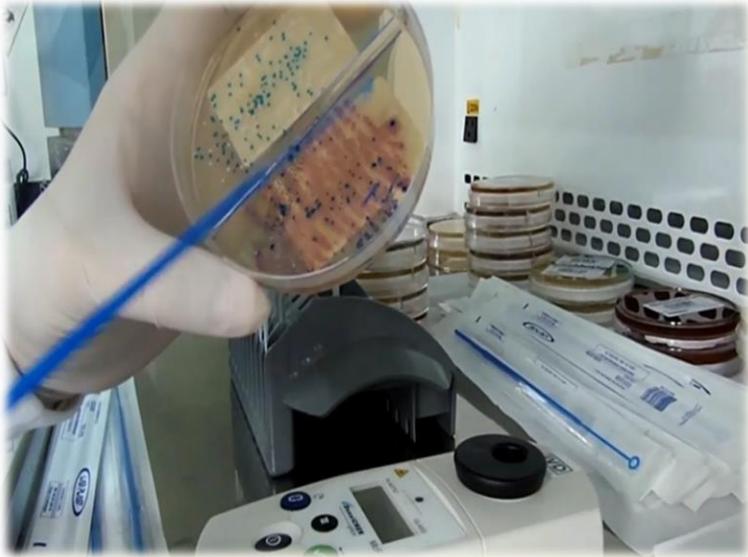
- Las tarjetas son de plástico transparente
- Tienen 24 micropocillos con sustratos deshidratados
- El llenado de las tarjetas se realiza por succión al vacío (puede llenar 10 a la vez) en el módulo de llenado

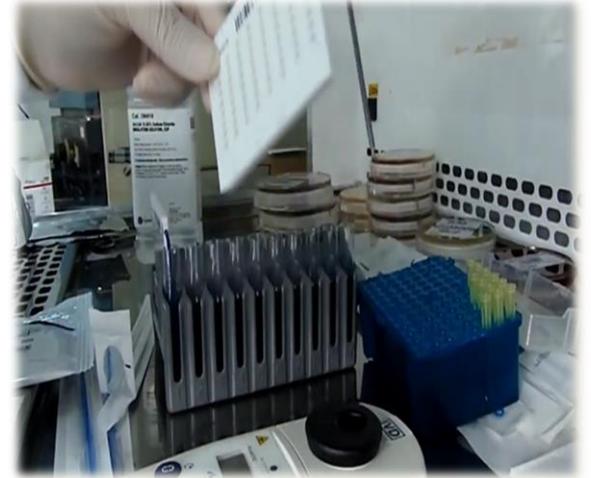
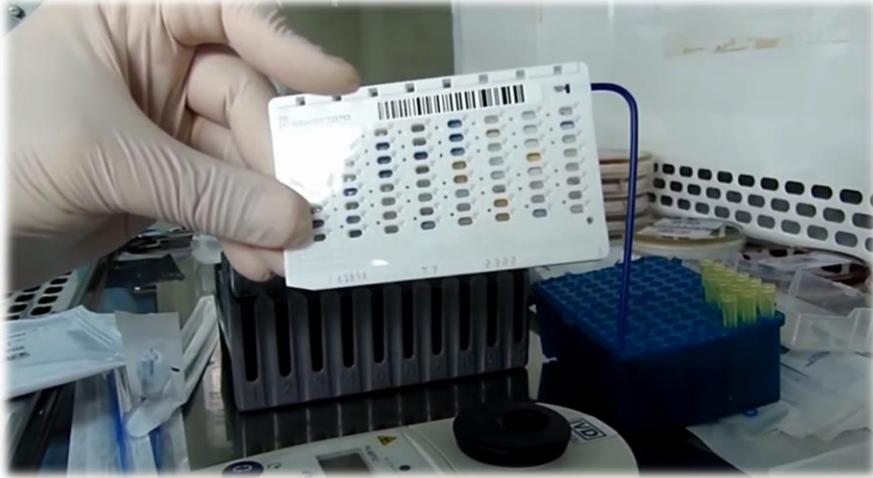
Pocillo con sustrato



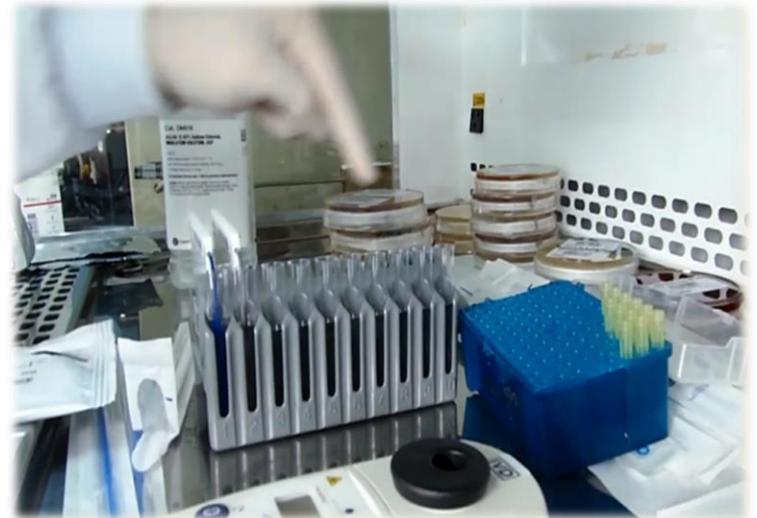
Transferencia automática del inóculo por succión al vacío







**Vitek 2™**  
ID & AST Cards  
RELIABLE • SAFE • RAPID

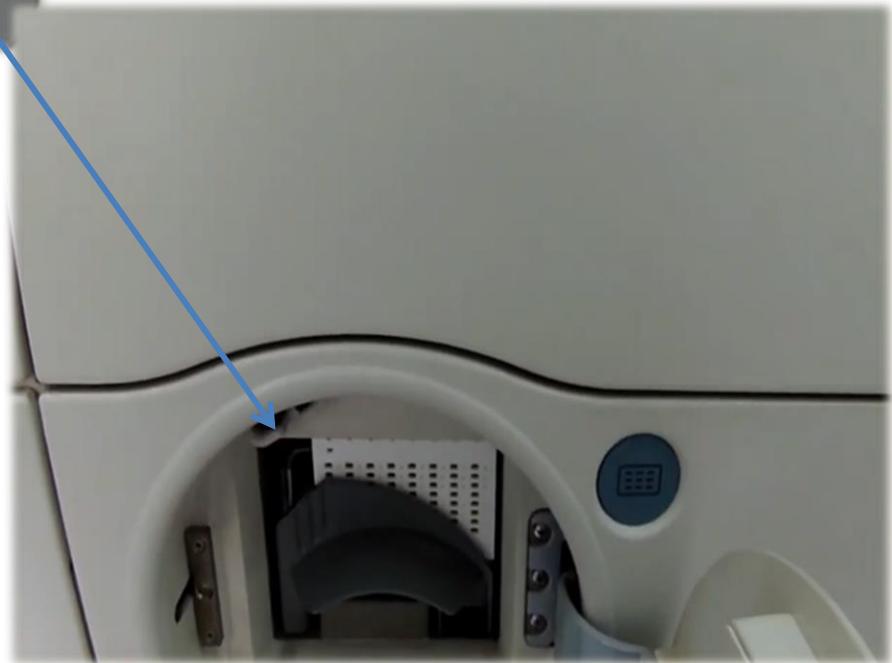


**MICROBIOLOGY WITH CONFIDENCE**



3. Las tarjetas se colocan en el módulo de llenado y sellado donde la muestra será introducida por succión al vacío en los pocillos, sellando después la tarjeta

Las tarjetas luego se introducen en el módulo de incubación y lectura



## Procedimiento

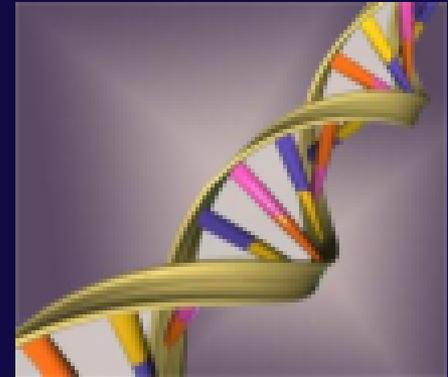
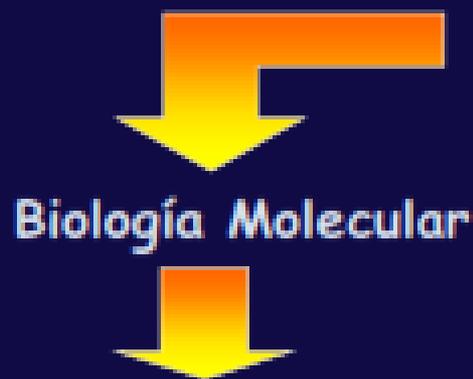
**5. Una hora después de cargar la muestra ya se puede pedir un informe preliminar**



**6. El informe final se imprime automáticamente para cada tarjeta al final del ciclo**



# Métodos Genotípicos para la identificación bacteriana



PCR convencional: Seq r RNA ribosomal 16 s, otros genes  
(*rpo B*, *gyr B*, *rec A*, *secA*)

MLSA (Análisis multilocus de secuencias)

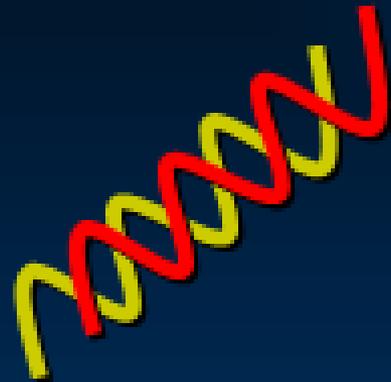
Hibridización DNA-DNA

# Técnicas de Biología Molecular

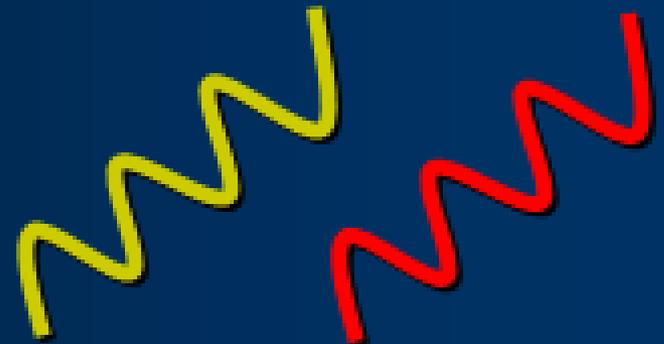
- Técnicas de Hibridación
- Técnicas de Amplificación
  - Reacción de la cadena de la Polimerasa (PCR) o Ligasa (RCL)



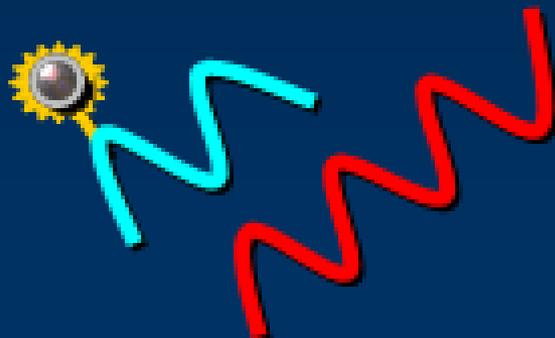
# Hibridación de Ácidos Nucléicos



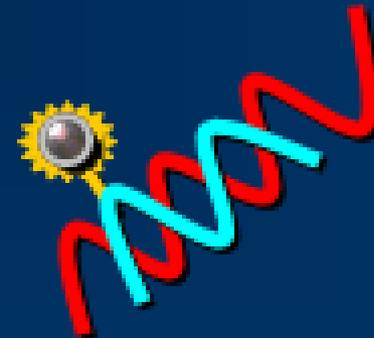
Aislamiento y Purificación



Denaturación



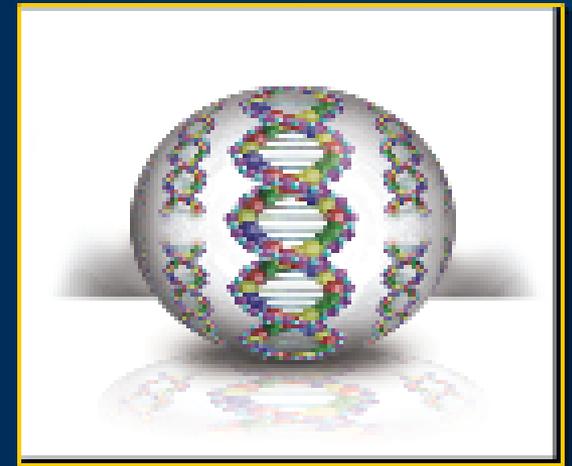
Hibridación



Detección del Híbrido

## Técnicas de Amplificación: PCR

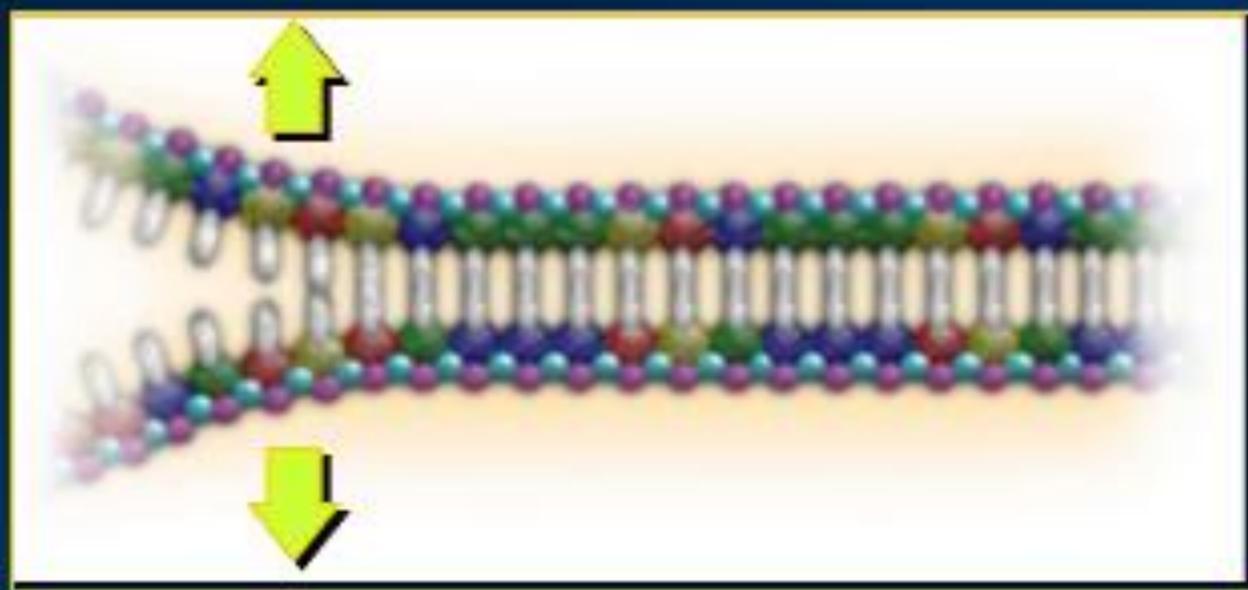
- Técnica de alta sensibilidad que permite la detección de mínimas cantidades de ácidos nucleicos microbianos en muestras clínicas



- En la reacción de PCR, el DNA microbiano es sintetizado repetidamente por oligonucleótidos que están presentes *in vitro* y que reconocen secuencias específicas microbianas

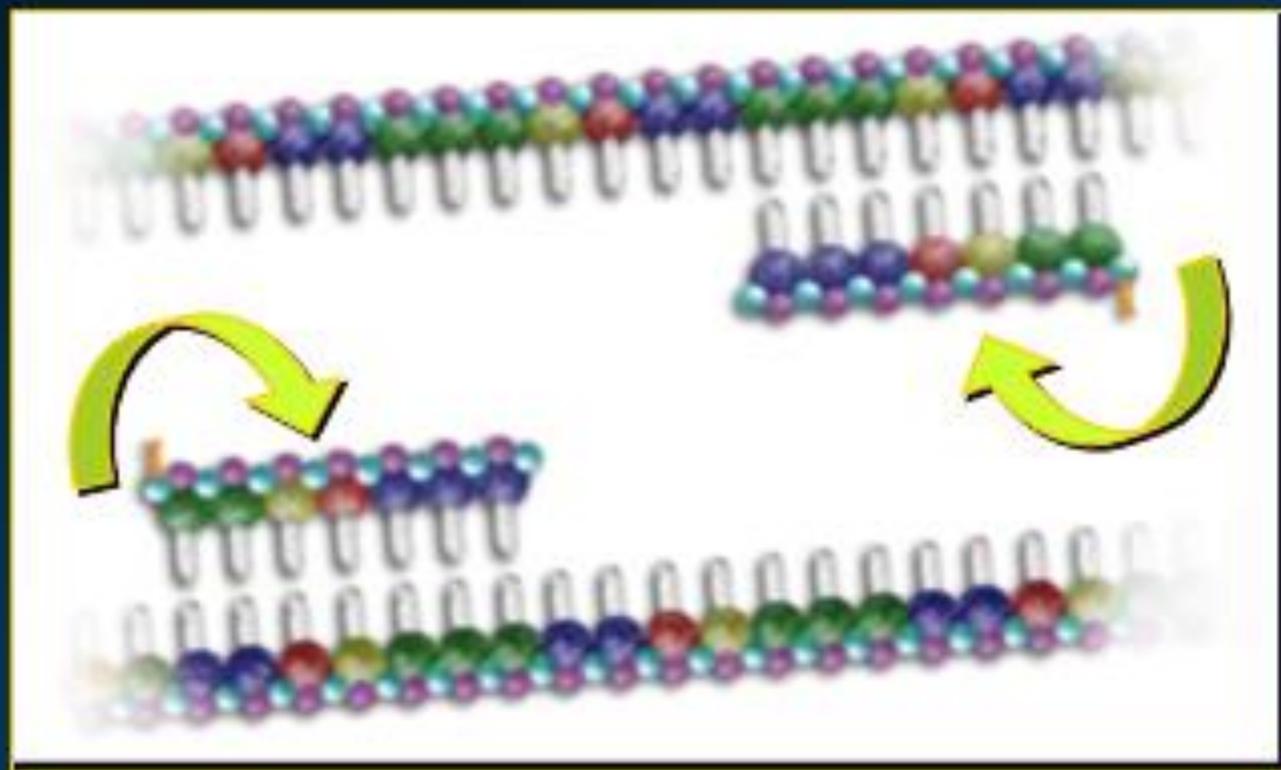
# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PRIMER PASO: DENATURACION POR CALOR 95°C



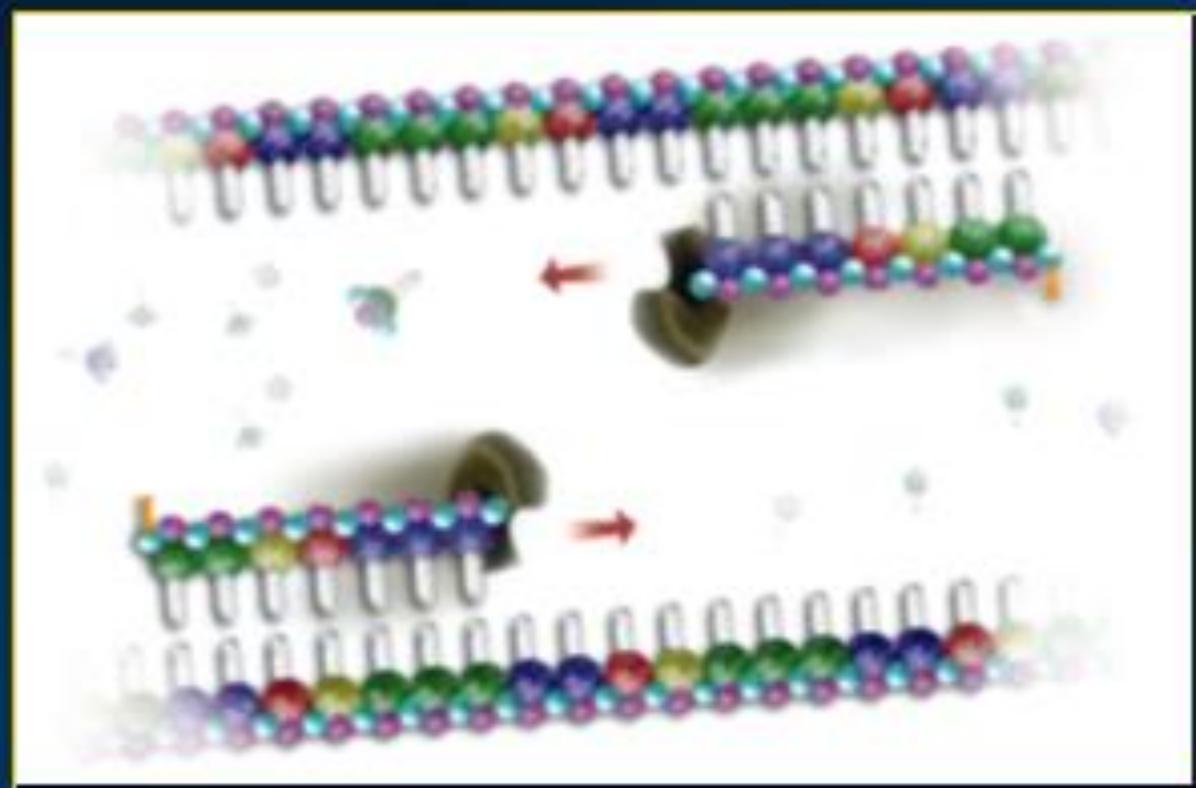
# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

SEGUNDO PASO: HIBRIDACIÓN CON "PRIMERS" 60° C



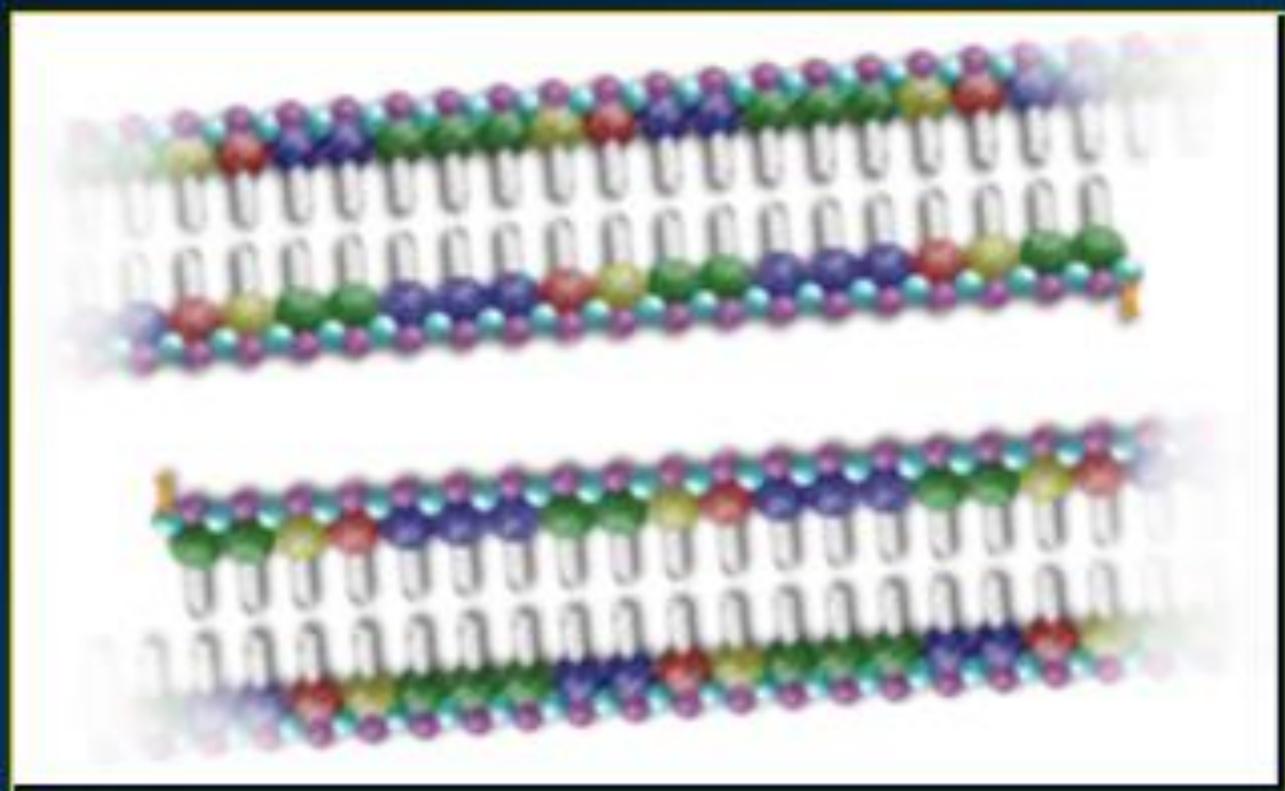
## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

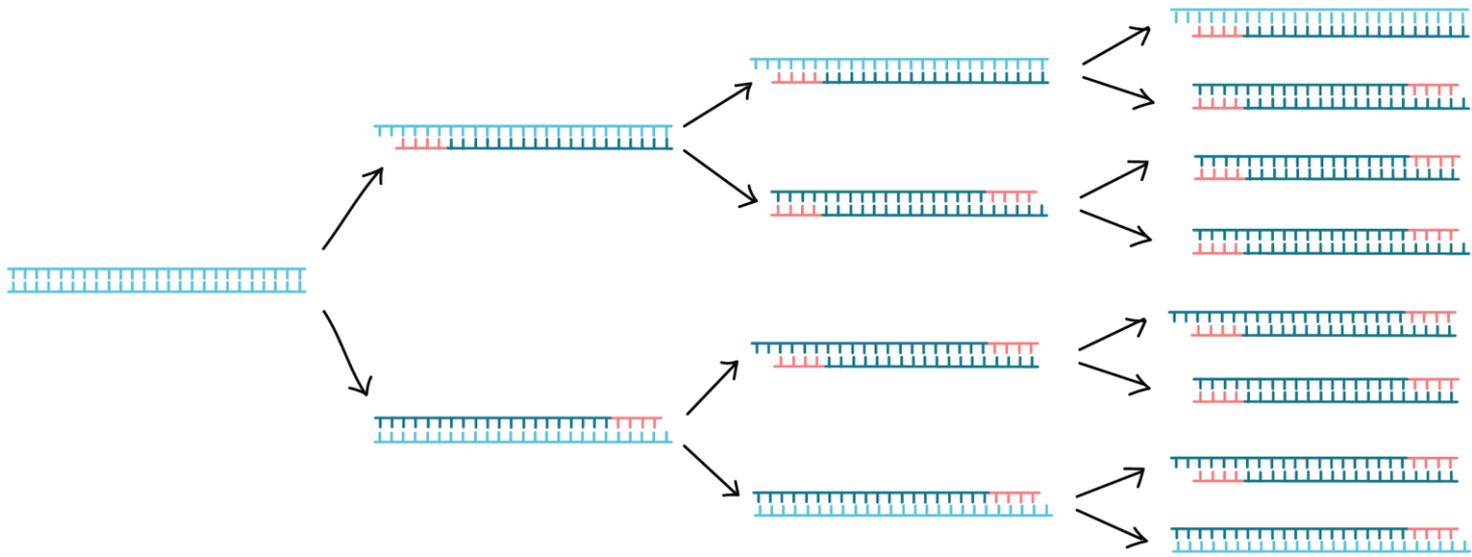
TERCER PASO: La *Taq DNA Polimerasa* es una enzima que cataliza la primera extensión, los nucleótidos son incorporados de manera complementaria cuando la temperatura de la reacción alcanza 72° C



# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

FINAL: RESULTAN DOS COPIAS DEL MOLDE ORIGINAL





Ciclo:

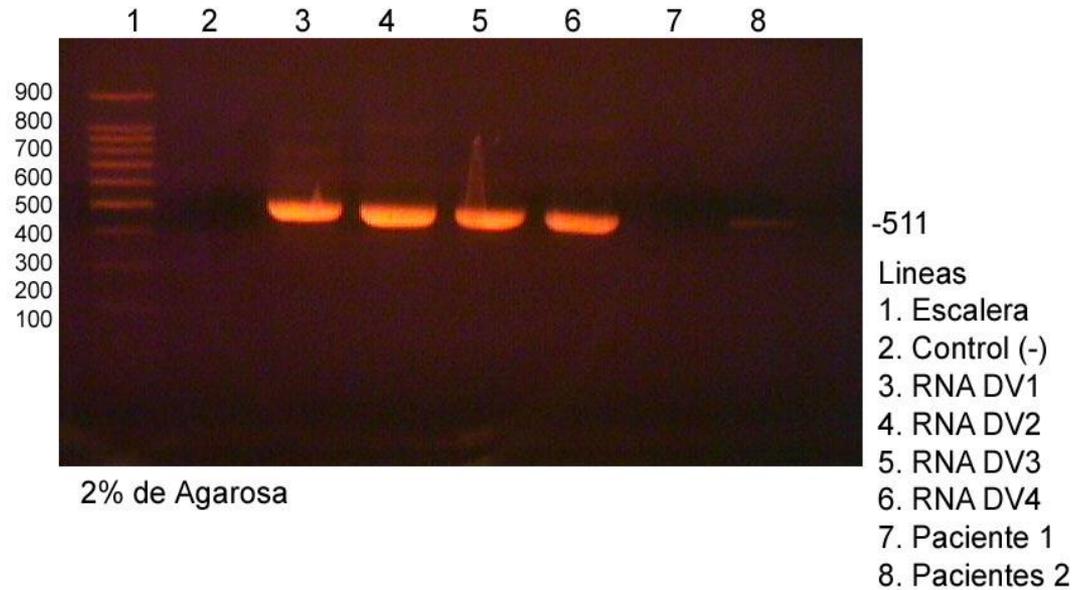
1

2

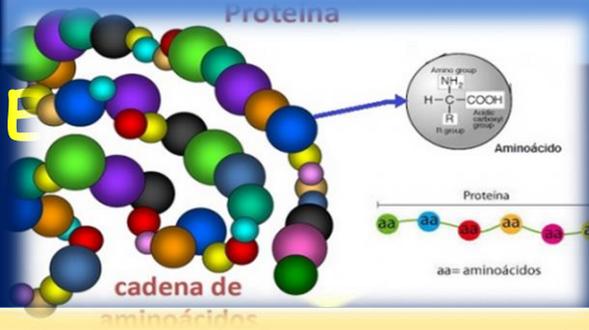
3

# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

## CONVENCIONAL



# Otros métodos de identificación: Proteómica



La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma).

## Espectrometría de Masas: Descripción del proceso (MALDI - TOF)

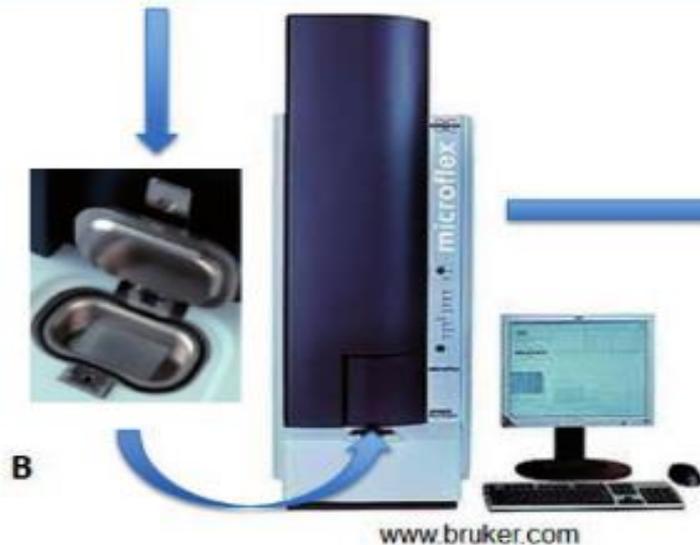
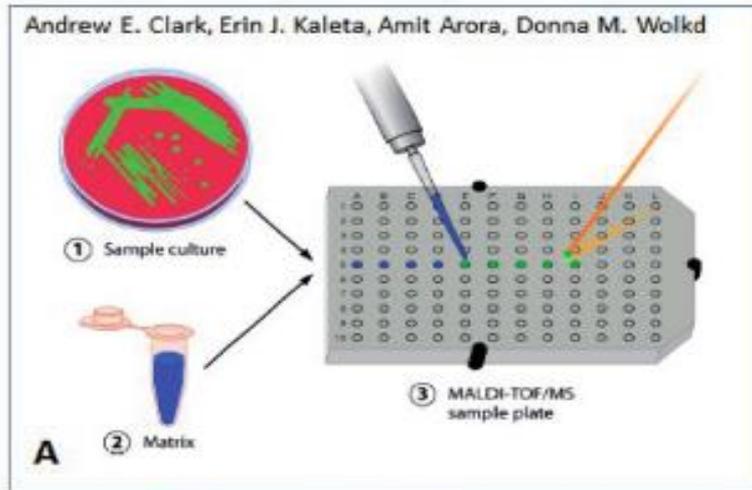


Espectrométricos

Espectrometría de  
masa

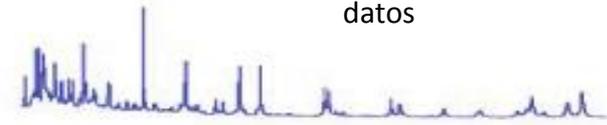
MALDI TOF

Matrix-assisted laser desorption/ionization (desorción/ionización por laser asistida por matriz) y TOF por el analizador time of flight (tiempo de vuelo)

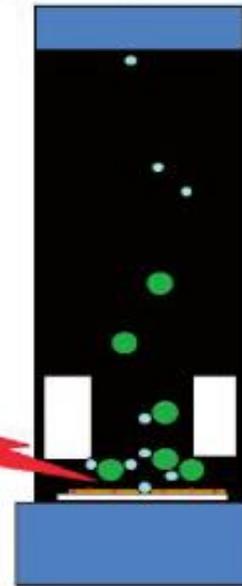


Espectro de masas de cada compuesto analizado

Comparan con patrones conocidos en base de datos



Detección de iones



Laser

**C**

Generación de iones

**Figura 1:** El esquema de análisis de un microorganismo aislado en un medio de cultivo mediante MALDI-TOF. **A.** La muestra se deposita en uno de los pocillos de la placa metálica y se cubre con 1  $\mu\text{L}$  de la matriz. **B.** La placa se introduce en el MALDI-TOF. **C.** Los principales componentes y el esquema de análisis mediante MALDI-TOF.