

12

IDENTIFICACIÓN MICROBIANA



TEMA 12

IDENTIFICACIÓN MICROBIANA. Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Al finalizar el estudiante podrá:

1. Discutir la importancia de la identificación microbiana dentro del campo del ejercicio profesional farmacéutico.
2. Enumerar los métodos utilizados para la identificación microbiana.
3. Discutir la importancia y dar ejemplos de las pruebas de utilización de sustratos y diagramas de flujo utilizados en la identificación de bacterias y hongos.
4. Utilizando el sistema anterior, citar algunos ejemplos de microorganismos indicadores de la calidad microbiológica de productos farmacéuticos y cosméticos.
5. Discutir la importancia y dar ejemplos de sistemas miniaturizados utilizados en la identificación microbiana.
6. Discutir la aplicación de los principales métodos serológicos utilizados en la identificación microbiana.
7. Discutir el fundamento y aplicación de métodos de detección molecular utilizados en la identificación microbiana. PCR. Sondas de ADN.
8. Citar ejemplos de microorganismos que pueden identificarse por los métodos discutidos en los objetivos 6 y 7.

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo. Estas técnicas se utilizan en diferentes áreas, por ejemplo:

- En el área clínica donde es de capital importancia conocer cuál es el agente causal de la infección que presenta un paciente, de manera de poder tratarlo con agentes terapéuticos.
- En la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos donde las normas de control de calidad exigen la ausencia de ciertos microorganismos.
- En investigación básica donde se aísla un determinado microorganismo que debe identificarse para comprobar si se trata de un microorganismo conocido o de uno nuevo para poder clasificarlo.

Durante su ejercicio profesional, es muy importante que el farmacéutico conozca el fundamento de los métodos existentes para la identificación microbiana. En el caso del ejercicio comunitario, un farmacéutico, por ejemplo puede estar asesorando a un paciente que tiene una infección bacteriana, y al cual el médico le tomó una muestra para ser enviada al laboratorio para identificar el agente causal, si el profesional conoce el fundamento y los métodos de identificación microbiana puede explicarle al paciente la razón por la cual los resultados de la identificación del microorganismo y su antibiograma puede retrasarse algunos días.

Si se desempeña en el área de producción de medicamentos y cosméticos, la fabricación de éstos debe realizarse en áreas controladas libres de microorganismos, para evitar la contaminación del producto, y como consecuencia de ello, se produzca su deterioro, o lo que es más grave que el producto contaminado le cause una infección a un paciente.

En el caso que el profesional se desempeñe en la industria de medicamentos y/o cosméticos, debe conocer las normas que rigen la calidad microbiológica del producto a ser elaborado, los microorganismos objetables y el fundamento de los métodos oficiales para descartar la presencia de éstos. También en el caso de la industria alimentaria, los alimentos son sometidos a una serie de controles microbiológicos para asegurar la ausencia de microorganismos que pueden causar enfermedades y/o descartar la presencia de toxinas capaces de causar intoxicaciones alimentarias.

Por estas razones, es importante conocer los métodos en los cuales se basa la identificación microbiana. No todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas. La mayor parte de los métodos se realizan en un laboratorio y se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles.

CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Los métodos más utilizados para la identificación microbiana, los podemos clasificar en:

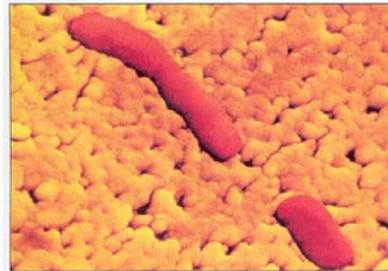
1. Métodos basados en criterios morfológicos
2. Métodos basados en tinción diferencial
3. Métodos basados en pruebas bioquímicas
4. Métodos basados en tipificación con fagos
5. Métodos basados en pruebas serológicas
6. Métodos basados en detección molecular

En la mayoría de los casos la identificación no se realiza con base a un solo método, sino a la combinación de más de uno. Ejemplo: identificación de bacterias con base a criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas y serológicas.

Antes de proceder a discutir los métodos que se han enumerado, es importante hacer énfasis que para cada uno de ellos se requiere disponer de una muestra. Cuando se requiere identificar un agente que está causando una determinada patología, la muestra debe proceder del sitio donde el microorganismo está causando el daño, o donde se multiplica. Algunos ejemplos de muestras que se utilizan en microbiología clínica tenemos: heces, orina, hisopado faríngeo, líquido cefalorraquídeo, sangre, lágrimas, semen, fluido vaginal, etc. También pueden utilizarse tejidos. Para aplicar algunos métodos se requiere aislar en forma pura el microorganismo de la muestra, pero para otros no se requiere realizar dicho aislamiento. Con fines de control de calidad de medicamentos, cosméticos y alimentos, la muestra a ser analizada, puede ser un producto en proceso o terminado.

1. Métodos basados en criterios morfológicos

Los rasgos morfológicos (estructurales) han ayudado a los taxonomistas por muchos años a clasificar organismos. Los organismos superiores tienen rasgos anatómicos tan diferentes que pueden ser fácilmente utilizados en su clasificación, pero con respecto a los microorganismos, éstos lucen bajo el microscopio tan similares que se dificulta su clasificación. Es decir, que estos microorganismos que se ven tan parecidos bajo un microscopio, pueden diferir en propiedades bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas. Sin embargo, aun cuando la morfología celular dice poco sobre las relaciones filogenéticas, sigue siendo útil para la identificación bacteriana. Por ejemplo: la presencia de endosporas y su localización resulta de mucha utilidad en la identificación de bacilos esporulados.



2. Métodos basados en tinción diferencial

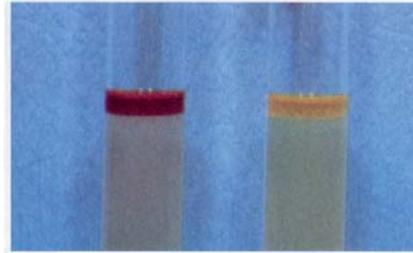
Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. La mayor parte de las bacterias, teñidas con Gram, las podemos clasificar como gram positivas o gram negativas, otras tinciones diferenciales, como la ácido resistente, se aplican a otro tipo de bacterias, como por ejemplo micobacterias. Un examen microscópico de una lámina teñida por medio de gram o de una tinción diferencial es útil para obtener una información rápida sobre la calidad de un ambiente clínico. Por otro lado, un médico también puede obtener suficiente información de un reporte técnico de laboratorio para comenzar el tratamiento apropiado de un paciente.



3.

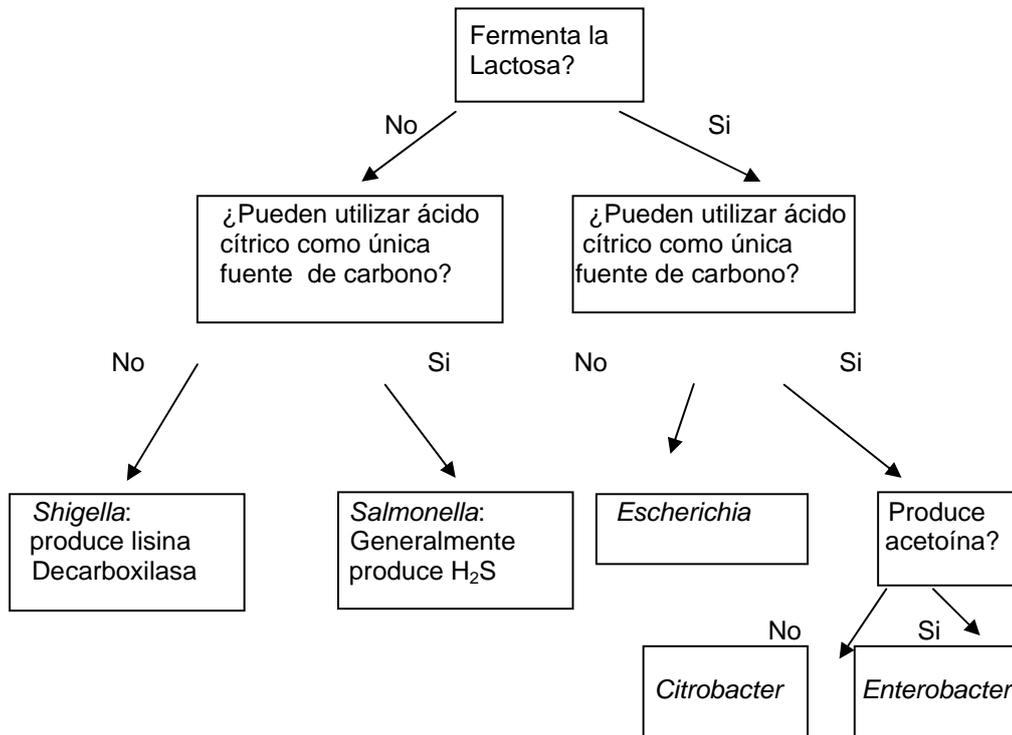
4. Métodos basados en pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Aun bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes con base a pruebas bioquímicas. Por ejemplo,



las bacterias entéricas gram negativas, forman un grupo muy grande y heterogéneo cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Esta familia, **Enterobacteriaceae**, incluye a varios patógenos que causan síndromes diarreicos. Un gran número de ensayos han sido desarrollados de manera de identificar rápidamente al patógeno, para que posteriormente el médico, con base al reporte, indique el tratamiento adecuado, o para que los epidemiólogos puedan localizar la fuente de la infección.

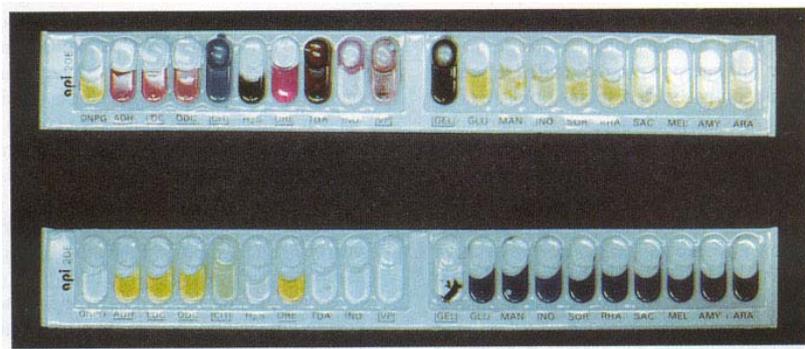
Existen flujogramas, como el que se describe a continuación para la identificación bacteriana, mediante pruebas bioquímicas de microorganismos. Por ejemplo, la presencia de un coco bacilo gram negativo, facultativo, fermentador de glucosa, oxidasa negativo, nos indica la presencia de una enterobacteria, para determinar su género podemos seguir el siguiente esquema.



Los géneros clínicamente más importantes de la familia **Enterobacteriaceae** son: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. El género *Escherichia*, *Enterobacter* y *Citrobacter* fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, a diferencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella* que no fermentan la lactosa.

Por otra parte, los medicamentos no estériles y/o productos cosméticos deben estar exentos de microorganismos patógenos tales como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* *Staphylococcus aureus*. Estos productos deben ser controlados para verificar la ausencia de estos microorganismos. En la USP se describen los procedimientos a seguir para la identificación de estas bacterias, que se resumen en procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y pruebas bioquímicas para su identificación final.

El tiempo necesario para la identificación de bacterias puede reducirse considerablemente con el uso de **sistemas miniaturizados** basados en pruebas bioquímicas. Estas herramientas que permiten reducir el tiempo del reporte, en primer lugar fueron elaborados para bacterias de importancia médica, tales como las enterobacterias. Estos sistemas han sido diseñados para realizar varias pruebas bioquímicas simultáneamente y permitir la identificación en un tiempo más corto. Cada uno de los ensayos, consta de tubos miniaturizados que contienen el medio de cultivo que se hidratan al inocularlos con la suspensión bacteriana pura. Las pruebas se clasifican en grupos; a cada uno de resultados positivos de los ensayos de se le asigna un determinado valor numérico, obteniéndose un código que corresponderá a un determinado género o especie en un texto de la base de datos.



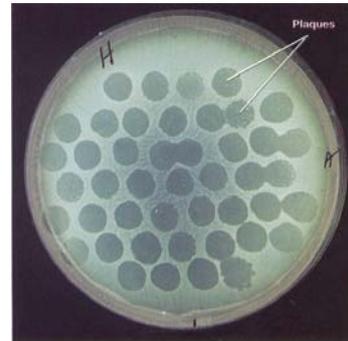
Con fines de control microbiológico, la USP indica cuales son las pruebas bioquímicas mínimas que se requieren para la identificación de los microorganismos objetables, pero no descarta que se utilicen sistemas miniaturizados donde se realizan un número mayor de pruebas bioquímicas.

Existen muchas casas comerciales que producen sistemas miniaturizados para diferentes tipos de microorganismos además de las enterobacterias. Cada casa fabricante tiene su propia presentación, cálculos, manuales, etc.

Una limitación de este tipo de método de identificación es la aparición de cepas mutantes y la adquisición de plasmidios que pueden dar origen a cepas con características diferentes. Este tipo de método de identificación también ha sido desarrollado para la identificación de levaduras y de otros hongos.

4. Métodos basados en tipificación con fagos

La interacción entre un virus bacteriano (fago) y su célula bacteriana sensible es sumamente específica, ya que el proceso de adsorción se encuentra mediado por receptores específicos tanto en el virus como en la célula bacteriana. A una placa con medio de cultivo sólido inoculado con un cultivo puro de una determinada bacteria, se le añade una alícuota de un fago específico; éste puede ocasionar la lisis de las bacterias, hecho que se evidencia en el cultivo como zonas claras definidas, denominadas placas, que indican que hubo infección y lisis celular. El uso de fagos específicos permite identificar y subclasificar bacterias dentro de una misma especie.



5. Métodos basados en ensayos serológicos

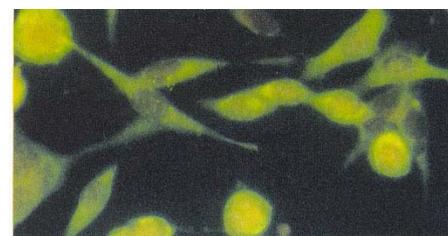
Los métodos serológicos, implican la utilización de preparaciones de inmunoglobulinas específicas provenientes del suero o de un reactivo, y que pueden ser de gran utilidad en la identificación microbiana en muestras puras o en muestras biológicas. Cada uno de los métodos tiene su fundamento particular, pero en líneas generales, todos se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente microbiano con su anticuerpo correspondiente. La solución que contiene los anticuerpos se denomina antisuero.

Estos métodos son muy útiles en diversas situaciones:

- Si a través de un sistema miniaturizado basado en pruebas bioquímicas se determinó que la bacteria causante de la infección es un miembro del género *Salmonella*, utilizando una batería de antisueros contra el antígeno O presente en el lipopolisacárido de las bacterias gram negativas, es posible identificar a la *Salmonella* aislada hasta el nivel de serotipo (poli O, A, B, C, D, etc.).

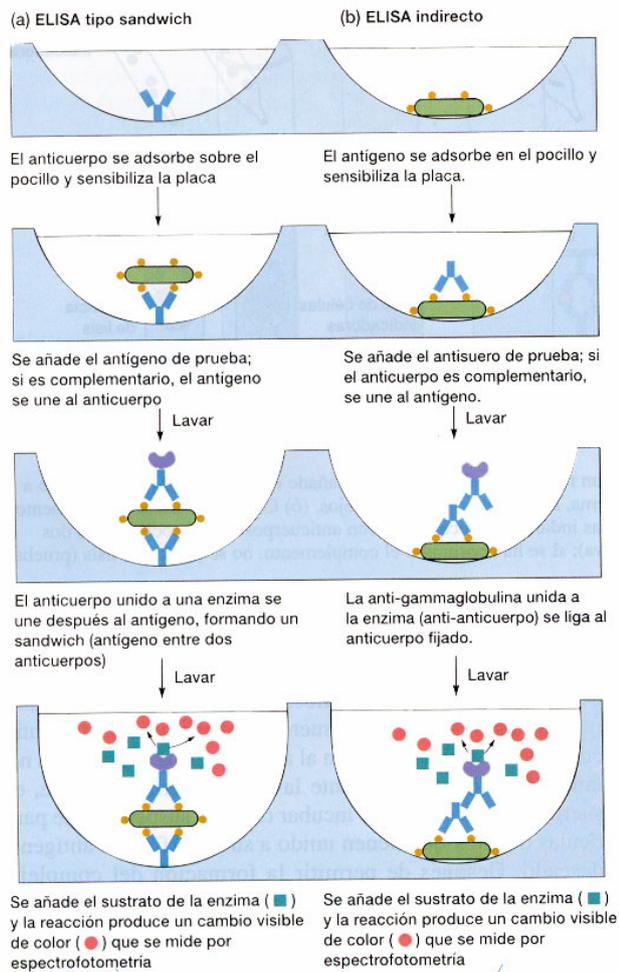


- La inmunofluorescencia ha resultado ser sumamente útil en casos de infecciones de diferente origen. Puede utilizarse para la identificación del microorganismo aislado o presente en una muestra biológica. En el método directo se fija la muestra problema a una lámina y se pone en contacto con el antisuero específico marcado con una sustancia fluorescente (rodamina o fluoresceína). Una vez transcurrido el tiempo para que tenga lugar la reacción antígeno anticuerpo, se expone la lámina a la radiación ultravioleta para visualizar la reacción. También existe la técnica indirecta, donde en primer lugar se utiliza el anticuerpo específico no marcado y posteriormente se utiliza un anti anticuerpo marcado.



- En caso de una infección viral, los virus no pueden ser identificados mediante pruebas bioquímicas, pero si pueden ser identificados en diferentes fluidos biológicos utilizando inmunoensayos, tales como el ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), el cual, a manera general, utiliza anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno a identificar, marcados con una enzima.

En un ensayo de ELISA tipo sandwich, los anticuerpos específicos para el antígeno, se colocan sobre los pozos de una microplaca, posteriormente se añade la muestra donde se quiere determinar la presencia del agente (bacteria, virus, protozooario). Si el agente está presente ocurre la reacción antígeno-anticuerpo; luego del lavado se añade el anticuerpo específico marcado con la enzima. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y realizado el lavado correspondiente, se añade el sustrato. Si se desarrolla un color se trata de un resultado positivo. Estos ensayos, al igual que otros, involucran el uso de controles positivos y negativos.



Inmunoensayos tipo ELISA han sido desarrollados para la detección e identificación de varios tipos de agentes microbianos. Ejemplos: VIH, virus de la Hepatitis A,B,C, *Chlamydea trachomatis*, *Legionella pneumophili*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Entamoeba hystoliticum*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*.

6. Métodos basados en biología molecular

Modernamente adquiere más importancia el uso de métodos basados en biología molecular donde, a través de procedimientos y reactivos, se pueden detectar determinadas secuencias de ADN que son propias de un determinado agente microbiano.

El método que se está utilizando ampliamente en los laboratorios de diagnóstico es el **PCR** (Polymerase Chain Reaction), que se aplica generalmente para la identificación de microorganismos que no pueden ser cultivados por los métodos convencionales. A través de este método, puede aumentarse la cantidad de ADN hasta niveles detectables mediante electroforesis o mediante sondas de ADN.

El proceso de PCR, puede resumirse en 4 etapas, que se repiten un *n* número de veces:

1. Separación de las cadenas de ADN, ello se realiza aumentando la temperatura, la cual rompe los enlaces de hidrógeno que mantiene unidos a las cadenas de ADN.
2. Adición de cadenas cortas de polinucleótidos, denominados **cebadores**, que se unen por complementariedad de bases a cada una de las cadenas del fragmento de ADN que se desee amplificar. Uno se une a la cadena 5' ---3' y otro a la cadena 3'—5'.
3. Disminución de la temperatura para permitir que los cebadores hibridicen con las cadenas de ADN de la muestra problema, por complementariedad de bases.
4. Adición de la ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos (ATP, GTP, TTP, CTP) y demás cofactores, para que tenga lugar la síntesis de la cadena complementaria.
5. Repetición de las etapas 1 a 4.

Este proceso se caracteriza por ser exponencial. En cada ciclo se duplica la región de ADN ubicada entre los cebadores.

Este procedimiento se realiza en un equipo denominado termociclador, que permite regular las diferentes temperaturas que se requieren para cada uno de los pasos.

A continuación se enumeran ejemplos de agentes microbianos subclasificados en bacterias, virus y protozooario, que han sido identificados mediante PCR.

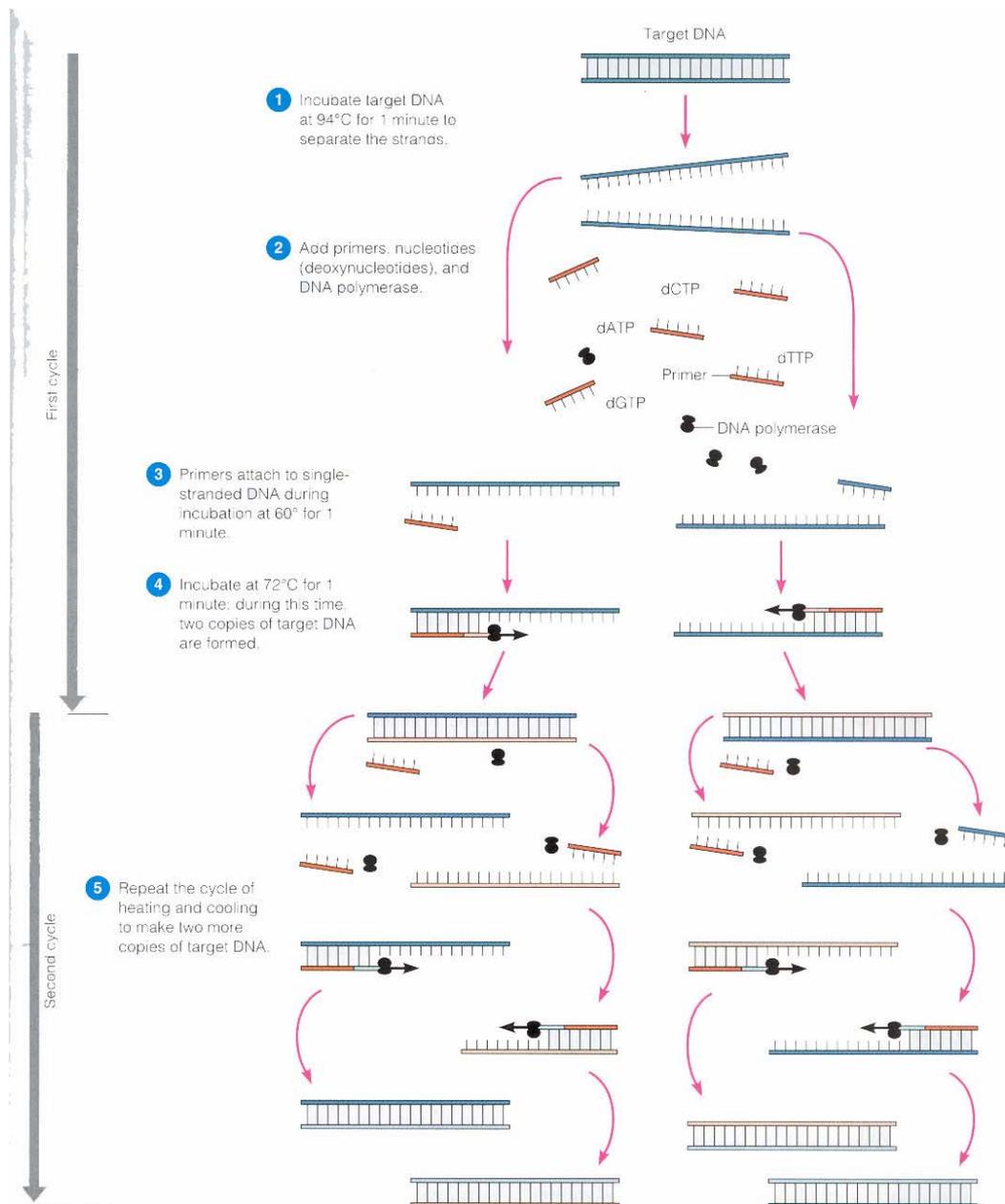
Bacterias:

Borrelia burghdoferi, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Stahylococcus aureus*, *Chlamydea trachomatis*, *Shigella dysenteriae*, *Treponema pallidum*, *Escherichia coli* enterotoxinogénica, *Mycobacterium tuberculosis* y *Legionella pneumonophilia*, *Campylobacter jejuni*.

Virus: Parvovirus, Herpes-simplex virus, Rotavirus, Papillomavirus, Virus del dengue, Virus Varicella-Zoster, Virus de la Rubéola, Adenovirus, Rhinovirus.

Protozoarios: *Plasmodium falciparium*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolyticum*, *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma cruzi*.

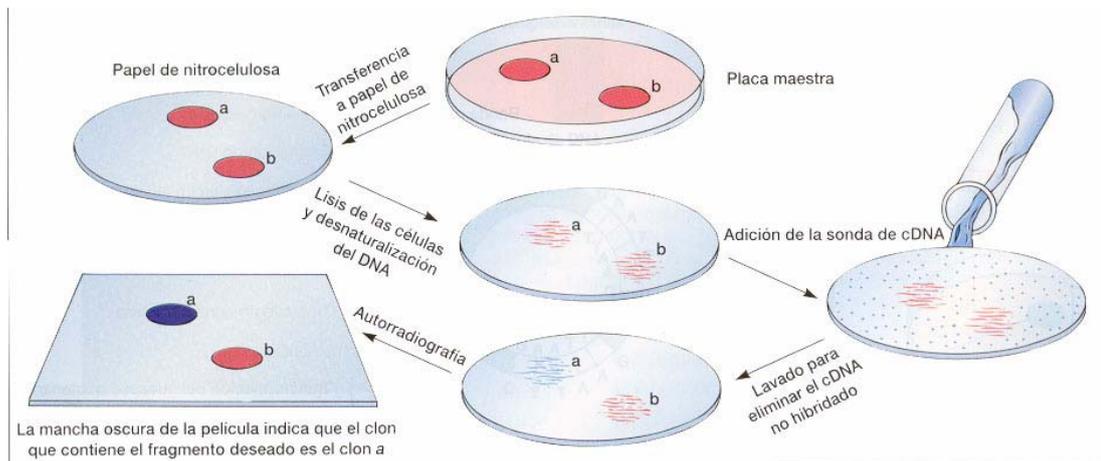
IDENTIFICACIÓN MICROBIANA



Otro método que también ha sido ampliamente utilizado y que se fundamenta en complementariedad de bases de ácidos nucleicos, son aquellos que utilizan **sondas de ADN**, que se definen como secuencias de oligonucleotidos de ADN marcados, con un elemento radioactivo (^{32}P , ^{125}I , ^{35}S) o con una proteína unida a una enzima como la fosfatasa alcalina. Estas sondas se utilizan para la detección de una secuencia complementaria de ADN o ARN, presente en el agente que se desea identificar.

La muestra, que se supone que contiene un agente microbiano con una secuencia complementaria que se desea identificar, se coloca en un filtro, se trata de manera tal de liberar al ácido nucleico, se calienta para que las cadenas complementarias

se separen. Posteriormente se añade la sonda, y se deja transcurrir un periodo para que tenga lugar la hibridación si existe la cadena complementaria. La unión de la sonda a la secuencia complementaria se detecta mediante la señal radiactiva que emite la sonda o mediante métodos enzimáticos.



A continuación se presentan una lista con ejemplos de bacterias que han sido detectadas e identificadas por medio de sondas de ADN:

- **Bacterias gram negativas:** *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Haemophilus influenzae*.
- **Bacterias gram positivas:** *Streptococcus Grupo A*, *Streptococcus Grupo B*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.
- **Micobacterias:** *Mycobacterium tuberculosis*, *M. Avium*, *M. Intracelulare*.
- **Hongos:** *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*.

Siempre que sea posible se debe utilizar el método más eficiente y más barato. Las identificaciones utilizando PCR son muy costosas debido a los equipos, los reactivos y los materiales de laboratorio que se deben utilizar. El área donde se realiza una parte del ensayo sólo puede utilizarse para un determinado agente.

BIBLIOGRAFÍA

Madigan M.T, Martingo J. M. y Jack Parker. 2004. Décima Edición. Brock Biología de los Microorganismos Prentice Hall

Mahon, C. and Manuselis G. 2000. Textbook of Diagnostic Microbiolgy. Second Edition. W.B. Saunders Company. USA

Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D. 1999. Microbiología. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana.

Tortora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case 2007. Introducción a la Microbiología 9^{na} Edición. Editorial Médica Panamericana.

Milagros de Vizcarrondo
Sofía Gutiérrez de Gamboa
Enero 2002
Revisión 2008

ACTIVIDADES ADICIONALES

Elabore una clave para la identificación de diferentes especies bacterianas.

Investigue por qué la prueba del ELISA-VIH presenta el inconveniente de obtener falsos negativos.

Busque en un diccionario de inglés técnico la traducción al español de las palabras siguientes:

Acid fast stain	
Annealing	
Antibodies labeled cells	
Antiserum	
Differential staining	
Food associated infections	
Human pathogen	
Hybridization	
Indirect fluorescent antibody	
Monoclonal antibodies	
Morphology	
Nucleic target sequence	
Oligonucleotide	
Primer	
Probe	
Serology	
Specificity	
Sputum	
Viral species	
Western blotting	

