



IDENTIDAD MICROBIANA

Identidad bacteriana es el ejercicio práctico en el que se ejercen las pruebas de identificación bacteriana. Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más accesibles. Los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales.

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 combinación 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 costo 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.

En la medicina general es común que llegue un paciente con síntomas de alguna infección bacteriana, el determinar un diagnóstico y poder interpretar qué bacteria causó la molestia al paciente es aventurado, pues hay muchas bacterias que causan las mismas enfermedades, por eso es conveniente realizar pruebas de identificación, que son sumamente importantes para un buen diagnóstico de cualquier patología.

Cada género, inclusive especie, tiene diferentes reacciones cuando se les enfrentan diferentes reactivos, esto se hace a partir de un cultivo puro, ya la bacteria aislada, con estas pruebas podremos decir casi con exactitud de qué género y qué especie es esta bacteria. A estas pruebas se les ha como primarias, secundarias y Complementarias.

Para la identificación de las bacterias en el laboratorio es importante conocer sus características morfológicas, la reacción a la tinción de Gram, agrupación, propiedades, morfología colonial, reacciones metabólicas como producción de enzimas y reacciones de óxido-fermentación



• OBJETIVOS Y UTILIDAD DE LOS MÉTODOS

En este apartado se revisan las técnicas de identificación fenotípica de las principales bacterias que pueden encontrarse en muestras clínicas y pretende ser una guía detallada del proceso de identificación. No incluiremos en este documento microorganismos con características especiales como son micobacterias, anaerobios, rickettsias, clamidias, micoplasmas y espiroquetas ya que son tratados específicamente en otros procedimientos.

Estas técnicas son dependientes del cultivo bacteriano y no son aplicables para identificación de bacterias directamente de las muestras.

En ningún caso, los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta. Únicamente indicarán cuál es el género y/o la especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer.

La identificación bacteriana primaria se basa en los siguientes puntos:

- ✓ **Tinción de Gram:** Revela la forma de la bacteria, agrupación y grupo taxonómico al que pertenece: Gram positivo o Gram negativo.
- ✓ **Tinción de Ziehl Neelsen:** Las bacterias Alcohol-Ácido resistentes (BAAR), son difíciles de cultivar, tal vez y en un agar sangre muestre algo de crecimiento, por eso es útil esta tinción de identificación primaria.
- ✓ **Tinción de esporas:** La espora es un mecanismo de defensa generalmente de los géneros Bacillus y Clostridium.

• Pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (hay discos o tabletas comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado).

- **Prueba de catalasa:** La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, esta enzima es similar a la estructura de la hemoglobina. Excluyendo al género Streptococcus y algunos otros la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen catalasa.
- **Prueba de oxidasa:** Básicamente es la detección de la enzima oxidasa, muy útil en la identificación de bacterias Gram (-). La reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema de citocromo-



oxidada, la cual activa citocromos reducidos por oxígeno molecular, por la transferencia de un aceptor al estado terminal del sistema de transferencia de electrones.

- **Ácido de la Glucosa:** La mayoría de las bacterias de interés médico usan la glucosa como fuente de carbono, como parte importante de su metabolismo. Se determina si la bacteria usa la glucosa produciendo ácido y/o gas a partir de dicho carbohidrato. En un tubo con agua peptonada al 1% tapado, y un tubo de Durham, se inocula la bacteria por agitación teniendo cuidado de no mover el tubo de Durham e incubándolo 24 horas y 37°C se obtienen los siguientes resultados.
- **Prueba de O/F:** para realizar esta prueba se usa el medio básico de Hugh y Leifson con un pH de 7.1. Es un medio semisólido de color verde que se inocula por picadura, contiene carbohidratos como: glucosa, lactosa, sacarosa o maltosa al 10%. Como indicador de pH tiene Azul de bromotimol. Se usa en dos tubos, uno sin aceite y otro con aceite o vaselina sellándolo.

Se inoculan los dos tubos con la bacteria por picadura y se mantiene a 37°C por 24 horas, obteniéndose:

TUBO ABIERTO	TUBO SELLADO	INTEPRETACIÓN
Amarillo	Verde	Oxidación (aerobio)
Amarillo (anaerobio facultativo)	Amarillo	Fermentación
Verde (anaerobio estricto)	Amarillo	Fermentación
Verde	Verde	Negativo (NH ₃)

- **Prueba de Motilidad:** Llamada también de la gota suspendida. Algunas bacterias son móviles por presentar flagelo, los flagelos son encontrados principalmente en las formas bacilares y pueden presentarse en número y posición variados (monótricos, peritricos, etc.). La base de esta prueba es determinar si la bacteria es móvil o inmóvil. Con un asa de inoculación se le coloca a un cubreobjetos un poco de muestra y se le agrega una gota de agua destilada. Se coloca sobre un portaobjetos y se observa al microscopio. Podremos observar si las bacterias tienen movimientos rectilíneos o curvos y en todas direcciones.

Motilidad (+): como en *Pseudomonas auruginosa*.

Motilidad (-): como en *Pasteurella multocida*.

- **Pruebas Secundarias.**

La identificación se fundamenta en la comparación del microorganismo que deseamos identificar con los microorganismos de identidad conocida. La exactitud de la identificación depende de la eficacia del trabajo preparatorio así como su grado. Estas pruebas se clasifican de la siguiente manera:

- *Simples:* Citrato, Malonato, MR-VP, Nitrato y Leche Tornasol.
- *Múltiples:* TSI, LIA y SIM.
- *Especiales:* Coagulasa, Hialuronidasa y Acriflavina.



- **Pruebas rápida, con lectura en menos de 6 hrs.**
 - **Hidrólisis del hipurato.** Demuestra la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipuricasa. Como indicador de la reacción se utiliza ninhidrina. Esta prueba se utiliza en la identificación de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus agalactiae*.
 - **β -galactosidasa (ONPG).** Esta prueba demuestra la presencia de la enzima β -galactosidasa. Hay bacterias que a pesar de poseer enzimas que hidrolizan la lactosa (β -galactosidasas), no pueden actuar sobre ella porque les faltan las enzimas extracelulares apropiadas (permeasas). Para conocer si un microorganismo es productor de β -galactosidasa, basta añadir el compuesto orgánico O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) que es incoloro. Si la bacteria posee las enzimas hidrolizantes (β -galactosidasa), el compuesto se transforma en ortonitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo. Todas las bacterias fermentadoras lentas de la lactosa son β -galactosidasa positivas.
 - **Aminopeptidasa: PYR.** La L-pirrolidonil- β -naftilamida sirve como sustrato para la detección de pirrolidonil peptidasa. Se utiliza principalmente en la identificación de *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus* spp. También en la diferenciación de *Staphylococcus lugdunensis* de otros estafilocos coagulasa negativa.
 - **LAP.** Se utiliza para la detección de la enzima leucina amino peptidasa (LAP) y es una de las pruebas para la identificación de cocos grampositivos catalasa negativa; diferencia específicamente los géneros *Aerococcus* y *Leuconostoc* de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, y *Pediococcus*.
 - **Ureasa.** Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado. La prueba también se utiliza para diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de *Moraxella* spp. *Helicobacter pylori* y *Brucella* spp. también hidrolizan la urea. Esta prueba puede ayudar en la identificación de *Cryptococcus* spp. que produce un resultado positivo después de una incubación prolongada.
 - **Indol.** Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.
- **Pruebas lentas, con lecturas de 18 a 48 hrs.**
 - **Óxido-Fermentación.** Mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno).
 - **Reducción de nitratos.** Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos. Se utiliza para asignar bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*, en la diferenciación de *Moraxella catarrhalis* del género *Neisseria* y en la identificación de bacilos grampositivos aerobios.
 - **Rojo de metilo.** El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido- mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos gramnegativos.



- **Voges-Proskauer.** Permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el α -naftol. Se usa en la identificación a nivel de especie de bacilos entéricos gramnegativos, *Aeromonas* spp., y *Vibrio* spp.
- **Agar hierro de Kligler.** Mediante esta prueba se puede determinar:
 - a. La capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico (en este caso glucosa, lactosa o ambas) incorporado en un medio de crecimiento básico.
 - b. Producción o no de gases: CO₂ e H₂ como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono.
 - c. Producción de ácido sulfhídrico (SH₂).
- El medio de Kligler contiene como hidratos de carbono la glucosa y la lactosa. Existe otro medio, el *triple sugar iron* (TSI) que posee un tercer hidrato de carbono, la sacarosa.
- **Fermentación de azúcares.** Las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H₂ o CO₂). Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH.
- **Hidrólisis de la esculina.** Hay microorganismos con capacidad de hidrolizar la esculina en esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un compuesto castaño oscuro o negro. El citrato férrico actúa como indicador de la hidrólisis de la esculina. Si se añade bilis al medio se inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos del género *Streptococcus* pero no de la especie *Streptococcus bovis* y tampoco inhibe el crecimiento de microorganismos de los géneros *Enterococcus* y *Listeria*.
- **Coagulasa.** Permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus*. La prueba de la coagulasa en tubo se puede leer tras incubación de 4h, pero si es negativa debe incubarse hasta 24h.
- **Fenilalanina-desaminasa.** Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por la actividad enzimática de la fenilalanina desaminasa, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* por lo que se utiliza para separar estos tres géneros de otros géneros de enterobacterias.
- **ADNasa.** Se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar enzimáticamente el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos.
- **Hidrólisis de la gelatina.** Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas.
- **Descarboxilasas.** La descarboxilación es un proceso en el cual las descarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que la descarboxilación de arginina da citrulina por acción de una dehidrolasa. Esta prueba se debe realizar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso se produce en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6,0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la



descarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador a color violeta. Esta prueba se utiliza tanto en la identificación de bacilos gramnegativos como de bacilos y cocos grampositivos.

- **Lipasa.** Se basa en la capacidad que tienen ciertas bacterias de descomponer las grasas en ácidos grasos y glicerol, por acción de la enzima lipasa.
- **Lecitinasa.** La prueba de la lecitinasa pone de manifiesto la producción de dicha enzima por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la lecitina, sustancia orgánica nitrogenada y fosfatada, contenida principalmente en la yema de huevo.
- **Utilización de citrato.** Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono.
- **Utilización de malonato.** Pone de manifiesto la capacidad que poseen determinadas bacterias de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente liberación del catión, que en presencia de iones agua produce alcalinidad.

Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción tampón produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. Se utiliza en la diferenciación de especies entre las *Enterobacteriaceae*. La mayoría de las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* utilizan malonato de sodio.

- **Prueba de CAMP.** Sirve principalmente para determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la α -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso. En esta prueba la hemólisis producida por algunos microorganismos se inhibe por la β -hemolisina de *S. aureus* (por ejemplo, la producción de fosfolipasa D de *Arcanobacterium haemolyticum* o la fosfolipasa E de *Rhodococcus* spp.)

- **Otras herramientas diagnóstico:**

- **Optoquina.** El clorhidrato de etilhidroxi-cupreína (optoquina) inhibe a muy baja concentración (5 $\mu\text{g/ml}$ o menos) el crecimiento de *S. pneumoniae*, mientras que no afecta al crecimiento de otros *Streptococcus* alfa-hemolíticos.
- **Bacitracina.** Esta prueba puede utilizarse como diagnóstico presuntivo en la identificación de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A de Lancefield, ya que, a diferencia de la mayoría de los estreptococos, suelen ser sensibles a bajas concentraciones de bacitracina.

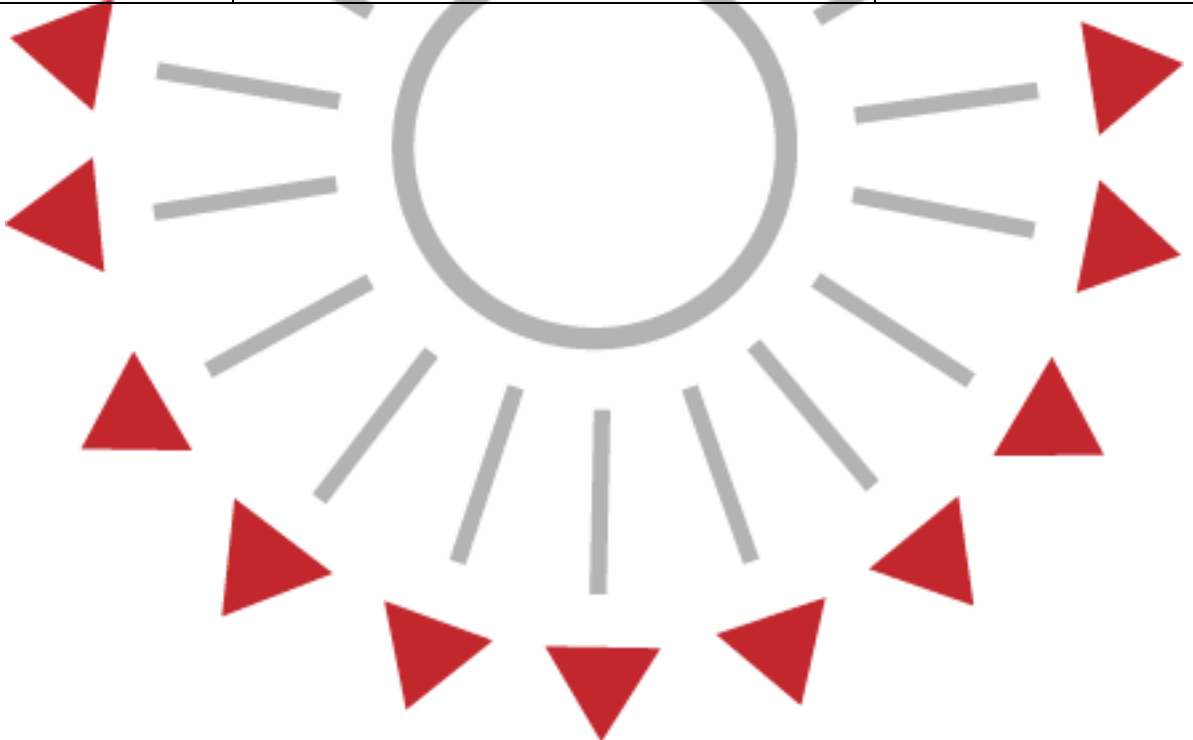


- **Solubilidad en bilis.** Se basa en la capacidad de determinadas especies bacterianas de lisarse en presencia de sales biliares, las más utilizadas de las cuales son el taurocolato y el desoxicolato de sodio. Ambas provocan un descenso de la tensión superficial, que, unido a la actuación de enzimas autolíticas, destruyen la célula. El efecto de esta enzima autolítica se pone de manifiesto sobre colonias de *S. pneumoniae* crecidas en medios sólidos, en las que se aprecia una umbilicación central, y también en colonias mucoides.
- Crecimiento en caldo hipersalino. Determina la capacidad de algunos microorganismos de desarrollarse en medios de cultivo con una concentración de cloruro sódico del 6,5%.
- **SISTEMAS COMERCIALES MULTIPRUEBAS:** Existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipruebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todas exigen unas condiciones precisas en cuanto al inóculo, modo de inoculación, incubación y lectura que, de no seguirse, pueden dar lugar a errores. Estos sistemas pueden ser manuales o estar automatizados.
- **Métodos Proteómicos de identidad bacteriana:**
 - **La proteómica** es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.
 - **Espectrometría de masas.** La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga (m/z). Un ión es un átomo o molécula cargada eléctricamente debido al exceso o falta de electrones. Dado que la mayoría de los iones formados poseen una sola carga, la relación " m/z " es equivalente a " m ".



Parámetros a determinar:

PARÁMETRO	MÉTODO	LÍMITE
MICROBIOLÓGICO		
Cuenta total bacteriana	NOM-092-SSA1-1994	25-250 UFC/placa
Cuenta de mohos y levaduras	NOM-111-SSA1-1994	10-150 UFC/placa
Cuenta total de coliformes	NOM-113-SSA1-1994	15-150 UFC/placa
Patógenos (E. coli, Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa, Salmonella)	NOM-113-SSA1-1994 NOM-114-SSA1-1994	Específico de cada muestra
Otros microorganismos	Protocolos internos, NMX, AOAC, NOM	Específico de cada muestra





REFERENCIAS

1. Isenberg HD, Ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC. ASM Press, 2004.
2. Prats G, Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana, Barcelona 2006.
3. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010 ; 48:1549-1554.
4. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010; 48:444-447.
5. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
6. NOM-113-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.
7. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias en placa.
8. CCAYAC-M-004 Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Método de prueba para la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP), detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por NMP.07-03-2006.
9. NMX-015-SCFI. Alimentos vegetales, determinación de volumen de aceite envasado-método de prueba.
10. NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.
11. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Sancho, J. Bota, E. de Castro, J.J. Editorial Alfaomega. México, D.F. 2002.
12. Laidler, Keith J. Y Meiser John H., Fisicoquímica, CECSA, México, 1997, pág. 987
13. NIELSEN S. (ed); Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 1998.
14. F.L. Hart, H.J. Fischer, Análisis Moderno de los Alimentos, Editorial Acribia. Zaragoza (España) Pág. 1 – 4.
15. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical.