



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPACTO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA IDENTIFICACIÓN  
DE MICROORGANISMOS**

**INFORME DE LA PRÁCTICA PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS MIGUEL DE LOS RIOS BOYER**

**Tutor: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios**

**Ciudad Universitaria, CD.MX. a 19 de octubre de 2021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios**

**VOCAL:**                   **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Norma Angelica Castellanos Chávez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**BRUKER MEXICANA S.A DE C.V**

**ASESOR DEL TEMA:**

**RODOLFO PASTELÍN PALACIOS**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rodolfo Pastelín Palacios', is written over a grid of horizontal and vertical lines. The signature is somewhat stylized and cursive.

**SUSTENTANTE (S):**

**LUIS MIGUEL DE LOS RIOS BOYER**

# Indice

.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	4
Abreviaturas.....	5
1.- INTRODUCCION.....	6
Bruker. ....	6
La Microbiología actualmente.....	7
Fundamento de los sistemas de Espectrometría de Masas para la identificación de microorganismos.....	8
2.- Objetivos.....	11
3.- Actividades desarrolladas:.....	12
Flujo de trabajo en Espectrometría de Masas para la identificación de microorganismos.....	12
Transferencia directa <sup>(1)</sup> :.....	13
Transferencia Directa Extendida <sup>(1)</sup> :.....	14
Extracción con ácido fórmico <sup>(1)</sup> .....	14
Comparación de espectros e identificación.....	15
Hongos Filamentosos, Micobacterias y Hemocultivos.....	18
Actividades desarrolladas en Bruker de 2011 al 2021.....	21
Impacto del uso de Espectrometría de masas como herramienta para la identificación de microorganismos en los laboratorios clínicos.....	22
Aplicaciones fuera del ámbito clínico. ....	24
4.- Conclusiones.....	26
Perspectivas y avances en el futuro.....	27
5.- Referencias: .....	28
6.- Bibliografía.....	28
7.- Anexo 1: Técnicas tradicionales de identificación microbiana.....	30

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un Sistema MALDI-TOF .....	9
Figura 2 . Diagrama de Flujo de trabajo para identificación de microorganismos por medio de Espectrometría de Masas. Imagen obtenida del Catalogo MALDI Biotyper RUO, Bruker Daltonics 2015.12	
Figura 3. Impacto del método de preparación de muestra en la identificación. ....	15
Figura 4. Espectro de masas de Pseudomonas oleovorans en 7 medios de cultivo diferentes con espectros de masas sin cambios significativos. ....	16
Figura 5 Comparación de Espectros y asignación de valores de calificación.....	17
Figura 6 Diagrama de Flujo de trabajo para hongos filamentosos.....	18
Figura 7 . Resumen del flujo de trabajo para Micobacterias.....	20
Figura 8 . Flujo de trabajo para la preparación de muestras en hemocultivos positivos.....	21
Figura 9. Mecanismo simplificado de acción de las beta-lactamasas .....	24

## **Abreviaturas**

MALDI – Por sus siglas en inglés Ionización Desorción Laser Asistida por Matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

TOF – Por sus siglas en inglés Tiempo de Vuelo (Time Of Flight)

FT-IR – Por sus siglas en inglés Infrarrojo por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infra-Red)

MSP – Por sus siglas en inglés Perfil Espectral Principal (Main Spectra Profile)

RPM – Revoluciones por minuto

# 1.- INTRODUCCION.

## **Bruker.**

Bruker es una de las empresas más importantes a nivel mundial en el desarrollo de tecnología para la Química analítica con más de 6000 empleados a nivel mundial, es una empresa con una trayectoria de más de 50 años desarrollando y comercializando equipos de Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopia Infrarrojo, Cristalografía de Rayos X, Fluorescencia de Rayos X, sistemas de detección para microscopia electrónica, espectrómetros de emisión óptica y Espectrometría de Masas.

Los productos de los cuales soy responsable se clasifican en 3 grupos principalmente:

- **Sistemas Electrospray:**
  - Dentro de estos se cuenta con sistemas de trampas de iones y sistemas híbridos Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo, con los cuales se pueden llevar a cabo análisis en las áreas de Metabolómica, Proteómica, análisis de moléculas pequeñas como productos de síntesis, fármacos, detección de drogas de abuso, monitoreo de pesticidas entre otras.
- **Sistemas Triple Cuadrupolares:**
  - Estos sistemas son los más comercializados a nivel mundial, estos equipos se utilizan regularmente acoplados a un sistema de separación por cromatografía ya sea de líquidos o de gases. Las aplicaciones principales son la cuantificación de moléculas pequeñas en concentraciones bajas, como pueden ser pesticidas, drogas de abuso, productos de síntesis, cuantificación de drogas de abuso, estudios de bioequivalencia y pruebas de dopaje.
- **Sistemas MALDI:**
  - Estos sistemas cuentan con analizadores de masas por tiempo de vuelo, y pueden realizar estudios de Masas y Masas/Masas. Las principales aplicaciones son en las áreas de Proteómica, polímeros, imagenología molecular de tejidos, análisis de placas de cromatografía en capa fina, e identificación de microorganismos.

Uno de los productos que más desarrollo e impacto han tenido es el sistema de identificación de microorganismos por medio de Espectrometría de Masas MALDI Biotyper, con más de 4000 equipos a nivel mundial de los cuales 53 han sido instalados en México en los últimos 8 años, el MALDI Biotyper es el producto líder en el mercado de identificación de microorganismos por espectrometría de masas, y debido al impacto que tiene para las áreas de la salud y su potencial para otros mercados como son la industria farmacéutica, la alimentaria, bebidas y agropecuaria, a continuación se describe el funcionamiento del mismo y el impacto que ha tenido en los laboratorios de microbiología.

## **La Microbiología actualmente.**

Una de las actividades más importantes en el laboratorio clínico es la identificación de agentes infecciosos, como son las bacterias, levaduras y hongos. De esta identificación en muchos casos depende el tratamiento que se ofrece a los pacientes, mejorando de esta forma la recuperación de estos.

Actualmente en la mayoría de los laboratorios la identificación de bacterias se realiza de manera rutinaria por medio de pruebas fenotípicas como las tinciones, el cultivo de muestras y las características de crecimiento, así como por pruebas bioquímicas. A pesar de que algunas de estas pruebas se realizan en cuestión de unos minutos, la identificación completa se lleva a cabo en unas horas en el mejor de los casos, y en otros hasta varios días para microorganismos como el género *Mycobacterium* que puede tardar de 4 a 6 semanas para crecer en el laboratorio al igual que el género *Brucella* que además de tener un periodo de incubación de 4 semanas requiere de un ambiente rico en CO<sub>2</sub> para poder desarrollarse, e incluso existen algunos microorganismos que no pueden cultivarse de manera tradicional como son los casos de *Chlamydia* que solo crece en células humanas, por lo que se requiere usar un cultivo celular como medio para su crecimiento o el caso del *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis, el cual se cultiva en conejos. Todas estas metodologías, al consumir tanto tiempo dificultan el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que sufren de una infección, lo cual puede ser de alto impacto en infecciones como Sepsis o Infecciones en el sistema nervioso central en las cuales la tasa de mortalidad aumenta conforme el paciente se encuentra expuesto al microorganismo.



**Espectrometría de Masas:** Esta prueba consiste en el análisis de las proteínas ribosomales de las bacterias las cuales se encuentran altamente conservadas en las mismas, siendo ideales para la identificación. Por medio de la ionización de dichas proteínas y la comparación del patrón de estas contra una base de datos se obtienen resultados de identificación de género y especie de la bacteria en unos minutos posteriores al crecimiento de esta. Cuando se generan las bases de datos, se selecciona que proteínas ribosomales serán las utilizadas como patrón para la identificación, seleccionándose por lo general las que se encuentren en mayor proporción y tengan una resolución de masas adecuada. Muestra por muestra la técnica de espectrometría de masas es la más económica, aunque la inversión inicial es alta, el costo beneficio es igualmente alto al tener resultados rápidos y precisos con una técnica sencilla de utilizar.

## **Fundamento de los sistemas de Espectrometría de Masas para la identificación de microorganismos.**

La espectrometría de masas es un método de análisis molecular, por medio del cual se puede calcular la masa molecular de un compuesto. Esto se hace mediante la interacción entre una molécula eléctricamente cargada con un analizador de masas por medio del uso de fuerzas electrostáticas. El resultado obtenido de esta interacción es la relación entre la masa y la carga de la molécula ( $m/z$ ). La principal ventaja de esta técnica es la alta sensibilidad de la misma, permitiéndonos analizar muestras de concentración en el orden de femtomol, lo cual la convierte en la técnica de elección para el análisis de moléculas como proteínas, enzimas y neurotransmisores, los cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en los organismos vivos. Complementándola con otras técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear, o la espectroscopia FT-IR permite el análisis y determinación de la masa y estructura molecular de los compuestos de interés.

Para el caso específico de la identificación de microorganismos el tipo de espectrometría de masas utilizado requiere de una ionización de tipo Desorción y Ionización Laser Asistida por Matriz (MALDI por sus siglas en inglés) asociada a un analizador de masas de Tiempo de Vuelo (TOF por sus siglas en inglés).

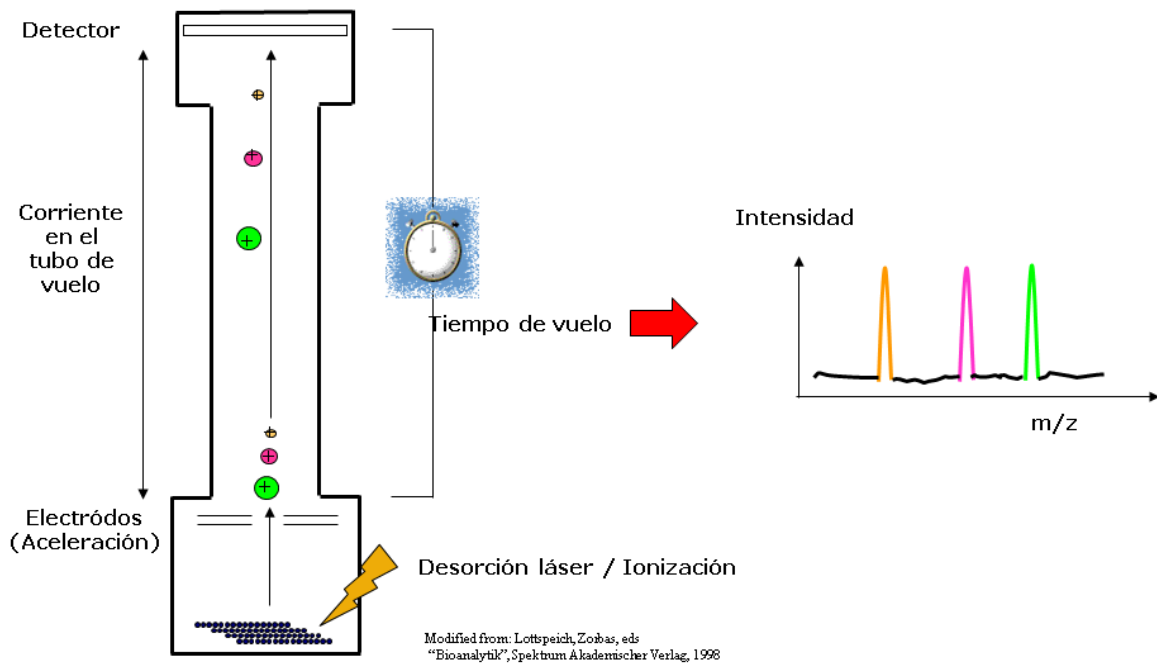


Figura 1 Esquema de un Sistema MALDI-TOF

En la figura 1 se muestra de manera esquemática el funcionamiento de un sistema MALDI-TOF, en donde el sistema dispara un láser sobre la muestra, la energía del láser es transferida a través de la Matriz hacia la muestra ionizando la misma y generándose un proceso de desorción dejando las moléculas cargadas en fase gaseosa.

Dichas moléculas pueden ser proteínas, lípidos, polímeros sintéticos e incluso moléculas pequeñas como fármacos o metabolitos.

Posterior a esto la muestra ya ionizada es lanzada por medio de un pulso electromagnético para que la misma vuele recorriendo el tubo de vuelo el cual se encuentra en condiciones de alto vacío hasta impactar con un detector. La separación de las moléculas durante este periodo de vuelo se debe únicamente a su diferencia de masa, ya que el tubo de vuelo se encuentra en condiciones de alto vacío para evitar que las moléculas de interés sean desviadas de la ruta de vuelo, o bien impacten con otras moléculas pudiendo generar fragmentaciones o pérdidas de carga haciendo que el análisis sea menos preciso. Durante este periodo de vuelo, las moléculas se van separando de acuerdo con su masa, ya que las de menor masa volarán más rápido a través de tubo y las de mayor masa molecular volarán más lento separándose y permitiendo la asignación de la masa correspondiente. La condición de alto vacío ( $6-9 \times 10^{-7}$  mbar) es de suma importancia, ya que si en el tubo de vuelo se encuentran moléculas con las que puedan

impactar los analitos, estos pueden fragmentarse en moléculas más pequeñas, dando como resultado masas diferentes a las de la molécula original. Este tipo de fragmentación se puede realizar en condiciones controladas para producir fragmentos específicos, obteniéndose información útil para la identificación de moléculas y para la elucidación de la estructura molecular.

Para la correcta asignación de masas, es necesario llevar a cabo una calibración del sistema con una serie de estándares de masa conocida, los cuales se analizan bajo las mismas condiciones que las muestras de interés. Se determina el tiempo de vuelo de cada masa del estándar, construyendo de esta forma una curva de calibración de masas contra la cual se interpolan los tiempos de vuelo de las moléculas de interés determinándose así la masa de las mismas. Algunos estándares de calibración pueden ser mezclas de formiatos, mezclas de péptidos, mezclas de proteínas, los cuales se eligen de acuerdo con el rango de masas en el que se va a trabajar,

Las dos mayores ventajas de la aplicación de esta técnica para la identificación microbiológica son la rapidez de identificación, ya que posterior al crecimiento del microorganismo la identificación del género y la especie de este se lleva a cabo en aproximadamente 5 minutos incluyendo la preparación de la muestra, y la segunda ventaja es la alta precisión de la identificación del que es superior al 95%, dando resultados comparables con las técnicas de PCR.

## 2.- Objetivos.

Conocer el funcionamiento de los sistemas MALDI Biotyper para la identificación de microorganismos, así como el impacto que ha tenido esta técnica en los laboratorios de análisis microbiológico.

Describir el uso de esta tecnología, así como sus innovaciones en el área de resistencia a antibióticos, el uso en el diagnóstico de sepsis de manera rápida y precisa y su aplicación en áreas industriales como alimentos y farmacéutica.

Describir de manera general las actividades que he tenido dentro de la empresa Bruker a lo largo de 10 años con énfasis especial en la división de Microbiología.

### 3.- Actividades desarrolladas:

Dentro de las actividades fundamentales en Bruker ha estado la capacitación de usuarios en el uso de las soluciones en el área de microbiología, así como brindar soporte técnico tanto a usuarios como distribuidores, los temas principales que se cubren en estas actividades se desarrollan a continuación.

### Flujo de trabajo en Espectrometría de Masas para la identificación de microorganismos.

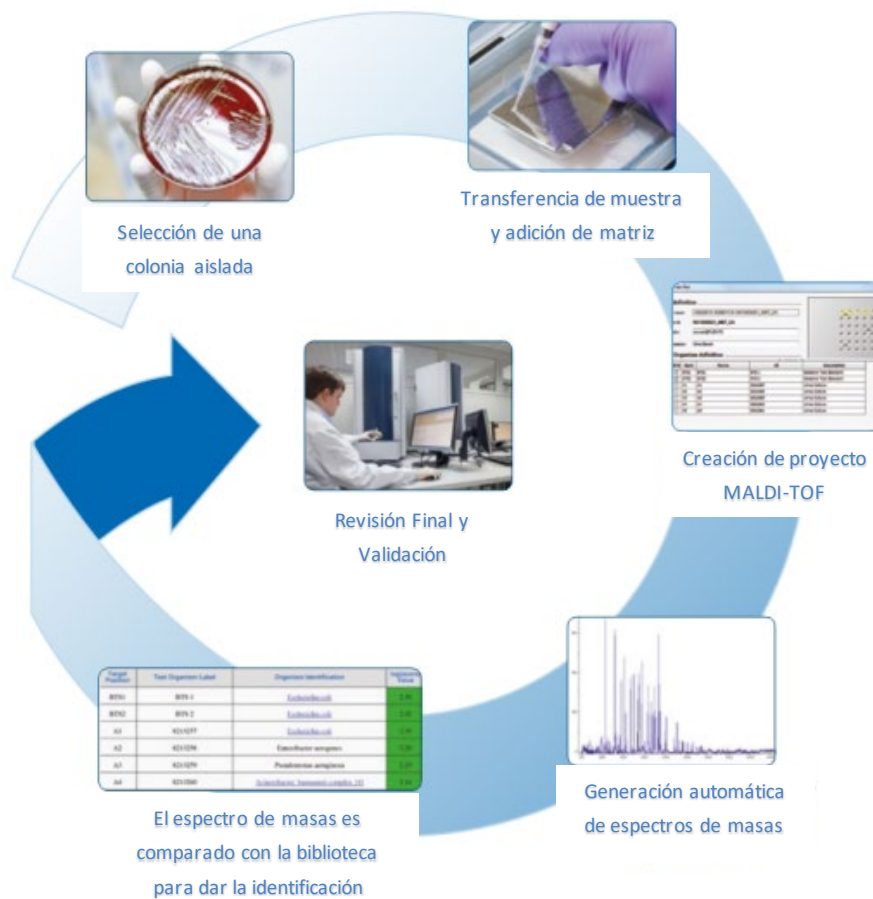


Figura 2 . Diagrama de Flujo de trabajo para identificación de microorganismos por medio de Espectrometría de Masas. Imagen obtenida del Catalogo MALDI Biotyper RUO, Bruker Daltonics 2015

Dependiendo del tipo de microorganismo que se desee identificar se debe llevar a cabo un protocolo de preparación de muestra, por medio del cual nos aseguraremos de obtener los mejores resultados posibles.

El primer paso es la recolección de la muestra y el cultivo de esta. Dependiendo del ámbito en el que se esté trabajando, las muestras pueden proceder de diferentes orígenes. En el caso de infecciones las muestras pueden venir de exudados, tomas de fluidos biológicos (Sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, entre otros).

Así mismo esta tecnología de identificación se puede utilizar en los ámbitos de la investigación, ambiental, bio-remediación, biosíntesis, industriales y en cualquier sitio en donde sea necesario realizar la identificación de microorganismos.

Una vez que la muestra ha sido recolectada, es necesario que la misma sea sembrada e incubada por un periodo de 18 a 24 horas, en este paso se pueden utilizar medios de cultivo enriquecidos, selectivos o incluso cromogénicos, con la finalidad de que cualquier microorganismo pueda reproducirse. Se requiere de un cultivo puro del microorganismo y biomasa suficiente ( $10^4$ - $10^5$  células bacterianas) para obtener una buena señal por lo que se deben tener las precauciones necesarias para ello. Debido a que se analizan las proteínas del microorganismo el medio de cultivo utilizado no tiene ningún impacto real en el proceso de identificación al no tomarse en cuenta el metabolismo del microorganismo. Así mismo, se pueden usar cultivos crecidos en medios sólidos o líquidos para realizar la identificación.

### **Transferencia directa (1):**

Una vez que se tiene el crecimiento del microorganismo, se debe seleccionar una colonia aislada, y una cantidad pequeña de biomasa es transferida a la placa de identificación, esta placa cuenta típicamente con 48 o 96 espacios para la identificación de este número de muestras.

Para el caso de los medios líquidos, lo que se debe hacer es concentrar por centrifugación la muestra a, desechar el sobrenadante y tomar un microlitro de biomasa del fondo transfiriéndolo a la placa de identificación.

Una vez que la muestra ha sido colocada en la placa, se debe agregar un microlitro de Matriz, para el caso de la identificación de microorganismos dicha Matriz se trata de un Ácido Orgánico (Acido 2-Ciano-3-(4-hidroxifenil)acrílico o HCCA) el cual debe cumplir con características de pureza para trabajar en espectrometría de masas (Grado

Espectrometría de Masas). Al hacerse el disparo del láser sobre la muestra, la matriz transfiere la energía del láser a la muestra haciendo que el microorganismo se lise, con lo cual se liberan y se ionizan las proteínas las cuales son analizadas.

### **Transferencia Directa Extendida (1):**

Se le llama transferencia directa extendida por que requiere de un paso adicional que consiste en la adición de un microlitro de ácido fórmico a la muestra antes de colocar la matriz, una vez que el ácido se ha secado a temperatura ambiente se agrega la matriz y se continua con la identificación de la misma manera que en la transferencia directa.

El ácido fórmico favorece la ruptura de la membrana y la pared celular, y ayuda a obtener una mejor ionización de las proteínas, obteniéndose así un espectro de masas más limpias, y por ende un resultado más confiable.

Esta metodología se recomienda para microorganismos que por la naturaleza de sus paredes celulares pueden presentar dificultades de identificación como son los géneros *Corynebacteria*, *Nocardia*, *Actinomyces*, las levaduras y hongos filamentosos.

### **Extracción con ácido fórmico (1).**

Este método se basa en la extracción de las proteínas para su análisis directo. Para ello se coloca en un tubo de microcentrífuga 300 µL de agua y se agrega una colonia grande del cultivo bacteriano, esta mezcla se lleva a agitación con vortex, después se agregan 900 µL de etanol y se agita de nuevo con vortex. La mezcla se centrifuga a una velocidad entre 13,000 y 15,000 rpm por dos minutos, se decanta el etanol y se vuelve a centrifugar, posterior a esto se remueve todo el exceso de etanol y se agregan 50 µL de ácido fórmico al 70%, se agita de nuevo con vortex, se agregan 50 µL de acetonitrilo al 100%, se agita de nuevo con vortex, se centrifuga de nuevo por 2 minutos, y se toma un microlitro del sobrenadante y se coloca en la placa de análisis, una vez seca la muestra se agrega un microlitro de matriz, se deja secar nuevamente a temperatura ambiente y se hace la identificación. Este método se recomienda para microorganismos que por la naturaleza de sus paredes celulares presentan dificultades en la identificación como *Corynebacteria*, *Nocardia* o *Actinomyces*, así como para la creación de bibliotecas propias con microorganismos que no se encuentran en las bases de datos comerciales.

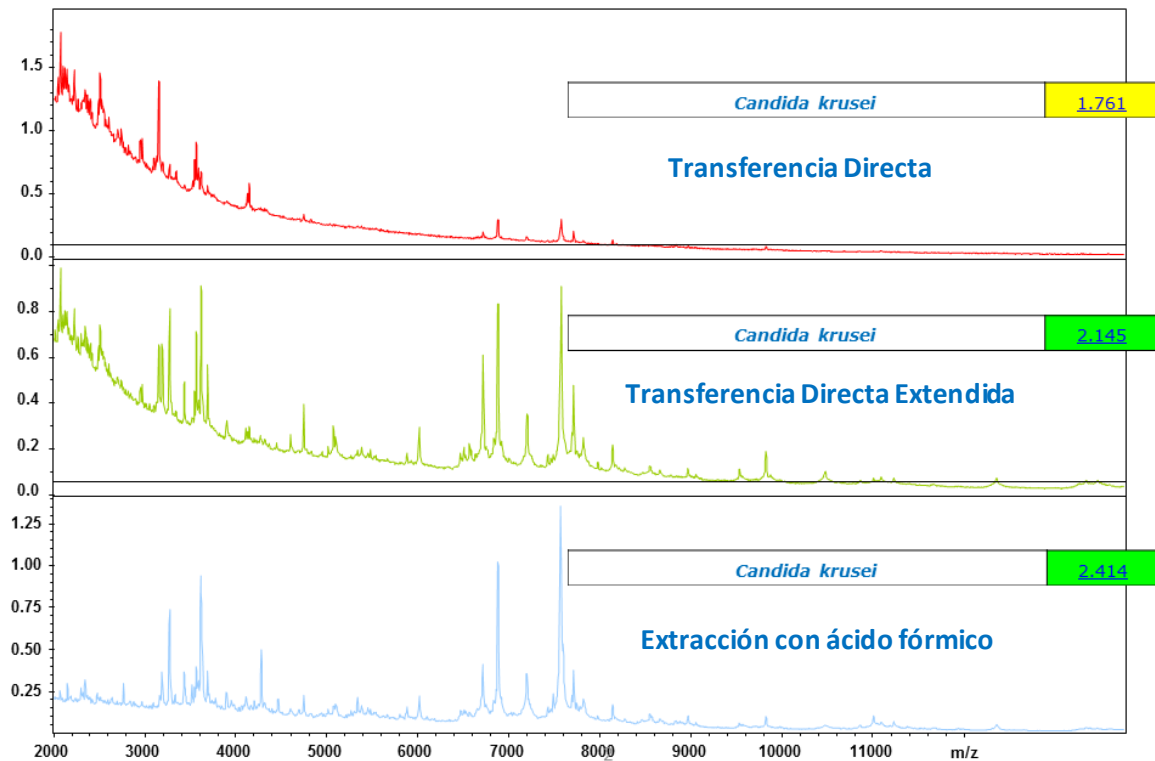


Figura 3. Impacto del método de preparación de muestra en la identificación.

En la figura 3 se muestra un comparativo de identificaciones realizadas por los tres métodos antes mencionados para una muestra de *Candida krusei*, el caso superior muestra el resultado del análisis por transferencia directa, el cual da un espectro de masas con picos de intensidades muy bajas, y un nivel muy alto de ruido en la parte izquierda correspondiente a masas entre 2000 y 6000 Dalton.

El segundo caso nos muestra como la adición de ácido fórmico mejora la intensidad de los picos en todo el espectro, y disminuye el nivel de ruido en las masas entre 2000 y 6000 Dalton, mejorando así la calidad de la identificación.

Por último, el caso de la extracción con ácido fórmico elimina prácticamente el ruido por completo, y da mejores intensidades en todos los picos de espectro, dando la mejor identificación de todas.

### Comparación de espectros e identificación.

Una vez preparada la muestra y realizado el análisis, el sistema obtiene un espectro de masas que es específico del microorganismo analizado.



El rango de masas dentro del que se realiza el análisis es de 2000 a 20,000 Dalton, con lo cual se cubre una gran parte de las proteínas ribosomales, las cuales son las más abundantes en los microorganismos y no se ven influenciadas por las condiciones de crecimiento de estos, son fáciles de ionizar y fáciles de analizar por tiempo de vuelo. Debido a que se ignoran las masas por debajo de 2000 Dalton, no se observan los metabolitos, los cuales si pueden variar de acuerdo con el medio de cultivo y condiciones de crecimiento. En la figura 4 se muestra una serie de identificaciones de *Pseudomonas oleovorans* en diferentes medios de cultivo, pudiéndose apreciar que no hay cambios significativos en el espectro de masas.

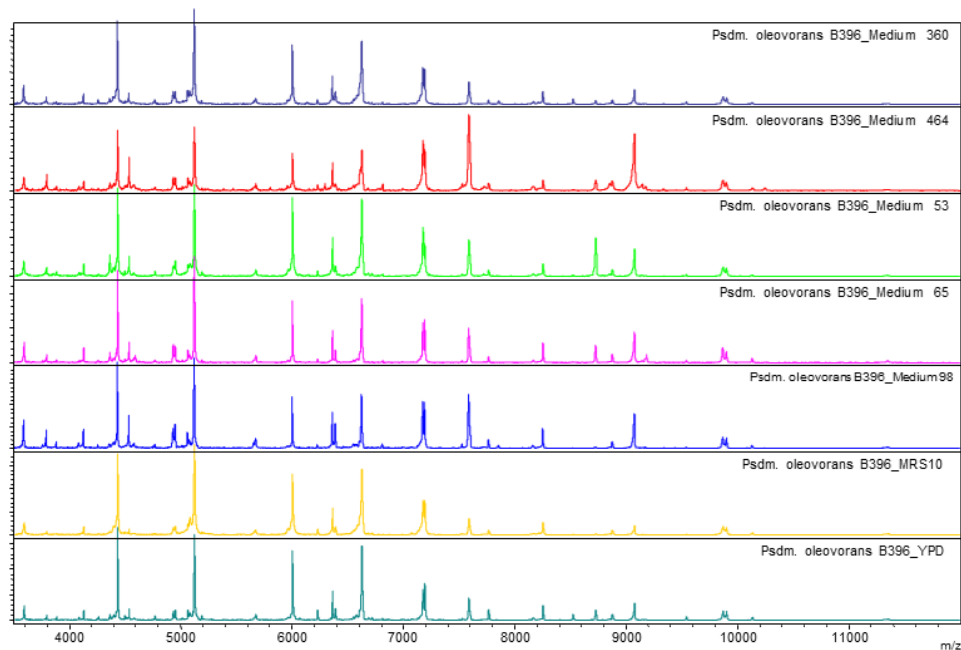


Figura 4. Espectro de masas de *Pseudomonas oleovorans* en 7 medios de cultivo diferentes con espectros de masas sin cambios significativos.

Una vez obtenido el espectro, el mismo es comparado con la base de datos, buscando coincidencias en base al espectro desconocido, a los espectros de referencia y a la correlación de las intensidades de las masas coincidentes. Para ello la base de datos del sistema cuenta con varios espectros de referencia para cada género y especie llamados MSP (Por sus siglas en ingles "Main Spectrum Profile"), con lo cual se cubren las diferentes cepas y variaciones de una misma especie, favoreciendo que haya una mejor identificación de los microorganismos. Bruker cuenta con 3 bases de datos, una que incluye 1603 bacterias gran positivas, 1379 gran negativas, 216 levaduras y 41 hongos

filamentosos, una base de datos específica con 178 especies de micobacterias y una específica de hongos filamentosos con 180 especies.

En la figura 5 se muestra un ejemplo de cómo se realiza el cálculo de la calificación de identificación, el espectro desconocido es comparado con todos los MSP de la base de datos de manera automatizada, cada uno de los comparativos arriba mencionados pueden obtener una calificación máxima de 10, después estas tres calificaciones son multiplicadas entre sí (con un resultado máximo de 1000), y se calcula el logaritmo de este número, obteniéndose una calificación máxima de 3 para la identificación.

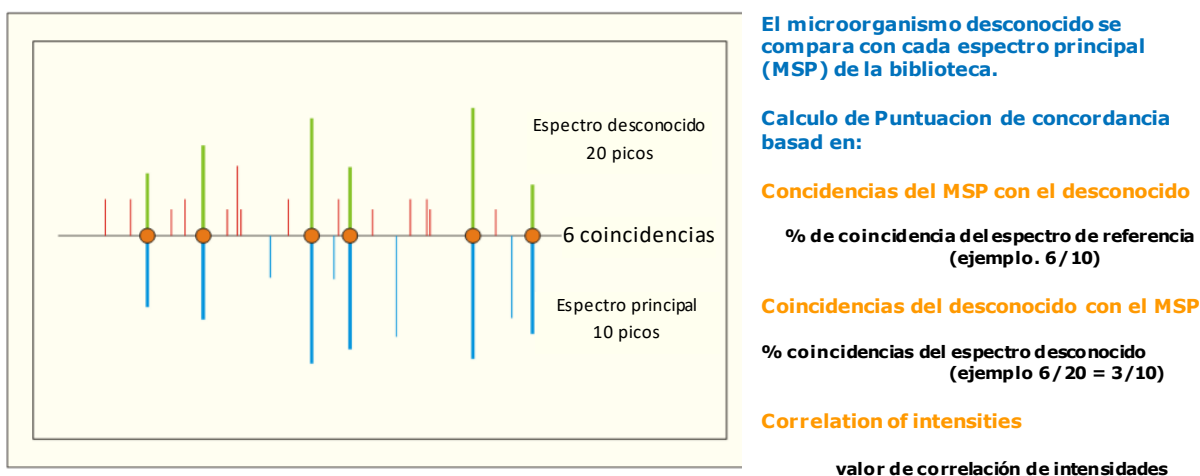


Figura 5 Comparación de Espectros y asignación de valores de calificación.

El sistema asigna la calificación a la identificación y de acuerdo con la misma en el resultado asigna un código de color y en un sistema de cruces, como se muestra en la tabla 1.

Rango	Descripción	Símbolos	Color
2.300...3.000	Identificación de Especie altamente probable.	(+++)	Verde
2.000...2.299	Identificación de especie probable, identificación de género asegurada.	(++)	Verde
1.700...1.999	Identificación de genero probable	(+)	Amarillo
0.000...1.699	Identificación no confiable	(-)	Rojo

Tabla 1. Asignación de calificación, color y código de cruces.

## Hongos Filamentosos, Micobacterias y Hemocultivos.

### *Hongos Filamentosos*

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema tiene la capacidad de identificar bacterias, levaduras, hongos filamentosos y micobacterias. De estos microorganismos, las bacterias y levaduras son en su mayoría analizadas usando los flujos de trabajo antes mencionados, para el caso de los hongos filamentosos y las micobacterias existen protocolos específicos ya que las características de estos microorganismos hacen que la obtención de las proteínas ribosomales sea más laboriosa, por lo que se han desarrollado protocolos específicos para dichos microorganismos.

En el caso de los hongos filamentosos se requiere de una siembra en un medio de cultivo liquido el cual se incuba en un agitador rotativo para tubos a una velocidad de 20 RPM durante un periodo de 24 a 48 horas, con lo que se obtiene el micelio del hongo evitando el crecimiento de esporas, las cuales no permiten una buena identificación de este. Una vez terminado este periodo se procede con los flujos de trabajo antes mencionados hasta finalizar la identificación. La base de datos general del equipo contiene algunas entradas para identificación de Hongos filamentosos, y se cuenta con una base de datos dedicada solamente a la identificación de hongos filamentosos.

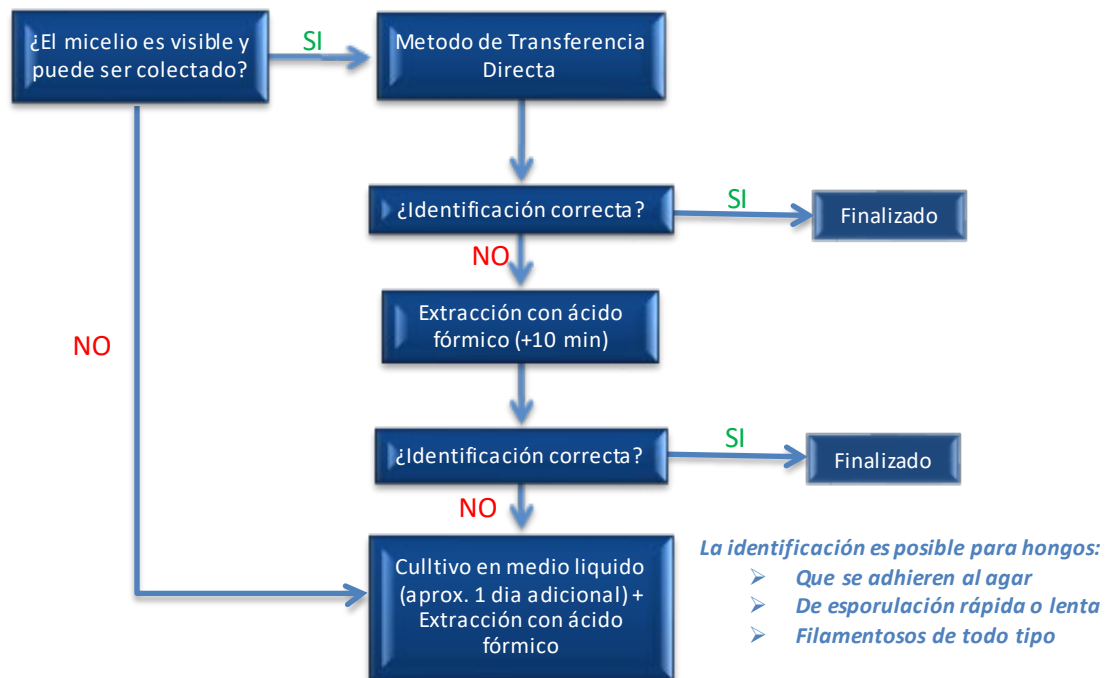


Figura 6 Diagrama de Flujo de trabajo para hongos filamentosos.

## *Micobacterias*

Para el caso de las micobacterias, debido a que es un género potencialmente peligroso por lo que requiere manejo con un nivel de bioseguridad 3, una vez que se obtiene el crecimiento de las mismas en medios adecuados para su crecimiento, el primer paso a seguir es una inactivación de las mismas, para las muestras cultivadas en medio sólido esto se realiza colocando en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL 300 µL de agua, aquí se transfiere biomasa del cultivo de Micobacterias utilizando un asa de cultivo de 1 microlitro se transfieren 2 asadas completas. Para el caso de los cultivos líquidos, se deja sedimentar el medio por 10 minutos y se toma 1.2 mL del fondo del tubo este volumen se transfiere a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se centrifuga y descarta el sobrenadante, la biomasa resultante se suspende en 300 microlitros de agua. A partir de aquí el proceso es el mismo para todas las muestras, se lleva a la inactivación por calor, en baño maría a 100°C por 30 minutos o en un calentador de bloque seco. Terminada la inactivación se deja enfriar la muestra, y una vez a temperatura ambiente se agrega 900 microlitros de Etanol absoluto, se suspende en vortex y se vuelve a centrifugar la muestra por dos minutos a 15000 RPM, se decanta el sobrenadante, y se centrifuga de nuevo y con ayuda de una micropipeta se elimina el resto del líquido de la muestra. Se deja secar el pellet 2 minutos a temperatura ambiente y se agregan de 10 a 50 microlitros (dependiendo del tamaño del pellet) de acetonitrilo puro y se agita con vortex. Se agrega una punta de micro espátula de perlas de zirconio de 0.5 mm de diámetro y se agita con vortex a máxima velocidad por un minuto con la finalidad de ayudar a romper las paredes celulares de las bacterias. Posteriormente se agrega ácido fórmico al 70% en un volumen igual al de acetonitrilo, se homogeniza en vortex y se centrifuga a 15000 RPM por 2 minutos. Se toma un microlitro del sobrenadante, el cual se coloca en la placa de análisis. Una vez que este se seca a temperatura ambiente se coloca un microlitro de matriz, se deja secar a temperatura ambiente y se analiza en el sistema.

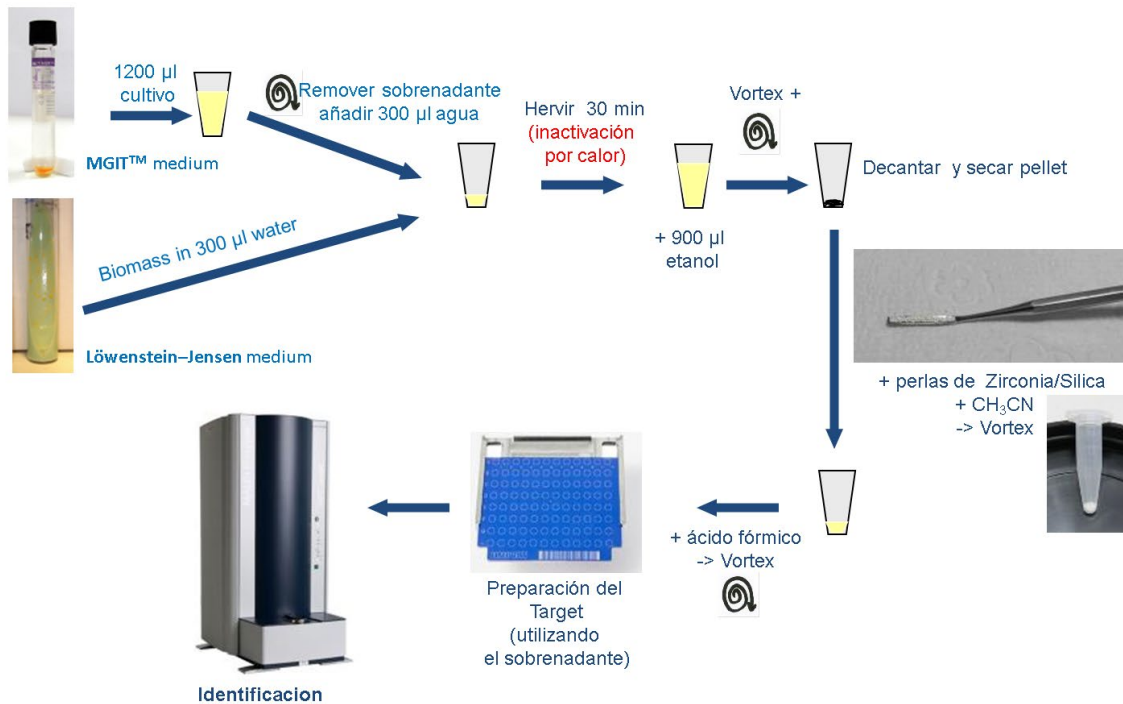
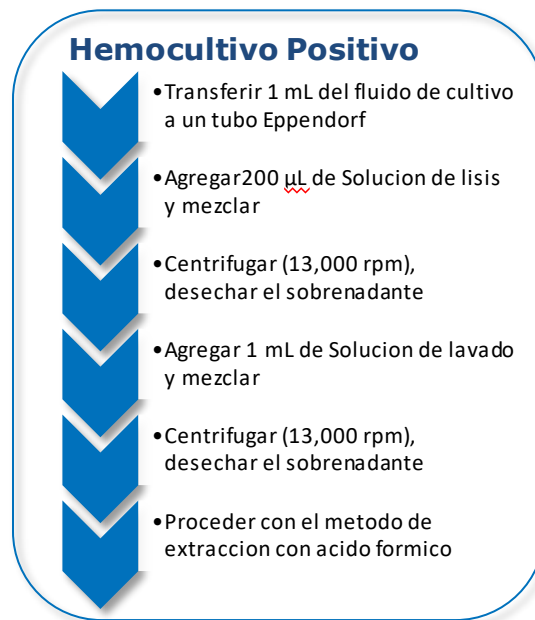


Figura 7. Resumen del flujo de trabajo para *Micobacterias*

### Hemocultivos

En el laboratorio clínico uno de los estudios más importantes en el área de microbiología es la identificación de hemocultivos positivos en los casos de bacteriemias. En estos casos la identificación rápida de las bacterias puede significar una diferencia importante en la cura de dicha infección, por lo que se ha desarrollado un método en el que una vez que se tiene un hemocultivo positivo se lleva a cabo un procedimiento de extracción de la muestra directamente del hemocultivo para la obtención de las proteínas del microorganismo y se logre la identificación en el sistema. La figura 8 muestra un resumen de este procedimiento.



*Figura 8 . Flujo de trabajo para la preparación de muestras en hemocultivos positivos*

El objetivo de este procedimiento es la eliminación del paquete celular y las proteínas sanguíneas, para que solamente los microorganismos que se han desarrollado durante el periodo de cultivo sean los que se analicen en el sistema de masas. Una vez se finalizan estos lavados, el pellet que se obtiene se somete al procedimiento de extracción con ácido fórmico detallado anteriormente para lograr la identificación del microorganismo.

### **Actividades desarrolladas en Bruker de 2011 al 2021.**

A lo largo de diez años en Bruker he desarrollado actividades de servicio técnico, soporte y capacitación a usuarios, capacitación de personal interno, actividades gerenciales de la unidad de negocio para Mexico, Centroamérica y la región de los Andes, y durante los últimos 3 años responsabilidad de la línea de negocios de Microbiología y Diagnostico para toda Latinoamérica, tanto en el área comercial como en la parte de soporte de aplicaciones a usuarios y distribuidores de nuestros productos.

Durante este tiempo estuve involucrado en la implementación de más de 80 instrumentos MALDI Biotyper, desarrollándome en las áreas de soporte técnico y recientemente en el área comercial trabajando con distribuidores y directamente con usuarios en 19 de los 20 países soberanos de Latinoamérica. Así mismo he sido

responsable de las presentaciones técnicas y comerciales en diversos congresos, ferias y exposiciones comerciales con la finalidad de divulgar y promover el uso de esta técnica.

## **Impacto del uso de Espectrometría de masas como herramienta para la identificación de microorganismos en los laboratorios clínicos.**

Como se mencionó anteriormente, las metodologías tradicionales de identificación microbiológica implican en el mejor de los casos, tiempos de análisis de 48 a 72 horas a partir de que la muestra se recibe en el laboratorio. El uso de tecnologías rápidas de identificación tiene un impacto directo en el manejo del paciente, en los resultados clínicos y en el costo económico derivado de estos.

El impacto económico del uso de esta tecnología se centra en el análisis de la relación costo-beneficio en los laboratorios. Si bien, la inversión inicial para adoptar esta tecnología es ronda alrededor de los cinco millones de pesos se debe tomar en cuenta que el costo por identificación es de aproximadamente veinte pesos por muestra, una cifra significativamente menor a los costos de las metodologías tradicionales que pueden ir desde los cien pesos por muestra para el caso de pruebas bioquímicas manuales, hasta varios miles de pesos para el caso de las metodologías de secuenciación genética.

Esta diferencia de costos hace que la adopción de la espectrometría de masas represente un ahorro para el laboratorio clínico y de entre el 60 y el 80%, esto sin considerar los tiempos adicionales de cultivos, las placas para los cultivos recurrentes, o bien el uso de los reactivos para amplificación de secuencias en el caso de la secuenciación genética; a todo esto se suma la ventaja de la disminución en la generación de desechos por parte del laboratorio, lo cual además de un impacto económico también genera un impacto ambiental.

El segundo punto de impacto que tiene esta tecnología se da en la disminución del tiempo requerido para la identificación microbiana, ya que con las técnicas tradicionales por pruebas bioquímicas la identificación se da en un periodo de al menos 24 horas posteriores al primer cultivo, mientras que con los sistemas de espectrometría de masas este tiempo se reduce a un total de 6 a 8 minutos por muestra incluyendo la preparación de estas. Dependiendo de la tecnología utilizada, se puede hablar de un tiempo de 30-60 minutos para el análisis de 96 muestras, incluyendo el tiempo necesario para la preparación de estas, lo cual implica una reducción de tiempo de

más de 50 veces comparado con la identificación fenotípica, y más de 150 veces comparado con las técnicas de genotipificación, sumado a esto la gran diversidad de microorganismos disponible en las bases de datos actuales teniendo acceso a 3239 especies de bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras y hongos filamentosos en la base de datos principal y la opción de ampliarla con una base de datos de 178 especies de micobacterias y otra con 180 especies de hongos filamentosos.

La reducción del tiempo de identificación a partir de cultivos en placa va de las 8 horas a más de un día dependiendo del tipo de microorganismo y la preparación de muestra que se lleve a cabo. Es importante destacar que con el uso de esta tecnología se logra identificar aproximadamente el 85% de las muestras durante las primeras 24 horas a partir del cultivo, mientras que para las metodologías tradicionales este valor es de aproximadamente un 10%.

Para el caso de los hemocultivos, la reducción de los tiempos de identificación a partir de la toma de muestra va de las 23 a las 37 horas, esto dependiendo de las rutinas de trabajo de cada laboratorio., ya que en algunos casos los hemocultivos positivos se procesan tan pronto como se detecta el crecimiento, y en otros casos se tiene horarios específicos para el tratamiento de este tipo de muestras.

El tercer punto del impacto generado por la implementación de esta técnica es en el manejo de los pacientes y de los resultados clínicos. La correcta y rápida identificación microbiana brinda al médico a cargo del tratamiento del paciente la oportunidad de ajustar el tratamiento antibiótico en etapas más tempranas de la infección, lo cual implica una reducción en las tasas de mortalidad asociadas a dichas infecciones que pueden ir del 6 hasta un 20%, así como la reducción en la estancia hospitalaria del paciente, la cual se reduce en periodos de 3 a 5 días, lo cual trae como consecuencia una reducción de costos para el hospital de entre 60 y hasta 300 mil pesos.

Un tema importante es la resistencia a antibiótico para la cual, en la mayoría de los casos, aun es necesario llevar a cabo las determinaciones por vías tradicionales enfrentado al microorganismo a diferentes concentraciones de antibiótico a probar y determinando en base al crecimiento de este si es resistente o susceptible al mismo. Sin embargo, a través de la técnica de espectrometría de masas se pueden determinar algunos biomarcadores de resistencia de forma directa, permitiendo adecuar el tratamiento desde etapas tempranas del diagnóstico. Como un ejemplo, *Klebsiella pneumoniae* tiene la capacidad de generar carbapenemasas mediadas por un plásmido brindándole resistencia a la mayoría de los betalactámicos, este plásmido puede ser detectado por espectrometría



de masas y dar información al analista sobre la posible resistencia de este microorganismo, y debido a que el plásmido puede transferirse a otras bacterias, el mismo criterio puede aplicarse a estas otras bacterias, de la misma forma se pueden detectar biomarcadores de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*.

Así mismo se ha desarrollado una técnica en la que a través del análisis de espectrometría de masas del antibiótico en el medio de cultivo se puede determinar de forma indirecta la resistencia a carbapenémicos y cefalosporinas cuando esta es mediada por enzimas. Para esto se incubaba al microorganismo en presencia de un antibiótico beta-lactámico y posterior a la incubación se busca si ha habido una modificación de la masa del antibiótico al ganar 18 Dalton por una molécula de agua y la pérdida de 44 Dalton por la pérdida de CO<sub>2</sub> como se ilustra en la Figura 9.

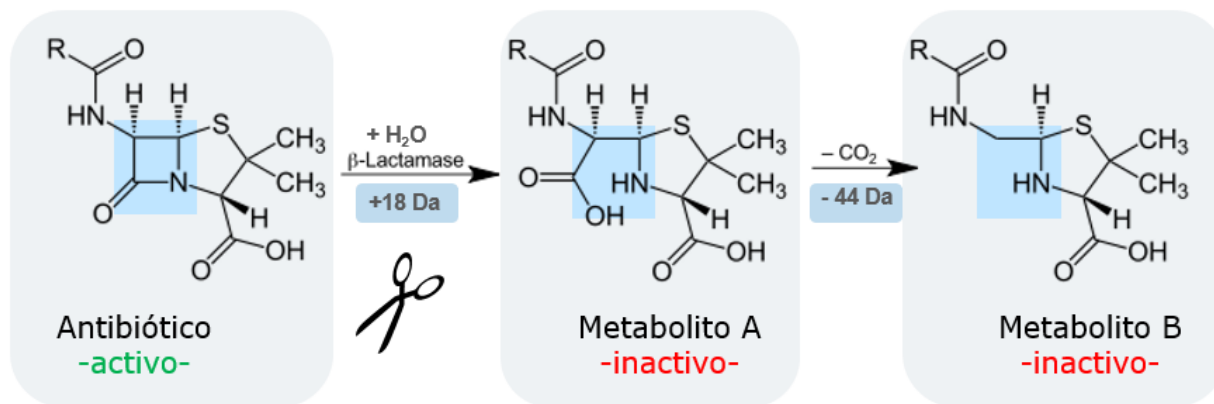


Figura 9. Mecanismo simplificado de acción de las beta-lactamasas

En el caso de sepsis y bacteriemias, la identificación rápida del agente patógeno puede significar la clave para la recuperación del paciente, ya que por cada hora que se retrasa el uso de los antibióticos adecuados la tasa de supervivencia decrece en un 7.6%, y el cambio de tratamiento de un antibiótico de amplio espectro a una terapia dirigida ayuda a disminuir la exposición del paciente a un tratamiento agresivo de manera innecesaria, incrementa la efectividad de la terapia y disminuye la posibilidad de que el patógeno genere multiresistencias.

### Aplicaciones fuera del ámbito clínico.

Aunque el uso principal de la tecnología de Espectrometría de masas para la identificación de microorganismos ha sido en laboratorios clínicos alrededor del mundo, su uso ha sido adoptado en otros ámbitos en donde la identificación microbiana juega un papel importante en las actividades y procesos.

Entre los más destacados se encuentra la industria farmacéutica, dado que las condiciones y regulaciones para la producción de fármacos son sumamente estrictas, el uso de esta tecnología ha ayudado a la reducción de costos y tiempos al brindar la identificación de microorganismos de manera rápida y confiable. En las áreas de control de calidad se utiliza para el control de áreas, producto terminado, puntos de control en sistemas de tratamiento y purificación de agua, control de calidad en áreas estériles, control para equipos de esterilización entre otras. Debido a que en esta industria no es necesario conocer la resistencia a antibióticos, la sola identificación del microorganismo implica una reducción de tiempo y costo justificando la inversión necesaria para la puesta en marcha de esta tecnología.

Otra de las áreas de impacto económico es la de la salud animal, ya que la rápida identificación de agentes patógenos favorece el correcto tratamiento en el caso de animales de producción. Un ejemplo muy simple de esto son las infecciones en las ubres de vacas de producción de leche (Mastitis), por las cuales se puede contaminar la leche producida, para lo cual la rápida identificación de posibles patógenos puede generar un impacto económico sumamente importante ya que se pueden tomar decisiones rápidas con respecto a cómo proceder con lotes de leche posiblemente contaminados, así como con los tratamientos a seguir para los animales de producción. Así mismo la aplicación de esta metodología para la identificación y rastreo de origen de infecciones específicas en producción avícola puede generar ahorros importantes en la producción y ayuda a prevenir nuevos brotes de estas infecciones al poder rastrear de manera rápida el origen de estas.

Por otro lado, en la industria alimenticia se puede hacer uso de esta técnica para el control de calidad, rastreo de contaminantes, detección rápida de posible patógenos como enterobacterias, en el caso de la industria cervecera la principal aplicación es la de rastrear y tipificar los microorganismos responsables de afectar la calidad del producto, y con la identificación y rastreo del origen de estos se evita el desperdicio y pérdida de lotes enteros de producción. Además de la identificación microbiana, en el caso de la industria alimenticia, se han desarrollado algunas aplicaciones en las que se utilizan los algoritmos de identificación para tipificar productos cárnicos y pescados, y autentificar el tipo de producto, así como el origen de este, asegurando que el productor está entregando a la industria lo que está ofreciendo.

A pesar de que las bibliotecas comerciales provistas por Bruker cuentan con microorganismos provenientes de todos los ámbitos de la microbiología, se cuenta con la posibilidad de crear bibliotecas propias con los microorganismos específicos que así se desee, eso puede permitir la identificación de microfaunas locales, o bien el rastreo de cepas de producción o biotecnológicas, que en el caso de la industria de los alimentos pueden ser microorganismos ya conocidos o incluso patentados para la producción en una empresa en particular.

En las áreas de la agricultura y ambiental se ha aplicado esta técnica, para la identificación de microorganismos que puedan generar infecciones en los campos de siembra ayudando al correcto y rápido tratamiento de los mismos, evitando así pérdidas importantes en productos de cosecha, así mismo, en las áreas de biorremediación en donde se busca llevar un control de los microorganismos usados. En el caso del área ambiental una de las aplicaciones más interesantes es el análisis de aguas de lastre en barcos, ya que al tomar el agua de un sitio y trasladarse a otras áreas del mundo se pueden estar transportando microorganismos ajenos al área en donde se descargan dichas aguas, generando impactos en la microfauna de dicha área, lo cual podría llegar a tener impactos importantes en el ecosistema.

Por último, en centros de investigación y universidades esta tecnología ha abierto las puertas a la realización de nuevos estudios, ya que dado que el costo por muestra es sumamente bajo, la rapidez de obtención de resultados y la exactitud de los mismos son tan altos, se pueden realizar estudios a gran escala por costos comparablemente menores a los estudios por Biología Molecular, haciendo que la obtención de resultados sea más fácil y favoreciendo el avance en estudios como descubrimientos de nuevos agentes patógenos, evaluación de infecciones nosocomiales, estadísticas de recurrencia de infecciones, tipificación de las poblaciones microbianas en áreas de interés, identificación de microorganismos endófitos en plantas, entre muchas otras.

## 4.- Conclusiones.

La aplicación de la técnica de Espectrometría de masas para la identificación de microorganismos ha resultado en una mejora en el flujo de trabajo de los laboratorios clínicos, disminuyendo los tiempos de espera de horas o incluso días a solamente unos minutos lo cual ha generado cambios de impacto en múltiples niveles de las áreas de la salud, desde ahorros significativos en el gasto requerido por el laboratorio clínico, hasta la mejora en la aplicación de los tratamientos antibióticos, permitiendo que los mismos sean más eficientes, mejorando así la salud de los pacientes

de forma más rápida, y ayudando a disminuir la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos, lo cual se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial.

Por otro lado, en las áreas industriales el impacto económico es el de mayor efecto, permitiendo la liberación de productos, inspección de áreas, optimización de controles de calidad, y mejora en general de todos los procesos de alguna manera impactados por el tipo de microorganismo que pueda estar presente.

Los desarrolladores de esta metodología siguen trabajando en hacer mejoras a la misma, desarrollando nuevas aplicaciones que complementan la identificación como es la capacidad del sistema de tipificar las subespecies de algunos microorganismos de acuerdo con la presencia de algunas proteínas específicas.

Desde el punto de vista personal las capacidades y conocimientos como QFB han sido de gran importancia en el desarrollo de las actividades profesionales, permitiendo dar un soporte integral a los usuarios así como dando ventajas importantes en el desarrollo de las actividades comerciales que se encuentran a mi cargo.

## **Perspectivas y avances en el futuro.**

El uso de la espectrometría de masas en el campo de la microbiología ha revolucionado la forma de trabajo en los laboratorios de diagnóstico clínico, así como en el tratamiento de las infecciones, sin embargo, aún hay varios retos que pueden hacer de esta técnica aún más productiva, uno de ellos y tal vez el más importante en el ámbito clínico es la determinación de susceptibilidad de los microorganismos a los diferentes antibióticos. Debido a que los mecanismos de resistencia son muy variados aún no es posible determinar la susceptibilidad, pero se han desarrollado ya las primeras técnicas específicamente para determinar si un microorganismo es capaz de inactivar enzimáticamente los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los microorganismos con esta capacidad utilizan beta-lactamasas y carbapenemasas para hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico. Para determinar esto se incuba el microorganismo en un medio con el antibiótico durante 2 horas a 37°C, posterior a esto se centrifuga y un microlitro del sobrenadante se analiza buscando cambios específicos como es la aparición de masa correspondientes al antibiótico hidrolizado y la disminución de la señal del antibiótico intacto.

Otra aplicación para este sistema es el análisis de leches contaminadas, y esto se puede lograr usando una metodología muy similar a la del hemocultivo positivo, en la cual una muestra de la leche contaminada se trata con

soluciones de lisis y lavados para eliminar los componentes de la leche y poder analizar al microorganismo e identificarlo, y de esta manera se puede rastrear en donde se produjo la contaminación y evitar que siga sucediendo.

En algunos grupos de investigación se han realizado análisis de productos cárnicos por medio del uso de los algoritmos de identificación usados en espectrometría de masas para determinar el origen de dichos cárnicos, por medio de la generación de una base de datos con los perfiles proteicos de diferentes muestras de carnes provenientes de ganado bovino, porcino, equino, ovino y avícola y algunos animales salvajes. La metodología aún está en la parte experimental, pero podría convertirse en un método rápido y eficiente para el control de calidad en la industria alimenticia.

## 5.- Referencias:

- 1) MBT Compass User Manual (2016), Bruker Daltonics Inc.
- 2) Roberto C. González Meléndez, Briseida Elizalde Cuevas, Marian Estefanía Cortés Cruz, Manuel Orduña Sánchez, Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. UNAM, FES Zaragoza, noviembre de 2020

## 6.- Bibliografía

- 1) McMurray DN. Mycobacteria and Nocardia. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4a Edición. Galveston (TX): Universidad de Texas, en Galveston; 1996. Capítulo 33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7812/>
- 2) Alton GG, Forsyth JRL. Brucella. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4a Edición. Galveston (TX): Universidad de Texas, en Galveston; 1996. Capítulo 28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8572/>
- 3) Eric J. Stewart, Growing Unculturable Bacteria, J. Bacteriology. Agosto 2012 194:16 4151-4160.
- 4) Mass spectrometry. (2017, Diciembre 20). En *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. Disponible en: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Mass\\_spectrometry&oldid=816358256](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Mass_spectrometry&oldid=816358256)

- 5) Matrix-assisted laser desorption/ionization. (2017, Noviembre 14). En *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. Disponible en [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Matrix-assisted\\_laser\\_desorption/ionization&oldid=810311013](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Matrix-assisted_laser_desorption/ionization&oldid=810311013)
- 6) Chen, J. H. K., Ho, P.-L., Kwan, G. S. W., She, K. K. K., Siu, G. K. H., Cheng, V. C. C., ... Yam, W.-C. (2013). Direct Bacterial Identification in Positive Blood Cultures by Use of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1733–1739. <http://doi.org/10.1128/JCM.03259-12>
- 7) Piseth Seng, Michel Drancourt, Frédérique Gouriet, Bernard La Scola, Pierre-Edouard Fournier, Jean Marc Rolain, Didier Raoult; Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 4, 15 August 2009, Pages 543–551, <https://doi.org/10.1086/600885>
- 8) Elia Gómez G. de la Pedrosa, Concepción Gimeno, Alex Soriano, Rafael Cantón, Estudios de coste-efectividad con MALDI-TOF e impacto clínico, In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 34, Supplement 2, 2016, Pages 47-52, ISSN 0213-005X, [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30191-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30191-4).
- 9) Jordi Vila, Yuliya Zboromyrska, Almudena Burillo, Emilio Bouza, Perspectivas de futuro de la espectrometría de masas en microbiología, In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 34, Supplement 2, 2016, Pages 53-58, ISSN 0213-005X, [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30192-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30192-6).
- 10) Anantharajah Ahalieyah, Tossens Bastien, Olive Nathalie, Kabamba-Mukadi Benoit, Rodriguez-Villalobos Hector, Verroken Alexia, Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS, In *Frontiers in Microbiology*, Volume 10, 2019, Pages 1413, ISSN=1664-302X, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01413>

## 7.- Anexo 1: Técnicas tradicionales de identificación microbiana.

A continuación, se presentan algunas de las pruebas para la identificación de microorganismos utilizadas de manera rutinaria en los laboratorios clínicos.

### Tinción y Microscopia<sup>(2)</sup>

- Tinción de Gram<sup>(11)</sup>: Es la técnica más fundamental de identificación de Bacterias, es una tinción diferencial, ya que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos (Gram Positivas y Gram Negativas).
- Tinción de Ziehl Neelsen o ácido resistente <sup>(11)</sup>: Es una de las tinciones más útiles para diferenciar bacilos tuberculosos de otros microorganismos relacionados, siendo estos últimos susceptibles a la decoloración por acido-alcohol a diferencia de las micobacterias que retienen la coloración.
- Tinción de cápsula <sup>(11)</sup>: La cápsula es una capa mucosa, que envuelve la pared celular de algunas bacterias, debido a su alto contenido de agua esta estructura se tiñe débilmente, por lo que se utiliza una técnica de tinción negativa, en la que el fondo del campo mantiene la coloración y las bacterias encapsuladas se ven como secciones sin teñir.
- Tinción de esporas Schaefer Fulton <sup>(11)</sup>: Esta tinción permite la caracterización de microorganismos capaces de generar estas estructuras como el género *Bacillus* y *Clostridium*, en esta tinción se usa el verde de malaquita y calentamiento para introducir el colorante a la espora, y posteriormente se usa safranina como contraste.
- Tinción de Albert y Loeffler <sup>(11)</sup>: Los gránulos metacromáticos son comunes en corinebacterias, espirilos y bacilos lácticos, y pueden servir para identificar a estas bacterias, a través del uso de colorantes básicos como la fucsina básica se tiñen los

gránulos y se usa colorante de Albert que contienen verde de malaquita o azul de metileno (en la técnica de Loeffler) como contraste.

- Tinciones simples <sup>(11)</sup>: En este tipo de tinción se usa un solo colorante, mostrando todas las estructuras del mismo color, permitiendo conocer la morfología y tipo de agrupación, entre estas se encuentran al de azul de algodón lactofenol usada en micología para analizar la estructura de los hongos.
- Por medio de la observación al microscopio se pueden identificar diferencias en la morfología de las bacterias, y algunas características como la generación de esporas, la forma de agruparse de las mismas, pruebas que ayudan a la identificación de una bacteria. Estas pruebas son poco exactas, llevan largos tiempos, y requieren de personal con amplia experiencia y en muchos de los casos no son útiles para la selección de un tratamiento o la emisión de un diagnóstico.

**Cultivo de Muestras en Medios Selectivos<sup>(2)</sup>:** La forma de las colonias al crecer bajo condiciones específicas puede ser una forma de identificar a las bacterias, pero esta depende de muchos factores que pueden hacer que los resultados no sean confiables, además de requerir personal con amplia experiencia. Los medios de cultivo selectivos, que en algunos casos pueden ser muy específicos, pero en general dan una identificación muy poco exacta al permitir el crecimiento de algunos grupos de bacterias, pero en la mayoría de los casos siendo específico por el género más no para la especie. Los tiempos necesarios para el enriquecimiento del cultivo y el correcto desarrollo de las colonias depende de varios factores entre los cuales se encuentran el tipo de medio de cultivo, el microorganismo y la temperatura de incubación. Dependiendo de estas condiciones, los tiempos de incubación van de las 12 horas hasta 6 semanas.

**Cultivo en medios Cromogénicos:** En este tipo de medios se utilizan sustratos especiales que confieren un color a bacterias específicas, permitiendo de esta forma poder identificar de manera rápida y sencilla microorganismos específicos en una muestra heterogénea. Estos medios pueden o no ser selectivos.

**Pruebas bioquímicas:** La actividad enzimática de un microorganismo es única en condiciones de crecimiento controladas, esta característica nos permite desarrollar pruebas en las que se puede determinar el género y especie



de acuerdo con las reacciones enzimáticas presentadas frente a diferentes sustratos. En la actualidad este tipo de pruebas son las más utilizadas en la identificación de microorganismos.

**Genotipificación:** Esta prueba es la más confiable y por tradición la prueba por excelencia para la identificación de bacterias consiste en la amplificación parcial del gen 16S ribosomal, para después secuenciar el mismo y compararlo contra una base de datos, dando la identificación de género y especie de la bacteria con un alto grado de exactitud. Algunas desventajas de estas pruebas son que la preparación de las muestras es larga y debe hacerse con mucho cuidado, ya que de ello depende una correcta identificación, y el costo de los reactivos necesarios es alto, por estas razones pocos laboratorios utilizan esta técnica a diferencia de las pruebas bioquímicas.