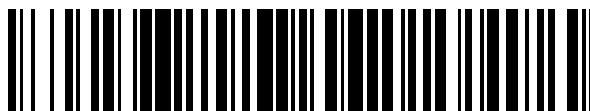


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 499**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2008 E 08737565 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2121963**

54 Título: **Métodos para la identificación de una cepa aislada de una muestra clínica a nivel de especie y/o subespecie**

30 Prioridad:

08.01.2007 EP 07290019

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.07.2014

73 Titular/es:

ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (50.0%)

**Carré Historique de l' Hôpital Saint-Louis, Porte 23, 1 Avenue Claude Vellefaux
75475 Paris Cedex 10, FR y
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NASSIF, XAVIER;
BERETTI, JEAN-LUC;
CARBONNELLE, ETIENNE;
FERRONI, AGNÈS;
BOUGNOUX, MARIE ELISABETH y
DEGAND, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 477 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la identificación de una cepa aislada de una muestra clínica a nivel de especie y/o subespecie

5 Descripción

La invención se refiere a un método para la identificación precisa y rápida a nivel de especie y/o a nivel de subespecie de un aislado clínico usando espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz con un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS).

10 MALDI-TOF-MS es una técnica usada para examinar el perfil de proteínas detectado directamente de la superficie celular bacteriana intacta.

15 Se trata de un método de ionización suave basado en masas moleculares relativas que permiten la desorción de péptidos y proteínas de diferentes microorganismos enteros cultivados. Los iones se separan y se detectan de acuerdo con su masa molecular y su carga. Las especies se identifican por su masa: relación de carga (m/z). Este enfoque produce un espectro reproducible en minutos que consiste en una serie de picos de 500 a 20.000 m/z. Cada pico corresponde a un fragmento molecular liberado de la superficie celular durante la desorción por láser.

20 MALDI-TOF-MS ya se ha usado para la caracterización de las bacterias. Sin embargo, entre los diversos componentes identificados en un espectro, solo unos cuantos están presentes en una gran población de gérmenes de una genoespecie dada, bien siendo el resto aislados de manera específica o variables en base a las condiciones de crecimiento (medios, temperatura de incubación, etc.), y no se pueden usar para identificar la especie o subespecie de una bacteria y, más en general, de un germen.

25 La falta de una estrategia global para identificar esos picos de los espectros que pueden servir para distinguir diversas genoespecies ha dificultado el uso de MALDI-TOF-MS en los laboratorios de microbiología clínica habituales para el diagnóstico de genoespecies. De hecho, estos picos tienen que corresponder a componentes que estén presentes en la mayoría de los aislados de una genoespecie dada y que estén presentes en gran cantidad en la pared celular. Teniendo en cuenta la posible variabilidad en una genoespecie, es probable que la característica de una genoespecie no se base en la presencia de un solo pico, sino más bien en la presencia de un conjunto de picos que estén más o menos conservados entre la genoespecie.

35 Los antecedentes relevantes de la técnica están representados por los documentos DE 10 2005 002672 A1; US 2002/192676 A1; Dare D., en: ADV TECHNIQUES IN DIAGNOSTIC MICROBIOL, 2006, 117-133; Du Z *et al.*, ANAL CHEM, 74(21), 2002, 5487-5491; Walker J *et al.*, J MICROBIOL METHODS, 48(2-3), 2002, 117-126; Smole S. C. *et al.*, J MICROBIOL METHODS, 48(2-3), 2002, 107-115; Keys C. J. *et al.*, INFECTION GENETICS & EVOL, 4(3), 2004, 221-242; WO 98/09314 A; US-B1-7 020 559; US-B1-6 177 266; WO 01/92872 A; Coales M. C. *et al.*, ABSTR GENERAL MEETING AM SOC MICROBIOL, vol. 102, 2002, página 103, C -25; Nagai R. *et al.*, J BONE JOINT SURG BR PROCEEDINGS, vol. 88 - B, 2006, página 238; y Nielsen P. B. *et al.*, CLIN MICROBIOL INFECT, 11 (supl. 2), 2005, página 210, P723.

45 Los inventores han encontrado que dichos problemas se podrían resolver (i) mediante la realización de un análisis fenotípico del germen que se vaya a identificar antes del análisis de MALDI-TOF-MS, y (ii) mediante la realización del análisis de MALDI-TOF-MS en condiciones específicas relativas particularmente a la selección de la solución de la matriz y las bases de datos de referencia.

50 Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar un nuevo método basado en el análisis de MALDI-TOF-MS para la identificación de una cepa aislada de una muestra clínica a nivel de especie y/o de subespecie.

Es un objeto de la invención proporcionar bases de datos establecidas a partir de un conjunto de cepas con respecto a un germen dado.

55 Así pues, la invención se refiere a un método para la identificación, a nivel de especie y/o de subespecie, de una cepa aislada de una muestra clínica usando el análisis de MALDI-TOF-MS que comprende una etapa de clasificación de la cepa en un grupo antes de realizar el análisis de MALDI-TOF-MS, en el que dicho análisis de MALDI-TOF-MS comprende la etapa de comparar el perfil de espectros de la cepa que se va a identificar con una base de datos de referencia que contiene los espectros de MALDI-TOF-MS característicos de las cepas representativas de la genoespecie del grupo de gérmenes al que pertenece dicha cepa que se va a identificar, conteniendo dicha base de datos para cada cepa representativa los picos que tienen, en comparación con el pico con la intensidad más elevada fijada arbitrariamente en 1, una intensidad relativa superior a 0,05, más particularmente superior a 0,1, por lo que están presentes en al menos 2 subcultivos, preferentemente 5 o incluso 10 o más.

65 Dicho método puede comprender la etapa de mantener en el espectro de la cepa analizada los picos que tienen, en comparación con el pico con la intensidad más elevada fijada arbitrariamente en 1, una intensidad relativa superior a

0,05, más particularmente superior a 0,1.

La selección de picos llevada a cabo de acuerdo con la invención permite identificar con exactitud el germen presente en una muestra clínica.

La etapa de clasificación se basa en las condiciones de crecimiento y/o la característica de las colonias y/o la morfología de las bacterias ante el examen microscópico y/o la tinción de Gram y/o pruebas fenotípicas sencillas.

La técnica de MALDI-TOF-MS se lleva a cabo en células enteras intactas o en extractos de proteínas obtenidos tras la lisis o correspondientes a una fracción de los componentes celulares (pared celular, citoplasma, etc.). Lo ideal es realizar esta técnica en una colonia aislada de la cepa que se vaya a identificar, obtenida a partir de una muestra clínica cultivada en un medio de crecimiento apropiado e incubada a una temperatura apropiada.

Antes de realizar la técnica de MALDI-TOF-MS, se añade un medio de matriz a las colonias aisladas.

Los medios de matriz adecuados comprenden, por ejemplo, derivados de ácido benzoico tales como ácido hidroxibenzoico, particularmente ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

Cada espectro es la suma de al menos 400 disparos de láser, preferentemente más de 1.000, e incluso más de 2.000, desde diferentes regiones del pocillo que contiene la cepa que se va a analizar, siendo dicho espectro analizado en un intervalo de m/z de 500 a 50.000, y más preferentemente de entre 500 y 20.000, y más preferentemente de entre 2.000 y 20.000.

A continuación, se comparan los perfiles usando un programa informático que selecciona la mejor coincidencia entre la cepa analizada y los picos seleccionados de dicha base de datos de referencia obtenida mediante el análisis de una o varias cepas de referencia específicas de una genoespecie o genosubespecie dada. Cada cepa representa una genoespecie o genosubespecie del grupo en estudio, de manera que el conjunto de cepas corresponde a la genoespecie o genosubespecie pertinente de un grupo de gérmenes. El espectro de cada cepa de referencia se registra usando la técnica de MALDI-TOF-MS. Como se ha mencionado anteriormente, el pico con la intensidad más elevada se fija arbitrariamente en 1, y el resto de picos tiene un valor correspondiente a la intensidad relativa de este pico más elevado. Los picos presentes con una intensidad relativa superior a 0,05 o más particularmente superior a 0,1 se retienen, por lo que están presentes en al menos 2 subcultivos, preferentemente 5 o incluso 10 o más. Estos picos son los picos seleccionados.

Teniendo en cuenta una posible variación, el programa informático selecciona la mejor coincidencia entre la cepa analizada y la base de datos, teniendo en cuenta un posible error del valor m/z. El intervalo del error se fija arbitrariamente en ± 20 , o más preferentemente en ± 10 .

La presencia y ausencia de picos se consideran los identificadores genéticos de un determinado aislado.

Dicho método es una potente herramienta para la identificación rápida de un germen, lo que permite su uso en el diagnóstico habitual de laboratorio. La necesidad de un equipo costoso se compensa con la simplicidad del protocolo, que requiere un tiempo de práctica mínimo. Es especialmente apropiado para los laboratorios de referencia o los hospitales que reciben un alto volumen de muestras.

La alta resolución del método MALDI-TOF-MS realizado de acuerdo con la invención hace que sea posible, por ejemplo, obtener huellas espectrales características para cada especie e incluso subespecie de un germen dado.

Resulta ventajoso usar dicho método para la identificación de gérmenes seleccionados del grupo que comprende bacterias, levaduras, mohos a nivel de especie y/o subespecie.

De acuerdo con una realización específica, la invención se refiere a la identificación de especies y/o subespecies de estafilococos coagulasa positiva (abreviado como CNS).

La identificación de CNS a nivel de especie no se realiza de forma habitual, ya que con frecuencia se consideran contaminantes de la muestra. Además, los resultados de los métodos fenotípicos realizados en cepas clínicamente significativas son decepcionantes. Los kits comerciales de identificación tienen un valor limitado en la identificación de los aislados de CNS. La determinación de la secuencia *SodA*, a pesar de ser el método más preciso para la identificación correcta de especies de CNS, es largo, costoso y técnicamente exigente. Además, aunque los métodos genotípicos son claramente superiores a las identificaciones fenotípicas, un inconveniente de los métodos genotípicos basados en secuencias puede ser la falta de calidad de las secuencias depositadas en los bancos de datos.

Gracias a la invención, la diferenciación a nivel de subespecie es más precisa, por ejemplo, para la subespecie de los estafilococos, con MALDI-TOF-MS que con el método de *SodA*, pues se demostró que el gen *SodA* no diferencia bien entre las subespecies *S. capitis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* y *S. schleiferi*.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a la identificación de especies o subespecies de bacilos Gram negativos no fermentadores.

Las bases de datos usadas en dicho método también forman parte de la memoria descriptiva.

Consisten en un conjunto de picos seleccionados obtenidos mediante análisis de MALDI-TOF-MS de cepas al menos parcialmente conservadas entre cepas pertenecientes a las mismas genoespecie.

Dichos picos de referencia corresponden a los principales picos conservados con una intensidad relativa superior a 0,05, más particularmente superior a 0,1.

Dichas bases de datos se obtienen ventajosamente para cada grupo de gérmenes mediante el uso de un conjunto de cepas, representando cada cepa una genoespecie del grupo de estudio, de modo que el conjunto de cepas corresponde a la genoespecie pertinente de un grupo de gérmenes. El espectro de cada cepa de dicho grupo se registra usando la técnica de MALDI-TOF-MS. Cada cepa representa una genoespecie de este grupo de gérmenes, y se designa además como cepa de referencia. Como se ha mencionado anteriormente, el pico con la intensidad más elevada se fija arbitrariamente en 1, teniendo el resto de picos un valor correspondiente a la intensidad relativa de este pico más elevado. Los picos principales son mantenidos, teniendo dichos picos una intensidad relativa al menos superior a 0,05, más particularmente superior a 0,1. Entonces, se retienen los picos presentes que tienen una intensidad relativa superior a 0,05, o más particularmente superior a 0,1 en todos los conjuntos de datos obtenidos para una cepa de referencia dada, por lo que están presentes en al menos 2 subcultivos, preferentemente 5 o incluso 10 o más.

El conjunto de picos obtenido de este modo es específico de una genoespecie para una condición de crecimiento dada (medio y la duración), y con respecto a las características de un espectrómetro dado.

De aquí en adelante, se dan otras características y ventajas de la invención con respecto a la identificación de 1) CNS a nivel de especie; y 2) bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en la fibrosis quística. Se dan para ilustrar la invención sin limitar su alcance. En el presente documento, se hará referencia a las figuras 1 a 7, que representan, respectivamente:

- Figura 1: Perfiles de MALDI-TOF-MS de 10 aislados de la misma cepa de *S. aureus* CIP 7625;
- Figura 2: Dendrogramas de MALDI-TOF-MS de la especie *Micrococcaceae*, de acuerdo con las bases de datos 1 (Muëller Hinton 24H) y 2 (Muëller Hinton 48H), designando así la genoespecie por identificar en este grupo de gérmenes;
- Figura 3: Valor de m/z de los picos con una intensidad relativa superior a 0,1 en relación con las cepas de estafilococos;
- Figuras 4 y 5: Conservación del conjunto de picos de cepas seleccionadas entre las cepas pertenecientes a la misma genoespecie;
- Figura 6: Clasificación de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas;
- Figura 7: Perfiles de MALDI-TOF-MS de 6 bacilos Gram negativos.

1. Identificación de CNS a nivel de especie

Material y métodos

Cepas bacterianas

Los resultados dados a continuación se obtuvieron mediante el análisis de cincuenta y una cepas de bacterias pertenecientes a *Micrococcaceae* obtenidas de la colección del Instituto Pasteur (París, Francia).

En la Tabla 1, se dan las cepas seleccionadas usadas para establecer las bases de datos de MALDI-TOF-MS.

Tabla 1

Especie	Cepa
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 7625
<i>Micrococcus luteus</i>	CIP 103664
<i>M. lentus</i>	CIP 103430
<i>S. epidermidis</i>	CIP 103563
<i>S. warneri</i>	CIP 103960

Especie	Cepa
<i>S. xylosus</i>	CIP 8166
<i>S. intermedius</i>	CIP 8177
<i>S. haemolyticus</i>	CIP 81.56
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>saprophyticus</i>	CIP 104064
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>bovis</i>	CIP 105260T
<i>S. lugdunensis</i>	CIP 103642
<i>S. hominis</i> subesp. <i>hominis</i>	CIP 102642
<i>S. hominis</i> subesp. <i>novobiosepticus</i>	CIP 105721
<i>S. capitis</i> subesp. <i>capitis</i>	CIP 8153T
<i>S. capitis</i> subesp. <i>ureolyticus</i>	CIP 104191
<i>S. caprae</i>	CIP 104519
<i>S. pasteurii</i>	CIP 103831
<i>S. cohnii</i> subesp. <i>cohnii</i>	CIP 8154T
<i>S. cohnii</i> subesp. <i>urealyticum</i>	CIP 104023
<i>S. scheiferi</i> subesp. <i>scheiferi</i>	CIP 103643T
<i>S. scheiferi</i> subesp. <i>coagulans</i>	CIP 104370
<i>S. sciuri</i> subesp. <i>sciuri</i>	CIP 103824
<i>S. simulans</i>	CIP 8164 T

En la Tabla 2, se dan las cepas pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*.

Tabla 2

Especie	Cepa
<i>S. aureus</i>	68 aislados clínicos
<i>M. luteus</i>	CIP A270
<i>S. epidermidis</i>	81 aislados clínicos
<i>S. warneri</i>	CIP 106511
	CIP 8165
	6 aislados clínicos
<i>S. xylosus</i>	CIP 103720
	CIP 104065
<i>S. intermedius</i>	CIP 81.60
<i>S. haemolyticus</i>	CIP 104114
	13 aislados clínicos
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>saprophyticus</i>	CIP 76.125T
	CIP 103545
<i>S. saprophyticus</i> subesp. <i>bovis</i>	CIP 105262
	CIP 105261

(continuación)

Especie	Cepa
<i>S. saprophyticus</i> sp *	6 aislados clínicos
<i>S. lugdunensis</i>	CIP 103584
<i>S. hominis</i> subesp. <i>hominis</i>	CIP 81.57
	CIP 104689
<i>S. hominis</i> subesp. <i>novobiosepticus</i>	CIP 105719T
<i>S. hominis</i> sp *	10 aislados clínicos
<i>S. capitis</i> subesp. <i>capitis</i>	CIP 103688
<i>S. capitis</i> subesp. <i>ureolyticus</i>	CIP 104192T
<i>S. caprae</i>	CIP 104000T
	CIP 104520
<i>S. pasteurii</i>	CIP 105540T
	CIP 103830
	CIP 103832
<i>S. cohnii</i> subesp. <i>urealyticum</i>	CIP 104024T
	CIP 104025
<i>S. scheiferi</i> subesp. <i>coagulans</i>	CIP 104366
<i>S. sciuri</i> subesp. <i>sciuri</i>	CIP 8162T
	CIP 103583
	CIP 103825
*: La geno-especie de estas cepas clínicas se identificó usando la secuencia del gen <i>sodA</i> , que no distingue las 2 subespecies.	

5 También se estudiaron ciento dieciséis aislados clínicos de estafilococos coagulasa negativa (CNS): 74 cepas aisladas de hemocultivos, 25 cepas aisladas de mediastinitis infantil (piel, líquido mediastínico, electrodos), 12 cepas aisladas de infecciones óseas (Hôpital Necker-Enfants malades, París, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, Francia) y 5 cepas aisladas de infecciones del tracto urinario. Además, se analizaron 68 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* aisladas de diversas infecciones.

10 Identificación fenotípica y genotípica

15 Se diferenciaron las cepas clínicas de CNS de las cepas de *S. aureus* mediante pruebas fenotípicas convencionales incluyendo la prueba de aglutinación de látex de Slidex (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y la prueba de ADNasa. En caso de discordancia entre las dos últimas técnicas, se realizaron pruebas de coagulasa en tubo. La identificación precisa del CNS se obtuvo mediante la secuenciación de un fragmento interno del gen *SodA* como se ha descrito previamente. En síntesis, se realizó la extracción de ADN genómico de cultivos puros de CNS con el kit de Quiagene (Courtaboeuf, Francia). Se amplificó el gen *SodA* parcial y se secuenciaron los amplicones obtenidos usando el kit de reacción listo para la secuenciación por ciclos ABI Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) según lo descrito anteriormente por Poyart *et al.* 2001, *J. Clin. Microbiol.* 39:4296-4301. Las secuencias nucleotídicas se enviaron a la base de datos GenBank para la asignación de las especies.

20 Con esta estrategia, se identificaron los 116 aislados clínicos de CNS dados en la Tabla 2.

Técnica de MALDI-TOF-MS

25 Se cultivaron las cepas en agar Muëller Hinton o agar Columbia + sangre de caballo al 5 % (bioMérieux), se incubaron 24 o 48 horas a 37 °C. Para cada identificación, se cosechó una colonia aislada en 100 µl de agua estéril; se depositó 1 µl de esta mezcla sobre una placa diana (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) por triplicado y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 µl de etanol absoluto a cada pocillo y 1 µl de la solución

de matriz DHB (50 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, acetonitrilo al 30 %, ácido trifluoroacético al 0,1 %). Tras el secado, se añadió 1 µl de la solución de matriz DHB. Luego, se procesaron las muestras en el espectrómetro MALDI-TOF-MS modelo autoflex (Bruker Daltonics) con el programa informático de control de la flexión (Bruker Daltonics). Los iones positivos se extrajeron con un voltaje de aceleración de 20 Hz en modo lineal. Cada espectro era la suma de los iones de 5 x 200 disparos de láser procedentes de diferentes regiones del mismo pocillo, y se analizó en un intervalo de m/z de 1.000 a 23.000. El análisis se realizó con el programa informático de análisis de la flexión y se calibró con el patrón T de calibración de proteínas (Proteína I, Bruker Daltonics). Se añadieron los datos obtenidos con las 3 repeticiones para reducir al mínimo el efecto aleatorio. La presencia y la ausencia de picos se consideraron como los identificadores genéticos de un determinado aislado. Los perfiles se analizaron y se compararon usando el programa informático de la base de datos BGP disponible en la página web <http://sourceforge.net/projects/bgp>.

Resultados

Las cepas que figuran en la Tabla 1 son aquellas seleccionadas arbitrariamente como representativas de la geoespecie.

Se analizaron diez aislados de cada una de estas cepas seleccionadas mediante MALDI-TOF-MS como se ha descrito en el apartado de Materiales y métodos.

Para cada espectro, se dio a cada pico un valor correspondiente a la intensidad.

El pico con la intensidad más elevada se fijó arbitrariamente en 1, teniendo el resto de los picos un valor correspondiente a la intensidad relativa de este pico más elevado (Figura 1).

Los picos menores (intensidad relativa inferior a 0,1) estuvieron presentes de manera inconstante. Por lo tanto, el análisis se concentró posteriormente en los picos con una intensidad relativa superior al 0,1 que estaban presentes en la totalidad de los 10 conjuntos de datos obtenidos para una cepa dada.

Para determinar el impacto de las condiciones de crecimiento en la identificación bacteriana, se realizó el procedimiento anteriormente descrito con todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 y se cultivaron en agar Muëller Hinton o agar Columbia complementado con sangre de caballo al 5 % durante 24 o 48 horas.

Los resultados se dan en la Tabla 3.

Las bases de datos se denominaron 1 a 4, respectivamente: se obtuvieron usando cultivos bacterianos en Muëller Hinton 24H (base de datos 1), Muëller Hinton 48H (base de datos 2), medio de sangre de caballo Columbia 24H (base de datos 3), medio de sangre de caballo Columbia 24H (base de datos 4). Para una cepa dada, la desviación típica del valor de m/z para cada uno de los picos conservados nunca fue superior a 7. En la Figura 3, se registra el valor de m/z de los picos con una intensidad relativa superior a 0,1 y presentes en los 10 conjuntos de datos para cada condición de crecimiento.

Tabla 3

Número de picos para cada base de datos *									
	Base de datos 1	Base de datos 2	Base de datos 3	Base de datos 4		Base de datos 1	Base de datos 2	Base de datos 3	Base de datos 4
<i>S. aureus</i>	11	11 (8)	7(2)	8(4)	<i>S. intermedius</i>	10	12 (9)	7(6)	6(5)
<i>S. capitis capitis</i>	8	14(7)	4(4)	6(4)	<i>S. lugdunensis</i>	9	12(5)	5(3)	9(4)
<i>S. capitis ureolyticus</i>	5	9(4)	6(3)	4(4)	<i>S. pasteurii</i>	11	12 (11)	10 (10)	12 (9)
<i>S. caprae</i>	5	12(5)	6(2)	6(2)	<i>S. saprophyticus bovis</i>	9	12 (8)	7(2)	5(3)
<i>S. cohnii cohnii</i>	6	9(4)	10 (2)	11(5)	<i>S. saprophyticus saprophyticus</i>	8	10(6)	7(4)	11(4)
<i>S. cohnii urealyticum</i>	6	12(6)	7(4)	8(5)	<i>S. schiefeleri coagulans</i>	7	8(6)	4(4)	10(5)
<i>S. epidermidis</i>	4	11 (4)	4(2)	6(2)	<i>S. schiefeleri schiefeleri</i>	9	10 (9)	5(5)	9(5)
<i>S. haemolyticus</i>	5	10(5)	4(4)	8(4)	<i>S. sciuri sciuri</i>	8	11 (8)	3(1)	4(3)
<i>S. hominis hominis</i>	8	9(4)	4(4)	5(3)	<i>S. simulans</i>	8	8(7)	4(5)	110 (7)
<i>S. hominis novobiosepticus</i>	6	12(6)	8(2)	8(3)	<i>S. warneri</i>	9	13(6)	10(7)	14(6)
<i>S. intermedius</i>	10	12 (9)	7(6)	6(5)	<i>S. xylosum</i>	5	9(4)	8(4)	9(4)
<i>M. lentus **</i>	3	7(3)			<i>M. luteus</i>	6	13 (4)	10 (4)	13(6)

*: El número entre paréntesis es el número de picos comunes con los de la base de datos 1.

** : *M. lentus* no creció en el medio de sangre de caballo.

La Tabla 3 muestra para cada cepa seleccionada y cada base de datos el número de picos que se ha mantenido. Mientras que para una cepa, algunos picos se conservaron independientemente del medio o del tiempo de cultivo, otros picos bien desaparecieron o aparecieron al cambiar las condiciones de cultivo. Sin embargo, para un determinado medio y tiempo de cultivo, el conjunto de los picos fue específico de cada cepa como se muestra en los dendrogramas (Figura 2).

Conservación del conjunto de picos de cada una de las cepas seleccionadas entre las cepas pertenecientes a la misma genoespecie

Para abordar este punto, se realizó una MALDI-TOF-MS usando bacterias cultivadas en Muëller Hinton durante 24 horas a 37 °C. Las cepas usadas son los aislados enumerados en la Tabla 2.

Para cada cepa, se mantuvieron solo los picos con un valor superior a 0,1. Luego se comparó el perfil obtenido para cada uno de estos aislados con el de los de la base de datos 1.

Para realizar esta tarea, se desarrolló un programa informático (base de datos BGP disponible en <http://sourceforge.net/projects/bgp>) que permitió la rápida identificación del conjunto más cercano de valores de la base de datos con el de la cepa analizada. Este programa informático selecciona la mejor coincidencia entre la cepa analizada y las cepas de referencia de la base de datos, teniendo en cuenta un posible error del valor de m/z que se ha medido. Este valor se fijó arbitrariamente en 7.

La cepa analizada siempre tuvo la mejor coincidencia con la cepa perteneciente a la misma genoespecie de la base de datos. Todos los datos se presentan en la Figura 4 y la Figura 5.

Número medio de picos conservados de las cepas analizadas cultivadas de acuerdo con Muëller Hinton durante 24 h en comparación con el número de picos de cada base de datos

Se analizó el mismo conjunto de datos obtenido mediante el cultivo de las bacterias analizadas en Muëller Hinton durante 24 horas frente a las bases de datos 2, 3 y 4.

Los resultados se dan en la Tabla 4.

Tabla 4

Especie	Número de cepas	Base de datos 1	Base de datos 2	Base de datos 3	Base de datos 4
<i>S. aureus</i>	68	9,6/11	8,7/11	4,5/7	4,7/8
<i>S. capitis capitis</i>	1	8/8	14/14	4/4	6/6
<i>S. capitis urealyticus</i>	1	7/7	7/9	6/6	4/4
<i>S. caprae</i>	2	5/5	8/12	6/6	5/6
<i>S. cohnii urealyticus</i>	2	6/6	9/12	7/7	6,5/8
<i>S. epidermidis</i>	81	3,2/4	5,1/11	2,2/4	3,4/6
<i>S. haemolyticus</i>	14	3,4/5	5,4/10	3,3/4	4,8/8
<i>S. hominis hominis</i>	6	5,6/8	* 5,7/9	3,5/4	3,6/5
<i>S. hominis novobio</i>	7	4/6	* 7,7/12	*** 2,7/7	***** 3,1/8
<i>S. intermedius</i>	1	10/10	11/12	7/7	6/6
<i>S. lugdunensis</i>	1	8/8	11/12	5/5	9/9
<i>S. saprophyticus bovis</i>	3	7,6/9	9,6/12	**** 4/7	4/5
<i>S. saprophyticus saprophyticus</i>	7	6/8	** 5,8/10	5,1/7	8/11
<i>S. schleiferi coagulans</i>	1	7/7	6/8	4/4	10/10
<i>S. pasteurii</i>	3	11/11	11/12	9,5/10	11,6/12
<i>S. sciuri sciuri</i>	3	7/7	8,3/11	2,3/3	3,6/4
<i>S. xylosus</i>	2	5/5	9/9	7/8	6/9
<i>S. warneri</i>	8	6,7/9	8,8/10	8/10	6,8/14
<i>M. luteus</i>	1	7/7	11/12	8/10	11/11

* Una cepa por identificar a nivel de subespecie no se pudo diferenciar.

**3 identificaciones de *S. saprophyticus bovis*.

*** 6 identificaciones de *S. hominis hominis*.

**** 1 identificación de *S. saprophyticus saprophyticus*.

***** 3 cepas sin diferenciar entre *S. hominis hominis* y *S. hominis novobiosepticus*.

La Tabla 4 muestra, para cada genoespecie, el número medio de picos que se conservaron entre las cepas analizadas y cada una de las cuatro bases de datos.

5 A pesar del número de picos conservado al establecer las bases de datos usadas para la identificación de genoespecies usando diferentes condiciones de crecimiento de las usadas para las cepas analizadas, la identificación a nivel de especie fue posible en todos los casos.

10 La única diferencia observada mediante el uso de las bases de datos 2, 3 y 4 con los resultados obtenidos con la base de datos 1, es que la identificación a nivel de subespecie no fue posible para *S. hominis* y *S. saprophytica* a diferencia de los resultados obtenidos con la base de datos 1.

15 En conjunto, dichos datos demuestran que mediante la selección de un conjunto apropiado de cepas y el mantenimiento de solo los picos conservados con un valor de m/z superior a 0,1, se puede diseñar mediante ingeniería genética una base de datos que se pueda usar para la identificación de genoespecies. Además, la especificidad de estos picos es tal que la identificación de genoespecies fue posible, incluso habiéndose cultivado las cepas por identificar con diferentes condiciones de cultivo de las usadas para diseñar la base de datos.

2. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores

20 La primera etapa consistió en crear una base de datos completa para todas las especies pertenecientes al grupo de los bacilos Gram negativos no fermentadores recuperados en seres humanos. A continuación, se validó esta base de datos para identificar, usando MALDI-TOF-MS, todos los bacilos Gram negativos no fermentadores clínicos que se habían recuperado de pacientes con fibrosis quística (FQ) en el período de un año.

25 Material y métodos

Cepas bacterianas

30 Las cepas de referencia usadas para diseñar mediante ingeniería genética la base de datos de MALDI-TOF-MS pertenecían a 52 especies de bacilos Gram negativos no fermentadores que se pueden recuperar de pacientes. Estas cepas se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4

Especie	Cepa de referencia	Especie	Cepa de referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 76.110	<i>Inquilinus limosus</i>	CIP 108342 T
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CIP 69.13 T	<i>Pandoraea apista</i>	CIP 106627 T
<i>Pseudomonas mosselii</i>	CIP 104061	<i>Bordetella avium</i>	CIP 103348 T
<i>Pseudomonas putida</i>	CIP 52.191 T	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CIP 55.110 T
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CIP 103022 T	<i>Bordetella hinzii</i>	CIP 104527 T
<i>Pseudomonas mendocina</i>	CIP 75.21 T	<i>Alcaligenes faecalis</i> subesp. <i>faecalis</i>	CIP 60.80 T
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	CIP 101034T	<i>Aeromonas sobria</i>	CIP 74.33 T
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	CIP 66.14 T	<i>Aeromonas hydrophila</i> subesp. <i>hydrophila</i>	CIP 76.14 T
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	CIP 102996T	<i>Aeromonas veronii</i>	CIP 103438 T
<i>Pseudomonas luteola</i>	CIP 102995T	<i>Aeromonas caviae</i>	CIP 76.16 T
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CIP 60.77 T	<i>Delftia acidovorans</i>	CIP 103021 T
<i>Achromobacter xylosoxydans</i> subesp. <i>xylosoxydans</i>	CIP 71.32 T	<i>Shewanella putrefaciens</i>	CIP 80.40 T
<i>Achromobacter xylosoxydans</i> subesp. <i>denitrificans</i>	CIP 77.15 T	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CIP 63.5 T
<i>Achromobacter piechaudii</i>	CIP 60.75 T	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	CIP 101026 T
<i>Burkholderia cepacia</i>	CIP 80.24 T	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	CIP 60.57 T
<i>Burkholderia multivorans</i>	CIP 105495T	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	CIP 100541 T
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CIP 108255T	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	CIP 100542 T
<i>Burkholderia stabilis</i>	CIP 106845T	<i>Brevundimonas diminuta</i>	CIP 63.27 T
<i>Burkholderia vietnamlensis</i>	CIP 105875T	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	CIP 101035 T
<i>Burkholderia dolosa</i>	CIP 108406	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	CIP 100752 T

(continuación)

<i>Especie</i>	Cepa de referencia	<i>Especie</i>	Cepa de referencia
<i>Burkholderia ambifaria</i>	CIP 107266T	<i>Cupriavidus pauculus</i>	CIP 105943 T
<i>Burkholderia anthina</i>	CIP 108228T	<i>Inquilinus limosus</i>	CIP 108342 T
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	CIP 105874 T	<i>Pandoraea apista</i>	CIP 106627 T
<i>Burkholderia gladioli</i>	CIP 105410 T	<i>Bordetella avium</i>	CIP 103348 T
<i>Burkholderia gladioli pathovar cocovenenans</i>	ATCC 33664	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CIP 55.110 T
<i>Burkholderia glumae</i>	NCPFB 2391	<i>Bordetella hinzii</i>	CIP 104527 T
<i>Burkholderia plantarii</i>	ATCC 43733	<i>Alcaligenes faecalis</i> subesp. <i>faecalis</i>	CIP 60.80 T
<i>Burkholderia glathei</i>	CIP 105421 T	<i>Aeromonas sobria</i>	CIP 74.33 T
<i>Burkholderia andropogonis</i>	CIP 105771 T	<i>Aeromonas hydrophila</i> subesp. <i>hydrophila</i>	CIP 76.14 T
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	CIP 107281 T	<i>Aeromonas veronii</i>	CIP 103438 T
<i>Ralstonia pickettii</i>	CIP 73.23 T	<i>Aeromonas caviae</i>	CIP 76.16 T
<i>Cupriavidus gilardii</i>	CIP 105966 T	<i>Delftia acidovorans</i>	CIP 103021 T
<i>Cupriavidus pauculus</i>	CIP 105943 T		

5 Los aislados clínicos de bacilos Gram negativos no fermentadores se recuperaron del esputo de niños con FQ que
acudieron al departamento de pediatría del hospital Necker-Enfants Malades (París, Francia) entre el 01/01/06 y el
31/12/06. En síntesis, se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* los aislados que mostraban una pigmentación
verde o amarilla verdosa, prueba de oxidasa positiva, crecimiento a 42 °C, crecimiento en agar cetrimida y
susceptibilidad a la colimicina. Los aislados que no expresaban esos criterios se identificaron mediante el sistema
API 20NE. Los resultados de las pruebas API 20NE se interpretaron usando el paquete informático APILAB PLUS.
10 Cuando se consideró que los resultados obtenidos usando este programa informático no correspondían a una buena
identificación de *P. aeruginosa*, *A. xylosoxydans* subesp. *xylosoxydans* y *S. maltophilia*, las bacterias se identificaron
mediante la secuenciación de un fragmento interno del gen ADNr 16S.

15 Todas las cepas bacterianas usadas en el estudio se almacenaron a -80 °C en caldo de tripticasa de soja
complementado con glicerol al 15 %.

20 MALDI-TOF-MS. Las cepas se cultivaron en agar de Mueller-Hinton y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La
mayoría de los aislados crecieron después de 24 horas, pero algunas cepas que no crecieron tras 24 horas se
incubaron adicionalmente durante 48 h o 72 h. Se cosechó una colonia aislada en 100 µl de agua estéril; se depositó
1 µl de esta mezcla sobre una placa diana (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) por triplicado y se dejó secar a
temperatura ambiente. A continuación, se añadió un microlitro de etanol absoluto a cada pocillo, y se dejó secar la
mezcla. Luego, se añadió un µl de solución de matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 50 mg/ml, acetonitrilo al
30 %, ácido trifluoroacético al 0,1%). Se procesaron las muestras en el espectrómetro de MALDI-TOF-MS (Autoflex;
Bruker Daltonics) con el programa informático de control de la flexión (Bruker Daltonics). Los iones positivos se
25 extrajeron con un voltaje de aceleración de 20 kV en modo lineal. Cada espectro era la suma de los iones obtenidos
a partir de 200 disparos de láser llevados a cabo en cinco regiones diferentes del mismo pocillo. Los espectros se
analizaron en un intervalo de m/z de 2.000 a 20.000. El análisis se realizó con el programa informático de análisis de
la flexión y se calibró con el patrón T de calibración de proteínas (Proteína I; Bruker Daltonics). Se añadieron los
datos obtenidos por triplicado para reducir al mínimo el efecto aleatorio. La presencia y la ausencia de picos se
30 consideraron como los identificadores genéticos de un determinado aislado. Los perfiles se analizaron y se
compararon usando el programa informático de la base de datos BGP disponible en la página web <http://sourceforge.net/projects/bgp>.

Resultados

35 Diseño por ingeniería genética de la base de datos de los bacilos Gram negativos no fermentadores

40 Se usaron las cepas de referencia enumeradas en la Tabla 4 para determinar los valores de m/z obtenidos por
MALDI-TOF-MS que constituirían un espectro característico de cada especie bacteriana y que luego se podrían usar
para la identificación bacteriana. La Figura 7 muestra el espectro obtenido con 6 especies de bacilos Gram negativos
no fermentadores. Se analizaron diez aislados de cada una de estas cepas seleccionadas cultivadas en Mueller
Hinton 24H mediante MALDI-TOF-MS como se describe en el apartado de Métodos y materiales. Para cada
espectro, se adoptó la misma estrategia usada para *Micrococcaceae*. De acuerdo con esta estrategia, solo se
mantuvieron los picos con una intensidad superior a 0,1 que estaban presentes de manera constante en el total de
los 10 conjuntos de datos obtenidos para una cepa dada. Para cada cepa, la desviación típica del valor de m/z

(datos normalizados) para cada pico conservado no fue nunca superior a 8. La Tabla 5 muestra, para 8 especies, los valores de los picos que se han mantenido para la base de datos.

Tabla 5

<i>Achromobacter xylosoxidans xylosoxidans</i> CIP 71.32T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 76.110	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13T	<i>Pseudomonas putida</i> CIP 52.191	<i>Burkholderia cenocepacia</i> CIP 108255 T	<i>Burkholderia gladii</i> CIP 105410T	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CIP 60.77T	<i>Raistonia mannitolylitica</i> CIP 107281T
1.208±1	4.436 ±2	4.339 ±1	3.810±1	3.600±2	4.416±1	4.541±1	3.818±3
1.419±1	4.544±3	6.089±1	4.439±1	4.414±2	4.808±1	4.862±1	4.396±1
2.190±1	5.213±3	6.275±2	6.089±1	4.806±2	5.204±1	5.276±1	4.813±4
2.319±1	5.742±3	6.403±1	6.275±1	5.202±2	5.225±3	5.898±3	5.398±4
2.447±1	6.051±3	6.634±2	6.403±2	5.345±2	6.305±1	6.108±1	6.156±4
2.576±1	6.353±3	7.182±1	6.634±2	5.916±3	6.489±2	7.161±2	7.060±5
2.705±1	6.682±4	7.604±2	7.182±2	6.486±3	6.597±1	7.578±2	7.078±5
2.833±1	6.918±4	7.647±1	7.604±2	6.503±4	6.859±2	9.349±2	7.943±4
2.865±1	7.211±4	9.568±1	7.647±2	7.089±3	6.959±2		9.632±4
2.962±1	7.586±4		9.568±2	7.216±3	7.060±2		
4.334±1	7.621±4			7.318±3	7.105±2		
4.978±1	8.575±5			7.397±3	7.185±2		
5.018±1	9.100±5			7.967±3	7.217±3		
5.242±1				9.624±4	7.325±2		
6.328±2					7.673±1		
6.701±2					7.794±2		
7.108±1					8.737±2		
7.302±1					9.627±2		
9.417±2					10.458±4		
9.445±2							
10.045±2							
10.101±2							

El conjunto de picos mantenidos para cada cepa de referencia da un espectro característico.

Identificación de las cepas clínicas

- 5 Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las bases de datos anteriores se podían usar para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores clínicos, demostrando así que el conjunto de picos de cada cepa seleccionada se conservaba, al menos parcialmente, entre los aislados de la misma especie. De enero a diciembre de 2006, se recuperaron e identificaron mediante pruebas fenotípicas o método molecular 811 cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores: 699 cepas de *P. aeruginosa* (120 pacientes), 54 cepas de *A. xylosoxydans* (12 pacientes), 32 cepas de *S. maltophilia* (12 pacientes), 9 cepas de *R. mannitolilytica* (1 paciente), 14 Bcc (2 pacientes), 1 cepa de *B. gladioli*, 1 cepa de *B. hinzii* y 1 cepa de *I. limosus*. Entre estas, se realizó un análisis de MALDI-TOF-MS en un grupo de 400 cepas de *P. aeruginosa* y en el resto de las cepas distintas de *P. aeruginosa*. Para cada aislado, se consideraron todos los valores de m/z del espectro. Para cada cepa, se mantuvieron todos los picos independientemente de su intensidad y luego se compararon con el de la base de datos usando el programa informático de la base de datos BGP. Este programa informático selecciona la mejor coincidencia entre la cepa analizada y la base de datos, teniendo en cuenta un posible error del valor de m/z. Este valor se fijó en. La cepa se identificó como perteneciente a la geno especie de la cepa de la base de datos que daba la mejor coincidencia. Los resultados se dan en la siguiente Tabla 6, que muestra las coincidencias obtenidas para una cepa de *P. aeruginosa* proporcionada por el programa informático BGP.

Tabla 6

Nombre del perfil: <i>P. aeruginosa</i> Coincidencia: 13/13	
06178603,0, valores txt	Valores de <i>P. aeruginosa</i>
4.441	4.436
4.548	4.544
5.216	5.213
5.743	5.742
6.053	6.051
6.354	6.353
6.682	6.682
6.917	6.918
7.209	7.211
7.584	7.586
7.620	7.621
8.571	8.575
9.096	9.100
Nombre del perfil: <i>F. oryzae</i> Coincidencia: 7/12	
06178603,0, valores txt	Valores de <i>F. oryzae</i>
4.441	4.435
6.053	6.053
6.505	6.503
6.682	6.680
7.497	7.498
7.584	7.581
9.123	9.126

La Tabla 7 muestra la identificación obtenida para todas las cepas clínicas en comparación con la segunda elección de identificación de especies.

Tabla 7

Cepas (número)	Pacientes (número)	Especies identificadas por técnicas convencionales	Comparación con la cepa de referencia		Diferencia del % de picos comunes con las respectivas cepas de referencia entre la primera y segunda selección de especies
			Cepa de referencia	% medio de picos comunes	
400	100	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	86 (ext : 23-100)	35 (ext : 2-67)
54	11	<i>A. xylosoxydans</i> subesp. <i>xylosoxydans</i>	<i>A. xylosoxydans</i> subesp. <i>xylosoxydans</i>	91 (ext : 73-100)	75 (ext: 1-5) (II elección: principalmente <i>A. piechaudii</i> o <i>A. xylosoxydans</i> subesp. <i>denitrificans</i>)
32	12	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	82 (ext: 63-100)	36 (ext : 4-59)
14	2	Complejo de <i>B. cepacia</i> *	<i>B. cenocepacia</i>	89 (ext: 71 - 100)	23 (ext: 2-31)
9	1	<i>Ralstonia</i> sp **	<i>R. mannitolilytica</i>	76 (ext : 60-80)	8 (ext: 2-18)
1	1	<i>B. gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>	78***	14***
1	1	<i>B. hinzii</i>	<i>B. hinzii</i>	90	34
1	1	<i>I. limosus</i>	<i>I. limosus</i>	60	35

*Todas las cepas excepto 3 (identificadas como *B. cepacia* en sentido estricto) se identificaron correctamente como *B. cenocepacia*.
 ** Todas las cepas excepto una (identificada como *R. picketti*) se identificaron correctamente como *R. mannitolilytica*.
 ***: este porcentaje es el mismo que se obtuvo con *B. gladioli pathovar. cocovenenans*.

5 MALDI-TOF-MS identificó correctamente el 100% de las cepas de *P. aeruginosa*, 100% de las cepas de *A. xylosoxydans* y 100% de las cepas de *S. maltophilia*. La espectrometría de masas identificó cepas clínicas de *A. xylosoxydans* a nivel de subespecie. El análisis de espectrometría de masas identificó correctamente 11 cepas BCC como *B. cenocepacia*. Para las 3 cepas BCC restantes, no hubo diferenciación entre *B. cenocepacia* y *B. cepacia* en sentido estricto. Cabe señalar que las 9 cepas de *R. mannitolilytica*, excepto una (identificada por espectrometría de masas como *R. picketti*), se identificaron correctamente mediante espectrometría de masas.

Conclusiones

15 Estos resultados demuestran que la base de datos diseñada por ingeniería genética de acuerdo con la invención también es adecuada para la identificación precisa de especies de bacilos Gram negativos no fermentadores. Por lo tanto, mediante MALDI-TOF-MS, es posible, a partir de una colonia de bacilos Gram negativos no fermentadores (condiciones de cultivo, características de la colonia), obtener en pocos minutos una identificación precisa y sin necesidad de realizar ensayos adicionales. Las cepas clínicas de FQ analizadas se identificaron con precisión a nivel de especie, a excepción de tres cepas de *B. cenocepacia* y una de *R. mannitolilytica*. Es interesante señalar que la cepa identificada como *B. gladioli* también coincidió con la cepa de referencia de *B. cocovenenans*, una especie de bacteria que ha demostrado ser un sinónimo menor de *B. gladioli*. MALDI-TOF-MS permite la identificación de bacterias de manera rápida mientras que la identificación bioquímica convencional por API 20NE a menudo requiere más de 24 h-48 h con frecuentes identificaciones erróneas. Por lo tanto, la identificación de cepas por MALDI-TOF-MS es un método muy interesante para la caracterización de especies de bacilos Gram negativos y ayudará a la comprensión de su relevancia clínica y distribución.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la identificación de una cepa aislada de una muestra clínica, a nivel de especie y/o de subespecie, usando el análisis de MALDI-TOF-MS que comprende una etapa de clasificación del germen en un grupo antes de realizar el análisis de MALDI-TOF-MS, en el que dicho análisis de MALDI-TOF-MS comprende la etapa de comparar el perfil de espectros de la cepa que se va a identificar con una base de datos de referencia que contiene los espectros de MALDI-TOF-MS característicos de las cepas representativas de la genoespecie del grupo de gérmenes al que pertenece dicha cepa que se va a identificar, conteniendo dicha base de datos, para cada cepa representativa, los picos que tienen, en comparación con el pico con la intensidad más elevada fijada arbitrariamente en 1, una intensidad relativa superior a 0,05, por lo que están presentes en al menos 2 subcultivos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde dicha base de datos contiene, para cada cepa representativa, picos que tienen, en comparación con el pico con la intensidad más elevada fijada arbitrariamente en 1, una intensidad relativa superior a 0,1.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa de clasificación se basa en las condiciones de crecimiento y/o la característica de las colonias y/o la morfología de las bacterias ante el examen microscópico y/o la tinción de Gram y/o pruebas fenotípicas sencillas.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la realización de la técnica de MALDI-TOF-MS en células enteras intactas o en extractos de proteínas obtenidos tras la lisis o correspondientes a una fracción de los componentes celulares.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la adición de un derivado de ácido benzoico como medio de matriz a las colonias aisladas antes de realizar el análisis de MALDI-TOF-MS, siendo dicho derivado seleccionado del grupo que comprende DHB.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada espectro es la suma de al menos 400 disparos de láser, preferentemente más de 1.000, incluso más preferentemente más de 2.000, procedentes de diferentes regiones del pocillo que contiene la cepa que se va a analizar, siendo dicho espectro analizado en un intervalo de m/z de 500 a 50.000.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, que comprende el uso de al menos 1.000 disparos de láser.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende el uso de al menos 2.000 disparos de láser.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho espectro se analiza en un intervalo de m/z de entre 500 y 20.000.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho espectro se analiza en un intervalo de m/z de entre 2.000 y 20.000.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cepa por identificar se selecciona del grupo que comprende bacterias.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la bacteria es un estafilococo coagulasa negativa.
13. El método de la reivindicación 11, en el que la bacteria es un bacilo Gram negativo no fermentador.
- 50 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cepa por identificar se selecciona del grupo que comprende levaduras.
- 55 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cepa por identificar se selecciona del grupo que comprende mohos.
- 60 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende la conservación, en el espectro de la cepa analizada, de picos que tienen, en comparación con el pico con la intensidad más elevada fijada arbitrariamente en 1, una intensidad relativa superior a 0,05.
17. El método de la reivindicación 16, que comprende la conservación de los picos que tienen una intensidad relativa superior a 0,1.

FIGURA 1

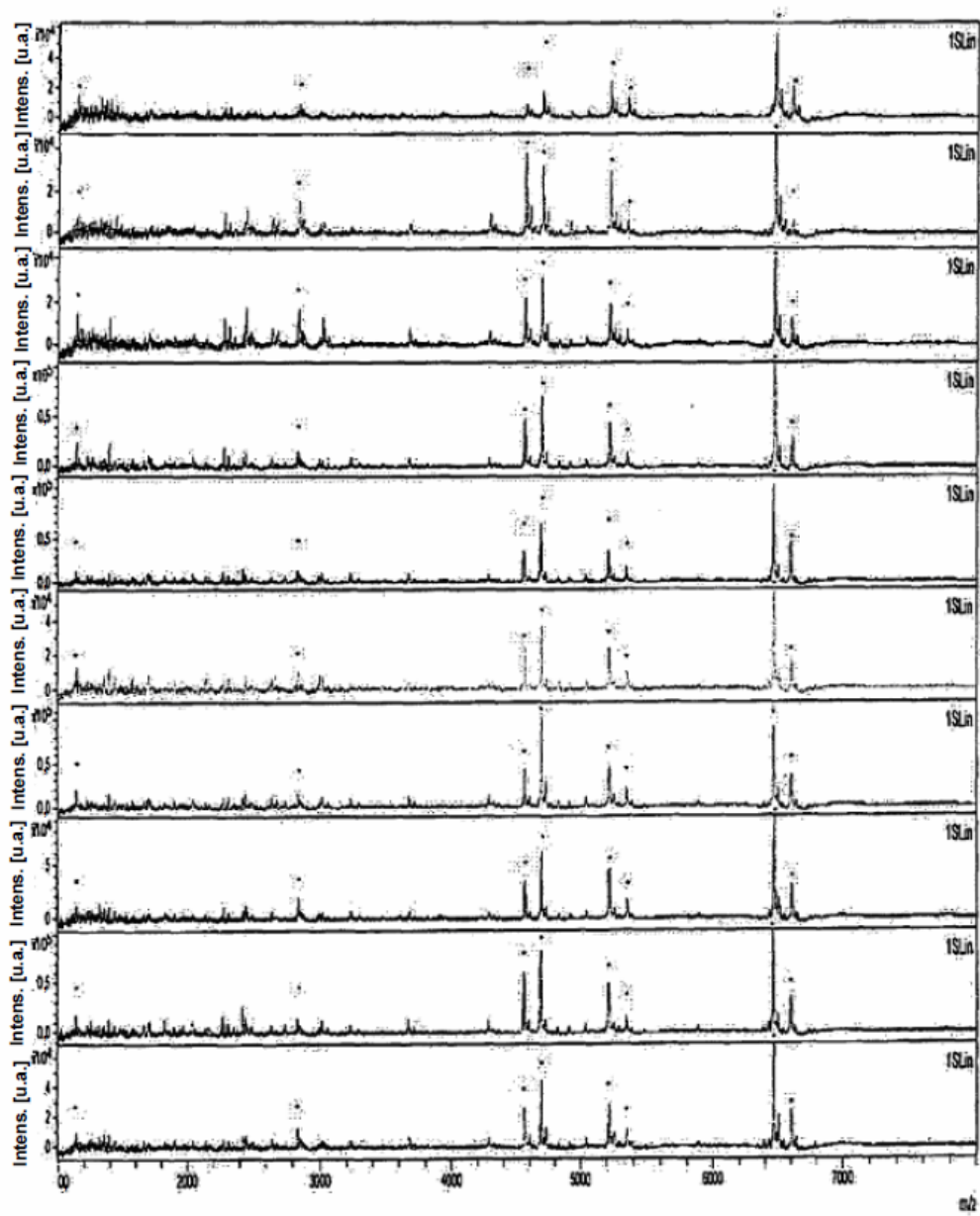


FIGURA 2

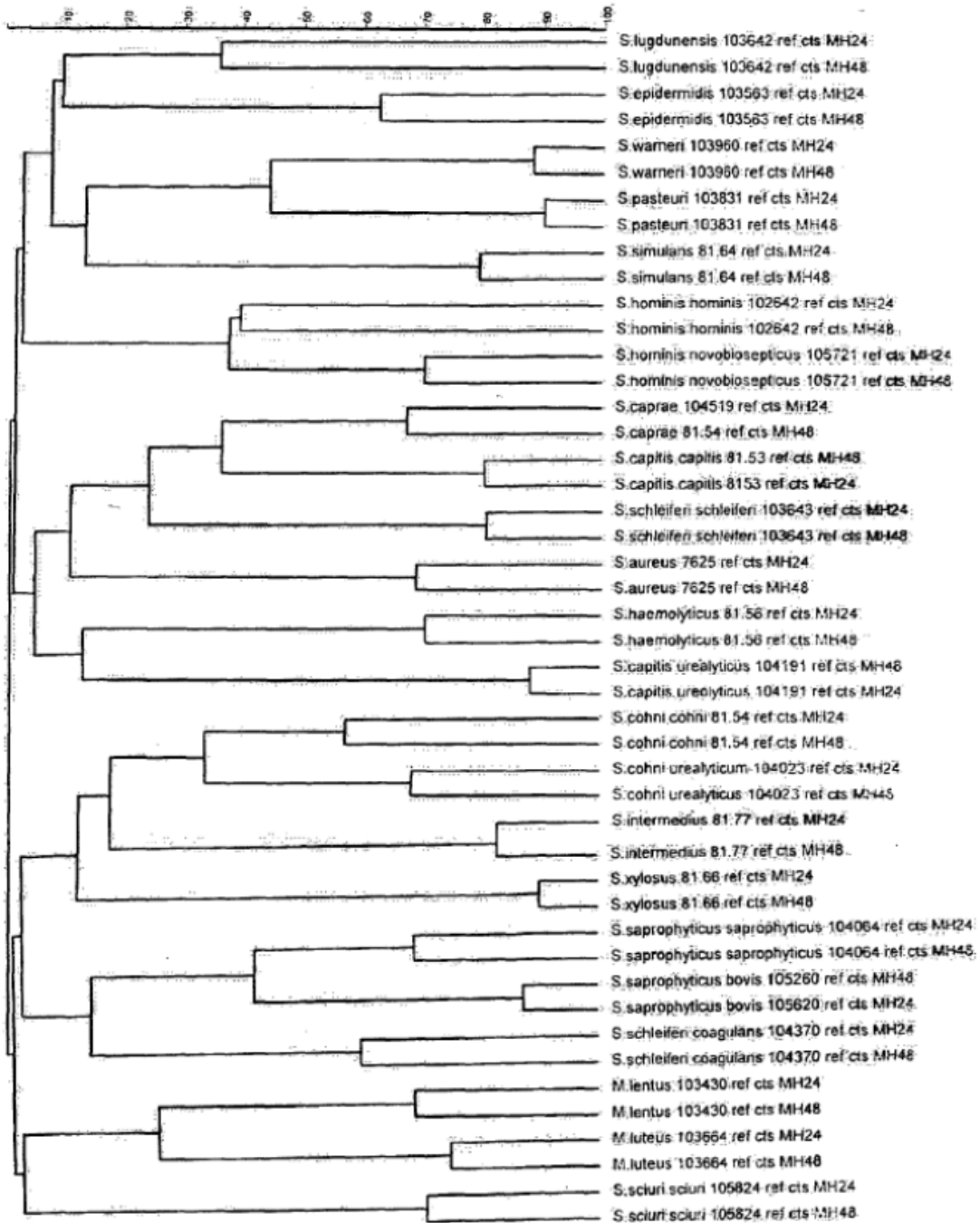


FIGURA 3

	Base de datos 1	Base de datos 2	Base de datos 3	Rasa de datos 4		Base de datos 1	Base de datos 2	Base de datos 3	Base de datos 4
<i>S. aureus</i>	2196 (+/-2) 2234 (+/-2) 2284 (+/-2) 2302 (+/-2) 2323 (+/-2) 2342 (+/-2) 3005 (+/-2) 3043 (+/-2) 4526 (+/-2) 5509 (+/-2) 6893 (+/-2)	2194 (+/-2) 2217 (+/-2) 2233 (+/-2) 2282 (+/-2) 2302 (+/-3) 2340 (+/-3) 2680 (+/-3) 2719 (+/-3) 3004 (+/-3) 3042 (+/-3) 6891 (+/-4)	1696 (+/-2) 1788 (+/-2) 3007 (+/-2) 4307 (+/-2) 5035 (+/-2) 5510 (+/-2) 6892 (+/-2)	1785 (+/-2) 2682 (+/-2) 2976 (+/-2) 3005 (+/-2) 3041 (+/-3) 5512 (+/-3) 6825 (+/-5) 6896 (+/-5)	<i>S. intermedius</i>	2092 (+/-2) 2117 (+/-1) 2133 (+/-1) 2154 (+/-1) 2170 (+/-2) 4278 (+/-3) 4796 (+/-3) 6244 (+/-4) 6732 (+/-4) 6770 (+/-5)	1358 (+/-3) 2092 (+/-2) 2117 (+/-2) 2133 (+/-2) 2154 (+/-2) 2777 (+/-2) 2816 (+/-2) 4278 (+/-1) 4796 (+/-2) 6244 (+/-3) 6733 (+/-3) 6771 (+/-3)	1378 (+/-2) 2094 (+/-2) 2135 (+/-2) 4279 (+/-2) 4797 (+/-2) 6245 (+/-2) 6733 (+/-2)	2133 (+/-2) 4278 (+/-2) 4796 (+/-3) 6245 (+/-5) 6734 (+/-5) 6873 (+/-5)
<i>S. capitis capitis</i>	2611 (+/-2) 2642 (+/-2) 2664 (+/-2) 2681 (+/-2) 2908 (+/-2) 2947 (+/-2) 5099 (+/-3) 6713 (+/-4)	2446 (+/-2) 2610 (+/-2) 2642 (+/-2) 2664 (+/-2) 2680 (+/-2) 2702 (+/-2) 2719 (+/-2) 2908 (+/-2) 2946 (+/-1) 5071 (+/-2) 5098 (+/-2) 5136 (+/-3) 6713 (+/-4) 6748 (+/-1)	2613 (+/-2) 2645 (+/-2) 5101 (+/-2) 6715 (+/-2)	2446 (+/-3) 2483 (+/-2) 2611 (+/-3) 2908 (+/-3) 5100 (+/-4) 6716 (+/-6)	<i>S. lugdunensis</i>	2586 (+/-2) 2744 (+/-2) 2782 (+/-2) 3078 (+/-2) 4460 (+/-3) 4499 (+/-2) 4568 (+/-3) 4953 (+/-3) 5166 (+/-4)	2547 (+/-2) 2586 (+/-2) 2743 (+/-2) 2764 (+/-3) 2781 (+/-2) 4949 (+/-2) 5162 (+/-2) 5183 (+/-2) 5200 (+/-2) 5238 (+/-2) 5298 (+/-2) 7351 (+/-3)	2549 (+/-2) 2745 (+/-2) 4953 (+/-3) 5166 (+/-3) 7357 (+/-4)	2546 (+/-1) 2585 (+/-1) 2742 (+/-1) 4955 (+/-3) 5152 (+/-3) 5167 (+/-4) 5206 (+/-4) 5304 (+/-4) 7363 (+/-5)
<i>S. capitis ureolyticus</i>	5098 (+/-3) 5137 (+/-3) 5235 (+/-3) 6713 (+/-4) 6751 (+/-4)	2580 (+/-2) 5041 (+/-3) 5082 (+/-3) 5098 (+/-2) 5120 (+/-2) 5136 (+/-2) 5235 (+/-3) 6713 (+/-4) 6752 (+/-4)	5084 (+/-2) 5100 (+/-2) 5122 (+/-2) 5139 (+/-2) 5236 (+/-2) 6715 (+/-2)	5100 (+/-3) 5138 (+/-3) 5236 (+/-3) 6717 (+/-5)	<i>S. pasteurii</i>	2176 (+/-1) 2215 (+/-1) 2352 (+/-2) 2393 (+/-2) 2432 (+/-2) 2784 (+/-2) 2807 (+/-2) 2823 (+/-2) 2866 (+/-2) 2888 (+/-2) 2905 (+/-2)	2176 (+/-2) 2215 (+/-2) 2352 (+/-2) 2375 (+/-2) 2393 (+/-2) 2433 (+/-2) 2785 (+/-2) 2807 (+/-2) 2823 (+/-2) 2824 (+/-2) 2866 (+/-2) 2889 (+/-2) 2905 (+/-2)	2178 (+/-2) 2353 (+/-2) 2395 (+/-2) 2434 (+/-2) 2785 (+/-2) 2806 (+/-2) 2808 (+/-2) 2825 (+/-3) 2867 (+/-2) 2887 (+/-2) 2889 (+/-3) 2906 (+/-3) 2906 (+/-3)	2176 (+/-3) 2352 (+/-3) 2394 (+/-3) 2785 (+/-3) 2806 (+/-2) 2824 (+/-3) 2867 (+/-3) 2888 (+/-2) 2904 (+/-2) 4531 (+/-4) 4965 (+/-4) 6182 (+/-5)

<i>S. caprae</i>	2642 (+/-1) 2665 (+/-1) 2681 (+/-1) 2959 (+/-1) 5215 (+/-3)	1004 (+/-2) 2553 (+/-2) 2641 (+/-2) 2664 (+/-2) 2680 (+/-2) 2702 (+/-2) 2718 (+/-2) 2740 (+/-2) 2920 (+/-2) 2954 (+/-5) 5214 (+/-2) 5252 (+/-3)	2921 (+/-2) 2956 (+/-3) 5016 (+/-2) 5216 (+/-2) 5254 (+/-2) 7050 (+/-2)	2554 (+/-2) 2920 (+/-2) 2957 (+/-3) 5017 (+/-3) 5217 (+/-4) 7052 (+/-6)	<i>S. saprophyticus bovis</i>	2478 (+/-2) 2499 (+/-2) 2517 (+/-2) 2828 (+/-3) 4936 (+/-4) 4987 (+/-3) 6288 (+/-5) 6383 (+/-5) 6617 (+/-5)	1004 (+/-2) 2478 (+/-2) 2497 (+/-4) 2517 (+/-2) 4263 (+/-3) 4936 (+/-3) 4987 (+/-3) 6037 (+/-3) 6289 (+/-4) 6384 (+/-4) 6394 (+/-4) 6618 (+/-4)	1118 (+/-2) 1144 (+/-3) 1158 (+/-2) 4265 (+/-3) 6290 (+/-4) 6385 (+/-4) 6291 (+/-3) 6386 (+/-3) 6399 (+/-4)	3761 (+/-1) 4262 (+/-2) 6290 (+/-4) 6385 (+/-4) 6619 (+/-4)
<i>S. colini colini</i>	2074 (+/-1) 2097 (+/-1) 2113 (+/-1) 2690 (+/-1) 4481 (+/-2) 6567 (+/-4)	1370 (+/-2) 2073 (+/-2) 2096 (+/-2) 2112 (+/-1) 2135 (+/-1) 2401 (+/-1) 2689 (+/-1) 4480 (+/-0) 5817 (+/-1)	1095 (+/-2) 1118 (+/-2) 1132 (+/-2) 1146 (+/-2) 1416 (+/-2) 2077 (+/-3) 2115 (+/-3) 2181 (+/-3) 2192 (+/-2) 2406 (+/-2)	1003 (+/-3) 2073 (+/-1) 2096 (+/-1) 2112 (+/-2) 2401 (+/-3) 2440 (+/-2) 2688 (+/-2) 4457 (+/-3) 4484 (+/-2) 4910 (+/-2) 5821 (+/-4)	<i>S. saprophyticus saprophyticus</i>	1004 (+/-1) 2478 (+/-2) 2828 (+/-2) 4935 (+/-4) 4986 (+/-4) 5066 (+/-4) 6228 (+/-5) 6617 (+/-5)	1004 (+/-2) 2126 (+/-2) 2479 (+/-3) 2555 (+/-2) 4935 (+/-3) 4935 (+/-3) 4986 (+/-3) 5008 (+/-3) 5025 (+/-3) 6228 (+/-5) 6617 (+/-5)	4265 (+/-2) 4938 (+/-2) 4989 (+/-3) 5027 (+/-2) 6230 (+/-3) 6387 (+/-4) 6619 (+/-3)	1317 (+/-4) 1440 (+/-4) 3761 (+/-1) 4262 (+/-2) 4936 (+/-3) 4987 (+/-4) 5008 (+/-2) 6038 (+/-4) 6230 (+/-4) 6256 (+/-5) 6619 (+/-5)
<i>S. colini urealyticum</i>	2075 (+/-1) 2098 (+/-1) 2114 (+/-1) 2136 (+/-2) 6079 (+/-3) 6541 (+/-4)	1357 (+/-1) 2074 (+/-1) 2097 (+/-1) 2114 (+/-1) 2135 (+/-2) 2153 (+/-1) 2441 (+/-1) 4895 (+/-2) 6079 (+/-3) 6118 (+/-3) 6540 (+/-4) 6579 (+/-4)	2077 (+/-2) 2115 (+/-2) 2406 (+/-3) 6080 (+/-2) 6118 (+/-2) 6542 (+/-2) 6580 (+/-2)	1318 (+/-2) 1442 (+/-3) 2075 (+/-3) 2098 (+/-3) 2114 (+/-2) 4898 (+/-3) 6083 (+/-4) 6545 (+/-4)	<i>S. schleiferi coagulans</i>	4276 (+/-4) 4851 (+/-4) 4873 (+/-4) 4889 (+/-4) 4984 (+/-4) 6683 (+/-6) 6771 (+/-6)	1004 (+/-2) 4852 (+/-4) 4874 (+/-4) 4890 (+/-3) 4987 (+/-4) 6571 (+/-5) 6685 (+/-6) 6773 (+/-7)	4853 (+/-3) 4875 (+/-3) 4891 (+/-3) 6774 (+/-4) 4876 (+/-2) 4987 (+/-1) 6405 (+/-5) 6688 (+/-6) 6775 (+/-6)	2135 (+/-2) 2820 (+/-1) 3506 (+/-1) 4854 (+/-2) 4876 (+/-2) 4987 (+/-1) 6405 (+/-5) 6688 (+/-6) 6775 (+/-6)
<i>S. epidermidis</i>	2836 (+/-4) 5340 (+/-2) 6682 (+/-4) 6720 (+/-4)	2256 (+/-1) 4102 (+/-4) 4478 (+/-4) 4938 (+/-5) 4979 (+/-5) 4996 (+/-4) 5017 (+/-4) 5035 (+/-5) 5132 (+/-4) 6890 (+/-7)	2738 (+/-2) 2882 (+/-3) 5341 (+/-2) 6684 (+/-2)	2485 (+/-2) 2735 (+/-3) 2845 (+/-3) 5340 (+/-3) 6685 (+/-5) 6821 (+/-4)	<i>S. schleiferi schleiferi</i>	2577 (+/-2) 2670 (+/-2) 2692 (+/-2) 2708 (+/-2) 2922 (+/-2) 2944 (+/-2) 2961 (+/-2) 2983 (+/-2) 3000 (+/-2)	2575 (+/-1) 2633 (+/-1) 2669 (+/-1) 2690 (+/-1) 2707 (+/-1) 2920 (+/-1) 2942 (+/-1) 2959 (+/-1) 2982 (+/-1) 2998 (+/-1)	2577 (+/-2) 2672 (+/-2) 2692 (+/-1) 2946 (+/-2) 2962 (+/-2) 2921 (+/-3) 2943 (+/-3) 2960 (+/-3) 2974 (+/-3) 3059 (+/-3)	2573 (+/-4) 2634 (+/-3) 2669 (+/-3) 2905 (+/-3) 2921 (+/-3) 2943 (+/-3) 2960 (+/-3) 2974 (+/-3) 3059 (+/-3)

FIGURA 4

<i>S. haemolyticus</i>	4981 (+/-3) 4997 (+/-3) 5036 (+/-3) 5131 (+/-3) 6891 (+/-5)	2256 (+/-1) 4102 (+/-4) 4478 (+/-4) 4938 (+/-5) 4979 (+/-5) 4996 (+/-4) 5017 (+/-4) 5035 (+/-5) 5132 (+/-4) 6890 (+/-7)	4982 (+/-2) 4998 (+/-2) 5133 (+/-2) 6892 (+/-2)	1319 (+/-3) 1724 (+/-3) 2256 (+/-1) 4480 (+/-3) 4983 (+/-3) 4999 (+/-4) 5135 (+/-3) 6895 (+/-5)	<i>S. scituri scituri</i>	1342 (+/-1) 1360 (+/-2) 1395 (+/-1) 1407 (+/-1) 1421 (+/-1) 1436 (+/-4) 5520 (+/-2) 5652 (+/-2)	1004 (+/-2) 1328 (+/-2) 1340 (+/-2) 1355 (+/-2) 1380 (+/-2) 1394 (+/-3) 1406 (+/-3) 1419 (+/-3) 1433 (+/-2) 5518 (+/-4) 5650 (+/-4)	1144 (+/-4) 2192 (+/-2) 5652 (+/-2)	1356 (+/-4) 5522 (+/-2) 5654 (+/-2) 6501 (+/-3)
<i>S. hominis hominis</i>	1138 (+/-2) 2839 (+/-2) 4564 (+/-2) 4695 (+/-2) 5223 (+/-2) 5356 (+/-2) 6476 (+/-2) 6609 (+/-2)	2430 (+/-2) 4291 (+/-1) 4565 (+/-1) 4603 (+/-1) 4697 (+/-1) 5224 (+/-1) 6462 (+/-2) 6478 (+/-2) 6516 (+/-2)	4565 (+/-3) 4697 (+/-3) 5224 (+/-3) 6477 (+/-3)	4565 (+/-3) 5225 (+/-3) 6464 (+/-4) 6480 (+/-4) 6617 (+/-4)	<i>S. simulans</i>	2780 (+/-1) 2893 (+/-1) 2933 (+/-2) 3958 (+/-2) 3996 (+/-1) 4094 (+/-2) 4321 (+/-2) 5694 (+/-3)	2779 (+/-2) 2893 (+/-2) 2932 (+/-2) 3957 (+/-2) 3979 (+/-2) 3995 (+/-2) 4094 (+/-2) 5693 (+/-4)	2743 (+/-2) 2782 (+/-3) 2896 (+/-3) 2935 (+/-3) 3960 (+/-2)	1315 (+/-0) 2738 (+/-0) 2760 (+/-0) 2778 (+/-0) 2891 (+/-1) 2931 (+/-0) 3957 (+/-1) 3995 (+/-0) 4094 (+/-0) 5695 (+/-0)
<i>S. hominis novobiosepticus</i>	2496 (+/-2) 2839 (+/-2) 4696 (+/-3) 4916 (+/-3) 5224 (+/-3) 6478 (+/-4)	2497 (+/-2) 2536 (+/-2) 2839 (+/-2) 2858 (+/-2) 2996 (+/-3) 4696 (+/-1) 4916 (+/-1) 5225 (+/-1) 6478 (+/-2) 6516 (+/-2) 6614 (+/-2)	1094 (+/-3) 1117 (+/-2) 1132 (+/-4) 1144 (+/-3) 2407 (+/-3) 2820 (+/-2) 4916 (+/-2) 6477 (+/-3)	1318 (+/-3) 2820 (+/-3) 4565 (+/-3) 4916 (+/-3) 5225 (+/-3) 6440 (+/-5) 6463 (+/-5) 6479 (+/-4)	<i>S. warneri</i>	2177 (+/-2) 2336 (+/-1) 2375 (+/-2) 2585 (+/-2) 2824 (+/-2) 2936 (+/-2) 5457 (+/-2) 5906 (+/-3) 5945 (+/-3)	2176 (+/-2) 2215 (+/-2) 2336 (+/-2) 2358 (+/-2) 2375 (+/-2) 2375 (+/-2) 2585 (+/-2) 2624 (+/-2) 2785 (+/-2) 2807 (+/-2) 2824 (+/-2) 2897 (+/-2) 2936 (+/-2) 5906 (+/-3)	2177 (+/-2) 2337 (+/-2) 2376 (+/-2) 2586 (+/-2) 2786 (+/-2) 2808 (+/-1) 2824 (+/-1) 2897 (+/-2) 2936 (+/-1) 5908 (+/-3)	2175 (+/-2) 2335 (+/-2) 2555 (+/-1) 2584 (+/-2) 2605 (+/-1) 2622 (+/-2) 2756 (+/-1) 2784 (+/-1) 2805 (+/-1) 2823 (+/-1) 2896 (+/-1) 2918 (+/-2) 2934 (+/-1) 5909 (+/-0)
<i>S. intermedium</i>	2092 (+/-2) 2117 (+/-1) 2133 (+/-1) 2154 (+/-1) 2170 (+/-2) 4278 (+/-3) 4796 (+/-3) 6244 (+/-4) 6732 (+/-4) 6770 (+/-5)	1358 (+/-3) 2092 (+/-2) 2117 (+/-2) 2133 (+/-2) 2154 (+/-2) 2777 (+/-2) 2816 (+/-2) 4278 (+/-1) 4796 (+/-2) 6244 (+/-3)	1378 (+/-2) 2094 (+/-2) 2135 (+/-2) 4279 (+/-2) 4797 (+/-2) 6245 (+/-2) 6733 (+/-2)	2133 (+/-2) 4278 (+/-2) 4796 (+/-3) 6245 (+/-5) 6734 (+/-5) 6873 (+/-5)	<i>S. xylosum</i>	2429 (+/-2) 4236 (+/-2) 6065 (+/-2) 6386 (+/-3) 6572 (+/-3)	2111 (+/-3) 2429 (+/-3) 2450 (+/-4) 2467 (+/-2) 4895 (+/-3) 4962 (+/-3) 6064 (+/-4) 6385 (+/-4) 6571 (+/-4)	1119 (+/-2) 1145 (+/-4) 1364 (+/-3) 4234 (+/-2) 4894 (+/-1) 6066 (+/-2) 6387 (+/-2) 6573 (+/-2)	1140 (+/-3) 3808 (+/-2) 4234 (+/-2) 4894 (+/-1) 6064 (+/-0) 6386 (+/-0) 6501 (+/-1) 6523 (+/-0) 6572 (+/-0)

CIP 76125T	1000 1005	1015 1321	CIP 105262	1135 1046	1001 1089	CIP 81660T	5243 2441	CIP 106511	5080 2113	CIP 81665	1112 2555	CIP 103540	2174 2172	CIP 8162	1096 1004	CIP 103583	1001 2072	CIP 105825	1060 1134
1435 1012	1100 1480	1431 1604	1153 1073	2200 2195	1016 1102	5246 2626	5087 2430	5087 2430	1112 2555	1134 4434	2174 2172	2174 2172	1110 1019	1110 1019	1016 2094	1016 2094	1079 1323	1079 1323	1079 1323
1438 1020	1431 1604	1435 1606	2493 1089	2338 2332	1018 1116	5249 2628	5119 2452	5119 2452	1134 4434	1216 4606	2172 2111	2132 2311	1110 1019	1110 1019	1039 2111	1039 2111	1098 1340	1098 1340	1098 1340
2121 1028	1435 1606	1473 2127	2532 1112	2377 2371	1028 1128	5254 2629	5135 2469	5135 2469	1315 4606	1315 4606	2349 2347	2372 2389	1131 2640	1131 2640	2412 2133	2412 2133	1102 1356	1102 1356	1102 1356
2350 1043	1473 2127	1356 1185	2669 1153	2395 1105	1028 1128	5258 2628	5157 2508	5157 2508	1354 4095	1354 4095	2391 2428	2391 2428	1313 2678	1313 2678	2550 2149	2550 2149	1117 1379	1117 1379	1117 1379
2474 1082	2121 2479	1394 1216	2818 1324	2395 1117	1030 1128	5264 2628	5174 2619	5174 2619	1392 5013	1392 5013	2412 2780	2412 2780	1352 2715	1352 2715	2589 2417	2589 2417	1139 1393	1139 1393	1139 1393
2512 1100	2172 2497	2428 1232	2835 1437	2434 1119	1030 1128	5268 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2639 2418	2639 2418	1177 1417	1177 1417	1177 1417
2551 1142	2211 2518	2447 1255	2856 2087	2471 1140	1034 1134	5274 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4259 1481	2427 2541	2644 1269	2874 2089	2471 1140	1034 1134	5278 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4932 1695	2473 2556	2836 1315	2885 2089	2471 1140	1034 1134	5282 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4970 1784	2496 2830	3677 1338	2937 2803	2471 1140	1034 1134	5286 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4983 2048	2512 4264	4598 1392	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5290 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
5006 2075	2550 4988	4691 1434	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5294 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
5061 2086	2551 5025	4730 2277	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5298 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
5063 2099	2804 5894	5219 2316	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5302 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6226 2114	2882 6038	5257 2836	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5306 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6615 2355	2882 6038	5350 4564	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5310 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6653 2127	2884 6384	6470 4695	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5314 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6653 2478	2900 6399	6508 5222	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5318 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2499 2938	2938 6618	6602 5261	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5322 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2517 4985	4260 6618	6640 5355	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5326 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2555 2555	4985 6478	6440 6440	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5330 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2557 5023	6342 6478	6478 6478	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5334 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2709 6287	6717 6497	6497 6497	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5338 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2828 6381	6316 6516	6516 6516	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5342 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
2867 6398	6611 6611	6611 6611	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5346 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4261 6616	6616 6616	6616 6616	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5350 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4932 6616	6616 6616	6616 6616	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5354 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
4971 6791	6807 6807	6807 6807	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5358 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
5004 6807	6807 6807	6807 6807	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5362 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
5062 6807	6807 6807	6807 6807	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5366 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6223 6242	6242 6242	6242 6242	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5370 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6378 6381	6381 6381	6381 6381	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5374 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6394 6611	6611 6611	6611 6611	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5378 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6633 6633	6633 6633	6633 6633	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5382 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6649 6649	6649 6649	6649 6649	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5386 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6747 6747	6747 6747	6747 6747	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5390 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473
6784 6784	6784 6784	6784 6784	2945 2803	2471 1140	1034 1134	5394 2628	5174 2619	5174 2619	1417 5030	1417 5030	2430 2802	2430 2802	1355 2918	1355 2918	2661 4477	2661 4477	1324 2473	1324 2473	1324 2473

FIGURA 5

S.epidermidis

LL1	LL2	LL3	LL4	LL5	LL6	LL7	LL8	LL9	LL10	LL11	LL12	LL13	LL14	LL15	LL16
1911	1041	2036	3344	2843	2420	5121	2841	3343	1234	3349	3344	2242	2246	3342	2841
2057	1234	2653	4298	2855	2458	5262	3345	5119	3344	3349	4298	2838	2840	5117	2854
2841	1577	2803	4678	3346	2842	5346	4299	5256	4298	4292	5119	3342	3343	5254	3343
3338	2419	2841	5120	4678	2855	6688	5120	5346	5120	5122	5257	3748	3746	5343	5119
5115	2458	2855	5251	5122	3345	6725	5261	6688	5262	5264	5346	5345	5119	6455	5260
5256	2842	3346	5345	5264	5122	6827	5347	6725	5345	5346	5394	5532	5261	6686	5345
5341	2853	3749	6688	5346	5264		6688	6826	6689	6688	6459	6689	5345	6723	6671
5888	2879	4679	6725	5397	5345		6726		6725	6726	6688	6725	6457	6822	6688
6582	3344	5122	6825	6462	5396		6827		6825	6824	6725	6934	6688		6725
6684	4299	5263		6688	6591						6825		6726		6824
6722	4678	5345		6725	6688										
6820	5262	5396		6828	6726										
8237	5346	6462			6828										
8702	5395	6688													
	6588	6828													
	6690														
	6724														
	6825														

CC4	ALA4	abm1	abm2	abm3	abm4	AMT1	AMT2	AMT3	AMT4	AMT5	AMT6	AMT7
2623	2494	1310	1151	2887	1151	1487	1486	1041	1486	1041	1797	2214
2663	2652	1442	2840	3339	2837	1517	1516	1488	1516	1458	2214	2419
4301	2671	1683	3341	3743	2881	2203	2213	1518	2201	1487	2419	2436
5122	2691	2191	4296	4900	3338	2418	2417	2215	2212	1501	2436	2457
5255	2841	2297	4901	5117	4293	2457	2437	2252	2417	1518	2457	2493
5344	2856	2630	5054	5344	4898	2554	2456	2420	2435	1531	2493	2854
6462	3344	2839	5345	6672	5342	2593	2841	2438	2457	1560	2840	2870
6688	5121	3332	6688	6686	6686	2752	2853	2458	2341	2173	2870	2889
6726	5253	4284	6725	6724	6724	2842	2876	2835	2853	2203	3345	4680
6829	5344	4888	6827	6825	6823	2854	4901	2889	2880	2215	4679	5345
	6590	4926		9634		3344	5345	4680	3343	2233	4906	6689
	6674	5295		9662		4903	6688	4905	4903	2420	5345	6725
	6689	5332				5119	6726	5345	5345	2436	6688	
	6725	5343				5346	6826	6678	6688	2459	6725	
	6826	6388				6688		6688	6826	2841		
		6659				6725		6726		2855		
		6685				6826				2889		
		6815								2919		
		6832								3345		
		7542								4680		
										4905		
										5345		
										6688		
										6725		
										6829		

ES 2 477 499 T3

mej1	mej2	dja	far1	boc	faua1	faua2	rem	yos1	yos2	yos3	sec2	sec3
3341	3339	1636	2644	1523	1036	1457	1033	3341	2648	1036	3339	3339
4294	5116	3336	3335	1638	1159	1487	1427	4294	2850	1572	5116	5117
4899	5248	5113	4290	3341	1273	1517	1440	5340	5345	1688	5249	5249
5115	5343	5244	4670	5119	1273	2172	1468	6683	6689	2648	5343	5344
5341	6672	5339	5113	5251	1442	2203	1555	6817	6826	2851	6508	6508
6684	6688	6683	5245	5345	1525	2214	1567			3341	6687	6672
6720	6725	6721	5339	5479	1527	2418	2640			4296	6725	6688
6823	6823	6817	6666	6674	1551	2457	2679			4674	6824	6726
		9657	6683	6688	1555	2554	2830			5345		6824
			6817	6725	1558	2593	2835			6689		
				6826	1565	2752	2836			6727		
					1569	2842	2875			6825		
					1681	2854	2880					
					2010	2888	3335					
					2413	3344	3736					
					2426	4903	3774					
					2430	5119	4286					
					2833	5345	4663					
					2842	6673	5108					
					2847	6687	5240					
					2876	6727	5338					
					2880	6826	5370					
					3339		6390					
					3339		6576					
					3743		6684					
					4292		6722					
					4679		6748					
					4899		6813					
					5000		9614					
					5116		9643					
					5343							
					6690							
					6827							

omz1	omz4	ban1	bem1	bem2	bem3	bem5	mah1	mah2	mah3	mah4	mah5
3340	3340	2837	1441	2839	2838	1035	1448	2837	2842	3337	2643
3743	3744	2877	2483	2877	2883	1451	1563	3339	3338	4293	2835
4295	4295	3337	2836	3342	3340	2137	3338	4294	5116	5115	2845
5115	5118	5114	2878	5119	5053	2837	4294	5116	5252	5342	3337
5342	5344	5340	2883	5345	5344	2882	5116	5254	5342	6670	5115
6684	6673	6668	3332	6674	6687	3340	5248	5342	6671	6688	5250
6719	6688	6684	5336	6688	6725	3742	5342	6402	6687	6725	5342
6820	6725	6723	6120	6725	6825	4295	6671	6688	6725	6824	6688
	6827	6820	6655	6826		5117	6686	6725	6824		6724
			6684			5344	6724	6823			6824
			6725			6586	6821				
			6809			6686					
						6725					
						6825					
						9635					
						9663					

ES 2 477 499 T3

mal1	mal2	mal3	mal4	dew2	blf1	blf2	blf3	guc1	guc2	taj1	gau1	gau2	gau3	gau4	gau5
3338	2410	1036	2415	1039	1032	1037	3340	3343	1441	1033	1439	1131	1156	1449	1165
4293	3337	3339	3340	3340	2134	1452	4900	5117	1556	1226	1516	1146	1271	1563	1280
4897	4898	4900	4900	4899	3337	2138	5118	5249	2647	1524	1631	1163	1325	3341	1334
5114	5115	5117	5117	5115	3740	3341	5344	5343	2836	1553	5345	1264	1439	5117	1449
5340	5341	5344	5344	5342	4898	4901	6589	6584	2850	2836	6685	1278	1554	5342	1563
6665	6670	6688	6673	6685	5115	5118	6673	6669	3337	3337		1333	1567	6686	1732
6682	6686	6726	6689	6723	5341	5344	6689	6685	3742	3740		1416	1681	6822	1847
6818	6823	6824	6725	6820	6585	6689	6725	6820	5116	5115		1428	1723		3341
8232	8242	8243	6825		6686	6826	6825		5248	5341		1431	1837		5343
8697	8708	8709			6723				5343	6585		1447	2840		6671
					6823				6588	6686		1547	3333		6686
									6673	6724		1561	5109		6725
									6688	6825		1730	5335		6822
									6823			1830	6663		
												1845	6680		
												2014	6717		
												2130	6816		
												3339			
												5116			
												5342			
												6670			
												6687			
												6725			
												6821			

faa1	ves2	ves4	ves5	ves6	fes2	fes3	lem1	lem2	lea1	lea2
3339	3336	2490	1035	3339	2414	1166	3337	2834	2485	2646
4293	5114	2648	2490	4294	3339	1449	4293	3337	2549	2685
5116	5341	2797	2648	5116	4899	1563	5116	3741	2645	2848
5250	6585	2839	2798	5343	5116	1734	5342	4293	2847	3340
5312	6669	2849	2838	6671	5342	3343	6688	5116	3338	3743
5342	6686	2888	2849	6687	6671	4900	6724	5342	4294	4671
6401	6823	3342	2871	6824	6688	5117	6825	6688	4672	5118
6671	9664	3745	2889		6725	5343		6825	5117	5251
6686		4297	3340		6824	6688			5249	5345
6724		4674	3744		8708	6824			5343	6460
6827		5120	4296			8708			6585	6674
6844		5345	4674						6672	6688
7556		6691	5118						6689	6726
9216		6726	5309						6824	6827
		6830	5345						9638	8101
		9667	6588						9666	9639
			6673							9665
			6689							
			6727							
			6826							
			9638							
			9666							

S.warneri

CC1	CC2	CC3	del	kho1	kho2
2185	2185	2184	1387	2380	1406
2224	2345	2223	2177	2585	1440
2338	2384	2344	2309	2786	1554
2356	2594	2367	2337	2897	1699
2474	2777	2383	2557	2947	1786
2512	2795	2593	2586	4970	1857
2594	2817	2776	2625	5457	1988
2633	2833	2794	2758	5906	2011
2795	2907	2816	2786	6042	2337
2833	2932	2832	2824		2356
2936	5466	2906	2869		2382
5915	5915	2930	2897		2586
		2945	5906		2786
		5914			2825
					2835
					2898
					3002
					3337
					3739
					3823
					4829
					4972
					5083
					5115
					5248
					5352
					5390
					5459
					5478
					5894
					5910
					6045
					6242
					6457

S.haemolyticus

ALA1	ban2	ban3	ban4	ban5	ban6	rib2	rib3	rib4	rib5	fes1	marn1	marn2
1668	2236	1016	1267	1321	2236	2492	535	2255	2491	1131	4477	1444
1725	3443	1030	1695	2259	3445	3441	657	2490	4292	1267	4996	4477
2256	4481	1045	1949	2496	3922	4478	738	4982	4480	1334	5038	4938
2273	4613	1071	4481	3445	4296	4610	762	4998	4612	1363	5130	4995
2296	4999	1109	4613	3922	4467	4940	780	5131	4941	2254	6892	5016
2494	5134	1126	4999	4295	4484	4981	794	6895	4998	2259		5036
4481	6471	1137	5134	4483	4616	4999	838		5131	2295		5129
4583	6877	1157	6471	4617	4986	5039	854		6894	2737		6891
4593	6894	1271	6687	4677	5000	5131	862			4293		
4758	7030	1326	6878	5001	5136	5150	968			4478		
4943		1341	6894	5135	6474	6497	4989			4611		
5000		1394	7031	5864	6882	6894	5004			4997		
5042		1443	9003	5940	6895		5138			5040		
6895		1478		6379	7034		6901			5136		
		1508		6473	9009					6470		
		1556		6787						6893		
		1580		6881						9000		
		1693		6895								
		1708		7034								
		1724		9007								
		1840		9710								
		1897										
		1932										
		1946										
		2012										
		2033										
		2126										
		2223										
		2232										
		2257										
		2274										
		2295										
		2313										
		3130										
		3918										
		4292										
		4479										
		4515										
		4612										
		4672										
		4998										
		5136										
		6469										
		6895										
		7030										

S.hominis hominis

AVL1	AVL2	dew1	ves1
1324	1718	1121	1278
1716	1834	1448	1447
1832	1978	3235	1561
2416	2435	3339	1716
2434	2454	3741	1731
2453	2470	4565	1751
2470	2653	4696	1831
2615	2749	4897	1844
2635	2844	5223	2433
2653	2874	5339	3235
2747	3002	6474	4566
2750	3027	6610	4699
2842	3044	6680	6462
2874	3239	6816	6478
3001	4570		6614
3026	5228		
3043	6480		
3238	6617		
4567			
5226			
6479			

S.hominis novobiosepticus

ALA2	ALA3	mbt	rib1	taj2	ves3
1086	1721	1156	1317	1160	1276
1101	1836	1256	1711	1317	1445
1117	1866	1269	1826	1440	1559
2431	1981	1317	1970	3234	1729
2494	2439	1324	2429	4564	1843
2532	2497	1423	2838	4696	2494
2656	2539	1439	3022	4917	3234
3000	2654	1554	3233	5225	4565
5228	2754	1610	4565	6480	6476
6475	2839	1709	4697	6518	
6789	2856	1723	5226	6617	
7143	4576	1824	6480		
7402	5226	1838			
9330	6481	1969			
	6628	2007			
		2121			
		2274			
		2426			
		4543			
		4560			
		4693			
		4911			
		5220			
		6475			

S.saprophyticus bovis

fel
 1441
 2788
 2826
 3299
 3757
 3942
 4930
 4982
 6032
 6378
 6566
 6594
 6612
 6747
 7874
 7890
 8026

S.saprophyticus saprophyticus

1272 2829 3301 1020 2826
 1319 3756 3756 1030 3107
 1325 4258 4259 1034 3301
 1440 4930 4930 1036 3757
 1446 4982 4983 1040 4931
 1556 5063 5065 1045 4983
 1726 6563 6030 1052 6206
 1904 6611 6175 1060 6222
 2253 7887 6376 1062 6358
 2793 6537 1082 6375
 2827 6617 1443 6612
 3302 2127
 3385 2480
 3757 2830
 3943 3762
 4933 4265
 4985 4938
 5069 4975
 6033 4990
 6376 5028
 6566 6231
 6613 6387
 7874 6621
 7890
 8025

FIGURA 6

Bacterias aeróbicas o aero-anaeróbicas facultativas

A – Bacterias aeróbicas o aero-anaeróbicas facultativas

A-1 Cocos Gram positivos

A-1-1 Catalasa positiva

Staphylococcus, Micrococcus

A-1-2 Catalasa negativa

Streptococcus (incluyendo *S. pneumoniae*), *Enterococcus, Aerococcus, Pediococcus, Gemella, Lactococcus, Leuconostoc*

A-2 Bacilos Gram positivos

Corynebacterium, Listeria, Bacillus, Nocardia, Rhodococcus, Erysipelothrix, algunos *Actinomyces, Lactobacillus*

A-3 Cocos Gram negativos

Neisseria, Moraxella catarrhalis

A-4 Bacilos Gram negativos oxidasa negativa que crecen en el medio habitual

Enterobactéria, Acinetobacter, Pseudomonas oryzihabitans et P. luteola, Stenotrophomonas (oxidasa lenta)

A-5 Bacilos Gram negativos oxidasa positiva que crecen en el medio habitual

Pseudomonas excepto *P. oryzihabitans* y *P. luteola*, *Burkholderia, Ralstonia, Brevundimonas, Alcaligenes, Achromobacter, Schewanella, Aeromonas, Plesiomonas, Flavobacterium, Sphingomonas, Comamonas, Chryseobacterium, Sphingobacterium, Ochrobactrum, Rhizobium, Inquilinus limosus, Bordetella* excepto *B. pertussis, Pasteurella, Vibrio, Moraxella osloensis*

A-6 Bacilos Gram negativos que crecen en agar sangre o chocolate

Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella, Brucella, Capnocytophaga, Francisella, Moraxella lacunata

B – Bacterias anaeróbicas estrictas

B-1 Cocos Gram positivos

Peptococcus, Peptostreptococcus

B-2 Bacilos Gram positivos

Clostridium, Eubacterium, Propionibacterium, algunos actinomyces, Bifidobacterium

B-3 Bacilos Gram negativos

Fusobacterium, Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella

B-4 Cocos Gram negativos

Veillonella

C – Bacterias que requieren medios específicos y, por tanto, una investigación dirigida

Mycobacteria, Campylobacter, Helicobacter, Bordetella pertussis, Legionella, Borrelia/Spirochetes

FIGURA 7

