

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 603**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2014 PCT/EP2014/074118**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15090727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2014 E 14796748 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 3083981**

54 Título: **Identificación microbiana mediante espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojos**

30 Prioridad:  
**20.12.2013 DE 102013022016**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2017**

73 Titular/es:  
**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)  
Fahrenheitstrasse 4  
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:  
**KOSTRZEWA, MARKUS**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 626 603 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

Identificación microbiana mediante espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojos

**Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para identificar microorganismos en una muestra mediante espectrometría.

- 5 En la invención se complementa una identificación fiable de la especie de microbios desconocidos mediante espectrometría de masas con un análisis detallado de la subespecie y las variedades mediante espectrometría de infrarrojos, principalmente con el fin de identificar variedades con relevancia médica, como patovares (por ejemplo, ECEH y ECEP) y microbios con resistencia a los antibióticos (SARM, por ejemplo). El análisis detallado mediante espectrometría de infrarrojos requiere el conocimiento de la especie microbiana con el fin de utilizar una base de datos específica y restringida a una sola especie (colección) de espectros de infrarrojos de referencia, y especialmente para realizar el cultivo microbiano de forma estandarizada y específica para esa especie. La identificación de los microbios mediante espectrometría de masas se realiza comparando, en busca de similitudes, sus espectros de masa con los espectros de referencia de microbios de todos los dominios taxonómicos en una amplia base de datos (colección). Por otro lado, el análisis detallado de las subespecies y variedades se realiza utilizando espectros de infrarrojos básicamente de la forma habitual, mediante un análisis de clasificación matemático-estadístico, aplicado en este caso a una cierta cantidad de espectros de infrarrojos de referencia de las subespecies y variedades de una única especie microbiana. Esta identificación consta al menos de dos pasos y tiene interés principalmente para el diagnóstico médico.

**Antecedentes de la invención**

- 20 La identificación rápida y sin errores de microorganismos tiene una gran importancia en la microbiología clínica en particular, pero también en el análisis de alimentos, en la supervisión y el control de los procesos biotecnológicos y en la supervisión de ríos y lagos. Los microorganismos, denominados más adelante también gérmenes y microbios, son en general organismos microscópicos que incluyen a las bacterias, los hongos unicelulares (p. ej., las levaduras), las algas microscópicas y los protozoos.
- 25 Identificar a un microorganismo significa clasificarlo conforme a un esquema jerárquico taxonómico: dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género, especie y subespecie. No obstante, la identificación de bacterias puede englobar adicionalmente variedades, tales como los serotipos o los patovares.

- Los términos «serotipo» o «serovar» (abreviación de «serovariedad») se emplean para describir variedades dentro de las subespecies bacterianas que pueden diferenciarse mediante pruebas serológicas. Difieren, en lo que respecta a los antígenos en la superficie de las células, y se identifican en la microbiología convencional con la ayuda de los anticuerpos específicos. La jerarquía taxonómica de los serotipos es la siguiente: género > especie > subespecie (subesp.) > serotipo, por ejemplo con la denominación binominal extendida de la especie *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhi, cuya forma abreviada es *Salmonella* Typhi.

- 35 Un patovar (del griego *pathos*, que significa 'sufrimiento' o 'enfermedad') es una cepa bacteriana o un grupo de cepas con las mismas propiedades, que se diferencia de otras cepas dentro de la especie o subespecie por su patogenicidad. Los patovares se designan mediante una extensión ternaria o cuaternaria de la denominación binominal de la especie. La bacteria *Xanthomonas axonopodis*, por ejemplo, que puede causar la antracnosis de los cítricos, tiene diversos patovares con diferentes especializaciones de huéspedes: *X. axonopodis* pv. *citri* es uno de ellos. La abreviatura «pv.» se refiere a «patovar». Las cepas virulentas de los patógenos humanos también tienen patovares, que se designan asimismo mediante una adición tras el nombre. Por ejemplo, la bacteria intestinal *Escherichia coli*, que en general es completamente inofensiva, tiene patovares altamente peligrosos: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Los patovares pueden, a su vez, contener diferentes serotipos. La ECEH tiene muchos serotipos conocidos, y en torno al 60 % de todos los serotipos de ECEH identificados son O157, O103 y O26. El serosubtipo O157/H7 es especialmente peligroso.

- En un sentido más amplio, la identificación de microbios puede también englobar variedades que difieren en otras propiedades con relevancia médica, en concreto su resistencia a los antibióticos (especialmente los antibióticos betalactámicos y los antibióticos glucopéptidos), pero también su formación de toxinas (toxivares) o su receptividad a los mismos o similares bacteriófagos (fagovares). En general, el término «biovar» se emplea cuando un grupo de microbios de una especie o subespecie posee propiedades biológicas comunes. Un ejemplo de una variedad resistente a los antibióticos es el SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la *meticilina*).

- El término «cepa» designa a una población que desciende de un único organismo y que se almacena en un banco (a menudo nacional) de cepas microbianas. Se añade una designación de la cepa estandarizada internacionalmente a la secuencia nomenclatural que comprende el género, la especie, la subespecie y la variedad. Los organismos individuales de una cepa son genéticamente idénticos; las diferentes cepas varían ligeramente en lo que respecta a su genotipo.

Recientemente se ha extendido ampliamente en los laboratorios microbiológicos el uso de dos métodos espectrométricos para la identificación de microbios. Se tratan de la espectrometría de masas y la espectrometría de infrarrojos. Es preciso señalar en este caso que, por extrañamiento que parezca, ningún grupo de investigación utiliza hasta el momento los dos métodos ni en paralelo ni en combinación. Si se examina detenidamente, este hecho puede deberse a que, en la mayoría de los casos, los campos de investigación de estos grupos son diferentes, al igual que ocurre con los objetivos de las identificaciones.

Siempre resulta conveniente utilizar la espectrometría de masas cuando se tienen que identificar microbios de una especie completamente desconocida de forma rápida y sencilla, hasta el nivel taxonómico de la especie, sin conocimiento previo de ningún tipo. En general, el método funciona muy bien siempre que los microbios se puedan cultivar sobre medios nutritivos o en estos. Es preferible producir colonias sobre medios nutritivos gelatinosos en placas de Petri. El método es muy consistente: la edad y nutrición de la colonia no tienen prácticamente ningún efecto en la identificación mediante espectrometría de masas; tampoco tienen demasiada importancia las cantidades, los métodos de preparación o los periodos de almacenamiento de las muestras en los soportes de muestras para espectrometría de masas. Esto significa que el método de propagación y preparación de la muestra no requiere una estricta estandarización. Además, solo se necesita una pequeña cantidad de material de muestra, ya que basta con colonias de tamaño mínimo. Los picos de los espectros de masa indican a las proteínas microbianas que son extremadamente comunes o fáciles de ionizar; del 60 al 85 % de estos picos corresponden al 40-60 % de las diferentes proteínas que constituyen los ribosomas. Puesto que cada ribosoma se encuentra varios miles de veces en cada célula, y puesto que las masas de todas las proteínas ribosómicas de las diferentes especies microbianas son característicamente diferentes entre sí, la uniforme frecuencia de aparición de estas proteínas las hace ideales para una identificación. Tras un cultivo exitoso, el método identifica a la especie taxonómica de los microbios investigados en cuestión de minutos utilizando programas informáticos automatizados para comparar sus espectros de masa con los espectros de masa de referencia de una amplia colección de espectros, que puede contener miles de espectros de masa de referencia de microbios de todos los dominios taxonómicos. El método proporciona un grado muy elevado de certeza sobre la identificación. Solo en unos pocos casos resulta imposible diferenciar entre dos especies microbianas con certeza. Por otro lado, solo de forma excepcional es posible identificar subespecies o incluso variedades y, conforme a los conocimientos actuales, esto apenas cambiará sobre la base de los métodos utilizados actualmente, que se optimizan en lo que respecta a la sensibilidad, velocidad y precisión de la identificación. La principal razón de ello es que las variedades no poseen diferentes proteínas ribosómicas.

Por el contrario, con la espectrometría de infrarrojos es posible identificar subespecies y variedades, tales como los serotipos y los patovares, en algunos casos incluso cepas individuales dentro de una especie, si se dispone de una colección adecuada de espectros de referencia para las subespecies y variedades de esta especie. No obstante, la compilación de esta colección requiere habitualmente que el cultivo, preparación y requisitos de medición específicos de esa especie se cumplan con precisión, lo cual es bastante diferente de lo que ocurre con la espectrometría de masas.

Los espectros de infrarrojos se basan en miles de vibraciones de los grupos funcionales y los enlaces polares en el material biológico; éstas, a su vez, se producen en todos los componentes de las células microbianas, tales como el ADN, el ARN, las proteínas, las estructuras internas, las membranas y las paredes celulares, así como también en las reservas de energía. No existen asignaciones inequívocas de moléculas a características concretas en los espectros, aunque ciertos intervalos espectrales se pueden asignar preferentemente a ciertas especies moleculares: el intervalo de ácidos grasos de 3050 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  con vibraciones de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , el intervalo de amidas de 1750 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  con enlaces peptídicos y el intervalo de polisacáridos de 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$ . El intervalo de 900 a 700  $\text{cm}^{-1}$  se denomina «intervalo característico». Contiene algo de todas las moléculas y es muy importante para la diferenciación entre las especies.

Las diferenciaciones dependen de mínimas diferencias en los espectros de infrarrojos, razón por la cual todos los pasos del método de identificación mediante espectros de infrarrojos suelen estar estandarizados, desde el cultivo de los microbios con las duraciones y temperaturas prescritas sobre los medios nutritivos prescritos hasta la preparación y medición de las muestras. Se debe supervisar el contenido de oxígeno y el nivel de humedad por encima del medio nutritivo. Pequeñas desviaciones del método estandarizado, tales como una desviación superior a media hora en el periodo de cultivo o superior a un grado Kelvin en la temperatura de cultivo, son suficientes para dificultar la identificación o falsearla.

Para compilar una colección de espectros de infrarrojos de referencia se cultivan microbios de un grupo y se miden en condiciones estandarizadas. El conjunto de espectros de esta colección de referencia se somete a continuación a un procedimiento de clasificación matemático-estadístico. Se emplean diversos métodos matemático-matemático-estadísticos, tales como ARNA (análisis de redes neuronales artificiales), ACP (análisis de componentes principales), PLS-DA (análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales), SVM (máquinas de vectores de soporte), análisis de agrupamiento jerárquico u otras técnicas de clasificación. Tras una fase de aprendizaje y verificación con ayuda de los espectros de infrarrojos de la colección, se pueden, a continuación, aplicar los de clasificación al espectro de infrarrojos de los microbios de una muestra, que han sido cultivados de la misma cepa. Los algoritmos proporcionan la clasificación taxonómica, tal como la especie, subespecie, serotipo, patovar e, la cepa. No obstante, si el microbio de la muestra no pertenece al grupo estrechamente emparentado, el análisis detallado mediante infrarrojos puede arrojar resultados completamente falsos. Como ejemplo de ello, se puede

incorrectamente el patovar ECEH si los microbios no son *E. coli*, como se había supuesto, sino los relativamente inofensivos *Citrobacter*, por ejemplo.

5 Estas diferencias en la manipulación y resultados significan que los campos de aplicación de la espectrometría de masas y la espectrometría de infrarrojos son diferentes. En la práctica, en el ámbito del diagnóstico clínico solo se utiliza la espectrometría de masas, ya que se debe asumir que los patógenos desconocidos pueden pertenecer a todos los dominios taxonómicos. Lo mismo se aplica a la supervisión de ríos y lagos y al resto de áreas donde tiene vital importancia la rápida identificación de cualquier tipo de microbio sin conocimiento previo de la especie microbiológica. Los microbios pueden pertenecer aquí a todos los dominios taxonómicos de bacterias, arqueas y organismos eucarióticos, incluidas las algas u hongos unicelulares, como las levaduras.

10 Por el contrario, si el objetivo es detectar fuentes de contaminación y rutas de transmisión de microbios en alimentos contaminados o ganado infectado, es importante determinar la subespecie y variedad para una identificación fiable de las fuentes de infección. En este caso, habitualmente se puede asumir que la especie de los microbios es conocida, al menos tras una única determinación microbiológica. Por lo tanto, hoy en día la espectrometría de infrarrojos se utiliza principalmente cuando se conoce la especie microbiana pero es importante determinar con  
15 precisión la subespecie y quizás también la variedad. Si, por ejemplo, se produce una intoxicación endémica por salmonela, y si se sospecha que la salmonela procede de un acuicultivo de gambas tailandesas, no basta con detectar a la salmonela en las gambas tailandesas. Conforme a la taxonomía actual, existen dos especies de salmonela, una de las cuales (*Salmonella enterica*) tiene cinco subespecies, pero estas reúnen en torno a 2600 serovares diferentes. Para volver a las gambas, se debe demostrar que se trata de la misma variedad de salmonela.  
20 Por ello, la salmonela de una muestra de heces se cultiva en un caldo de cultivo específico para la salmonela, y se utiliza la espectrometría de infrarrojos para analizar el serotipo de la salmonela cultivada de forma selectiva. Este serotipo se debe a continuación rastrear hasta el acuicultivo tailandés.

25 Por lo tanto, la espectrometría de infrarrojos se aplica principalmente en la producción alimentaria, la medicina veterinaria y las instituciones de salud pública, mientras que el ámbito del diagnóstico clínico está dominado por la espectrometría de masas.

Hoy en día, el método de identificación mediante espectrometría de masas se utiliza también en todo el mundo para el diagnóstico médico; en los países europeos y en muchos otros, los métodos y espectrómetros de masas de compañías particulares ya han sido aprobados para su uso clínico, puesto que cumplen con las disposiciones legales correspondientes. En otros países se están elaborando aprobaciones legales. En el método de la  
30 espectrometría de masas, en primer lugar se cultivan los microbios para formar colonias. El medio nutritivo para el cultivo se coloca habitualmente sobre agar en una placa de Petri, y mediante este método, el cultivo de «aislados» puros en colonias microbianas independientes se logra en horas o días, en función del vigor de los microbios. No obstante, no es absolutamente obligatorio cultivar los microbios sobre agar, sino que también se pueden cultivar en líquidos. Aunque las colonias se solapan o mezclen, se pueden obtener colonias aisladas, de nuevo del modo  
35 habitual, mediante un segundo cultivo. La mínima cantidad de  $10^4$  a  $10^6$  microbios, apenas apreciable a simple vista, que se transfiere desde una colonia seleccionada a un soporte de muestras para espectrometría de masas por medio de un pequeño hisopo (preferentemente con un mondadientes de madera limpio e higiénico), se rocía a continuación con una disolución muy acidificada de una sustancia matriz convencional (normalmente un ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico [HCCA] o un ácido 2,5-dihidroxibenzoico [DHB]) para la consiguiente ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). El ácido (normalmente ácido fórmico o ácido trifluoroacético) ataca las  
40 paredes celulares y el disolvente orgánico (normalmente acetonitrilo) de la disolución de la matriz puede penetrar en las células microbianas y provocar que sus paredes celulares debilitadas estallen por ósmosis. A continuación se seca la muestra mediante evaporación del disolvente, lo que provoca que el material de matriz disuelto se cristalice. Durante el proceso, las proteínas solubles de los microbios, y en muy escasa medida también otras sustancias de la  
45 célula, se incorporan a los cristales de la matriz.  
45 Los cristales de la matriz con las moléculas de analito incorporadas se bombardean con pulsos de láser UV dirigidos en un espectrómetro de masas, lo cual genera iones de las moléculas de analito en los plasmas de evaporación. A continuación estos iones se pueden medir en el espectrómetro de masas, separados conforme a su masa. Para este fin se usan habitualmente los espectrómetros de masas simples con analizador de tiempo de vuelo. El espectro de masa es el perfil de los valores de masa de estos iones de analito, que son predominantemente iones proteínicos.  
50 Los iones con la información más útil en lo que respecta a una identificación tienen masas de entre aprox. 3000 dalton y 15 000 dalton (1 dalton = 1 unidad de masa atómica). En este método, los iones proteínicos poseen en su inmensa mayoría una sola carga (número de carga  $z = 1$ ), razón por la cual en este caso se puede también hablar simplemente de la masa  $m$  de los iones, en lugar de utilizar siempre la expresión «cociente de masa/carga»  $m/z$ , como de lo contrario sería necesario en la espectrometría de masas.

55 En lugar de espectrómetros de masas simples con analizador de tiempo de vuelo, también es posible utilizar otros tipos, tales como los espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo e inyección ortogonal de iones; y en lugar de la ionización MALDI, es sin duda posible usar otros tipos de ionización, tales como la ionización por electronebulización (ESI), si bien proporcionan espectros de masa más complejos. Un método de ionización diferente para la generación de espectros de masa sencillos es la ionización química (IQ), que se puede utilizar con  
60 plasmas originados por desorción láser, por ejemplo.

El perfil con separación de masas de las proteínas solubles, es decir, el espectro de masa, es muy característico de las especies microbianas correspondientes, porque cada especie de microbios produce sus propias proteínas determinadas genéticamente, y cada una tiene una masa característica. Tal y como ya se ha mencionado, en torno al 60-85 % de las proteínas se originan en los ribosomas. Se trata de complejos de ADN y proteínas que siempre tienen la misma estructura y que siempre contienen entre 40 y 60 proteínas diferentes específicas de la especie en exactamente el mismo número y con la misma composición. Cada célula bacteriana contiene varios miles, y hasta diez mil, ribosomas; las células de los organismos eucarióticos contienen varios cientos de miles de ribosomas. Esto significa que no solo las masas de estas proteínas solubles y presentes en una mayor concentración están predeterminadas genéticamente, sino también sus frecuencias; no dependen de las condiciones nutritivas o de la madurez de la colonia, como sí ocurre con las lipoproteínas o los ácidos grasos que actúan como reservas de energía, por ejemplo. De forma similar, los perfiles proteínicos, en particular los de las proteínas ribosómicas, son característicos de una especie microbiana como las huellas dactilares lo son de una persona concreta. Actualmente hay disponibles colecciones de referencia con espectros de masa de referencia para miles de microbios que cuentan con la aprobación legal para su uso en aplicaciones médicas.

Este método de identificación mediante espectrometría de masas ha demostrado una extraordinaria eficacia. Proporciona un grado de certeza sobre la correcta identificación muy superior al proporcionado por los métodos de identificación microbiológica utilizados en la actualidad. En diversos estudios se ha logrado demostrar que, con cientos de especies microbianas diferentes, la certeza de la identificación era muy superior al 95 %, y generalmente superior al 98 %. En casos de duda, cuando había desviaciones respecto de los métodos de identificación microbiológica habituales, la secuenciación genética ha confirmado que la identificación mediante espectrometría de masas era correcta en la inmensa mayoría de los casos.

Para identificar a los microbios se miden, por ejemplo, los espectros de masa con intervalos de masas desde aproximadamente 2.000 dalton hasta 20.000 dalton, pero se ha observado que las señales de masas en el intervalo de masas inferior hasta aproximadamente 3.000 dalton son más difíciles de evaluar porque pueden deberse a sustancias cuya presencia es fundamentalmente aleatoria y variable, tales como los ácidos grasos, que se almacenan conforme a la naturaleza de la nutrición. Los mejores resultados en lo que respecta a la identificación se obtienen evaluando las señales de masas en el intervalo de masas de 3.000 a 15.000 dalton aproximadamente. Los espectrómetros de masas ultrasensibles utilizados ahora con este fin tienen una baja resolución de masa, lo que significa que los grupos de isótopos, cuyas señales de masa difieren en un dalton, no pueden distinguirse en este intervalo de masas. Únicamente se miden las envolturas de los grupos de isótopos.

Este método de identificación de microbios requiere en principio un cultivo puro de microbios, el denominado «aislado», para obtener un espectro de masa sin señales superpuestas de otros microbios. Sin embargo, se ha observado que también pueden evaluarse los espectros de masa de mezclas de dos especies microbianas e identificarse ambas especies. La certeza de la identificación solo se ve ligeramente afectada. Si en el espectro de masa están implicadas más de dos especies microbianas, o si estas dos especies microbianas están presentes en concentraciones muy diferentes, la probabilidad de identificación y la certeza de la identificación se reducen de forma considerable.

La identificación microbiana mediante espectrometría de infrarrojos también se basa en cultivos puros de microbios sobre medios nutritivos adecuados. No obstante, se deben evitar en este caso diferencias de edad y nutrición entre los microbios manteniendo condiciones estándar, ya que todos los componentes de las células contribuyen a los espectros de infrarrojos en todos los intervalos de longitud de onda en cada caso. Los microbios, que se cultivan sobre agar estandarizado en condiciones estandarizadas, se suspenden en agua pura y se depositan en una placa de soporte transparente a la radiación infrarroja. Es preciso asegurarse de que los microbios se depositan formando una capa uniforme. La capa se seca y se mide la absorción de los microbios de la placa de soporte en un espectrómetro de infrarrojos. Generalmente se utiliza un espectrómetro por transformada de Fourier (FT-IR), que tiene una elevada resolución. Los espectros medidos habitualmente abarcan desde 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Varios cientos de espectros se miden y suman a velocidades de obtención de 20 espectros por segundo, con el fin de mejorar el coeficiente de señal/ruido.

En una realización ligeramente modificada, los espectros de infrarrojos se pueden medir también en luz reflejada, en cuyo caso se preparan sobre un soporte metálico reflectante, hecho de aluminio, por ejemplo. También se puede emplear una espectroscopia Raman, que tiene la ventaja de que los espectros microbianos se pueden medir también en líquidos.

Aparte de la inspección alimentaria y la medicina veterinaria, hay otros campos donde es necesario clasificar microbios con la máxima precisión posible de acuerdo con la subespecie y variedad, pero en estos otros campos habitualmente al principio se desconocen por completo las especies microbianas. En el ámbito del diagnóstico médico, por ejemplo, es extremadamente importante conocer la patogenia, la toxicidad, la virulencia y, en particular, la resistencia a los antibióticos de los microbios. Por supuesto, estas propiedades pueden variar considerablemente entre las diferentes subespecies o variedades de una especie microbiana.

Las subespecies, serotipos, patovares y otras variaciones de los microbios se determinan a partir de sus características microbiológicas, por ejemplo a partir de su comportamiento de fijación (serotipos), su toxicidad, su

patogenia (patovares), su virulencia y también a partir de su resistencia o ausencia de resistencia frente a los diferentes antibióticos. No se conocen (por el momento) en detalle las variaciones que pueden diferenciarse espectrometría.

5 A la vista de lo expuesto, hay una necesidad de identificar microbios de un amplio intervalo de clases taxonómicas, y la clasificación debería también extenderse especialmente a manifestaciones por debajo del nivel taxonómico de la especie, esto es, a subespecies, patovares, toxivares, serotipos y, en particular, a la resistencia a antibióticos.

**Breve descripción de la invención**

10 La invención proporciona un método para identificar microbios desconocidos en una muestra, en el que a una determinación mediante espectrometría de masas hasta el nivel taxonómico del género o la especie le sigue una determinación detallada de un nivel taxonómico inferior o de una variedad mediante espectrometría de infrarrojos, utilizando colecciones de referencia restringidas de espectros de infrarrojos. Estas colecciones pueden ser o bien específicas del género, conteniendo solo espectros de infrarrojos de microbios de un género, o bien específicas de la especie, conteniendo solo espectros de infrarrojos de microbios de una especie.

15 La invención se basa en el hallazgo de que la espectroscopia de infrarrojos puede actualmente penetrar hasta niveles más bajos de clasificación taxonómica (incluida la determinación de variedades) en comparación con la identificación mediante espectrometría de masas, pero solo si los espectros de infrarrojos de referencia utilizados en el análisis matemático pertenecen únicamente a un pequeño grupo de microbios estrechamente emparentados, y en particular solo si los espectros de infrarrojos han sido obtenidos cumpliendo con especificaciones estandarizadas para el cultivo, la preparación y la medición de microbios de este grupo de microbios emparentados. Si se reúnen en una colección espectros de infrarrojos de referencia de todos los microbios de todos los dominios taxonómicos y se utilizan para la clasificación, no se puede luego esperar que la identificación de bacterias resultante en una muestra aporte mucho más que la determinación de si las bacterias son grampositivas o gramnegativas, en su caso. Los resultados mejoran si la colección de referencia se limita a bacterias y, adicionalmente, se tienen en cuenta las características microscópicas distintivas de las bacterias, y si cada colección creada de espectros de infrarrojos se limita a bacterias con forma de maza (corinebacteriáceas), esféricas (cocos) o con forma de bastón (bacilos), o bien con otras características morfológicas. Si, con una restricción aún mayor, la colección de referencia consiste solo en espectros de infrarrojos de diferentes patovares de una única subespecie microbiana, entonces a menudo es posible determinar de forma inequívoca el tipo patogénico de los microbios en una muestra por medio de espectrometría de infrarrojos, siempre que los microbios de la muestra pertenezcan realmente a esta subespecie. No obstante, si el espectro de infrarrojos de los microbios investigados no pertenece al grupo inicial esperado después de todo, el método puede conducir a resultados incorrectos que, en caso de diagnósticos médicos, pueden conllevar un peligro para la vida. Para obtener resultados óptimos, las especificaciones para el cultivo, preparación y medición deben ser diferentes entre las diferentes especies microbianas.

35 La invención proporciona métodos, por ejemplo, en los que a una determinación mediante espectrometría de masas de la especie microbiana le sigue una determinación detallada de la subespecie y/o la variedad mediante espectrometría de infrarrojos, objetivo para el cual se utiliza una colección de espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie. Una vez se conoce la especie microbiana, se puede tomar una decisión sobre si es necesaria una mayor concreción en lo que respecta a la subespecie o variedad, y si se puede llevar a cabo. Para la clasificación conforme a la subespecie o variedad, debe disponerse de una base de datos de espectros de infrarrojos restringida a esa especie y que contenga espectros de referencia de las diferentes subespecies y variedades. Cuando la respuesta a la cuestión de la necesidad y la posibilidad es afirmativa, se puede analizar un espectro de infrarrojos para determinar la subespecie o variedad. Si fuera necesario, los microbios pueden cultivarse también siguiendo de forma estricta las especificaciones estandarizadas para esta especie, que se pueden encontrar en la correspondiente base de datos de espectros de infrarrojos, y los microbios pueden prepararse para la subsiguiente obtención de un espectro de infrarrojos. Para obtener resultados óptimos, puede ser necesario aplicar un conjunto específico de condiciones de cultivo y preparación para cada especie microbiana que sea óptimo para la identificación mediante infrarrojos de las variedades. Este conjunto de condiciones constituye también la base de los espectros de infrarrojos, lo que significa que se debe compilar una base de datos individual de espectros de infrarrojos de referencia para cada especie microbiana.

50 Por lo tanto, la invención comprende un enfoque con al menos dos etapas: primero, la determinación de la especie microbiana mediante el método de espectrometría de masas, y a continuación la determinación de la subespecie y variedad, tal como el patovar o el serotipo, mediante espectrometría de infrarrojos. Si, como se sabe que ocurre con algunos géneros, la espectrometría de masas solo puede determinar con certeza el género, pero no la especie, la espectrometría de infrarrojos se puede utilizar para determinar la especie de los microbios sobre la base de una colección correctamente compilada de espectros de infrarrojos específica de ese género. A continuación puede ser necesario un método de tres etapas para determinar la subespecie y variedad.

60 En otro método de acuerdo con la invención, se puede obtener un espectro de infrarrojos utilizado para la determinación detallada antes de obtener un espectro de masa utilizado para la determinación mediante espectrometría de masas, y al menos algunas partes del mismo material microbiano se utilizan para la obtención de ambos espectros, especialmente tras un único cultivo.

Para diferenciar entre subespecies y variedades puede ser beneficioso utilizar solo partes específicas de las células microbianas (por ejemplo, las paredes celulares con las proteínas localizadas en su parte exterior) para los espectros de infrarrojos, ya que esas proteínas determinan el serotipo y habitualmente también el patovar. De nuevo los requisitos previos son en este caso una identificación previa y con certeza de la especie y la existencia de una base de datos apropiada para los espectros de infrarrojos de estas partes de las células microbianas. La preparación de los microbios cultivados puede, por tanto, englobar su sencilla sedimentación en un soporte de muestras, pero también la destrucción de las células y la selección de aquellos componentes celulares que son más beneficiosos que el microorganismo completo para determinar la variación. Los componentes pueden separarse mediante centrifugación o filtrado, especialmente mediante centrifugación por gradiente de líquido, y posiblemente también tras la formación de derivados, la coagulación u otras modificaciones.

Este método de operación requiere la existencia de colecciones específicas de la especie de espectros de infrarrojos de la subespecie microbiana o incluso de los componentes celulares de la subespecie microbiana. Esto parece una enorme empresa imposible de realizar. No obstante, es habitual que en los laboratorios microbiológicos de rutina solo un pequeño número de especies microbianas supongan más del 80 % de las identificaciones que se deben realizar cada día. Solo tres o cuatro de ellas requerirán quizás una clasificación más detallada; además, puede ser interesante realizar una clasificación más detallada de algunas de las especies microbianas menos habituales. Si bien estas especies microbianas de interés más urgente pueden variar de un laboratorio a otro, en función del enfoque empresarial concreto, su número relativamente reducido permite compilar colecciones de espectros de infrarrojos que son adecuados para estos microbios. Además, ha quedado de manifiesto que es posible un intercambio de colecciones de espectros entre diferentes laboratorios si se observa una estricta estandarización.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un ejemplo de un diagrama de flujo para la identificación de subespecies y variedades de microbios conforme a una primera realización. El método comienza con el suministro de una colección de espectros obtenidos mediante espectrometría de masas. A continuación, se suministran colecciones de espectros de infrarrojos de las subespecies y variedades para la especie microbiana concreta, que se han obtenido mediante un cultivo y preparación específicos de esa especie. A continuación, se cultiva un aislado microbiano a partir de la muestra. A continuación, se realiza una identificación mediante espectrometría de masas de la especie. A continuación, se plantea la cuestión de si es necesaria y posible la identificación de las subespecies y variedades. Si no lo es, en este ejemplo el método finaliza aquí. Si lo es, se sigue el cultivo y preparación específicos de esa especie de microbios del aislado para la obtención de espectros de infrarrojos. A continuación, se obtienen espectros de infrarrojos. Finalmente, se identifican la subespecie y variedad utilizando los espectros de infrarrojos de referencia específicos de la especie.

La parte izquierda de la figura 2 muestra una realización sencilla y esquemática para determinar la especie de un microorganismo. Se obtiene un espectro de masa de componentes típicos del microorganismo, y esos componentes se representan mediante un patrón concreto de señales de masa en el espectro de masa. El patrón de señales se compara con patrones de una colección de espectros de referencia, en este documento espectros de masa de referencia n.º 1 y n.º 2. El espectro de masa de referencia n.º 1 no muestra una coincidencia suficiente con el patrón de señales medido; por el contrario, hay una gran coincidencia entre el espectro de masa de referencia n.º 2 y el patrón de señales medido, así que puede determinarse la especie del microorganismo. La parte derecha de la figura 2 ilustra una realización sencilla y esquemática para determinar la subespecie y variedad mediante espectrometría de absorción infrarroja. Para ello, en una preparación especial, los microorganismos cuya especie se ha determinado con éxito mediante el análisis con espectrometría de masas se cultivan, preparan y miden mediante espectrometría de absorción infrarroja en condiciones específicas predeterminadas. Las características del espectro de absorción infrarroja (espectro de infrarrojos) obtenidas se pueden a continuación elaborar y visualizar, por ejemplo aplicando un análisis de los componentes principales (ACP), en los espectros de infrarrojos de referencia específicos de la especie. Los principales componentes medidos del espectro de absorción infrarroja (representados en el diagrama mediante estrellas \*) pueden a continuación introducirse en un «mapa», que contiene también agrupamientos de subespecies o variedades de la especie conocida del microorganismo, esto es, lugares donde se sitúan los parámetros para subespecies o variedades específicas tras un cultivo, preparación y medición con infrarrojos comparables. En un primer ejemplo, el parámetro \* está situado fuera de todos los agrupamientos y, por tanto, no se puede identificar. En un segundo ejemplo, el parámetro \* puede asignarse a un agrupamiento y, por tanto, se determina su pertenencia a una subespecie o variedad.

La figura 3 muestra un ejemplo de un diagrama de flujo para la identificación de subespecies y variedades de conforme a una segunda realización. El método comienza con la hipótesis de la presencia de una determinada microbiana en la muestra. A continuación, se suministra una colección de espectros de masa y una colección de espectros de infrarrojos de las subespecies y variedades de la especie microbiana supuesta, que se obtienen mediante un cultivo y preparación específicos de la especie. A continuación, se cultiva, de una forma específica para esa especie, un aislado microbiano a partir de la muestra. A continuación, se preparan los microbios del aislado un soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos para la obtención de espectros de infrarrojos. A continuación, se obtiene un espectro de infrarrojos (o espectros de infrarrojos). A continuación, se preparan los microbios sobre un soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos para la ionización MALDI. A se obtienen espectros de masa. A continuación, se realiza una identificación mediante espectrometría de masas de especie microbiana. A continuación, se plantea la cuestión de si era correcta la hipótesis sobre la especie

Si no lo es, en este ejemplo el método finaliza aquí. Si lo es, a continuación se identifican la subespecie y variedad ayuda del espectro de infrarrojos ya obtenido y los espectros de infrarrojos de referencia específicos de la especie.

### Descripción detallada

5 Los métodos de espectrometría de masas utilizados actualmente únicamente pueden, en general, identificar con certeza la especie; en casos favorables también la subespecie; no obstante, en algunos casos excepcionales solo pueden identificar el género de los microbios. Debe volver a enfatizarse aquí que la invención se basa en el hallazgo de que la espectrometría de infrarrojos puede actualmente penetrar hasta niveles inferiores de la clasificación taxonómica en comparación con la identificación mediante espectrometría de masas. Esto solo es aplicable si los espectros de infrarrojos utilizados en el análisis de clasificación matemática corresponden a un pequeño grupo de microbios estrechamente emparentados, por ejemplo si pertenecen a un único género o una única especie, o incluso una subespecie, y los microbios han sido cultivados preferentemente en condiciones estandarizadas específicas para el género, la especie o la subespecie. Si la colección de referencia consta solo de espectros de infrarrojos de diferentes patovares o serovares de una única especie microbiana, entonces a menudo es posible determinar de forma inequívoca el tipo patogénico o el serotipo (o al menos el grupo de patovares o serovares) de los microbios en una muestra, siempre que los microbios de la muestra pertenezcan realmente a esta especie. Si el espectro del microbio no pertenece a la especie esperada, no es posible una asignación.

10 No obstante, en particular, en el ámbito del diagnóstico médico, hay casos en los que microbios extraídos de la sangre, moco nasal, heces u orina son en gran medida desconocidos al inicio, pero que deben caracterizarse con la máxima precisión hasta variedades como los biovares, serovares, fagovares o patovares, normalmente tras determinar la especie. El término «patovares» implica, por sí solo, que no todas las variedades de la especie son patógenas, pero la importancia para el diagnóstico médico reside principalmente en la patogenia. Puesto que esta determinación no se puede lograr en general únicamente mediante espectrometría de masas, en esos casos puede utilizarse uno de los métodos de acuerdo con la invención.

15 Los métodos de acuerdo con la invención para la identificación taxonómica de microbios en una muestra se caracterizan fundamentalmente por la complementación de una determinación de la especie mediante espectrometría de masas con una determinación de la subespecie y/o variedad mediante espectrometría de infrarrojos. Para la determinación de la subespecie y la variedad se utiliza una colección específica de esa especie de espectros de infrarrojos de referencia.

20 En una primera realización del método de acuerdo con la invención, a la identificación mediante espectrometría de masas de la especie microbiana le sigue un recultivo y una preparación de los microbios con el objetivo de determinar la subespecie y la variedad. Este recultivo y preparación se realizan conforme a exactamente las mismas especificaciones con las que se obtuvieron los espectros de infrarrojos de la colección específica de la especie de espectros de infrarrojos de referencia. La preparación de los microbios para los espectros de infrarrojos puede incluso comprender la selección y separación de componentes celulares individuales a partir de los cuales se obtienen los espectros de infrarrojos. Por ejemplo, las paredes celulares purificadas pueden utilizarse para obtener los espectros de infrarrojos. También es posible utilizar cualquier fracción seleccionada de los componentes celulares obtenidos mediante centrifugación por gradiente. También se pueden formar derivados a partir de los componentes celulares para obtener espectros de infrarrojos informativos.

25 Tal y como se puede observar en la figura 1, esta primera realización del método de acuerdo con la invención para la determinación de la especie, subespecie y/o variedad de microbios desconocidos en una muestra comprende los pasos:

- a) suministrar una colección con espectros de masa de referencia y colecciones con espectros de infrarrojos de referencia obtenidos de una forma específica para la especie,
- b) cultivar un aislado microbiano a partir de la muestra,
- 30 c) determinar mediante espectrometría de masas de la especie de los microbios,
- d) cultivar y preparar los microbios del aislado en las condiciones específicas para la especie conforme a las cuales se obtuvieron los microbios para la colección de espectros de infrarrojos de referencia para esa especie,
- e) obtener un espectro de infrarrojos,
- f) determinar la subespecie y/o la variedad mediante un método de clasificación matemático-estadístico utilizando los espectros de infrarrojos de referencia específicos de la especie.

El método puede finalizar tras el paso c) si, después de la determinación mediante espectrometría de masas de la especie microbiana en el paso c), se verifica que no es necesaria una clasificación más detallada o que no hay ninguna base de datos con espectros de infrarrojos de referencia para una clasificación semejante.

El paso d) del cultivo y preparación de microbios de acuerdo con las especificaciones para esta especie en la

correspondiente colección de espectros de infrarrojos de referencia ya indica que, para cada especie, hay una colección independiente de espectros de referencia que han sido medidos en microbios cultivados conforme a métodos estandarizados, adaptados precisamente a dicha especie. Los métodos estandarizados pueden incluir estipulaciones relativas al medio nutritivo, la duración y la temperatura del cultivo, el contenido de oxígeno y el nivel de humedad sobre el medio nutritivo, y también el tipo de preparación de la muestra para el espectrómetro de infrarrojos y finalmente incluso el esquema de ponderación para cada una de las secciones del espectro de infrarrojos para la clasificación.

El método de preparación también puede requerir la selección de ciertos componentes celulares si esta es la única forma de obtener una diferenciación satisfactoria de las variedades. Muchos serovares de bacterias, por ejemplo, se distinguen por los diferentes tipos de lipopolisacáridos de la membrana celular externa (como los antígenos de superficie), y se designan entonces, por ejemplo, como O104:H4 (este es el serovar de ECEH del brote epidémico de ECEH más reciente, en 2011). La letra «O» se refiere en este documento al «antígeno de superficie». La diferenciación precisa de los lipopolisacáridos requiere la separación y purificación de las paredes celulares, pero sin disolver la capa exterior de la membrana celular.

Esta primera realización puede, por tanto, comprender un método de preparación en el que las células de los microbios se destruyan cuidadosamente y los componentes de las células se separen antes de obtener un espectro de infrarrojos a partir de uno de los componentes. La digestión celular mediante la destrucción de las paredes celulares debe realizarse de tal forma que no se pierdan ni destruyan componentes importantes, tales como proteínas de la envoltura y lipopolisacáridos. Aunque la digestión celular suele realizarse utilizando ácidos fuertes (ácido fórmico al 70 % o ácido trifluoroacético) para disolver en la medida de lo posible todas las proteínas, puede ser conveniente en este caso realizar la digestión celular con la enzima lisozima. Las células digeridas son a continuación separadas en componentes celulares individuales, preferentemente mediante centrifugación por gradiente, y solo ciertos componentes, tales como las paredes celulares, se utilizan para la medición de espectros de infrarrojos.

Mientras que con la primera realización se obtiene primero el espectro de masa, y solo a continuación el espectro de infrarrojos, en una segunda realización este orden se invierte. Esta segunda realización es preferible si se tiene alguna idea sobre cuál es la especie microbiana presente en la muestra. Se realiza un cultivo específico de la especie sobre la base de esta suposición, y se prepara un aislado a partir de una colonia sobre un soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos. Como soportes de muestras para espectrometría de infrarrojos se han utilizado con éxito materiales transparentes a la radiación infrarroja, tales como las placas de seleniuro de zinc o silicio. Tras la obtención de un espectro de infrarrojos, la muestra microbiana se prepara a continuación para la ionización MALDI, esto es, los microbios son digeridos y el contenido de las células microbianas se prepara en cristales de matriz. Esto se puede realizar sobre el propio soporte de las muestras para la medición con infrarrojos, por ejemplo sobre la placa de silicio. La obtención de espectros de masa lleva a la identificación de la especie microbiana, que confirma o desmiente la suposición sobre la especie. Si está presente la especie microbiana correcta, la subespecie y, si procede, la variedad pueden ahora determinarse a partir del espectro de infrarrojos ya obtenido. Si una determinación de este tipo se realizase sin confirmar mediante espectrometría de masas la especie supuesta, podría resultar en peligrosos falsos positivos o falsos negativos.

Esta segunda preparación es particularmente atractiva porque los espectros de infrarrojos y los espectros de masa se pueden obtener a partir de los mismos microbios y, en realizaciones especiales, también sobre la misma placa de soporte de las muestras. La figura 3 muestra un ejemplo de un diagrama de flujo para esta segunda realización.

Esta segunda realización es particularmente adecuada para su uso con enterobacterias, esto es, con *E. coli* en particular. Un especialista en la técnica ya es capaz de identificar correctamente la colonia sobre el medio nutritivo gelatinoso en una placa de Petri como *E. coli* con una probabilidad de en torno al 90 %, de forma que este procedimiento tiene una elevada probabilidad de éxito. En el caso de *E. coli* existe una necesidad urgente de identificar el patotipo, tal como, por ejemplo, ECEH. No obstante, si no se logra una confirmación mediante espectrometría de masas de *E. coli*, por ejemplo, porque es una *Citrobacter*, la evaluación del espectro de infrarrojos puede conducir a resultados falsos con peligrosas consecuencias diagnósticas.

Los métodos mencionados arriba a modo de ejemplo requieren la existencia de colecciones de espectros de infrarrojos específicas de la especie o de la preparación. De hecho, estas colecciones pueden ser creadas por especialistas en los propios laboratorios microbiológicos, aunque esto parezca inicialmente una enorme empresa de imposible realización. No obstante, se ha puesto de manifiesto, en primer lugar, que la estricta estandarización permite el intercambio de colecciones de espectros entre diferentes laboratorios; y, en segundo lugar, que en los laboratorios microbiológicos de rutina solo de cuatro a seis especies de microbios suponen más del 80 % de las identificaciones que se tienen que llevar a cabo diariamente. Solo tres o cuatro de ellas requerirán quizás una clasificación más detallada (p. ej., *E. coli*, salmonela y *S. aureus*); además, puede ser interesante realizar una clasificación más detallada de algunas de las especies microbianas menos habituales. Si bien estas especies microbianas de interés más urgente pueden variar de un laboratorio a otro, en función del enfoque empresarial concreto, los laboratorios particulares pueden compilar este tipo de colecciones de espectros de infrarrojos para estos microbios a lo largo del tiempo.

Tal y como se ha indicado arriba brevemente, en unos pocos casos, pero a veces importantes, el método de identificación mediante espectrometría de masas no puede proporcionar una diferenciación satisfactoria y segura

entre dos especies (o incluso géneros). Para una especie microbiana, la colección de espectros de masa de suele contener entre cinco y veinte espectros de referencia de diferentes cepas, las cuales se han seleccionado de forma que sus espectros de referencia cubren la variación en los espectros de masa de esta especie microbiana de forma más amplia posible. Puede ocurrir que las variaciones de los espectros de masa de una cierta especie se solapen con los espectros de masa de una especie diferente, o incluso un género, debido a su similitud. Un caso de este tipo, que se debe considerar crítico, es el problema de diferenciar de forma inequívoca entre la especie *E. coli* (que, aparte de las variedades de ECEH descritas arriba, también posee una variedad que es un patógeno de la relativamente inofensiva diarrea del viajero) y el género *Shigella* (cuatro especies; patógenos de shigelosis bacilar], que requiere tratamiento médico). La especie *E. coli* presenta espectros de masa con una variación extraordinariamente elevada. Por ello, ocasionalmente son extremadamente parecidos a los espectros de masa de cualquiera de las cuatro especies de *Shigella* (*Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella* las cuales no se pueden distinguir fácilmente unas de otras mediante espectrometría de masas, y en consecuencia a menudo no es posible una identificación definitiva mediante espectrometría de masas.

Es necesario indicar en este punto que las similitudes filogénicas llevan a algunos biólogos moleculares a creer que las cuatro especies de *Shigella* no forman un género diferente, sino que son cuatro subespecies de *E. coli*. Tanto si en el futuro se lleva a cabo una reclasificación como si no, los diferentes requisitos terapéuticos implican la persistencia del problema de identificar esta subespecie.

Una realización especial del método de acuerdo con la invención descrita arriba resulta en este documento de ayuda, pero en este caso se utiliza una colección de espectros de infrarrojos de referencia que contiene microbios del género *Shigella* y de la especie *E. coli*. Si la identificación mediante espectrometría de masas de *Shigella* o *E. coli* es completamente inequívoca, el procedimiento se habrá concluido de forma satisfactoria. No obstante, si no es inequívoca, se utiliza la colección de espectros de infrarrojos de referencia que comprende el género *Shigella* y la especie *E. coli*, y es preferible cultivar los microbios conforme a la especificación que se aplicó en el cultivo de los microbios para los espectros de referencia de esta colección de espectros de infrarrojos de referencia. Los espectros de infrarrojos permiten entonces una determinación fiable de la especie presente. Un pequeño número de casos similares de este tipo requiere una espectrometría de infrarrojos para la determinación definitiva de la especie, y para ello se requieren bases de datos con espectros de infrarrojos de referencia de todas las especies que no se pueden diferenciar mediante espectrometría de masas.

Para determinar las subespecies y variedades de esta especie, puede ser necesario un tercer paso del análisis, con espectros de infrarrojos de referencia especiales para esta especie o con un algoritmo de evaluación especial para los espectros de referencia del género, que se seleccionan para que sean específicos de la especie. Por tanto, una identificación definitiva de *E. coli* puede ir seguida de una determinación de la variedad. *E. coli* es parte de la flora intestinal normal y es inofensiva como tal, pero hay muchas variedades patogénicas. Aparte de la ya mencionada ECEH, que se describió por primera vez en 1977 y comprende varios serovares como el serovar O157, el serovar O103 y el serovar O26, hay más *E. coli* patógenas: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). En este caso también puede ser conveniente aplicar el método fundamental de destruir las células microbianas y separar los componentes celulares antes de obtener un espectro de infrarrojos a partir de uno de los componentes. Solo ciertos componentes, tales como las paredes celulares, se utilizan para la medición de espectros de infrarrojos.

Para cualquier tratamiento tiene particular importancia la resistencia de un microbio a ciertos antibióticos, lo que aún debe determinarse con laboriosos métodos analíticos. Es posible que métodos precisos de medición de espectros de infrarrojos permitan también la determinación de tipos de resistencia específicos. También es de esperar que los tipos de serovar puedan correlacionarse con resistencias a los antibióticos.

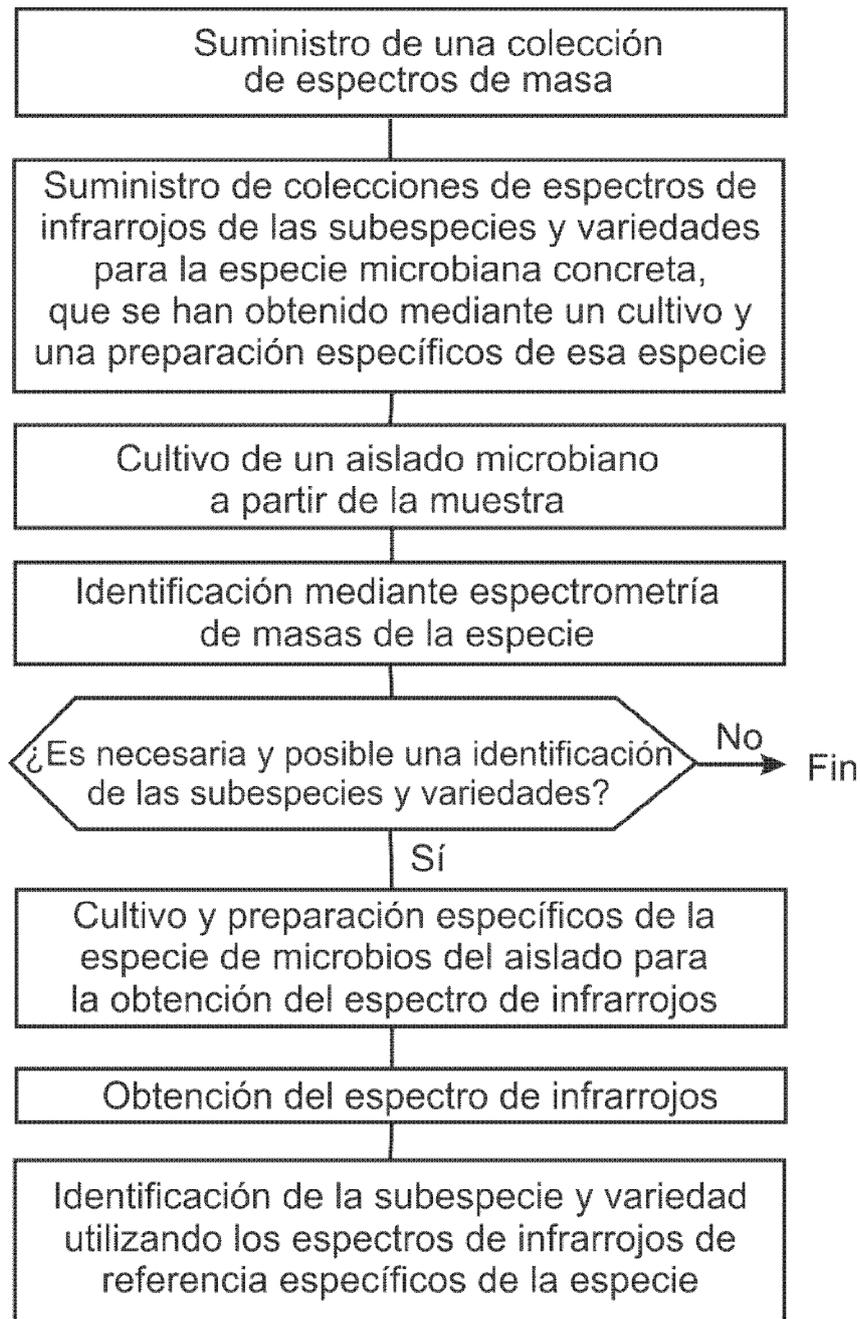
Es posible que el método de acuerdo con la invención permita la detección de diferentes tipos de resistencia a los antibióticos directamente mediante espectrometría de infrarrojos, posiblemente solo con ciertas fracciones de los microbios que se estén utilizando para la medición de espectros. Estas fracciones pueden obtenerse, por ejemplo, básicamente mediante el modo conocido una vez las paredes celulares hayan sido destruidas mediante centrifugación, en particular mediante centrifugación por gradiente de densidad. Cuando sea aplicable, los componentes de los microbios también pueden prepararse mediante la formación de derivados, la coagulación u otras modificaciones bioquímicas de un modo tal que los microbios con diferentes resistencias puedan diferenciarse entre sí a partir de sus espectros de infrarrojos.

La invención se ha descrito con referencia a un número de realizaciones diferentes de la misma. No obstante, ha de entenderse que diversos aspectos o detalles de la invención pueden modificarse, o diversos aspectos o detalles de las diferentes realizaciones pueden combinarse de forma arbitraria, si fuera factible, sin desviarse de la información técnica de la invención. En general, la anterior descripción tiene únicamente fines ilustrativos, y no pretende limitar la invención, que solo queda definida por las reivindicaciones anexas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la identificación de microbios desconocidos en una muestra, en donde una determinación mediante espectrometría de masas hasta el nivel taxonómico del género o la especie se complementa mediante una determinación detallada de al menos un nivel taxonómico inferior o la variedad mediante espectrometría de infrarrojos, utilizando una colección de espectros de infrarrojos de referencia limitados al género o a la especie para la determinación detallada del nivel taxonómico inferior o la variedad.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la determinación de la especie mediante espectrometría de masas se complementa mediante una determinación detallada de la subespecie y/o la variedad mediante espectrometría de infrarrojos, utilizando una colección de espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie para la determinación detallada de la subespecie y/o la variedad.
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en donde la determinación de la especie mediante espectrometría de masas se complementa con una determinación detallada del serovar, el patovar o el comportamiento de resistencias mediante espectrometría de infrarrojos, y una colección de espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie para la determinación detallada.
- 20 4. El método según la reivindicación 1, en donde la determinación del género mediante espectrometría de masas se complementa con una determinación detallada de la especie mediante espectrometría de infrarrojos, y una colección de espectros de infrarrojos de referencia específica del género para la determinación detallada.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el espectro de infrarrojos utilizado para la determinación detallada se obtiene antes de obtener el espectro de masa utilizado para la determinación mediante espectrometría de masas, y al menos parte del mismo material microbiano se utiliza para ambas obtenciones.
- 30 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde un cultivo y/o una preparación de los microbios para la determinación detallada se lleva a cabo conforme a las especificaciones especiales según las cuales se han obtenido los espectros de infrarrojos de la colección de espectros de infrarrojos de referencia específica del género o la especie.
- 35 7. El método según la reivindicación 6, en donde la preparación de los microbios comprende la selección y el aislamiento de componentes celulares individuales, a partir de los cuales se obtienen a continuación los espectros de infrarrojos.
- 40 8. El método según la reivindicación 7, en donde las paredes celulares purificadas se utilizan para obtener los espectros de infrarrojos.
- 45 9. El método según la reivindicación 7, en donde una fracción de componentes celulares que se ha obtenido mediante centrifugación por gradiente se utiliza para la obtención de los espectros de infrarrojos.
10. El método según la reivindicación 7, en donde los derivados formados a partir de los componentes celulares se utilizan para obtener los espectros de infrarrojos.
11. El método según la reivindicación 1 que comprende los pasos siguientes:
  - 35 - proporcionar una colección con espectros de masa de referencia y colecciones con espectros de infrarrojos de referencia específicas de la especie,
  - cultivar un aislado microbiano a partir de la muestra,
  - determinar mediante espectrometría de masas la especie microbiana del aislado,
  - seleccionar una colección de espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie,
  - 40 - cultivar y preparar los microbios del aislado conforme a las especificaciones especiales según las cuales se obtuvieron los microbios para la colección seleccionada,
  - obtener un espectro de infrarrojos de los microbios cultivados y preparados,
  - determinar la subespecie o variedad mediante un método de clasificación matemático-estadístico, utilizando los espectros de infrarrojos de referencia pertenecientes a la colección específica de la especie de espectros de infrarrojos de referencia.
  - 45
12. El método según la reivindicación 1, con los siguientes pasos:
  - asumir la hipótesis de la presencia en la muestra de una determinada especie microbiana,
  - proporcionar una colección con espectros de masa de referencia y una colección con espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie para la especie microbiana asumida,

- cultivar y preparar un aislado microbiano a partir de la muestra sobre una placa de soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos de acuerdo con las especificaciones especiales según las cuales se obtuvieron los microbios para la colección de espectros de infrarrojos de referencia específica de la especie,
  - obtener un espectro de infrarrojos de los microbios cultivados y preparados del aislado,
- 5
- preparar los microbios del aislado para la ionización MALDI,
  - obtener el espectro de masa y determinar la especie microbiana del aislado, y
  - si se ha confirmado la hipótesis sobre la especie microbiana, determinar la subespecie o variedad mediante una clasificación matemático-estadística del espectro de infrarrojos ya adquirido utilizando los espectros de infrarrojos de referencia de la colección específica de la especie de los espectros de infrarrojos de referencia.
- 10
13. El método según la reivindicación 12, en donde la placa de soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos está compuesta por seleniuro de zinc o silicio.
14. El método según las reivindicaciones 12 ó 13, en donde el aislado microbiano a partir de la muestra también se prepara para la ionización MALDI sobre la misma placa de soporte de muestras para espectrometría de infrarrojos.
- 15
15. El método según la reivindicación 1, en donde a la determinación mediante espectrometría de masas de la especie del género *Shigella* o la especie *Escherichia coli* le sigue una determinación detallada de la especie mediante espectrometría de infrarrojos utilizando una colección de espectros de infrarrojos de referencia que contenga únicamente espectros de infrarrojos de microbios del género *Shigella* y la especie *Escherichia coli*.



*Figura 1*

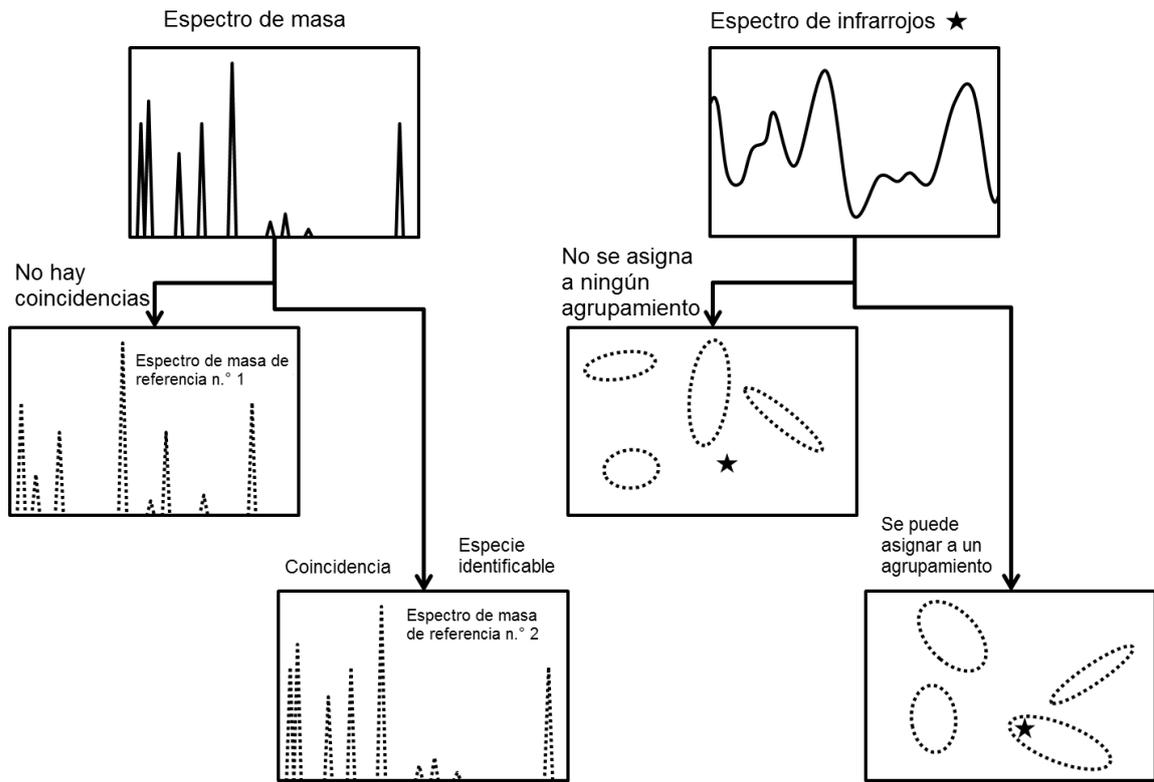
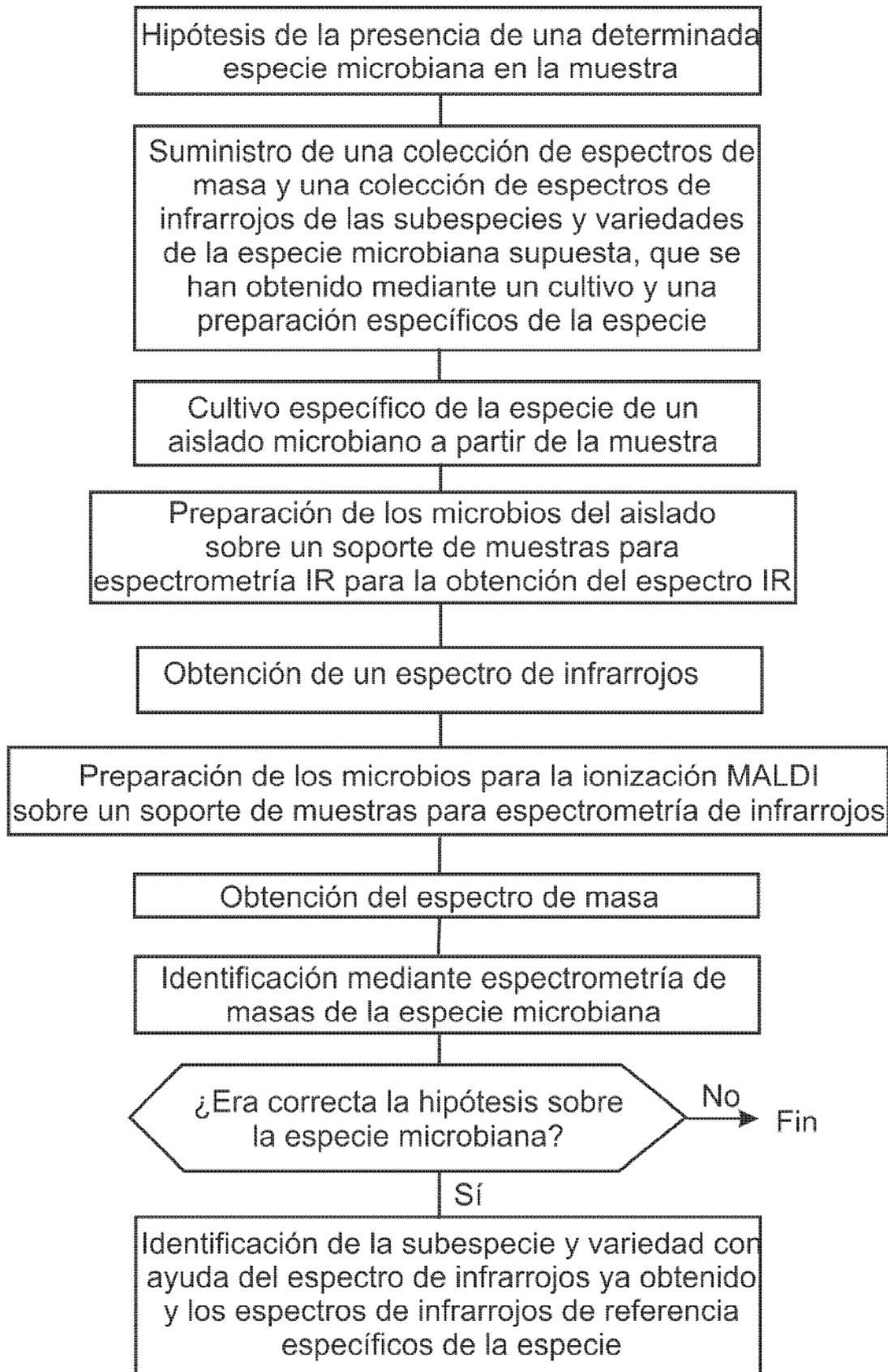


Figura 2



*Figura 3*