

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER DE MEDICINA, SANIDAD Y MEJORA ANIMAL

***PCR Y MALDI-TOF MS: DOS ALTERNATIVAS A LA
IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE
Trueperella pyogenes***

Córdoba, Julio de 2013

José Antonio Infantes Lorenzo

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



Departamento de Sanidad Animal

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER DE MEDICINA, SANIDAD Y MEJORA ANIMAL

***PCR y MALDI-TOF MS: DOS ALTERNATIVAS A LA
IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE
Trueperella pyogenes***

VºBº Tutora

Carmen Borge Rodríguez



UNIVERSIDAD
DE
CORDOBA



Departamento de Sanidad Animal

CARMEN BORGE RODRÍGUEZ

Profesora Contratada Doctora de Sanidad Animal.
Universidad de Córdoba
TUTORA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

I N F O R M A:

Que el trabajo de Fin de Máster titulado “*PCR y Maldi-Tof MS: dos alternativas a la identificación fenotípica de Trueperella pyogenes*”, elaborado por el Licenciado en Veterinaria D. José Antonio Infantes Lorenzo, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento reuniendo, a nuestro juicio, los requisitos necesarios para su lectura y defensa.

Y para que conste, y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente Informe en Córdoba a dos de julio de dos mil trece.

Carmen Borge Rodríguez

ÍNDICE

1. Resumen	9
2. Introducción y Objetivos	13
3. Material y Métodos	23
3.1. Material patológico	25
3.2. Condiciones de cultivo	25
3.3. Identificación fenotípica	25
3.4. Identificación serológica	26
3.5. Identificación genética	27
3.6. Identificación proteómica	29
4. Resultados y Discusión	31
4.1. Identificación fenotípica	33
4.2. Identificación serológica	34
4.3. Identificación genética	34
4.4. Identificación proteómica	35
Anexo	39
5. Conclusiones	43
7. Referencias Bibliográficas	47
8. Agradecimientos	55

1. RESUMEN

RESUMEN

En nuestro estudio hemos realizado la identificación fenotípica, genética y proteómica de un total de 70 cepas de origen porcino aisladas a partir de lesiones de carácter supurativo, a las que se les había realizado una caracterización previa en base a sus características morfológicas, hemolíticas y serológicas como la reacción de aglutinación con el antisuero frente al grupo G de *Lancefield*.

La caracterización fenotípica se llevó a cabo mediante el sistema comercial API Coryne 2.0 (software de lectura Apiweb V 3.0) que identificó 67 cepas como *Trueperella pyogenes* con perfiles bioquímicos variables, dos cepas como *Arcanobacterium haemolyticum* y una cepa como *Microbacterium spp.*

Para la identificación genética se emplearon técnicas de PCR convencional: la amplificación del *gen plo* sirvió para la caracterización de los aislamientos de *T. pyogenes*, mientras que la amplificación del *gen aln* se utilizó en el caso de *A. haemolyticum*. Las 67 cepas identificadas mediante API Coryne como *T. pyogenes* fueron *plo+*, mientras que en el resto no pudo determinarse la presencia del gen. El *gen aln*, no fue amplificado en ninguna de los aislamientos estudiados, estando este resultado en discordancia con el obtenido mediante el sistema API Coryne.

Por último, el estudio proteómico se realizó con el sistema MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) que se reveló como una técnica válida para la identificación rutinaria de las cepas de *T. pyogenes* a un nivel similar a las técnicas de PCR.

SUMMARY

In our study we have performed the phenotypic, genetic and proteomic identification of a total of 70 bacterial porcine strains isolated from suppurative lesions, which were previously characterized based on their morphological, hemolytic and serologic characteristics as the agglutination reaction with the antiserum against *Lancefield* G group.

The phenotypic characterization was carried out by using the commercial system API Coryne 2.0 (apiweb reading software V 3.0), identifying 67 strains as *Trueperella pyogenes* with variable biochemical profiles, two strains as *Arcanobacterium haemolyticum* and one strain as *Microbacterium spp.*

For the genetic identification, conventional PCR techniques were used: the *plo* gene amplification was used for the characterization of *T. pyogenes* isolates, while the *aln* gene amplification was used in the case of *A. haemolyticum*. The 67 strains identified by API Coryne as *T. pyogenes* were *plo+*, while the presence of this gene was not found in the rest of the strains. The *Aln* gene was not amplified in any of the studied isolates, being this result in disagreement with that obtained with the API Coryne system.

Finally, the proteomic study was performed by using MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*), which was demonstrated as a valid method for the routine identification of *T. pyogenes* strains, with similar results to those obtained by means of PCR techniques.

Keyword: *Trueperella pyogenes*, molecular identification, MALDI-TOF MS.

2. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En Andalucía, se estima que existen más de 12.000 explotaciones porcinas con 2,14 millones de animales, lo que supone el 4,6 por ciento de la Producción Agraria, generando más de 20.000 empleos tanto directos como indirectos en nuestra comunidad. Esta situación obliga a prestar una especial atención a las pérdidas económicas que se producen como consecuencia de las tasas de enfermedad, gastos en tratamientos e incremento de trabajo en las explotaciones afectadas por cualquiera de las enfermedades propias de la especie porcina (Olvera, 2008).

Una de las principales causas de estas pérdidas son los decomisos que se producen en mataderos como consecuencia de alteraciones morfológicas tanto de origen infeccioso como parasitario, siendo claro ejemplo las piobacilosis producidas por *Trueperella pyogenes*. Este microorganismo provoca a menudo enfermedades crónicas, desarrollando lesiones de carácter supurativo que pueden producir el decomiso total o parcial de la canal, principalmente por la presencia de abscesos en diferentes localizaciones orgánicas (Martinez *et al.*, 2007). Las pérdidas económicas que provoca *T. pyogenes* en las explotaciones porcinas como consecuencia de ciertas patologías donde este microorganismo está implicado, tanto como agente primario (artritis, abscesos, mamitis), como ejerciendo una acción secundaria (neumonías), pueden resultar considerables, sin olvidar las mermas por decomisos en mataderos, así como su posible relevancia sanitaria emergente como zoonosis. A estos hechos debemos sumarle la incertidumbre que desde un punto de vista microbiológico tiene esta especie en su nuevo enclave taxonómico o la dificultad de diferenciación con otras especies de su mismo género. Todos estos aspectos hacen que el estudio de las infecciones por *T. pyogenes*, en cualquiera de sus vertientes hayan adquirido un interés creciente en los últimos años.

Según la décima edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* el género *Arcanobacterium* se encuadra dentro de la familia *Actinomycetaceae* que incluye cuatro especies: *A. haemolyticum*, *A. bernardiae*, *A. phocae* y *A. pyogenes*. Recientemente se han descrito cinco especies más: *A. pluranimalium* (Lawson *et al.*, 2001), *A. hippocoleae* (Hoyles *et al.*, 2002), *A.*

bonasi (Lehnen *et al.*, 2006), *A. bialowiezense* (Lehnen *et al.*, 2006) y *A. abortisuis* (Azuma *et al.*, 2009).

Sin embargo en base a estudios comparados de quimiotaxonomía y filogenéticos Yassin *et al.* propusieron en 2011 que *A. abortisuis* junto con *A. bernardiae*, *A. bonasi*, *A. bialowiezense* y *A. pyogenes* debían ser reclasificados en un nuevo género llamado *Trueperella*. El género *Arcanobacterium* quedó restringido a *A. haemolyticum*, *A. phocae*, *A. pluranimalium* y *A. hippocoleae*. Además, en el año 2012, Hijazin *et al.* describieron por primera vez *Arcanobacterium canis* aislado de una otitis canina.

Si bien la mayoría de estas especies causan infecciones supurativas en humanos, *T. pyogenes* tiene además especial interés en medicina veterinaria por ser el agente causal de las piobacilosis en diferentes especies de animales domésticos (Hermoso de Mendoza and Piriz, 2002).

Trueperella pyogenes es una bacteria Gram positiva pleomórfica, inmóvil, no formadora de esporos y catalasa negativa. Para su primoaislamiento requiere medios enriquecidos con sangre de ovino o bovino donde todas las cepas muestran una β -hemólisis cuando se incuban en condiciones de microaerofilia (Ramos *et al.*, 1997).

Este microorganismo se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza considerándose un colonizador habitual de las membranas mucosas tanto respiratorias como genitales, fundamentalmente de rumiantes y cerdos (Narayanan *et al.*, 1998; Nattermann and Horsch, 1977; Queen *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2008). Tras una solución de continuidad o bien por la acción concomitante con otras infecciones bacterianas, *T. pyogenes* puede comportarse como un microorganismo oportunista y producir procesos supurativos. Los signos clínicos y lesiones que desarrolla son variables, describiéndose un amplio rango de patologías entre las que destacan la formación de abscesos en diferentes localizaciones, los cuadros respiratorios y las artritis (Jost and Billington, 2005). Por lo general, en la mayoría de las ocasiones la única lesión que desarrolla la bacteria es la formación de abscesos poco evidentes (sobre todo subcutáneos e intramusculares) que son descubiertos durante la inspección postmortem en matadero. Además es capaz de causar infección en humanos (Plamondon *et al.*, 2007).

Hasta la fecha se han identificado un gran número de proteínas extracelulares asociadas con la virulencia de *T. pyogenes* entre las que destaca una exotoxina con actividad hemolítica denominada piolisina (*plo*), capaz de lisar las células rojas de la sangre de diferentes especies de mamíferos y responsable de su característica β -hemólisis (Billington *et al.*, 1997; Jost *et al.*, 1999). Otras proteínas de importancia en el desarrollo de la acción patógena de *T. pyogenes* son: la proteína de unión a colágeno (CbpA) (Esmay *et al.*, 2003; Pietrocola *et al.*, 2007), dos neuraminidasas (NanH y NanP) y varias fimbrias que juegan un importante papel en la adhesión a las células epiteliales del hospedador (Hijazin *et al.*, 2011; Jost and Billington, 2005; Jost *et al.*, 2001, 2002; Silva *et al.*, 2008).

Para su identificación inicialmente se llevan a cabo pruebas rápidas y sencillas como la tinción de Gram y la catalasa, para después continuar con pruebas bioquímicas. Las características bioquímicas de esta especie, fueron descritas por Ding y Lammler (1992) y Ramos *et al.* (1997). Esta identificación se puede realizar utilizando kits comerciales como los sistemas *API Coryne* (Biomérieux®) utilizados en la mayoría de los trabajos consultados (Funke *et al.*, 1997); Almuzara *et al.*, 2006). No obstante, algunos autores han demostrado que la base de datos del sistema no contiene todos los perfiles numéricos que identifican las cepas de *T. pyogenes* aisladas de animales (Narayanan *et al.*, 1998). Si bien no existe un patrón fijo para la identificación bioquímica de *T. pyogenes*, sí se puede tomar un grupo de reacciones, normalmente las más constantes para realizar una identificación presuntiva de la especie (Almuzara *et al.*, 2006). Diferentes estudios recomiendan la identificación definitiva de este microorganismo y su diferenciación con las principales especies del género (en concreto respecto a *A. haemolyticum*) en base a las pruebas de hidrólisis de la gelatina tras 48 horas de incubación, fermentación de la D-xilosa, producción de β -glucuronidasa, todas ellas positivas para *T. pyogenes* (Lammler and Blobel, 1986); Simeon *et al.*, 1997; Heremida *et al.*, 2004).

Por otra parte, también se ha observado como todos los aislamientos de *T. pyogenes* presentan una reacción cruzada con el antisuero específico de estreptococos del grupo G de Lancefield (Lammler and Blobel, 1986).

Aunque algunas de estas pruebas se llevan a cabo en cuestión de minutos, la identificación bioquímica completa necesita en la mayoría de los casos 24 horas o incluso más tras su cultivo.

En los últimos años, las técnicas moleculares han permitido una identificación bacteriana rápida con un elevado nivel de sensibilidad. Estas técnicas presentan numerosas ventajas, facilitando la identificación de microorganismos de crecimiento lento, en un periodo de tiempo corto. Desafortunadamente, la información obtenida no siempre es lo suficientemente discriminante para obtener una identificación a nivel de especie. requiriéndose a veces una serie de pasos adicionales con el objetivo de amplificar otros genes diana. Estas técnicas de identificación requieren además un alto nivel de conocimientos técnicos, son caras de realizar, y generalmente no se recomienda su empleo para la identificación rutinaria.

Concretamente, en el caso de *T. pyogenes* la más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica el *gen plo*, específico de este microorganismo (Jost and Billington, 2005; Ulbegi-Mohyla *et al.*, 2010; Ertas *et al.* 2005.). Este gen expresa la piolisina (*plo*), hemolisina dependiente del colesterol reconocida como importante factor de virulencia para esta especie y producida por todos los aislamientos identificados hasta la fecha (Billington *et al.*, 1997; Ding and Lammler, 1996; Jost and Billington, 2005).

Recientemente se han desarrollado otros protocolos para la detección de genes o fragmentos de genes de esta bacteria que puedan usarse como nuevas dianas en la identificación de *T. pyogenes*, obteniéndose buenos resultados con el *gen sodA* que codifica la enzima superóxido dismutasa (Hijazin *et al.*, 2011) o el *gen rpoB* que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa (Khamis *et al.*, 2004). Asimismo, los primers 16S-23S rDNA *intergenic spacer region* (ISR) específicos para *T. pyogenes* descritos por Ulbegi-Mohyla *et al.* en 2010 también podría ser utilizado para la identificación mediante PCR, así como para la secuenciación del gen 16S rDNA (primers universales).

Una de las últimas herramientas que se ha implementado en numerosos laboratorios para el diagnóstico rutinario que está revolucionando el diagnóstico microbiológico, es el conocido como *MALDI-TOF MS* (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Esta técnica supone un enfoque radicalmente nuevo y metódicamente sencillo que

reduce en gran medida el coste de los consumibles y el tiempo empleado en el diagnóstico (Sauer and Kliem, 2010; Seng *et al.*, 2009).

A diferencia de los métodos convencionales de identificación basados en criterios bioquímicos que requieren el aislamiento previo de las bacterias e incubaciones de larga duración, MALDI-TOF-MS es un método rápido, preciso y rentable que puede identificar microorganismos en cuestión de minutos a partir de las colonias en los medios de cultivos. En contrapartida, se encuentra la elevada inversión inicial que supone la adquisición de los equipos, aunque esta inversión se amortiza con los bajos costos generales de operación por la baja cantidad de fungibles necesarios.

Al tratarse de una técnica muy sensible, sólo se requiere una pequeña cantidad de bacterias para llevar a cabo el análisis; la muestra se mezcla con una solución matriz (ácido cinámico o derivados de ácido benzoico) que penetra en la pared celular haciendo accesibles las proteínas intracelulares para el análisis. Cuando los disolventes se evaporan de la suspensión de células, se empiezan a formar cristales de la matriz que incluyen las proteínas y otros compuestos celulares (proceso llamado "co-cristalización") (Horneffer *et al.*, 2001). Este material se lleva a continuación a la cámara de medición donde las muestras individuales se exponen a pulsos cortos de láser que vaporiza el microorganismo junto con la matriz, dando lugar a la ionización de las proteínas ribosómicas.

De esta forma, tras la migración en un campo electromagnético, los iones se separan en función de su peso molecular. El grado de ionización, así como la masa de las proteínas determinan lo que se conoce como "tiempo de vuelo individual" (TOF). En base a este TOF se registra un espectro característico que constituye una huella digital específica de la muestra. Es decir, el procedimiento proporciona un espectro proteico único para cada microorganismo.

La identificación mediante MALDI-TOF se basa, por una parte en las variaciones de estos espectros entre los diferentes microorganismos y por otra, en la detección de algunos compuestos que forman parte del espectro que son específicos de género, especie e incluso subespecie.

Para la identificación a nivel de especie, el rango de tamaño de las proteínas generalmente utilizado está entre 2 y 20 kDa. Este rango de tamaño está dominado por proteínas ribosomales que ionizan bien y proporcionan espectros precisos poco influenciados por las condiciones de crecimiento microbiano.

Los registros que se generan se recogen en un *software* informático que compara automáticamente los espectros recogidos con un banco de datos de referencia que contiene una amplia variedad de aislamientos relevantes generando un valor numérico (*score*) en base a las similitudes entre los conjuntos de datos observados y almacenados. Un valor de *score* por encima de 2.0 se considera generalmente que es una identificación a nivel de especie válida; los valores entre 2.0 y 1.7 representan identificaciones nivel de género fiables. No cabe duda de que el requisito más importante para la identificación exacta de los microorganismos es la existencia de datos de referencia fiables en la base de datos (Hsieh *et al.*, 2008).

El primer estudio que propuso la identificación bacteriana mediante el análisis MALDI-TOF MS fue realizado por Holland *et al.* en 1996. Posteriormente, diversos estudios han evaluado el potencial de MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología encontrándose una tasa de identificación cercana al cien por cien en el caso de los géneros *Neisseria* (Ilina *et al.*, 2009; Ilina *et al.*, 2008; Pignone *et al.*, 2006), *Clostridia* (Grosse-Herrenthey *et al.*, 2008), *Mycobacteria*, *Salmonella* (Dieckmann *et al.*, 2008), *estreptococos del grupo viridans* (Friedrichs *et al.*, 2007), *Helicobacter pylori* (Ilina *et al.*, 2010), y *Campylobacter* (Martiny *et al.*, 2011) entre otros, encontrándose aún resultados controvertidos con algunos grupos de microorganismos. Así, las principales dificultades ocurren en la identificación de especies que no difieren lo suficiente en sus proteínas ribosomales, como entre *Shigella spp.* y *Escherichia coli* ó entre *S. pneumoniae* y miembros de los *estreptococos* pertenecientes al grupo *mitis*.

Actualmente, se están desarrollando nuevas aplicaciones de MALDI-TOF MS, como la detección de mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos o la diferenciación de los aislamientos por debajo del nivel de especie (Barbuddhe *et al.*, 2008; Hrabak *et al.*, 2013).

MALDI-TOF MS también se ha utilizado con éxito para identificar levaduras, sin embargo es necesario optimizar la técnica para mejorar el rendimiento en la identificación de los hongos pluricelulares (Marklein *et al.*, 2009; Putignani *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2010). Asimismo existen pocas referencias en la bibliografía respecto a la identificación de virus mediante este sistema, desarrollándose actualmente diversos estudios que en futuro evaluarán su utilidad (Giebel *et al.*, 2010). Del mismo modo, otros trabajos intentan conseguir la aplicación de MALDI-TOF MS en la diferenciación de patógenos directamente de muestras de sangre (Christner *et al.*, 2010; Ferroni *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 2011); o de orina (Ferreira *et al.*, 2011).

La incertidumbre que desde un punto de vista microbiológico tiene la identificación de esta especie en su nuevo enclave taxonómico y la dificultad de diferenciación con otras especies de su mismo género, hacen que nos planteemos como **objetivo general** de este trabajo de investigación la puesta a punto de nuevas herramientas diagnósticas que nos ayuden en la caracterización de las cepas de *T. pyogenes* de forma rápida, fiable y económica frente a la metodología convencional. Para la consecución de este objetivo general nos planteamos las siguientes metas específicas:

- Caracterización fenotípica de un cepario, previamente identificado mediante pruebas como la morfología del cultivo y la hemólisis, mediante el sistema de identificación bioquímica API Coryne 2.0.
- Determinación de la presencia del gen *plo* mediante el uso de PCR convencional de las cepas bioquímicamente identificadas como *T. pyogenes*.
- Determinación de la presencia del gen *aln* mediante el uso de PCR convencional de las cepas identificadas como *A. haemolyticum*.
- Aplicación de MALDI-TOF MS para la identificación de cepas de *T. pyogenes* previamente caracterizadas fenotípica y genéticamente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas analizadas y material patológico

Para la realización de este estudio se han analizado un total de 70 cepas procedentes de cerdos con diferentes patologías que presentaban lesiones de carácter supurativo. Estos aislamientos forman parte de un cepario obtenido a partir de muestras clínicas analizadas en Servicio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Córdoba durante los años 2008-2013, así como de decomisos parciales o totales de matadero durante los años 2009 a 2013. Hasta su utilización, las cepas se conservaron utilizando el sistema de criopreservación *Maintenance Freeze Medium* (Oxoid, TP15731) a -80°C en viales de 1 mL.

También se han incluido las cepas de referencia de *T. pyogenes* (ATCC 19411), *A. haemolyticum* (ATCC 9345) y *E. coli* (ATCC 25922) que se utilizaron como controles positivo y negativo en las pruebas de identificación.

3.2. Condiciones de cultivo

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron placas de agar sangre (Oxoid, CM55) suplementado con un 5 por ciento de sangre de ovino desfibrinada y estéril, según las instrucciones del fabricante. Las cepas fueron cultivadas a partir de los viales de glicerol mantenidos a -80 °C e incubadas a 37 °C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia. Además de aportar diversos factores de enriquecimiento, este medio es útil para determinar la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos.

3.3. Identificación bioquímica

Para la realización de este trabajo seleccionamos aquellas colonias que fueron pequeñas, circulares, convexas, brillantes y rodeadas de una zona de betahemólisis tras 48 horas de incubación bajo condiciones de microaerofilia, que tras la bacterioscopia presentaron una morfología de cocobacilos o bacilos Gram positivos y fueron negativos a la prueba de la catalasa.

Para determinar la presencia de la enzima catalasa se depositó una colonia de cada uno de los aislamientos sobre un portaobjetos añadiendo una gota de agua oxigenada al 3 por ciento. La presencia de la enzima descompone

el agua oxigenada en agua y oxígeno molecular observándose en caso positivo el desprendimiento de burbujas de gas (Blanco *et al.*, 2002).

A continuación, las cepas que resultaron negativas en la prueba de la catalasa se replicaron en agar sangre durante 48 horas para su identificación bioquímica mediante el sistema comercial *API Coryne versión 2.0* (Biomérieux, 20 900). Cada galería se incubó en una cámara húmeda a 35-37 °C durante 24 horas tras las que se procedió a su lectura e interpretación según la guía del fabricante. Tras la lectura de la galería se obtuvo un perfil numérico de siete cifras que se analizó mediante el *software* informático *apiweb TM versión 3.0*. (Biomérieux, 40011), que compara el perfil de la cepa problema con los perfiles incluidos en la base de datos del *software*.

3.4. Identificación serológica

Las cepas de *T. pyogenes* presentan una reacción positiva con el antisuero del grupo G de *Lancefield*, reacción que se emplea para su diferenciación de otras especies bioquímicamente muy similares como *A. haemolyticum* que lo hace frente al grupo B (Lammler and Blobel, 1986; Simeon *et al.*,1997). Así, como dato complementario a la identificación bioquímica de los aislamientos, realizamos de forma simultánea una prueba serológica enfrentando cada una de las cepas al antisuero del grupo G.

Para la determinación de esta reacción se ha utilizado el *Streptococcal grouping kit* (Oxoid, DR0585A) según el procedimiento indicado por el fabricante. La prueba se basa en un sistema de aglutinación con partículas de látex que se unen a las inmunoglobulinas (Ig G) por su fracción Fc, quedando libre la fracción Fac para unirse a los antígenos.

Para ello, las cepas problemas se sembraron en agar sangre a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. A continuación, se seleccionaron dos o tres colonias que fueron resuspendidas en 0,4 mL de la enzima de extracción incluida en el kit.

La suspensión fue incubada 10 minutos a 37 °C, sometiéndola a agitación a los 5 minutos. En una placa de *Huddleson* se depositó una gota del reactivo frente al grupo G y una gota del extracto, mezclándose mediante rotaciones suaves. En caso de reacciones positivas, aparece una aglutinación clara en menos de un minuto.

3.5. Identificación genética

Una vez realizado el estudio fenotípico y para confirmar la identificación de los distintos aislamientos pasamos a realizar su identificación molecular utilizando técnicas de PCR convencionales.

La extracción de ADN se realizó seleccionando dos colonias de cada cepa en estudio (cultivadas en agar sangre a 37°C durante 48 horas) que fueron resuspendidas en 100 µL de agua Mili-Q a los que posteriormente se le añadieron 100 µL de cloroformo. Una vez agitada la mezcla se incubó a 80°C al baño maría durante 20 minutos. Para terminar, cada muestra se centrifugó a 12000 x g durante 5 minutos, conservando el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

Para confirmar que los aislados pertenecían a la especie *T. pyogenes* se utilizó la técnica de PCR descrita por Ertas *et al.* (2005) que amplifica un fragmento del gen *plo*, único para *T. pyogenes*, utilizando los *primers* diseñados por Billington *et al.* (2002) obteniéndose un producto de amplificación de 270 pb (tabla 1). Todos los cebadores utilizados en este estudio fueron sintetizados por la casa Sigma-Aldrich®.

Tabla 1.- Cebadores de PCR específica de especie para *T. pyogenes* (Billington *et al.*, 2005)

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplicón (pb)
PLO-R	AAC TCC GCC TCT AGC GC	270
PLO-F	GGC CCG AAT GTC ACC GC	

La mezcla de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 5 µL de buffer PCR 10X (10mM Tris-Cl, pH 9,0; 50mM de KCl; 0,1% TRITON® X-100), 5 µL de MgCl₂, 250 µM de cada deoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 2U de Taq DNA polimerasa (Biotools®), 1 µM de cada primer y 5 µL de cada muestra de ADN. Las condiciones de la reacción en el termociclador se detallan en la tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones de PCR de especie *T. pyogenes*

	FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
35 ciclos	Desnaturalización inicial	94	5 minutos
	Desnaturalización		1 minuto
	Hibridación	55	1 minuto
	Elongación	72	1 minuto
	Elongación final		5 minutos

A continuación quisimos probar la PCR desarrollada por Jost *et al.* (2011) para la identificación de *A. haemolyticum*. Esta PCR amplifica un fragmento de la arcanolisina (*aln*), hemolisina recientemente descrita como factor de virulencia para esta especie y sobre la que solamente hemos encontrado hasta el momento un trabajo en la bibliografía donde se defiende que el gen que la codifica está presente en todos los aislamientos de *A. haemolyticum* y que solamente se encuentra en esta especie, constituyendo una excelente diana para su identificación. En la tabla 3 se describen los cebadores utilizados en esta PCR.

Tabla 3.- Cebadores de PCR específica de especie para *A. haemolyticum* (Jost *et al.*, 2011)

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplicón (pb)
ALN-R	GCCGCCGCTAGCGTTGACGCTTCAACACAAACCGATCC	1669
ALN-F	GCCGCCCTCGAGTCACTCGCTATGAACGATGTTCTTG	

La mezcla de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L que contenían 5 μ L de buffer PCR 10X (10mM Tris-Cl, pH 9,0; 50mM de KCl; 0,1% TRITON[®] X-100), 5 μ L de MgCl₂, 200 μ M de cada deoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 1,5 U de Taq DNA polimerasa (Biotools[®]), 1 μ M de cada primer y 5 μ L de cada muestra de ADN. Las condiciones de la reacción en el termociclador fueron las mismas que las detalladas en la tabla 2, incluyendo algunas modificaciones que hemos incluido durante el desarrollo de este trabajo sobre el protocolo de Jost *et al.* (2011), como la temperatura de anillamiento que pasó a 53 °C y los tiempo de extensión y extensión final que fueron de 2 y 7 minutos respectivamente.

La amplificación se realizó en todos los casos en un termociclador modelo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). La visualización de los productos de PCR se efectuó en geles de agarosa al 1,5% en TAE 1x con *RedSafe TM (INtRON Biotechnology[®])*, en un transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 2000,

BioRad). Cada amplificación realizada, además, incluyó un control positivo con la cepa tipo correspondiente y dos controles negativos: uno que contenía todos los reactivos excepto el ADN problema que fue sustituido por un volumen similar de agua Mili-Q y otro con ADN de *Escherichia coli*.

3.6. Identificación proteómica

Por último, 51 de los aislados bacterianos se analizaron mediante MALDI-TOF MS, usando un espectrómetro de masas *Microflex LT* de sobremesa (Bruker Daltonics, Alemania). El *software* para controlar el instrumento fue *FlexControl 3.3* y *Maldi Biotyper 3.0* (Bruker Daltonics) para el análisis de los espectros y la comparación con la base de datos. Con objeto de llevar a cabo una calibración, se incluyó en cada medición un estándar bacteriano proporcionado por el fabricante. Para todas las detecciones se aplicaron los ajustes por defecto (adquisición de espectros de masas en el modo positivo lineal dentro del rango de 2-20 kDa, fuente de iones 1 (IS1) 20 kV, IS2 18.05kV, lente 6.0kV, detector lineal 2560 V).

Antes de la identificación con MALDI-TOF MS se recogió una pequeña cantidad de bacterias mediante un asa estéril que fue colocada sobre una placa MALDI de acero pulido. Estos depósitos se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se recubrieron con 1 μ L de matriz de MALDI (una solución de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%), preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez que la matriz se secó al aire, los espectros fueron adquiridos por el espectrómetro de masas para finalmente compararse con la base de datos.

Previamente al análisis de las cepas y para que el *software* reconociera los espectros de *T. pyogenes* y *A. haemolyticum* fue necesario generar sus respectivos espectros de referencia utilizando para ello las cepas tipo descritas anteriormente. Estos espectros se introdujeron en la base de datos como patrón de referencia en la identificación de los aislamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como comentamos anteriormente, nuestro estudio incluye una selección de cepas previamente aisladas por nuestro grupo de investigación, en las que hemos determinado las siguientes características: cepas betahemolíticas que tras la bacterioscopia inicial fueron compatibles con *T. pyogenes*, resultaron negativas a la prueba de la catalasa y fueron positivas a la aglutinación frente a anticuerpos del grupo G de *Lancefiel*.

4.1 Identificación fenotípica

Tras el análisis de los 70 aislamientos mediante el sistema *API Coryne*, obtuvimos 67 cepas identificadas como *T. pyogenes* encontrando diferentes perfiles bioquímicos a los que el *software* adjudica distintos porcentajes de identificación, desde 51 cepas con un 99,9% de similitud con las cepas de referencia del sistema, hasta 13 cepas que fueron identificadas simplemente como “taxón más probable”. Este resultado viene a confirmar, como ya han reflejado diversos autores la gran variabilidad bioquímica presente dentro del grupo de las corinebacterias. Así, diversos autores han demostrado que la base de datos del sistema no contiene todos los perfiles numéricos que identifican las cepas de *T. pyogenes* aisladas de animales (Narayanan *et al.*, 1998); no obstante, son numerosos los estudios que utilizan el sistema comercial *API Coryne* para conocer los perfiles bioquímicos de este microorganismo (Funke *et al.*, 1997).

Las cepas restantes fueron identificadas, dos como *A. haemolyticum* y una como *Microbacterium spp*. En la tabla 5 se muestra para cada especie el número de cepas y su porcentaje de identificación.

Tabla 4.- Identificación bioquímica mediante la galería *API Coryne*

ID API	Excelente	Buena	Taxón más probable	Total
<i>T. pyogenes</i>	48	6	13	67
<i>A. haemolyticum</i>	1	0	1	2
<i>Microbacterium spp</i>	1	0	0	1
Total	50	6	14	70

4.2 Identificación serológica

En nuestro estudio, las 67 cepas identificadas mediante el sistema API Coryne como *T. pyogenes* aglutinaron frente al grupo G de *Lancefield*; de las dos cepas identificadas como *A. haemolyticum* una fue positiva a la aglutinación y otra negativa, mientras que la cepa identificada como *Miscrosporium spp.* no aglutinó frente a este antisuero. Estos datos confirman como todos los aislamientos de *T. pyogenes* aglutinan frente al antisuero del grupo G de *Lancefield*, aunque no de forma exclusiva, pues existen otras especies que también presentan esta reacción (Lämmler and Blobel, 1986; Simeon *et al.*, 1997; Hermida *et al.*, 2004; Almuzara *et al.*, 2006).

4.3 Identificación genética

Una vez realizada la identificación bioquímica de las cepas, los 70 aislamientos se sometieron a un estudio mediante PCR para identificar un fragmento del *gen plo*, específico de *T. pyogenes* (Ertas *et al.*, 2005).

La PCR identificó la presencia del *gen plo* en 67 cepas, las mismas que fueron identificadas mediante la galería API Coryne como *T. pyogenes*, independientemente de su nivel de identificación (excelente o taxón más probable). Tres cepas fueron negativas a la presencia del gen, correspondiendo con las identificadas mediante la galería API Coryne como *A. haemolyticum* y *Microbacterium spp.*

Estos resultados coinciden con los obtenidos por autores como Jost *et al.* (2005) quienes afirman que el cien por cien de las cepas de *T. pyogenes* presentan el *gen plo* y que este es específico para este microorganismo. Coincidiendo con Funke *et al.* (1997), nuestros resultados reflejan como el API Coryne, versión 2.0, es un sistema útil para la identificación de *T. pyogenes*, siendo la PCR una herramienta a tener en cuenta para confirmar la identificación de este microorganismo en aquellos casos en que el sistema API sólo logre una identificación como “taxón más probable”.

Como se comentó en el apartado de material y métodos también hemos puesto a punto una PCR, previamente descrita por Jost *et al.* (2011) para la identificación de *A. haemolyticum*. Este estudio tiene dos propósitos; en primer lugar determinar si los aislamientos identificados mediante la galería API Coryne como *A. haemolyticum* presentan el *gen aln*; por otro lado y puesto

que la arcanolisina es una hemolisina con muchas similitudes con la piolisina de *T. pyogenes*, nos propusimos descartar la existencia de uniones inespecíficas entre los cebadores descritos para la amplificación del *gen aln* con el *gen plo* que pudieran dar lugar a la aparición de reacciones cruzadas.

Los resultados de la PCR que amplifica el *gen aln* mostraron la ausencia de este *gen* en todos los aislamientos estudiados, a excepción de la cepa de referencia de *A. haemolyticum* ATCC 9345 utilizada como control positivo. Ninguna de las dos cepas identificadas por el sistema API Coryne como *A. haemolyticum* presentaron este *gen*, existiendo un error en la identificación por parte de alguna de las dos técnicas. Tampoco hemos encontrado ninguna cepa previamente identificada mediante el API Coryne como *T. pyogenes* que presentara el *gen aln*; hecho que confirma la especificidad de los *primers* desarrollados por Jost *et al.* (2011) al no amplificar un *gen* muy similar al *gen aln* como es el *gen plo*.

4.3 Identificación proteómica

Por último, nos planteamos evaluar la especificidad del el nuevo sistema de identificación MALDI-TOF MS en la identificación de las cepas de *T. pyogenes* seleccionando para ello un total de 51 cepas del cepario original: 48 identificadas como *T. pyogenes* mediante el sistema API Coryne y la PCR *plo*; dos cepas identificadas como *A. haemolyticum* mediante el sistema API Coryne y negativas a las PCRs *plo* y *aln* y una cepa identificada mediante la galería API Coryne como *Microbacterium spp* y negativa a ambas PCRs que se utilizó como control negativo.

Para aumentar la reproducibilidad de MALDI-TOF MS y asegurar la identificación satisfactoria de las cepas fue necesario, previamente al estudio, introducir los perfiles de las cepas tipos (*A. haemolyticum* ATCC 9345 y *T. pyogenes* ATCC 19411) tras ser cultivadas en diferentes medios (Ayyadurai *et al.*, 2010; Seibold *et al.*, 2010; Valentine *et al.*, 2005).

El sistema MALDI-TOF MS fue capaz de reconocer, con un *score* superior a 2 (identificación buena a nivel de especie) las 48 cepas previamente tipificadas como *T. pyogenes*.

Por otra parte, de las dos cepas identificadas como *A. haemolyticum* mediante el sistema API Coryne y negativas a las PCRs *aln* y *plo*, una de ellas

no fue reconocida por MALDI-TOF MS (*score*=1,663), mientras que la otra fue identificada como *T. pyogenes* (*score*=1,698).

En el primer caso el resultado indica que a pesar de haber introducido previamente en la base de datos el perfil de la cepa tipo de *A. haemolyticum*, no existe en el sistema ninguna cepa con un perfil de proteínas con suficiente similitud para poder realizar una identificación correcta. Este dato, unido a la ausencia del *gen aln*, nos indica que efectivamente no se trata de un aislamiento de *A. haemolyticum* (taxón más probable) como previamente había determinado el sistema API Coryne.

En el caso de la cepa identificada como *A. haemolyticum* mediante el sistema API Coryne, negativa a las PCRs *aln* y *plo* y positiva a la aglutinación frente al grupo G, que MALDI-TOF MS identifica como *T. pyogenes*, creemos muy importante prestar atención al *score*, que muestra un valor de 1,698. Son varios los estudios que indican como valores de *score* inferiores a 2 y hasta 1,7 corresponden a una buena identificación a nivel de género, pero no a nivel de especie (Seng *et al.*, 2009), por tanto es muy posible que nos encontramos ante una especie del género *Trueperella* diferente a *T. pyogenes*, que actualmente no se encuentre dentro de la base de datos del MALDI-TOF MS utilizado en este trabajo. Además, al tratarse de un género que incluye especies de reciente descripción cabe la posibilidad de que su perfil no se encuentre aún dentro de la base de datos del sistema API Coryne y por ello este sistema lo identifique erróneamente *A. haemolyticum* con un nivel de “excelente”.

Por último, la cepa identificada mediante el API Coyne como *Microbacterium spp.*, que a su vez fue *aln* y *plo* negativa, incluida en el análisis mediante MALDI-TOF MS como control negativo, no fue reconocida por el sistema.

En el anexo 1 se muestran los resultados obtenidos mediante todas las técnicas utilizadas en este estudio en cada una de las cepas incluidas en este trabajo.

Los perfiles obtenidos con cada uno de los aislamientos nos han permitido ampliar la información de la base de datos utilizada en este estudio con aislamientos muy interesantes al tratarse de microorganismos de origen animal, mejorando así el sistema para su uso en el diagnóstico. Además

nuestros resultados indican que MALDI-TOF MS identifica correctamente las especies *T. pyogenes* y *A. haemolyticum*, aunque aún es necesario realizar en el futuro estudios complementarios. En este sentido, y tras obtener estos resultados preliminares, actualmente estamos completando este trabajo incluyendo un número mayor de cepas, aisladas a partir de diferentes hospedadores y diferentes localizaciones geográficas, así como cepas pertenecientes a diferentes especies de los géneros *Arcanobacterium*, *Corynebacterium* y *Trueperella* para poder así calcular la sensibilidad y la especificidad de la técnica.

ANEXO

Anexo 1: Resultados globales obtenidos tras el análisis de las cepas en estudio

Ref. cepa	Id. API	% API	PCR	MALDI-TOF MS	Score
10/08	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
215/08	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
435/08	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
D2A	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	nd	nd
228/08	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
470/08	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
348/08	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
645/07	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
634/07	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	nd	nd
605/07	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
387/07	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
377/08	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
335/08	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
M2C	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
390/08	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
M1C	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	nd	nd
44	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	nd	nd
290/12	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
A20	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	nd	nd
203/10	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,23
203/10	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,241
349/08	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,092
498/08	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,144
5/07	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,247
425/07 1	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,271
43	<i>T. pyogenes</i>	79	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,193
45	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,142
46	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,138
105	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,228
110	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,264
122	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,263
130	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,216
132	<i>T. pyogenes</i>	83	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,273
133	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,233
134	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,237

Ref. cepa	Id. API	% API	PCR	MALDI-TOF MS	Score
162/11 1B	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,141
162/11 2B	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,286
607/07	<i>A. haemolyticum</i>	97,6	Plo-/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	1,689
223/08	<i>Microbacterium spp</i>	99,8	Plo-/Aln-	<i>no identificado</i>	1,227
661/07	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,202
132/07	<i>T. pyogenes</i>	Taxón más prob	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,173
425/07 2A	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,016
D1	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,306
NL1	<i>T. pyogenes</i>	98,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,268
NL2	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,212
NL3	<i>T. pyogenes</i>	99,2	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,221
NL4	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,225
A1	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,269
A2	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,226
A4	<i>T. pyogenes</i>	98,3	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,257
A5	<i>T. pyogenes</i>	85	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,22
A12	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,244
A16	<i>T. pyogenes</i>	79	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,093
A17	<i>T. pyogenes</i>	85	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,266
A18	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,161
A19	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,287
A21	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,191
A22	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,241
A23	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,218
A24	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,212
A25	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,212
A26	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,356
A27	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,276
A28	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,249
CMP-4	<i>T. pyogenes</i>	79	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,208
P4	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,222
P5	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,258
P6	<i>A. haemolyticum</i>	Taxón más prob	Plo-/Aln-	<i>no identificado</i>	1,663
161/13	<i>T. pyogenes</i>	99,9	Plo+/Aln-	<i>T. pyogenes</i>	2,231

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA.- El sistema comercial API Coryne versión 2.0 se ha mostrado válido en la identificación fenotípica de los aislamientos de *Trueperella pyogenes* de origen animal. No obstante el hecho de que existan determinados perfiles bioquímicos identificados con un bajo nivel de fiabilidad (simplemente taxón más probable) y los errores detectados en la identificación de especies afines al género como *Archanobacterium haemolyticum* hacen recomendable que la revisión de la base de datos *apiweb* V 3.0 adaptándola a las modificaciones taxonómicas publicadas recientemente.

SEGUNDA.- La técnica de PCR que amplifica un fragmento del *gen plo*, desarrollada por Ertas *et al.* (2005), es capaz de identificar adecuadamente y de forma rápida las cepas de *Trueperella pyogenes*, mostrándose como una herramienta a tener en cuenta tanto en el diagnóstico rutinario de esta especie, como para confirmar la identificación del microorganismo en aquellos casos en que otros sistemas no lo consigan de forma fiable.

TERCERA.- La técnica de PCR que amplifica un fragmento del *gen aln*, que codifica la arcanolisina, es capaz de identificar adecuadamente y de forma rápida las cepas de *Archanobacterium haemolyticum*, si bien en nuestro estudio fue necesario realizar algunas modificaciones sobre el protocolo original como el aumento de la temperatura de anillamiento hasta 53 °C.

CUARTA.- A pesar de las similitudes existentes entre las secuencias de los *genes aln* y *plo*, los cebadores utilizados en este estudio y diseñados por Jost *et al.* (2011) no mostraron reacciones cruzadas en la identificación de ambas especies.

QUINTA.- Este estudio muestra al sistema MALDI-TOF MS como una técnica consistente, válida para la identificación rutinaria a nivel de especie de las cepas de *T. pyogenes*, mostrando un poder de discriminación similar al de la PCR y siendo al igual que la anterior, una técnica rápida y con un bajo coste a largo plazo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almuzara, M.N., De Mier, C., Rodriguez, C.R., Famiglietti, C.A. and Vay, C.A. 2006. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para identificación de bacilos gram positivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 197-201.
- Ayyadurai, S., Flaudrops, C., Raoult, D., Drancourt, M., 2010, Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol* 10, 285.
- Azuma, R., Murakami, S., Ogawa, A., Okada, Y., Miyazaki, S., Makino, T., 2009, *Arcanobacterium abortusuis* sp. nov., isolated from a placenta of a sow following an abortion. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1469-1473.
- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2008, Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 5402-5407.
- Billington, S.J., Jost, B.H., Cuevas, W.A., Bright, K.R., Songer, J.G., 1997, The *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. *J Bacteriol* 179, 6100-6106.
- Billington, S.J., Post, K.W., Jost, B.H., 2002, Isolation of *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis. *J Vet Diagn Invest* 14, 159-162.
- Blanco, J., Blanco M., Blanco E. J., Mora, A., Alonso, M.P., González, E.A. and Bernárdez, M.I. 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. Ed. McGRAW-Hill. Interamérica, 301-327.
- Christner, M., Rohde, H., Wolters, M., Sobottka, I., Wegscheider, K., Aepfelbacher, M., 2010, Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48, 1584-1591.
- Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008, Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 7767-7778.
- Ding, H., Lammler, C., 1992, Evaluation of the API Coryne test system for identification of *Actinomyces pyogenes*. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 273-276.
- Ding, H., Lammler, C., 1996, Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*. *Zentralbl Veterinarmed B* 43, 179-188.
- Ertaş HB, Kiliç A, Özbey G, Muz A. 2005. Isolation of *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* from abscessed cattle kidney and identification by PCR. *Turk J Vet Anim Sci.*; 29:455-459.
- Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J.L., Gonzalez-Buitrago, J.M., 2011, Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17, 1007-1012.
- Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J.L., Dauphin, B., Bille, E., Meyer, J., Bougnoux, M.E., Alanio, A., Berche, P., Nassif, X., 2010, Real-time identification of bacteria and

- Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48, 1542-1548.
- Friedrichs, C., Rodloff, A.C., Chhatwal, G.S., Schellenberger, W., Eschrich, K., 2007, Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* 45, 2392-2397.
- Funke, G., von Graevenitz, A., Clarridge, J.E., 3rd, Bernard, K.A., 1997, Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 10, 125-159.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S.M., Kleinheinz, G.T., Robbins, M., Sandrin, T.R., 2010, Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 71, 149-184.
- Grosse-Herrenthey, A., Maier, T., Gessler, F., Schaumann, R., Bohnel, H., Kostrzewa, M., Kruger, M., 2008, Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* 14, 242-249.
- Hermida, A.A., Romero, J.P., Carbacos, O.A. and Treviño, C.M., 2004. A propósito de un caso de neumonía por *Arcanobacterium pyogenes*. *An. Med. Interna*, Vol. 21, Nº 7, 334-336.
- Hermoso de Mendoza, J., Vadillo, S and Piriz, S. 2002. Manual de microbiología veterinario. Ed. McGRAW-Hill. Interamérica. Cap. 38 (Géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Actinobaculum* y *Arcanobacterium*) 519-537.
- Hijazin, M., Prenger-Berninghoff, E., Sammra, O., Alber, J., Lammler, C., Kampfner, P., Glaeser, S.P., Busse, H.J., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Zschock, M., 2012, *Arcanobacterium canis* sp. nov., isolated from otitis externa of a dog, and emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1983 emend. Yassin *et al.* 2011. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2201-2205.
- Hijazin, M., Ulbegi-Mohyla, H., Alber, J., Lammler, C., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., Zschock, M., 2011, Molecular identification and further characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine mastitis and from various other origins. *J Dairy Sci* 94, 1813-1819.
- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr., 1996, Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10, 1227-1232.
- Horneffer, V., Forsmann, A., Strupat, K., Hillenkamp, F., Kubitscheck, U., 2001, Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. *Anal Chem* 73, 1016-1022.
- Hoyles, L., Falsen, E., Foster, G., Rogerson, F., Collins, M.D., 2002, *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 617-619.
- Hrabak, J., Chudackova, E., Walkova, R., 2013, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 26, 103-114.

- Hsieh, S.Y., Tseng, C.L., Lee, Y.S., Kuo, A.J., Sun, C.F., Lin, Y.H., Chen, J.K., 2008, Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics* 7, 448-456.
- Iilina, E.N., Borovskaya, A.D., Malakhova, M.M., Vereshchagin, V.A., Kubanova, A.A., Kruglov, A.N., Svistunova, T.S., Gazarian, A.O., Maier, T., Kostrzewa, M., Govorun, V.M., 2009, Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J Mol Diagn* 11, 75-86.
- Iilina, E.N., Borovskaya, A.D., Serebryakova, M.V., Chelysheva, V.V., Momynaliev, K.T., Maier, T., Kostrzewa, M., Govorun, V.M., 2010, Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24, 328-334.
- Iilina, E.N., Vereshchagin, V.A., Borovskaya, A.D., Malakhova, M.V., Sidorenko, S.V., Al-Khafaji, N.C., Kubanova, A.A., Govorun, V.M., 2008, Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2175-2182.
- Jost, B.H., Billington, S.J., 2005, *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88, 87-102.
- Jost, B.H., Lucas, E.A., Billington, S.J., Ratner, A.J., McGee, D.J., 2011, Arcanolysin is a cholesterol-dependent cytolysin of the human pathogen *Arcanobacterium haemolyticum*. *BMC Microbiol* 11, 239.
- Jost, B.H., Songer, J.G., Billington, S.J., 1999, An *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. *Infect Immun* 67, 1723-1728.
- Jost, B.H., Songer, J.G., Billington, S.J., 2001, Cloning, expression, and characterization of a neuraminidase gene from *Arcanobacterium pyogenes*. *Infect Immun* 69, 4430-4437.
- Jost, B.H., Songer, J.G., Billington, S.J., 2002, Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. *Infect Immun* 70, 1106-1112.
- Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B., 2004, *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42, 3925-3931.
- Lammler, C., Blobel, H., 1986, Tentative identification of *Actinomyces pyogenes* with antisera against group G streptococci. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 262, 357-360.
- Lawson, P.A., Falsen, E., Foster, G., Eriksson, E., Weiss, N., Collins, M.D., 2001, *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 55-59.
- Lehnen, A., Busse, H.J., Frolich, K., Krasinska, M., Kampfer, P., Speck, S., 2006, *Arcanobacterium bialowiezense* sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov., isolated from the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis, and emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1983. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 861-866.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.G., 2009, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47, 2912-2917.

- Martinez, J., Jaro, P.J., Aduriz, G., Gomez, E.A., Peris, B., Corpa, J.M., 2007, Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *Vet J* 174, 160-164.
- Martiny, D., Dediste, A., Debruyne, L., Vlaes, L., Haddou, N.B., Vandamme, P., Vandenberg, O., 2011, Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clin Microbiol Infect* 17, 1001-1006.
- Narayanan, S., Nagaraja, T.G., Staats, J., Chengappa, M.M., Oberst, R.D., 1998, Biochemical and biological characterizations and ribotyping of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses in cattle. *Vet Microbiol* 61, 289-303.
- Nattermann, H., Horsch, F., 1977, [The *Corynebacterium pyogenes* infection in cattle. 1. Incidence of the pathogen]. *Arch Exp Veterinarmed* 31, 405-413.
- Olvera, R. 2008. "Mediadas de apoyo al sector porcino ibérico en Andalucía". *VIII Edición del Encuentro sobre Porcino Ibérico*.
- Pignone, M., Greth, K.M., Cooper, J., Emerson, D., Tang, J., 2006, Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 44, 1963-1970.
- Plamondon, M., Martinez, G., Raynal, L., Touchette, M., Valiquette, L., 2007, A fatal case of *Arcanobacterium pyogenes* endocarditis in a man with no identified animal contact: case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 663-666.
- Putignani, L., Del Chierico, F., Onori, M., Mancinelli, L., Argentieri, M., Bernaschi, P., Coltella, L., Lucignano, B., Pansani, L., Ranno, S., Russo, C., Urbani, A., Federici, G., Menichella, D., 2011, MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst* 7, 620-629.
- Queen, C., Ward, A.C., Hunter, D.L., 1994, Bacteria isolated from nasal and tonsillar samples of clinically healthy Rocky Mountain bighorn and domestic sheep. *J Wildl Dis* 30, 1-7.
- Ramos, C.P., Foster, G., Collins, M.D., 1997, Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47, 46-53.
- Sauer, S., Kliem, M., 2010, Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8, 74-82.
- Schubert, S., Weinert, K., Wagner, C., Gunzl, B., Wieser, A., Maier, T., Kostrzewa, M., 2011, Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn* 13, 701-706.
- Seibold, E., Maier, T., Kostrzewa, M., Zeman, E., Spletstoeser, W., 2010, Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J Clin Microbiol* 48, 1061-1069.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009, Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543-551.

- Silva, E., Gaivao, M., Leitao, S., Jost, B.H., Carneiro, C., Vilela, C.L., Lopes da Costa, L., Mateus, L., 2008, Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet Microbiol* 132, 111-118.
- Simeon, D., Le Costumer, A., Bombarde, A., Shawali, A. and Peloux, Y. 1999. Infections humaines à *Actinomyces pyogenes*: à propos de un cas. *Med. Mal. Infect.*, 27: 818-826.
- Ulbegi-Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lammler, C., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., Zschock, M., 2010, Identification of *Arcanobacterium pyogenes* isolated by post mortem examinations of a bearded dragon and a gecko by phenotypic and genotypic properties. *J Vet Sci* 11, 265-267.
- Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., Wahl, K., 2005, Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 71, 58-64.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C., Kuijper, E.J., 2010, High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48, 900-907.
- Yassin, A.F., Hupfer, H., Siering, C., Schumann, P., 2011, Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1982 emend. Lehnert *et al.* 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1265-1274.

7. AGRADECIMIENTOS

7. Agradecimientos:

Porque un trabajo de investigación no es fruto del esfuerzo una de sola persona, quisiera agradecer con unas líneas a todos aquellos que me han ayudado a hacerlo posible.

A mi tutora, la Doctora Carmen Borge Rodríguez por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo de investigación.

A todos los miembros del grupo de investigación por su apoyo y por los buenos momentos vividos con ellos, sobre todo Alfonso Lara que me proporcionaba el material de laboratorio antes incluso de que se lo pidiera.

A la Doctora Belén Rodríguez por estar involucrada en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del máster, que consiguieron hacerme disfrutar el día a día con ellos.

A mis compañeros de piso por escucharme, aguantarme y animarme a seguir adelante.

A todos mis amigos del fútbol, porque me han ayudado a desestresarme con ellos. Sin Fede, Miguel, Claudio, Néstor, Llopis, Oscar, Jose y Rafa este año hubiera sido diferente.

A toda mi familia, ya que sin ellos no habría llegado hasta donde estoy.

Y a Lidia, porque tu apoyo durante todo el año ha sido muy importante para mí.

Gracias.

José Antonio Infantes Lorenzo