

# Caracterización microbiológica por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF)

Una metodología novedosa para el diagnóstico y caracterización de microorganismos en el estudio de las enfermedades infecciosas

*Jorge Enrique Gómez Marín<sup>1,2</sup>, Ganesh D. Sockalingum<sup>1</sup>, Fernando Alvarado<sup>2</sup>, Jean Michel Pinon<sup>1</sup>, Michel Manfait<sup>2</sup>*

## Resumen

Desarrollos recientes en instrumentación y métodos estadísticos han permitido que la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF) surja como una nueva alternativa en la caracterización rápida, segura y poco costosa de microorganismos. EITF ofrece la ventaja de no requerir preparación previa o especial para el análisis, el cual puede ser realizado incluso sobre la muestra clínica. Los espectros EITF son abundantes en información estructural, no siempre perceptible en un primer análisis, pero puede ser puesta en evidencia por la aplicación de juiciosos métodos matemáticos o estadísticos. Otra ventaja adicional de EITF es que es una técnica no destructiva, que permite estudiar las diferencias ultra-estructurales de los microorganismos a nivel intraespecie (estudio de cepas y aislados). EITF es una nueva metodología para el estudio de las características biomoleculares y biofísicas de los microorganismos, y representará en un futuro no lejano, una nueva revolución en el diagnóstico y caracterización de los agentes responsables de las enfermedades infecciosas.

La elaboración de una nueva técnica que permitiera seguir y controlar el comportamiento de constituyentes bacterianos, en diferentes condiciones biológicas, es ciertamente de gran importancia. Las aplicaciones serían numerosas, tales como la determinación del mecanismo de acción de nuevos antibacterianos, aplicaciones diagnósticas, caracterizaciones fenotípicas detalladas, y aplicaciones en epide-

miología nosocomial y diseminación de gérmenes virulentos o con resistencia a antibióticos. El estudio de las bacterias por métodos espectroscópicos comenzó en 1950 (1). Los trabajos de esta época indicaron que la espectroscopia infrarroja (EI) respondía a todos los criterios de rapidez en acceso a resultados, aplicabilidad en todos los microorganismos, utilización de pequeñas cantidades de muestra y cos-

1. Laboratoire de Parasitologie Mycologie, IFR 53, EA 2070, Faculté de Médecine, Université de Reims Champagne Ardenne, CHU, 51096 Reims, France.

2. Unidad de Infectología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá D.C., Colombia.

3. Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire Unité McDIAN, IFR 53, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

to razonable. De otra parte, el espectro infrarrojo se pudo obtener de manera reproducible cuando se controlaban todos los parámetros de cultivo y registro de espectros. Sin embargo, las limitaciones de los instrumentos de la época frenaron el desarrollo de esos primeros trabajos. La integración de la ecuación denominada "Transformada de Fourier" a los procesos de análisis y automatización de los espectrofotómetros infrarrojos, significó una mejoría substancial en rapidez y sensibilidad del método y lanzó de nuevo el estudio de las estructuras bacterianas por EI. En años recientes, varios grupos de trabajo y notablemente el grupo europeo MIDAS (<http://midas.rki.de/>) compuesto por laboratorios de biofísica y microbiología, han retomado la utilización de esta técnica. Los resultados obtenidos permiten presagiar que la EI podrá ser utilizada como una alternativa novedosa y eficaz en el estudio de los agentes infecciosos en un futuro próximo, y puede significar una nueva revolución para el laboratorio clínico. Este artículo pretende demostrar los avances recientes en este campo así como los trabajos que nuestro grupo ha realizado en este tema.

## Fundamentos de espectroscopia

La espectroscopia es una ciencia que se basa en el estudio de las informaciones obtenidas enviando un haz luminoso sobre una muestra en estudio, y midiendo las longitudes de onda que son absorbidas. La espectroscopia infrarroja (IR) en particular, estudia las longitudes de onda entre 2,5 y 15 mm. La propiedad fundamental de la espectroscopia infrarroja es que permite el estudio de la energía vibracional, la cual se obtiene cuando una radiación de longitud de onda adecuada atraviesa una muestra en estudio. Por ello se le llama también espectroscopia vibracional. En contraste, en las regiones ultravioleta y visible se estudia el nivel de excitación electrónica, y en el rango de microondas los cuantos de energía absorbidos aumentan la energía de rotación de las moléculas, obteniéndose la llamada espectroscopia de rotación.

Los niveles de vibración de las moléculas corresponden a los movimientos del núcleo de

cada uno de los átomos que componen la molécula en estudio. Estos niveles son llamados los «modos normales de vibración». Para una molécula dada, el número de modos normales posibles se calcula restando seis grados de libertad de la molécula completa al número de grados de libertad de los núcleos. Por lo tanto existen  $3N-6$  «modos normales» para una molécula de  $N$  átomos, esto es, varios millares para una macromolécula. Existen tres tipos principales de bandas de absorción:

- ◆ *Las bandas fundamentales:* características de cada modo vibracional.
- ◆ *Las bandas armónicas:* bandas en las cuales la frecuencia de vibración es un múltiplo de la frecuencia fundamental.
- ◆ *Las bandas de combinación:* en las cuales las frecuencias son próximas de la suma o de la diferencia de dos (o más) frecuencias fundamentales.

Cada grupo químico tiene una asociación de frecuencias característica. Así entre 1.800 y 1.500  $\text{cm}^{-1}$  las bandas son atribuidas a modos de vibración de tipo elongación de bases carboxilo. Entre 1.500 y 1.250  $\text{cm}^{-1}$  las bandas son atribuidas a vibraciones de entidades base-azúcar. La literatura permite reconocer una gran parte de bandas IR del espectro. Actualmente se conocen numerosos datos de macromoléculas tales como las pertenecientes a azúcares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

## Aplicación de espectroscopia infrarroja en microbiología

La Espectroscopia Infrarroja (EI) ha sido uno de los métodos más utilizados para la identificación de compuestos orgánicos. La popularidad de esta técnica es debida a su simplicidad de utilización, su versatilidad y precisión. Una de sus mayores ventajas es que la muestra puede ser analizada en diferentes condiciones físicas y químicas. Esto es de gran interés en biología celular, pues permite estudiar una muestra sin preparación previa, y en los últimos años la aparición de numerosas modificaciones de las técnicas y métodos de registro han facilitado la aplicación de la EI sobre bacterias y células enteras. Ha sido notable el aporte de la ecuación "Trans-

**FIGURA 1**



Equipo para la obtención de espectros infrarrojos con transformada de Fourier por reflectancia difusa. Se trata de un espectrómetro IFS28 FT-IR (Bruker Spectrospin Ltda., Banner Lane, Coventry CV4 9GH, UK) equipado con un detector MCT (mercury-cadmium-telluride).

formada de Fourier". Esta ecuación ha sido integrada en los métodos analíticos de los espectrofotómetros infrarrojos y ha permitido abordar el estudio de bacterias enteras gracias a una mayor sensibilidad y rapidez en el registro y tratamiento de los espectros (Figura 1). La gran dificultad en el estudio de células enteras con Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF) es que el resultado del análisis es un producto de la absorción de todas las macromoléculas constituyentes. Ciertas bandas pueden ser atribuidas a grupos químicos específicos pero aún se está lejos de obtener una comprensión completa de las numerosas informaciones contenidas en el espectro. Sin embargo, los datos provenientes del estudio de constituyentes aislados y extraídos químicamente, han facilitado la interpretación de las características de estos espectros, procedentes de estructuras complejas, sobre todo en el caso de algunas bacterias (2, 3).

Los trabajos del grupo de Naumman (4) han abierto la aplicación práctica de los resultados de espectros EITF obtenidos sobre bacterias completas. Este grupo ha logrado desarrollar métodos de análisis estadístico multivariado y obtener espectros bacterianos referenciados que permiten una identificación taxonómica. Esto ha permitido elaborar un método de estudio por EITF ultrarrápido y poco costoso para la identificación de bacterias. Los estudios de Naumman (4,5) tienen la ventaja de restringir el análisis a ciertas regiones del espectro, en particular a la ventana correspondiente al espectro entre 1.200 y 900  $\text{cm}^{-1}$ . Aunque esto puede dejar de lado cierta infor-

mación que procuran otras regiones del espectro ello ha simplificado el análisis de resultados.

Recientemente EITF ha sido aplicado en el estudio de los mecanismos e interacciones de la estructura molecular global de microorganismos tales como bacterias y levaduras (6,7). Es así como es posible asignar ciertas bandas a tipos particulares de enlaces covalentes. Modificaciones electrónicas locales de esos enlaces se relacionan con modificaciones en los detalles del espectro. Así, por ejemplo, algunas informaciones que se han logrado obtener a partir de las bandas de amidas I, II y III de los espectros de absorbancia, permiten conocer detalles de las estructuras de los enlaces peptídicos de proteínas, y esto puede tener aplicaciones en el estudio de los efectos de las condiciones de cultivo y de los mecanismos de acción de los antibióticos sobre estos microorganismos. Al mismo tiempo, los patrones de espectroscopia obtenidos por EITF son altamente reproducibles y típicos para diferentes bacterias. Recientemente (8) fue demostrado que es posible discriminar por esta técnica cepas de *P. aeruginosa* sensibles y resistentes al antibiótico imipenem. El mismo grupo de trabajo (9) obtuvo resultados semejantes sobre *Escherichia coli*, y lograron diferenciar entre fenotipos de *E. coli* sensibles o presentando resistencia a ciertos antimicrobianos. Las ventajas de EITF frente a los métodos tradicionales son múltiples. Los métodos de estudio por EITF son no destructivos y permiten obtener informaciones de tipo "fingerprint" o "huella digital" espectral, para el organismo analizado. Esta técnica ha logrado discriminar a nivel taxonómico, sin preselección por otros criterios (5). También ha sido aplicada en el estudio del efecto de diferentes medios de cultivo sobre la ultraestructura de organismos (10).

### **Caracterización de especies de *Candida* por EITF**

Timmins et al. (7) han reportado recientemente que EITF es capaz de discriminar entre *C. albicans*, *C. stellatoidea* y *C. dublinensis* obtenidos de aislados clínicos. Este equipo utilizó la estrategia de EITF por reflectancia-absorbancia difusa, la cual requiere preparación previa de suspensiones de

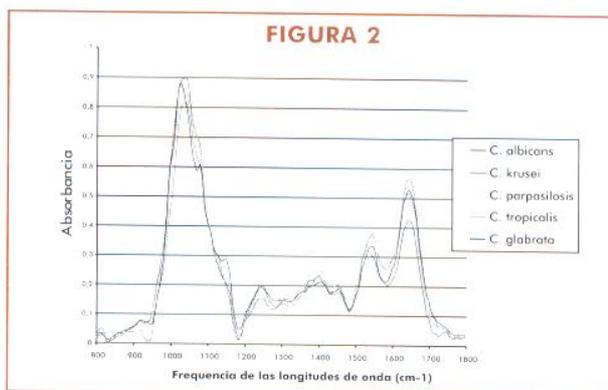
levaduras. Nosotros (11) hemos trabajado igualmente en la caracterización de *Candida* y quisimos establecer un banco de datos espectrales por el método de reflectancia total atenuada para EITF. A diferencia del EITF por metodología de reflectancia-absorbancia difusa, el EITF por reflectancia total atenuada no requiere de preparaciones previas de las colonias de levaduras, las cuales se esparcen de manera homogénea y directa sobre un cristal de ZnSe. En la Figura 2 mostramos los espectros promedio de cada una de las cinco cepas de referencia de especies de *Candida* que estudiamos. Nuestros resultados muestran que EITF es un método simple, rápido, accesible que permite diferenciar entre especies de *Candida*. Sin embargo, una buena discriminación puede ser obtenida sólo en ciertas condiciones y puede ser lograda por la utilización de determinados métodos matemáticos. Estos resultados a su vez están siendo utilizados en la construcción de un banco de datos de cepas de referencia para comparaciones futuras con aislados clínicos.

## Agradecimientos

Los resultados presentados en este trabajo son parte del trabajo postdoctoral de J.E. Gómez y financiado por el programa "EC Biomed II" (contract no. BMH4-97-2054) y el Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Ministère de la Santé, Paris, France).

## Summary

Recent developments in the instrumentation and statistical methods have made the emergence of FTIE (Fourier-transformed Infrared Spectroscopy) possible as an alternative in the identification of microorganisms. FTIE is a rapid, reliable and relatively cheap technique. It has the advantage of no special preparation of samples, and can be done over the clinical specimen. FTIE spectra provide ample structural information, not always perceived at the first analysis, but after judicious mathematical and statistical handling. An additional advantage of this methodology is that it is non-destructive, allowing the study of ultra-structural differences of microorganisms, at interspecies level (study of strains and isolates). FTIE is a new methodology for the biomolecular and biophysical characteristics of microorganisms. It is foreseen that in the near future this technique will be commonly used for the identification and characterization of infectious disease agents.



Espectros promedio (n=10 medidas espectrales) obtenidos por Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF) de 5 especies de *Candida*. Las cepas de referencia provienen de la colección del Instituto Pasteur (Paris). Los espectros se obtuvieron por reflectancia atenuada difusa sobre un cristal de ZnSe, a partir de colonias de medio sólido con 24 horas de cultivo en medio Sabouraud y esparcidas de manera homogénea sobre el cristal.

## Referencias

- Riddle JW, Kabler PW, Kenner BA, et al. Bacterial identification by infrared spectrophotometry. *J Bacteriol* 72:593-594; 1956
- Verdel-Zeroual W. Application de la spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier a l'étude des comportements bactériens en fonction de l'environnement. Essai de reconnaissance de cible des antibactériens. Thèse de Doctorat. Reims: Université de Reims, 1994. 169 p.
- Daffe M, Laneelle MA, Lacave C. Structure and stereochemistry of mycolic acids of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *Res Microbiol* 142:397-403, 1991.
- Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351:81-2, 1991.
- Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137:69-79, 1991.
- Horbach I, Naumann D, Fehrenbach FJ. Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 126:1106-10, 1988.
- Timmings EM, Howell SA, Alsberg BK, Noble WC, Goodacre R. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 36:367-74, 1998.
- Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, et al. ATR-IR/FT spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. *Biochem Biophys Res Commun* 232:240-1997.
- Bouhedja W, Sockalingum GD, Pina P, et al. ATR-IR/FT spectroscopic investigation of *E. coli* transconjugants beta-lactams-resistant phenotype. *FHBS Lett* 412: 39-42, 1997.
- Zeroual W, Manfait M, Choisy C. FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*). *Pathol Biol (Paris)* 43:300-5, 1995.
- Gómez JE, Sockalingum GD, Aubert D, Toubas D, Pinon JM, Witthuhn F, Manfait M. Characterization of *Candida* reference strains by ATR- FTIR Submitted, 1999.