



# Diferenciación por espectroscopia

## <sup>+</sup>HRMN de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en cultivo

Polanco N. <sup>1</sup> .

Leal E. <sup>2</sup> .

Martín M. <sup>3</sup> .

Pekerar S. <sup>4</sup> .

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. UCV n5polanc@hotmail.com

<sup>2</sup>Escuela de Química. Facultad de Ciencias. UCV

<sup>3</sup>Escuela de Física. Facultad de Ciencias. UCV

<sup>4</sup>Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Química. IVIC

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 06 de Febrero del 2012 a la Revista Vitae Academia

## RESUMEN

Pese a los variados métodos de identificación bacteriana existentes actualmente, aún persisten problemas en la práctica de rutina del Laboratorio clínico, por tal razón, se planteó diferenciar, en cultivo líquido, por espectroscopia +HRMN, algunas bacterias patógenas para humanos. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, fueron aisladas de pacientes con diferentes cuadros infecciosos e identificadas por métodos convencionales. Posteriormente se cultivaron en Caldo Infusión "cerebro-corazón" (CICC), durante 18-24 h a 37 °C en 10% de CO<sub>2</sub> y se analizaron por espectroscopia +HRMN. Los espectros fueron procesados a través del programa matNMR v. 2.7 (MATLAB ®). Las señales que por su desplazamiento químico y/o intensidad facilitaron la diferenciación de las especies y de su medio de cultivo, se encuentran en la región alifática. Conclusión: No obstante el gran número de señales desplegadas por las distintas especies y por el CICC, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* fueron diferenciadas por espectroscopia +HRMN directamente en CICC.

**PALABRAS CLAVE:** +HRMN, Espectroscopia, Bacterias, Patógenos, Identificación bacteriana, Cultivos bacterianos.

## DIFFERENTIATION BY +HRMN SPECTROSCOPY OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE, STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y STREPTOCOCCUS AGALACTIAE IN CULTURE

### SUMMARY

In spite of several methods of bacterial identification existing today, problems still persist in the practice of routine clinical laboratory, for this reason, we consider differentiating, in liquid culture, some pathogenic bacteria in humans by means of +HNMR spectroscopy. Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, were isolated from patients with different infectious diseases and identified by conventional methods. Later were they cultivated in broth brain-heart- infusion (BBHI), during 18-24 h to 37° C in 10% of CO<sub>2</sub> and analysed by spectroscopy +HNMR. The spectra were processed using the matNMR v. 2.7 software (MATLAB ®). Signals which by their chemical displacement and/or intensity facilitate the differentiation of the species and its culture medium, are found in the aliphatic region. Conclusion: Despite the large number of signals shown by the different species and the BBHI, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* were differentiated by +HNMR spectroscopy, directly in BBHI.

**KEY WORDS:** +HNMR, Spectroscopy, Bacterias, Pathogens, Bacterial identification, Bacterial culture.

## DIFERENCIACIÓN POR ESPECTROSCOPIA +HRMN DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EN CULTIVO

## INTRODUCCIÓN

La espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear protónica ( $^1\text{RMN}$ ) de alta resolución se ha convertido en una de las herramientas analíticas más importantes para obtener información sobre diversos líquidos biológicos y extractos de tejidos. Puede proveer información sobre un amplio rango de metabolitos en células viables, con lo cual demuestra ser una técnica no invasiva. Esta característica facilita su aplicación biológica en diferentes estudios sobre aspectos de la bioquímica celular en los organismos vivos <sup>(1)</sup>. Afortunadamente, por los avances registrados en la generación de los campos magnéticos de los espectrómetros más recientes se ha aumentado su sensibilidad, esto ha permitido mayor aplicación de la  $^1\text{RMN}$  en el campo de la Microbiología <sup>(2)</sup>. Más recientemente ha sido usada para múltiples análisis como en la descripción de interacciones estructurales que ocurren en la formación de complejos proteína-proteína en una célula bacteriana <sup>(3)</sup>, determinación de estructuras de proteínas en células vivas <sup>(4)</sup>, entre otros usos.

Los núcleos de  $^{31}\text{P}$  <sup>(5)</sup>,  $^{13}\text{C}$  <sup>(6)</sup> y  $^{15}\text{N}$  <sup>(7)</sup> han sido usados frecuentemente en  $^1\text{NMR}$  para entender procesos metabólicos y fisiológicos incluyendo fenómenos de transporte en diferentes sistemas. Otro núcleo activo y muy utilizado es el protón ( $^1\text{H}$ ). Este núcleo posee dos propiedades muy útiles: i.- es abundante en la naturaleza (98-99%) y (ii).- está presente en casi todas las moléculas biológicas que contienen carbono. EL  $^1\text{H}$  tiene alta sensibilidad  $^1\text{NMR}$  debido a que tiene la más alta proporción giromagnética de todos los núcleos estables. Sin embargo, tiene la desventaja de tener un rango espectral relativamente pequeño y una aplastante señal de agua en el espectro <sup>(8)</sup>.

*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, son patógenos bacterianos aislados frecuentemente en muestras clínicas. *K. pneumoniae*, es un bacilo Gram-negativo miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Está distribuido ampliamente en el medio ambiente, algunas cepas pueden causar infecciones en humanos las cuales van desde la colonización asintomática del intestino, tracto urinario y tracto respiratorio hasta cuadros fatales de neumonía <sup>(9)</sup>, septicemia <sup>(10)</sup> y meningitis <sup>(11)</sup>.

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram-positivo miembro de la familia *Micrococcaceae*, está bien documentado como patógeno oportunista y como patógeno nosocomial. Es causa importante de morbilidad y mortalidad en seres humanos <sup>(12,13,14)</sup>.

*Streptococcus agalactiae*, es un coco  $\beta$ -hemolítico, miembro de la familia *Streptococcaceae*, es causa importante de infecciones serias tanto en neonatos como en adultos <sup>(15,16,17,18)</sup>.

Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas poseen moléculas estructurales y no estructurales que pueden generar intensidades espectrales detectables por RMN. El peptidoglicano componente común en la pared de ambos grupos bacterianos, forma en las bacterias Gram-negativas una capa delgada (5 a 10 nm). Esta característica tal vez le permite movimiento significativo libre y generar intensidades espectrales detectables por RMN <sup>(19)</sup>. En las bacterias Gram-positivas, debido a que este compuesto está unido covalentemente a otros biopolímeros como ácidos teicoicos, polisacáridos y lipoglicopéptidos, la pared celular que

forma, es relativamente gruesa (20 a 80 nm), con movimiento restringido y baja intensidad espectral <sup>(20)</sup>. Los fosfolípidos, compuestos que se encuentran en la red basal en la membrana citoplasmática en ambos grupos bacterianos también pueden generar intensidades detectables. Varios tipos de ellos pueden contribuir con la patogenicidad de la bacteria <sup>(21)</sup>.

Con estas consideraciones se planteó analizar por espectroscopia <sup>1</sup>H-RMN tres especies bacterianas en cultivos líquidos: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* provenientes de pacientes con diferentes patologías infecciosas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras clínicas objeto de este estudio, se obtuvieron en diferentes Laboratorios del área capitalina, las mismas fueron tomadas, siguiendo las normas del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT <sup>(22)</sup> a pacientes con cuadros clínicos de origen infeccioso tales como meningitis, infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, otitis externa, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, infección del tracto génito-urinario y sepsis. Los criterios de exclusión fueron la administración de tratamiento antimicrobiano durante los siete días previos a la toma de la muestra y el aislamiento de bacterias diferentes a las del estudio.

Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de Patogenicidad bacteriana de la Escuela de Bioanálisis donde fueron procesadas de inmediato según el procedimiento de la Sociedad Americana de Microbiología <sup>(23)</sup>.

Las cepas controles utilizadas fueron:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357

Estas dos cepas pertenecen a la Bacterioteca de la Cátedra de Microbiología.

*Streptococcus agalactiae*, cepa de referencia del Hospital Clínico Universitario (HCU).

### **Aislamiento e identificación de las cepas de *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. agalactiae***

Las muestras fueron sembradas por estriación en placas con agar base sangre (Oxoid), suplementado con 5% de sangre humana, con agar chocolate, agar base GC suplementado con Vitox (oxoid), seguidamente se incubaron a 37°C, en atmósfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> durante 18 a 24 horas y en agar Cled (Oxoid) incubado a 37°C, en atmósfera normal durante 18 a 24 horas <sup>(23)</sup>. Todas las cepas pertenecientes a los géneros en estudio fueron identificadas sobre la base de características fenotípicas convencionales aceptadas para los aislados clínicos. Para el aislamiento e identificación de *K. pneumoniae*, se seleccionaron colonias con aspecto mucoso, grandes, convexas, se les realizó la coloración de Gram y las pruebas bioquímicas siguientes: Determinación de la utilización de los sustratos urea, lisina, citrato, glucosa, lactosa, sucrosa, pruebas de motilidad en preparaciones al fresco y en agares semisólidos como manitol-motilidad y determinación de la producción de indol en los medios motilidad-indol-

ornitina <sup>(24)</sup>.

En el caso de *Staphylococcus aureus*, se seleccionaron de las placas colonias medianas con pigmento amarillo-anaranjado. Seguidamente, se le realizó la coloración de Gram y las siguientes pruebas: Crecimiento en los medios de Chapman, OF-glucosa, determinación de la síntesis de las enzimas catalasa, DNasa, estafiloaglutinasa, fosfatasa alcalina así como su comportamiento frente a la polimixina B y a la novobiocina <sup>(25)</sup>.

En el caso de *Streptococcus agalactiae*, se seleccionaron colonias pequeñas, translúcidas con un pequeño halo de  $\beta$ - hemolisis. Seguidamente se le realizó la coloración de Gram y las siguientes pruebas: Determinación de la producción de la enzima catalasa, capacidad para hidrolizar el hipurato y la producción de la proteína extracelular difusible o factor CAMP <sup>(26)</sup>.

Este procedimiento de identificación descrito se aplicó también a las cepas controles.

### **Cultivo en medio líquido de las cepas de *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. agalactiae***

Posteriormente a la identificación de las cepas, bajo campana de flujo laminar (Labconco, Purifier <sup>TM</sup> Class II Safety CABINET), se tomaron 4 ó 5 colonias de cada cepa, para realizar una suspensión en solución salina estéril (0,85%) con turbidez compatible con el patrón de McFarland N° 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) <sup>(27)</sup>, de esta suspensión celular, se extrajo 1,0 ml y se agregó en un tubo conteniendo 5 ml de caldo infusión-cerebro-corazón (Oxoid). Los tubos se incubaron a 35-37° C durante 18 a 24 horas.

### **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear protónica (<sup>1</sup>H RMN).**

Transcurrido este tiempo, de cada cultivo líquido se tomó una alícuota de 0.7 ml, se transfirió estérilmente a la celda <sup>1</sup>H RMN (5mm, diámetro externo) y se le agregó 0,05 ml de óxido de deuterio. De la misma manera se procedió con una alícuota estéril de caldo infusión-cerebro-corazón (CICC). A cada cultivo se le comprobó la pureza, mediante el cultivo en placas de agar base sangre (Oxoid), suplementado con 5% de sangre humana, e incubados a 37°C, en atmósfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> durante 18 a 24.

Las celdas RMN conteniendo los cultivos fueron inmediatamente transportadas a 4Â° C hasta el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear en el Departamento de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las medidas de <sup>1</sup>H RMN fueron realizadas a 37 °C en un Bruker AM-300 MHz. Los espectros en una dimensión (1D) fueron adquiridos con los siguientes parámetros: frecuencia, 300,13 MHz; ángulo de pulso de 30° para un pulso de 90 ° de 10 Âµs, tiempo de repetición 3S, puntos de datos: 32 K, número de barridos 128, amplitud espectral 20 ppm, tiempo total de adquisición 10 a 20 min. El campo se bloqueó con la señal de Deuterio del solvente D<sub>2</sub>O. La supresión del agua se realizó por presaturación de la misma.

## RESULTADOS

Las muestras de donde se aislaron las cepas de las especies bacterianas fueron: Hemocultivo, orina, esputo, aspirado traqueal, aspirado bronquial, absceso, exudado ótico, secreción nasal y exudado vaginal (Tabla 1).

**TABLA 1. FUENTE DE AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

ESPECIE	CEPA N°	FUENTE DE AISLAMIENTO
<i>K. pneumoniae</i>	1,2,3,6,7,9	Hemocultivo
	4,10	Orina
	5	Esputo
	8	Aspirado traqueal
<i>S. aureus</i>	1, 4, 8, 10	Hemocultivo
	2	Aspirado bronquial
	3	Absceso en mano
	5	Exudado ótico
	6,9	Esputo
	7	Secreción nasal
<i>S. agalactiae</i>	1, 4, 6,7	Exudado vaginal
	2, 3, 5, 9	Orina
	8	Hemocultivo
	10	Líquido cefalorraquídeo

### Identificación de las bacterias por características fenotípicas convencionales.

Las cepas de cada una de las especies bacterianas fueron identificadas por los resultados siguientes:

- *Klebsiella pneumoniae*: Bacilos Gram-negativos, formadores de colonias mucosas, grandes que utilizaron los sustratos urea, lisina, citrato, glucosa, lactosa, sucrosa, carentes de motilidad y de producción de indol <sup>(24)</sup>.

\_ *Staphylococcus aureus*: Cocos Gram-positivos principalmente en forma de racimos, formadores de colonias medianas con pigmento amarillo-anaranjado y metabolismo fermentativo-oxidativo. Positivos en las reacciones enzimáticas de catalasa, DNAsa, estafiloaglutinasa y fosfatasa alcalina. Resistentes a la polimixina B y sensibles a la novobiocina <sup>(25)</sup>.

- *Streptococcus agalactiae*: Cocos Gram-positivos en cadenas, formadores de colonias pequeñas, translúcidas con un pequeño halo de  $\beta$ - hemolisis, carentes de la enzima catalasa, con capacidad para hidrolizar el hipurato y productor de la proteína extracelular difusible o factor CAMP <sup>(26)</sup>.

## **Espectros por Resonancia Magnética Nuclear protónica (<sup>1</sup>H RMN).**

### **Procesamiento de los datos.**

Los espectros en una sola dimensión fueron adquiridos a través del programa TOPSPIN versión 1.3. Posteriormente fueron procesados mediante el programa MatNMR V.3.90 que funciona bajo Matlab The MathWorks Inc, versión v. 7.5.0.342 (R2007b).

Para el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó el programa matNMR v. 2.7, software de distribución libre, desarrollado por Jacco van Beek <sup>(28)</sup>, utilizando el ambiente MATLAB® The MathWorks Inc, versión v. 7.5.0.342 (R2007b), el cual permite el procesamiento de espectros de 1 y 2 dimensiones, ajuste de picos espectrales, ajuste de T1 y permite además un despliegue gráfico adecuado para la comparación de los espectros.

### **Asignación de la señal**

El procedimiento para establecer una comparación de los espectros fue el siguiente: Se tomó como referencia común el pico correspondiente al agua (4,6 ppm) y en base a esto, se transforman los espectros para las diferentes muestras a fin de tener la mayoría de los picos comunes alineados. Seguidamente, cada espectro corregido fue guardado y posteriormente se obtuvo el promedio de 10 cepas para cada una de las especies bacterianas. Una vez normalizados los espectros se realizaron las comparaciones correspondientes entre las especies <sup>(28)</sup>.

Los espectros <sup>1</sup>H RMN de cada uno de los cultivos bacterianos, así como los del caldo infusión-cerebro-corazón (CICC), se obtuvieron en las regiones de 0 a 10 ppm. Los espectros se recortaron para facilitar la observación de las similitudes y diferencias entre las señales. De ellas, se destacaron principalmente las que contribuyen en la diferenciación de las bacterias entre si y del medio de cultivo.

La figura 1, muestra la ventana desde 0,5 ppm hasta 2,7 ppm de la región alifática de los espectros <sup>1</sup>H RMN promedio de 10 cepas de cada una de las especies bacterianas en cultivo, así como el del CICC. En el punto **A(1)** del espectro de los cultivos de *S. agalactiae*, destacan señales con desplazamiento químico de 0,98; 1,00; 1,01; 1,04 y 1,06 ppm, con intensidades de 0,00018; 0,00011; 0,00026; 0,00039 y 0,00031 respectivamente. En el punto **B(1)** del espectro de los cultivos de *S. aureus*, se destacan señales con desplazamiento químico de: 0,97; 0,99; 1,01; 1,03; 1,06 ppm con intensidades de 0,00026; 0,00032; 0,0006; 0,00105 y 0,00074 respectivamente. En el punto **C(1)** del espectro de los cultivos de *K. pneumoniae*, se destacan cuatro señales de: 0,98; 1,00; 1,03; 1,05 ppm, con intensidades de 0,00161; 0,00166; 0,00163 y 0,00095 respectivamente. En el punto **D(1)**, del espectro del caldo infusión cerebro-corazón no se observan señales.

En el punto B(2) de esta misma figura, aparece una señal de 2,27 ppm con 0,00053 de intensidad. En C(2) aparece una señal de 2,27 ppm con intensidad 0,00221. En A(2) y D(2), no aparece esta señal.

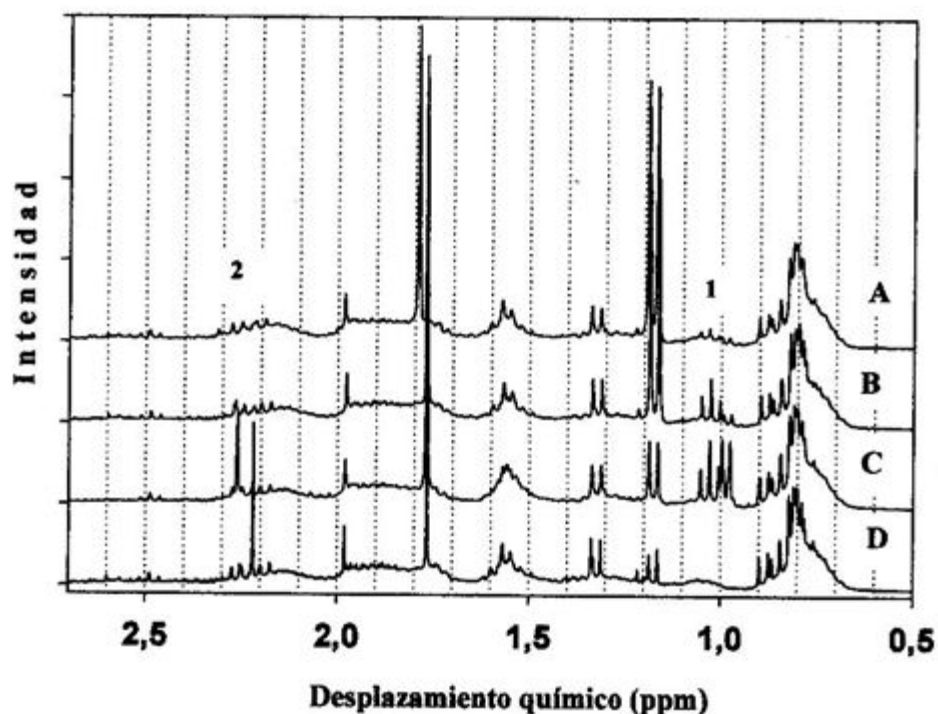


Figura 1. Espectros  $^1\text{H}$ RMN promedio de 10 cepas de cada especie bacteriana: A.- *Streptococcus agalactiae*. B.- *Staphylococcus aureus*. C.- *Klebsiella pneumoniae*. D.- Caldo infusión-cerebro-corazón. 300 MHz.

La figura 2, muestra la ventana desde 2,7 ppm hasta 4,0 ppm de la región alifática, de los espectros  $^1\text{H}$ RMN promedio de 10 cepas de cada una de las especies bacterianas, así como el del CICC. En ella se observa que en el punto A (1), correspondiente al espectro de los cultivos de *S. agalactiae* aparece 1 señal de 3,08 ppm con intensidad de 0,00035 ppm. En C (1) correspondiente al espectro de los cultivos de *K. pneumoniae* se destaca una señal en 3,08 ppm con 0,00033 de intensidad, la cual no aparece en B(1) ni en D(1). En A(2) se evidencian dos señales de 3,50 y 3,52 ppm con intensidades de 0,00054 y 0,00065. En B(2) destacan dos señales de 3,50 y 3,52 ppm con intensidades de 0,0011 y 0,0012. En C(2), aparecen señales de 3,51 y 3,53 ppm, con intensidades de 0,00092 y 0,00095 respectivamente. En D(2) no se observan estas señales.



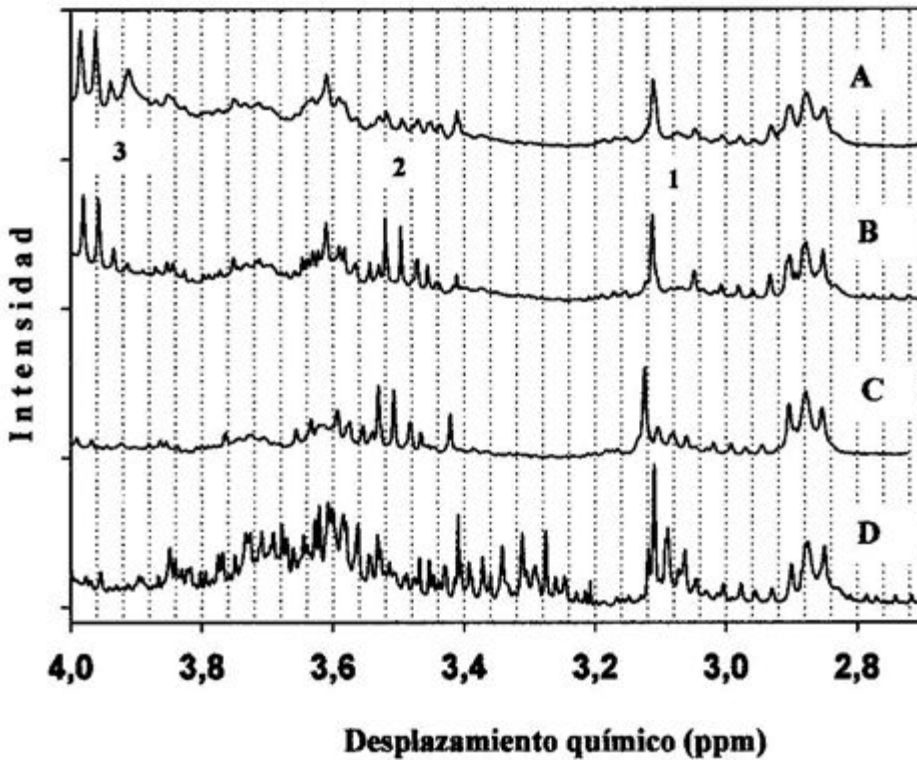


Figura 2: Espectros <sup>1</sup>H RMN promedio de 10 cepas de cada especie bacteriana: A.- *Streptococcus agalactiae*. B.- *Staphylococcus aureus*. C.- *Klebsiella pneumoniae*. D. Caldo infusión-cerebro-corazón. 300 MHz.

En el punto A(3), se destacan 4 señales: 3,92; 3,94; 3,96 y 3,99 ppm con intensidades de 0,00115; 0,00104; 0,00168 y 0,00173 respectivamente. En B(3), se observan 4 señales: 3,91; 3,94; 3,96 y 3,98 ppm, con intensidades de 0,0005; 0,00082; 0,00147 y 0,00155 respectivamente. En C(3) ni en D(3) se observan estas señales.

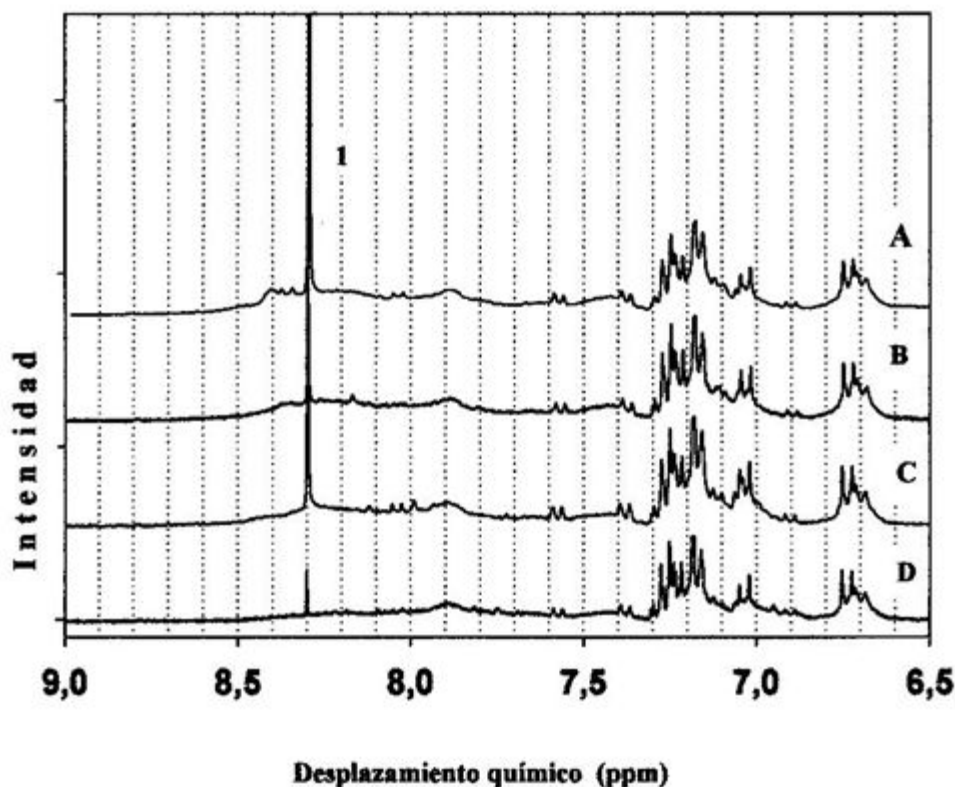


Figura 3: Espectros <sup>1</sup>HRMN promedio de 10 cepas de cada especie bacteriana: A.- *Streptococcus agalactiae*. B.- *Staphylococcus aureus*. C.- *Klebsiella pneumoniae*. D.- Caldo infusión-cerebro-corazón. 300 MHz.

La figura 3, muestra la ventana desde 6,5 hasta 9,0 ppm de la región aromática, de los espectros <sup>1</sup>HRMN promedio de 10 cepas de cada una de las especies bacterianas, así como el del CICC. En ella se observa en el punto 1 de los 4 espectros una señal con desplazamiento químico de 8,35 ppm e intensidades de 0,03447 (A), 0,0180 (B), 0,010 (C) y 0,00276 (D). En esta ventana las señales son escasas.

## DISCUSIÓN

Las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* fueron seleccionadas en este estudio por su importancia clínica en humanos, a fin de diferenciarlas en cultivo líquido por espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear protónica (<sup>1</sup>HNMR).

Las cepas fueron aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos infecciosos (Tabla I), a fin de considerar cualquier diversidad fenotípica que pudiera manifestarse en los cultivos bacterianos debido a la procedencia de la muestra, ya que se ha demostrado que cepas de una misma especie, provenientes de diferentes fuentes clínicas, pueden manifestar diversidad molecular en los cultivos <sup>(29,30)</sup>. La presencia de estas moléculas en los cultivos, pudiera

generar intensidades espectrales detectables por RMN y su ausencia, introducir cambios en el patrón de los espectros para una misma especie.

Todos los espectros  $^1\text{H}$ RMN obtenidos presentaron señales en la región de 0 a 10,0 ppm, región donde aparecen la mayoría de las señales de los protones encontrados en las moléculas orgánicas y biológicas <sup>(31)</sup>. A fin de diferenciar las especies bacterianas, de su medio de cultivo, se seleccionaron en primer lugar, aquellas señales que se encuentran en los espectros de las bacterias y no en el espectro del medio de cultivo (CICC). El mayor número y de mayor intensidad se encuentra en la región alifática (0 a 4,2 ppm), (Fig. 1 y 2), donde es posible separar a *S. agalactiae* de las otras dos especies por el desplazamiento químico de tres señales (1,04; 3,92 y 4,0 ppm). De manera similar, podría diferenciarse *S. aureus* de las otras dos especies con las señales de 0,97; 3,91 y 3,98 ppm. Así mismo, *K. pneumoniae* puede diferenciarse de *S. agalactiae* y *S. aureus* mediante las señales 1,05; 3,51 y 3,53 ppm.

Se ha sugerido que las diferencias en las intensidades relativas de las señales en los espectros de las bacterias podrían relacionarse con el pool de metabolitos contenidos en el medio en que se cultivan <sup>(32)</sup>. En tal sentido, hemos considerado de interés, algunas señales que tienen notables diferencias en sus intensidades relativas, aunque presentan el mismo desplazamiento químico (Figura 4).

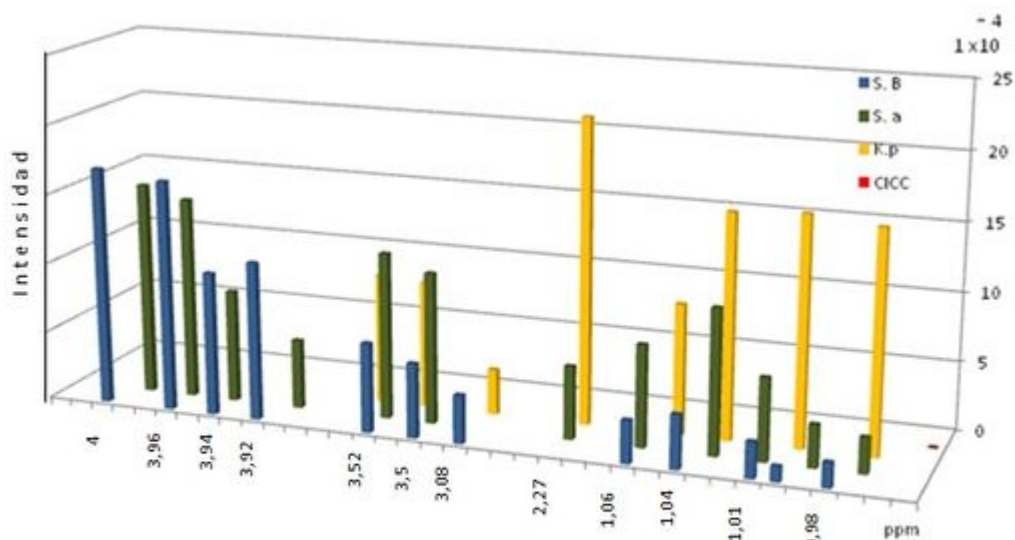


Figura 4. Señales diferenciales en los espectros  $^1\text{H}$ RMN de los cultivos de *Streptococcus agalactiae* (S.B), *Staphylococcus aureus* (S.a), *Klebsiella pneumoniae* (K.p) y del caldo infusión cerebro-corazón (CICC).

Como todas las bacterias fueron cultivadas en caldo infusión cerebro corazón y en las mismas condiciones de cultivo, estas señales podrían ser de utilidad en la diferenciación de estas especies.

Esta situación fue considerada cuando se presentó solamente en dos especies bacterianas y no en las tres, así tenemos que en los espectros de *S. agalactiae* y *S. aureus* aparecen seis señales (1,01; 1,06; 3,50, 3,52, 3,94 y 3,96 ppm) con esta característica, donde la intensidad de las primeras cuatro señales es mayor en el espectro de *S. aureus* que en el espectro de *S.*

*agalactiae*, en las dos últimas ocurre lo contrario. Esta misma situación ocurre con los espectros de *S. aureus* y de *K. pneumoniae*, se comparten dos señales (1.03 y 2.27 ppm) donde es muy pronunciada la diferencia en la intensidad relativa *K. pneumoniae*. Igualmente ocurre con *S. agalactiae* y *K. pneumoniae*, comparten tres señales (0.98; 1.00 y 3.08 ppm), donde es muy marcada la diferencia en intensidad de la segunda señal (Fig. 4). No fue objetivo del presente estudio identificar los metabolitos que permitieron diferenciar *S. agalactiae*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* entre si y de su medio de cultivo. Esta investigación sería motivo de otro trabajo.

Existen reportes de identificación bacteriana mediante espectroscopia  $^1\text{H}$ RMN de algunas bacterias resuspendidas en *buffer* a partir de colonias desarrolladas en medios de cultivos sólidos <sup>(31,32)</sup>. Este trabajo fue conducido mediante el análisis por espectroscopia  $^1\text{H}$ RMN directamente de los cultivos bacterianos en medios líquidos, donde no solamente se encuentran las moléculas estructurales de las bacterias *per se*, sino también, las moléculas extracelulares liberadas al medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano, ya que algunas de ellas, probablemente generen intensidades que puedan ser registradas por  $^1\text{H}$ RMN. Por otra parte, el registro de señales específicas para cada grupo bacteriano en los cultivos líquidos persigue el abordaje de la espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear (SRMN) en la identificación bacteriana de rutina y de esta forma disminuir el tiempo y/o costos de procesamiento de muestras clínicas por métodos convencionales. Este es el primer reporte conocido de identificación bacteriana en cultivo por SRMN

Sin embargo, se requieren estudios posteriores con un número significativo de diferentes muestras clínicas de origen infeccioso, para establecer aquellas señales que por su reproducibilidad puedan ser caracterizadas a fin de crear una base de datos que permitan la identificación de la etiología bacteriana en algunas muestras biológicas.

### Agradecimientos

-Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento de este proyecto identificado con el N° PI 09-00-6468-2006

-Profesor Luciano Vargas por su constante apoyo en los términos relacionados con la física cuántica.

### REFERENCIAS

1. Kinoshita Y, Yokota A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed* 1997; 10: 2-12.
2. Jean-Philippe Grivet, Anne-Marie Delort, Jean-Charles Portais. NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie* 2003; 85:823-840.
3. Berz David, Dutta Kaushik, Cowburn David and Shekhtman Alexander. In-cell NMR for protein-protein interactions (STINT-NMR). *Nature Protocols* 2006; 1:146-152.

4. Ikeya, T, Sasaki A, Sakakibara D, Shigemitsu Y, Hamatsu J, Hanashims T et al. NMR protein structure determination in living *E. coli* cells using nonlinear sampling. *Nature* 2010;5: 1051-1060.
5. Moreau C., Cavalier A. Le Floch M, Segalen J. Rocher C, Traikia M, Leray G, Bondon A, Thomas D, Le Rumeur E. Sarcolemma phospholipid structure investigated by immunogold electron microscopy and  $(^{31}\text{P})$  NMR spectroscopy with lanthanide ions. *FEBS Lett* 2001; 509 (3):417-22.
6. Rager, M.H., Binet, M.R.B., Ionescu G., Bouvet O.M.M.  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR studies of mannose metabolism in *Plesiomonas shigelloides*. *Eur. J. Biochem* 2000; 267:5136-5141.
7. Jazuński M., Mikkelsen K., Rizzo A., Witanowski M. A study of the Nitrogen NMR spectra of azoles and their solvent dependence. *J. Phys. Chem* 2000; 104:1466-1477.
8. Brecker Lothar, Weber Hansjorg, Griengl Herfried and Ribbons Douglas. In situ proton-NMR analyses of *Escherichia coli* HB101 fermentations in  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ . *Microbiology* 1999; 145:3389-3397.
9. Wendt, C., S. A. Messer, R. J. Hollis, M. A. Pfaller, R. P. Wenzel, and L. A Herwaldt. Recurrent Gram-negative bacteremia: incidence and clinical patterns. *Clin. Infect. Dis.* 1999;28: 611-617.
10. Desinor OY, Silva JL, Menos MJ. Neonatal sepsis and meningitis in Haiti. *J.Trop Pediatric* 2004; 50(1):48-50.
11. Wojsyk-Banaszak I, Szczapa J. Central nervous system infections in neonates caused by multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ginekol Pol* 2000; 71 (9):975-8
12. Tordecilla Echenique Y, Salamanca Bautista MP, Arias Jiménez JL, Guisado Espartero E. Haematogenous sternal osteomyelitis and community pneumonia in a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* sepsis. *Anales de Medicina interna* 2005; 22(4):191-193.
13. Coleman JM, Haider B, Cuyjet AB, Zahir RM, Rieuba L. Saric M. Fatal ascending aorta-to-right ventricle fistula formation after *Staphylococcus aureus* endocarditis of bicuspid aortic valve. *Heart Lung* 2005; 34(6): 429-32.
14. Arda B, Yamazhan T, Sipahi OR, Islekel S, Buke C, Ulusoy S. Meningitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): review of 10 cases. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(5):414-8.
15. López Sastre JB, Fernández Colomer B, Coto Cotallo GD, Ramos Aparicio A; Grupo de Hospitales Castrillo. Trends in the epidemiology of neonatal sepsis of vertical transmission in the era of group B streptococcal prevention *Acta Paediatr* 2005; 94(4):451-7.
16. Chotmongkol V, Soonfuang W, Chaithawangul S. Group B streptococcal meningitis and andophthalmitis. *J. Med. Assoc Thai* 2004; 87 (4):450-1.
17. Lee NY, Yan JJ, Wu JJ, Lee HC, Liu KH, Ko WC. Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(7):577-9.
18. Pedersen H, Engberg JH, Oturai PS. Acute multifocal osteomyelitis caused by haemolytic

group B streptococci. Ugeskr Laeger 2006; 168 (6):589-90.

19. Moreau C., Cavalier A. Le Floch M, Segalen J. Rocher C, Traikia M, Leray G, Bondon A, Thomas D, Le Rumeur E. Sarcolemma phospholipid structure investigated by immunogold electron microscopy and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy with lanthanide ions. FEBS Lett 2001; 509 (3):417-22.

20. Salton, M. R., and P. Owen. Bacterial membrane structure. Annu Rev Microbiol 1976;30: 451-482.

21. Prescott Lansing, M., Harley, John P and Klein Donald Patogenicidad de los microorganismos. Microbiología 2004. 5ta Edit. Cap. 34 pag. 850-857.

22. Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feliciangeli D, Ptaiza E. Mendible J, Villalón M, Aguilera M, Ceballo H. Godoy J, y col. Código de Bioética y Bioseguridad 2008. Capítulo 2 y 3. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2da Edición. Venezuela.

23. Caroline Mohr O'Á'Hara, Melvin P. Weinstein, and J. Michael Miller. Manual and Automated Systems for Detection and Identification of Microorganisms. In Manual of Clinical Microbiology 2003 8th. Edit Vol. 1. cap. 14. pag. 185-207.

24. Sharon L. Abbott. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas and other Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology 2003 8th. Edit Vol. 1. cap. 44. pag. 684-700.

25. Tammy L. Bannerman. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-Positive Cocci that Grow aerobically. In Manual of Clinical Microbiology 2003 8th. Edit Vol. 1. cap. 28. pag. 384-404.

26. Kathryn L. Rouff, R. A. Whiley and D. Beighton. *Streptococcus*. In Manual of Clinical Microbiology 2003 8th. Edit Vol. 1. cap. 29. pag. 405-421.

27. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved standard M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa, 2000.

28. Van Beek, Jacco Dowe. Laboratorium F. Physikalische-Chemie 2009. ETH. Zurich. (jabe@nmr.phys.chem.ethz.ch)

29. Polanco N, Moronta R y O'Á'Hara J.A. Variabilidad en los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de diferentes muestras clínicas. VITAE. Acad Med 2006 N° 27.

30. Polanco N. y O'Á'Hara J A. Reconocimiento de la Variabilidad de los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* en medios de cultivo y en infecciones clínicas. VITAE. Acad Med 2007 N° 33.

31. Delpassand Ebrahim S, Chari, Mohan V, Stager Charles E, Morrisett, Joel D, Ford J. Joseph and Romazi Masoud. Rapid Identification of common Human pathogens by high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy. J. Clin Microbiol 1995; 33: 1258-1262.

32. Bourne, R, Himmelreich, U., Sharma, A., Mountford, C. and Sorrell Tania. Identification of

*Enterococcus*, *Streptococcus* and *Staphylococcus* by multivariate analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Data from Plate cultures. J. Clin. Microbiology 2001; 39: 2916-2923.

Vitae Academia Biomédica Digital | Facultad de Medicina-Universidad Central de Venezuela  
Abril-Junio 2012 N° 50 DOI:10.70024 / ISSN 1317-987X