

1. INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* comprende más de 100 especies que se distribuyen actualmente en tres complejos, el primero, es el tuberculoso o especies causantes de tuberculosis humana y animal, en el segundo se encuentran las micobacterias no tuberculosas (MNT) con potencial patógeno y amplia distribución en la naturaleza, y en el tercer complejo solo se incluye *Mycobacterium lepra*; causante de la lepra. (1,2,3)

La transmisión persona a persona de MNT es rara, sin embargo generan un amplio rango de enfermedades en humanos y animales, estas enfermedades pueden ser pulmonares, confinadas a tejidos blandos y diseminadas. Existe una gran variabilidad geográfica en la incidencia y prevalencia de las micobacteriosis y estas se ven aumentadas principalmente en individuos con algún tipo de inmunocompromiso (4).

La diferenciación entre las especies de MNT normalmente se basan en sus características morfológicas y bioquímicas post aislamiento; pero las metodologías empleadas para esto son lentas, costosas y de bajo rendimiento. La prueba de amplificación del gen Hsp65 y su posterior restricción con endonucleasas (PRA) es rápida pero identifica un rango limitado de especies, y los métodos cromatograficos usados para diferenciar los componentes de la pared celular tienen baja reproducibilidad y no discriminan entre cepas (5). Por lo que el desarrollo de técnicas rápidas y precisas de identificación constituye una gran importancia en términos de diagnóstico acertado en el tratamiento y control de las micobacteriosis (2,5,6).

Recientemente se ha usado la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para la identificación de microorganismos, según los diferentes porcentajes de componentes celulares. Los estudios, aunque pocos; han demostrando una alta reproducibilidad y fácil manejo de las muestras. El nivel de diferenciación del método está basada en la expresión "*Fingerprint*" de componentes celulares que generan espectralmente características moleculares propias de especie y cepa bacteriana; esto ofrece la posibilidad de detectar e identificar microorganismos en una microcolonia, por lo que reduce significativamente el tiempo y los costos necesarios para la identificación (5). Este trabajo tiene como objetivo diferenciar fenotípicamente 10 especies micobacterianas por FT-IR.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

En los últimos años el incremento de la prevalencia de las enfermedades causadas por micobacterias, se ha relacionado principalmente con la pandemia del SIDA y otros tipos de inmunodeficiencia, por lo que muchas especies de MNT han pasado a considerarse como especies oportunistas, de amplio potencial patógeno, es de particular interés que en algunos países y hospitales, el número de casos de infección por MNT ha superado a los de la tuberculosis (7).

Históricamente, la identificación y taxonomía del género *Mycobacterium* se ha basado en caracterizaciones fenotípicas (reacciones bioquímicas) y en el análisis de ácidos micólicos y grasos de la pared celular, para esto se han usado métodos como: cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gas-líquido y cromatografía de capa fina, sin embargo estos métodos son lentos y los resultados ambiguos y difíciles de interpretar. En la actualidad se usan pruebas moleculares porque son rápidas, pero aun así no se ha podido identificar un amplio rango de especies.

Normalmente el diagnóstico de infección por MNT, se lleva a cabo posterior a el aislamiento e identificación de la especie micobacteriana, sin embargo tras una prueba de tinción directa (Ziehl Neelsen) positiva las infecciones se tratan con antituberculosos, los cuales no son efectivos en estos casos. Por lo que es de gran importancia el desarrollo y la evaluación nuevos métodos de identificación que sean más rápidos y precisos.

La técnica FT-IR (Espectroscopia Infrarroja con Transformación de Fourier), puede llegar a proporcionar una herramienta más rápida en la identificación de MNT disminuyendo considerablemente los costos y aumentando tanto el nivel de diferenciación como la sensibilidad de detección frente a las técnicas estándares, lo que justifica la evaluación de su efectividad y la realización de este trabajo (8).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Diferenciar fenotípicamente especies micobacterianas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

3.2. Objetivos Específicos.

- Estandarizar las condiciones de manejo y procesamiento de muestras micobacterianas necesarias para la evaluación bajo transmisión (KBr) y reflexión (ATR-ZnSe) del FT-IR.
- Analizar y comparar los espectros obtenidos por ATR-ZnSe y KBr.
- Comparar la sensibilidad de detección y el nivel de diferenciación del método FT-IR frente a las reportadas para las metodologías convencionales y moleculares.
- Generar una biblioteca informativa de los espectros obtenidos, de las diferentes especies del genero *Mycobacterium*.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diverso, de amplia distribución en la naturaleza. Se han descrito más de 100 especies, 25 de las cuales han sido identificadas como agentes infecciosos frecuentes para el hombre y animales (5).

Las otras especies del genero son saprofitas que actúan como patógenos oportunistas, causando enfermedades pulmonares o infecciones en otras localizaciones (1,2,5).

Las micobacterias son bacilos largos o curvos de 3 a 5 μm de longitud, en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de rápido y lento crecimiento, se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60 %) (5).

4.1.1. Clasificación y Nomenclaturas

Todas las especies del género *Mycobacterium* se encuentran distribuidas en tres complejos: el primero es el tuberculoso, donde su primer representante es *Mycobacterium tuberculosis*, además abarca otros patógenos estrictos que son causantes de un amplio rango de enfermedades en humanos y en animales. En el segundo se encuentran las micobacterias no tuberculosas (MNT), abarcando especies de vida saprofita, distribuidas ampliamente en la naturaleza, aunque algunas pueden llegar a ser patógenos estrictos, especialmente en personas que presentan alguna inmunodeficiencia y el tercer complejo incluye a *Mycobacterium lepra*, causante de la lepra (1,2,3).

Timpe y Runyon en los años 50, propusieron una clasificación útil de *Mycobacterium* en cuatro grupos, basada en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana) producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales. En la Tabla

1 se presenta una clasificación modificada de la original de Runyon que incluye los miembros del género *Mycobacterium* con mayor importancia epidemiológica (5).

Tabla 1. Clasificación micobacteriana de Runyon modificado (5).

Grupos y subgrupos	Especies de micobacterias	Patología
I. Fotocromógenos de crecimiento lento	<i>M. kansasii</i> (<i>M. licopinogenes</i>) <i>M. asiaticum</i>	Pulmonar, ganglionar, menígea, osteoarticular, urogenital, generalizada.
II. Escotocromógenos de crecimiento lento	<i>M. lactis</i> <i>M. scrofulaceum</i> (<i>M. marianum</i>) <i>M. gordonae</i> (<i>M. aquae</i>) <i>M. flavesceus</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> (<i>M. habana</i>)	Ganglionar, pulmonar, osteoarticular Pulmonar, ganglionar, articular Cutánea Cutánea, urogenital Pulmonar
III. No cromógenos de crecimiento lento	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrea</i> (<i>M. novum</i>) <i>M. triviale</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimodei</i>	Pulmonar, renal, osteoarticular, menígea, intestinal, ganglionar, cutánea, etc. Cutánea, ganglionar, generalizada. Ganglionar, pulmonar, osteoarticular, generalizada. Pulmonar
IV. Fotocromógenos de crecimiento rápido	<i>M. marinum</i> (<i>M. balnei</i>)	Cutánea, articular
V. Escotocromógenos de crecimiento rápido	<i>M. engbaekii</i> <i>M. acapulcense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gadium</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. thermoresistibile</i>	
VI. No cromógenos de crecimiento rápido	<i>M. fortuitum</i> (<i>M. peregrinum</i>) <i>M. chelonae</i> <i>M. chitae</i>	Cutánea, pulmonar, osteoarticular, ocular. Cutánea, pulmonar, osteoarticular menígea.

4.2. Diferencia en la naturaleza de la envoltura entre las *micobacterias* con *gram* negativas y *gram* positivas.

Hay una marcada similitud tanto química como estructural entre las envolturas de la mayoría de las bacterias, las micobacterias son biológicamente similares a las bacterias gram + (aunque frente a la tinción de gram las micobacterias son débilmente gram+ o no se tiñen); pero tienen aspectos distintos; en especial, se debe destacar que, aunque ambas poseen peptidoglicano, las moléculas unidas o asociadas a este polímero son, en las micobacterias, fundamentalmente de naturaleza lipídica en vez de proteínas y lipopolisacáridos, como en gram positivas (5).

La envoltura micobacteriana consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y alrededor de ella, la pared celular. La primera le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección. La pared celular está constituida por tres capas, con tinciones convencionales, su apariencia es:

- **Capa Interna**, moderadamente electrón-densa, compuesta por el peptidoglicano cuya estructura es similar a la de otras bacterias.
- **Capa media**, más ancha que la anterior y electron-transparente, compuesta por polisacárido, el arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las Micobacterias (70-90 átomos de Carbono).
- **Capa Externa**, de grosor variable, electrón-opaca, de la cual no puede conocerse con las técnicas actuales, su exacta composición, aunque se le atribuye una estructura glucolípida. En la figura 1 se observa un esquema de la envoltura.

Además de los componentes anteriores existen proteínas asociadas a la pared, algunas con función enzimática (necesarias para la construcción y reconstrucción de los polímeros de la pared durante el proceso de división celular y crecimiento), otros recientemente descubiertos con función de porina. Estas últimas, encontradas en bajo número, lo que está de acuerdo con la baja permeabilidad de las Micobacterias a las moléculas hidrofílicas (5).

La membrana plasmática de las micobacterias aparece en cortes ultra finos como en una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electron-densas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como característico la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomonanos y fosfatidil-inositol-manósidos (5).

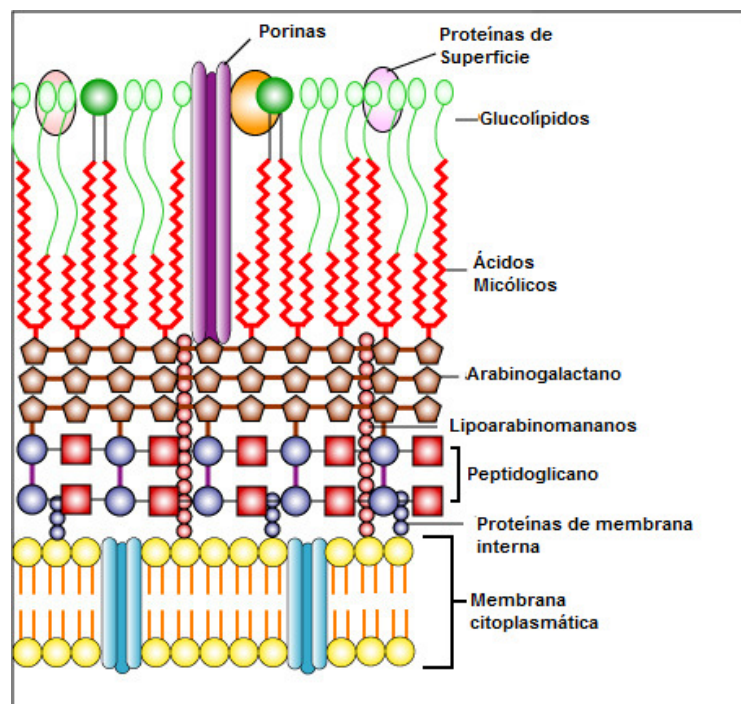


Figura 1. Estructura de la envoltura de las micobacterias (3).

Los ácidos micólicos (AM) son α -alquil β - hidroxíácidos de alto peso molecular (70 a 90 átomos de carbono) que se encuentran en la pared celular como componentes característicos de las micobacterias. Existen diferentes tipos de AM, cuyos ésteres son llamados α - micolatos que poseen grupos funcionales no oxigenados, y los micolatos con grupos funcionales oxigenados: ceto, metoxi, w-carboxi y epoxi, adicionados al β -hidroxíácido (6).

Los AM se designan con números romanos, correspondiendo el tipo I a los micolatos no oxigenados de cadena larga o α - micolatos, el tipo II a micolatos no oxigenados de cadena corta o α' - micolatos, el tipo III a metoximicolatos, el tipo IV a cetomicolatos, el tipo V a

epoximicolatos y el tipo VI a Carboximicolatos (7,8). La tabla 2, muestra el perfil de los AM de 10 especies micobacterianas.

Tabla 2. Perfil de ácidos micólicos de 10 especies micobacterianas (9).

ESPECIES	PERFIL DE MICOLATOS
<i>M. fortuitum</i>	α α' e
<i>M. flavensces</i>	α k w
<i>M. smegmatis</i>	α α' e
<i>M. chelone</i>	α α'
<i>M. triviale</i>	α
<i>M. vaccae</i>	α α' k w
<i>M. intracelulare</i>	α k v
<i>M. terrae</i>	α k w
<i>M. noncromogenicum</i>	α k w
<i>M. gordonae</i>	α m k

α= α micolatos (Tipo I) micolatos no oxigenados de cadena larga.
 α'= α' micolato (Tipo II), micolatos no oxigenados de cadena corta.
 m= metoximicolato (Tipo III).K= Ketomicolato (Tipo IV).
 e= epoximicolato (Tipo V).
 w= w- Carboximicolato (Tipo VI) o dicarboximicolato.

Los otros dos grupos grandes de bacterias son las gram positivas y las gram negativas, la diferencia se basa en la reacción a la tinción de gram, debido a que la morfología de las paredes celulares es muy distinta entre ellas figura 2. La pared celular en las gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las gram positivas está formada fundamentalmente por un solo tipo de molécula y suele ser más ancha (10,11).

En la pared celular de la bacteria hay una capa rígida que es la responsable de la resistencia de la pared celular. En bacterias gram negativas existen capas adicionales que se sitúan en el exterior de ésta. Esta capa rígida tiene una composición química muy similar tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas. Se denomina capa de peptidoglicano (o Mureína) y está formada por finas láminas compuestas por dos derivados de azúcares, N-acetil- glucosamina y ácido N- acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D- glutámico y o bien lisina o ácido diaminopimélico (DAP).

Estos componentes se unen entre si para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido del glicano (11). Además en las bacterias gram negativas se encuentra el lipopolisacarido (LPS) que le confiere a la bacteria resistencia a los antibióticos y a cambios drásticos de temperatura, compuesto que las bacterias gram positivas no poseen.

En bacterias gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared, aunque los ácidos teicoicos, también suelen estar presentes en pequeñas cantidades. Aunque algunas bacterias poseen sólo una capa de peptidoglicano rodeando a la célula, muchas otras, en especial las bacterias gram positivas, presentan varias capas (hasta 25 en algunos casos). En bacterias gram negativas, el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de la pared, estando constituido el resto por una membrana externa. Sin embargo, tanto en Gram positivas como en gram negativas se cree que la forma de la bacteria viene determinada por la longitud de la cadena de peptidoglicano y por el número y tipo de puentes establecidos entre las cadenas (11).

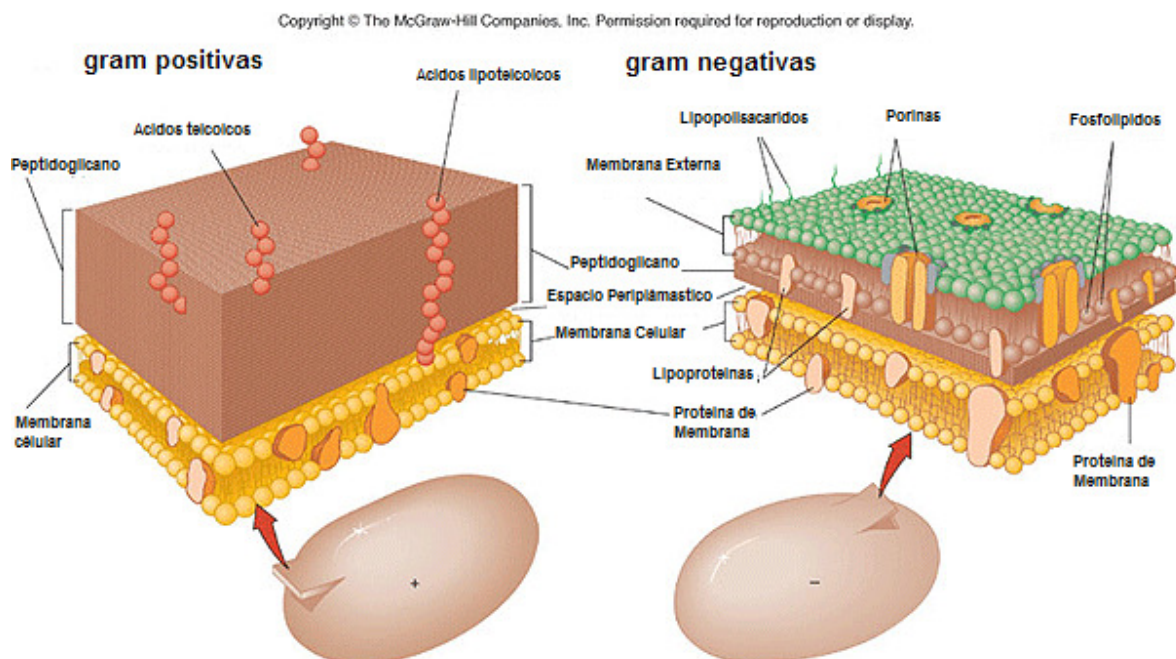


Figura 2. Envoltura de una bacteria gram positiva y gram negativa (11).

4.3 Reporte de métodos moleculares y bioquímicos para la identificación de micobacterias.

En el 2004, Lubasi D. *et al.* Evalúan una modificación del medio Ogawa, selectivo para micobacterias, para expresar una alta sensibilidad de detección. Un total de 276 muestras de esputo fueron colectadas de 138 sospechas de tuberculosis pulmonar; los resultados del LJ (Lowenstein jensen) fueron usados como un estándar, la sensibilidad de detección de Ogawa y el Ogawa modificado fueron del 81,7% y 90,3% respectivamente. Similarmente, el nivel de diferenciación de estos métodos fue del 96,7% y 92,3% respectivamente. En total, 90 muestras (32,6%) fueron positivas y 108 (39,1%) fueron cultivos positivos. Los positivos fueron presentados de la siguiente manera: 93 (33,7%) en LJ, 98 (35,5%) en Ogawa modificado y 82 (29,7%) en el Ogawa original. La tasa de contaminación fue de 1,1%, 5,1% y 9,8% para LJ, Ogawa y modificado de Ogawa respectivamente. El medio Owaga es económico y rápido. La baja sensibilidad de detección fue superada por el empleo de métodos de concentración. La sensibilidad de detección significativamente mejora de 81,7% a 90,3%. La utilización del medio Owaga es ideal en laboratorios de bajas fuentes económicas, especialmente en países en desarrollo (12).

En el 2001, Feher C. da SILVA *et al.* Realizan el análisis en la amplificación de un gen hsp65 por enzimas de restricción (PRA), para la identificación de micobacterias en el laboratorio clínico. El método PRA fue usado como un método rápido para la identificación de 103 aislados clínicos. Los patrones de las bandas fueron interpretados con tablas publicadas y patrones disponibles en internet (<http://www.hospvd.ch:8005>). Los resultados obtenidos de PRA y de identificación bioquímica concordaron en 76 de 83 aislados (91,5%). Los resultados de 20 aislados no podrían ser comparados, debido a la inconclusa identificación. Por otro lado los resultados muestran que PRA, podría mejorar la identificación de micobacterias en un examen más exhaustivo, ya que es considerada una prueba rápida, exacta y de bajo costo, en comparación con métodos convencionales (13).

4.4. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) aplicada a la identificación de microorganismos.

La técnica FT-IR, es método de alta eficiencia basada en la vibración (tijereteo, balanceo, cabeceo, trenzado, simétrico, asimétrico, mostrados en dos regiones espectrales, una de tensión y otra de flexión) que tienen las moléculas con excitación con luz infrarroja; además la técnica utiliza dos accesorios: el primero es bajo KBr (Bromuro de potasio), y el segundo es bajo ATR (Reflectancia Total Atenuada), a su vez la técnica realiza un análisis en diferentes escalas espectrales (Infrarrojo cercano, medio, lejano), distribuida en la escala de los 700 a 800 nm; por debajo de la escala del rojo, donde la longitud de onda es larga (14).

La técnica se llama transformada de Fourier, porque su inventor Joseph Fourier, con su conocimiento en el campo de las matemáticas, especialmente en las integrales transformó un simple comportamiento de un electrocardiograma, en un espectro de interpretación química. Explicando su descubrimiento, en la descomposición de una señal, en componentes de frecuencias diferentes para el comportamiento de una onda (15,16).

La clasificación bacteriana es generalmente basada en la morfología y reacciones bioquímicas de la bacteria. Las mediciones de espectroscopia infrarroja (IR) de bacterias son seguidos por una análisis formal quimiométrico que podría ofrecer avances de velocidad y consistencia. Tales análisis fueron probados a finales de 1950, con algunos éxitos, pero con limitaciones por la instrumentación y por la disponibilidad de herramienta después del procesamiento (17).

El análisis IR de bacterias, resurgió en 1980 con los avances instrumentales en la espectroscopia Infrarroja con Transforma de Fourier (FT-IR); haciendo que la señal de ruido generalmente actúe mejor, bajo una orden computacional, para el análisis bacterial.

Hopkinson *et al.*, y Naumann *et al* (1988), fueron los pioneros en usar la FT-IR para la identificación y diferenciación de microorganismos. Recientemente el trabajo con IR ha mostrado ser un método efectivo para la identificación de bacterias patógenas y no patógenas. (15,16).

La metodología estándar de infrarrojo, es basada en transmisión de luz a través de la muestra bacterial seca en una ventana de ZnSe, indiferentes a los métodos de preparación

de la muestra. La empresa “*Thermo Scientific*” ofrece un poderoso equipo de “*high-throughput screening*” (HTS) como “*hardware*” y herramientas de “*software*”, que podrían acelerar el análisis de muestras.

El “*hardware*” utilizado es un lector de fase de micro pozo de placa, insertado en un espectrofotómetro, como se muestra en la figura 3. Las muestras de la placa y el lector de fase son basados sobre el estándar industrial de 96 pozos en placa “*footprint*”, la cual permite el uso de varias muestras sobre una única transmisión en placa IR, con carga apropiada, las múltiples cepas pueden ser probadas simultáneamente y las replicas de las mediciones pueden ser hechas automáticamente para mitigar el interés de la reproducibilidad.

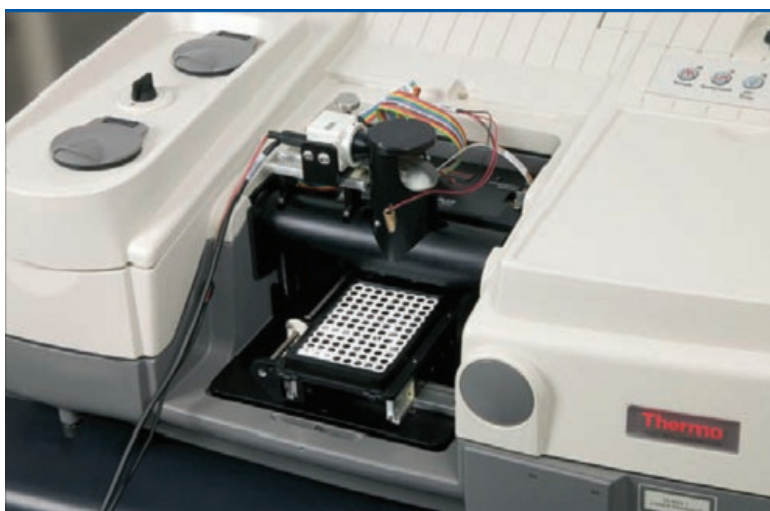


Figura 3. Lector de placa de micro pozo, instalado en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet 6700.

La automatización y aplicación de “*software*” permiten un alto nivel de control sobre el experimento. El usuario puede elegir el formato estándar de 96 pozos o definir personalmente la configuración de cada uno. La forma de automatización de interfase se establece directamente con el “*software*” del equipo, para el procesamiento de datos y los respectivos análisis. Una placa en el equipo, puede ser cargada, junto con los datos de recolección y el análisis es procesado sin una importante intervención (14).

La diferenciación rápida de especies y cepas de micobacterias no tuberculosas (MNT) por FT-IR, ha sido realizada desde el 2007 por Cecilia A. Rebuffo-Scheer, *et al.*, quienes

recomiendan su uso en laboratorios clínicos y determinan que las MNT pueden ser identificadas rápidamente a partir del monitoreo del crecimiento en placas de agar enriquecido. También se llevó a cabo un análisis jerárquico de agrupamiento, aplicado para obtener un mapa de espectros entre especies y se demostró una excelente reproducibilidad. En este trabajo se elaboró una biblioteca con 28 aislamientos clínicos de 4 especies de micobacterias y se demostró las diferencias tanto entre especies como entre cepas (18).

En el 2005. Mohammed Essendoubi *et al*, realizan una identificación de especies de *Cándida* por FT-IR, utilizando aislados clínicos y cepas de referencia lograron obtener diferenciación de 6 especies de *Cándida*, a partir de microcolonias con 10 horas de crecimiento, la sensibilidad de detección y el nivel de diferenciación fueron del 100%, mostrando la efectividad de la identificación por FT-IR (19).

En el 2007; Astrid Oust janbu, *et al*, presentan un estudio piloto para investigar el potencial de la Microspectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) para la rápida identificación de *Listeria* a nivel de especie. Usando esta técnica, se obtuvieron espectros de 30 cepas pertenecientes a 5 especies de *Listeria*, obteniendo un 96% en el nivel de diferenciación y 100% de sensibilidad de detección (20).

En el año 2007, Vitaly Erukhimovitch *et al*. Realizan un trabajo de diferenciación entre muestras bacterianas y fungicas, sus estudios provee datos de diferenciación claros cuando una muestra posee una mezcla de bacterias y hongos, por lo que proponen que la diferenciación por FT-IR, puede ser usada para discriminar rapido entre una infección bacteriana y una fungica. (21).

Según Chenxu Yu y Joseph Irudayaraj en el 2005, quienes estudiaron la "*Fingerprints*" o la impronta digital de bacterias, por medio de la microespectroscopia infrarroja con transformacion de Fourier (FT-IR), para la elucidación de las diferencias en composición química y estructural durante el crecimiento. La diferenciación a nivel de cepas de 6 microorganismos se evaluó a nivel de envoltura celular y componentes citoplasmaticos. Las bandas o las regiones, de los grupos funcionales fueron comparadas con el espectro original y se determinó que FT-IR, provee un "*Fingerprint*" molecular, bajo diferentes condiciones

fisiológicas, lo que permite diferenciar las especies a nivel bioquímico y monitoriar los efectos ambientales de una especie en particular (22).

En el 2007, Burgula *et al.*, publican una revisión de tema del uso del FT-IR como método de identificación bacteriana, concluyendo que las investigaciones y las combinaciones con estadística multivariada dejan notar las ventajas de estos métodos para la detección y la identificación de muestras de microorganismos. (23).

En el 2002, Mareike Wenning, Herbert Seiler y Siegfried Scher, usan la microespectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, para la identificación de levaduras. Las levaduras fueron crecidas, hasta obtener, microcolonias de 70 a 250 µm en diámetro y transferidas de la placa de agar al portador de ZnSe de IR-transparente. El método fue probado usando un modelo de librerías, comparando la referencia espectral de 45 cepas de 9 géneros y 13 especies, registradas, los resultados muestran que la identificación es equivalente a las muestras de referencia (24).

En el 2009, Sebnem Garip *et al.* Utilizan la técnica de identificación por FT-IR de microorganismos de seguridad alimenticia, como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis* y sus esporas, también se analizó *Micrococos luteus*, los resultados mostrarán que hay una cantidad de picos característicos pertenecientes a las especies *Micrococos* y *Bacillus*, que pueden ser usados para la identificación de bacterias de alimentos y sus endosporas, teniendo particular importancia que algunas bandas en regiones características fueron marcadores de la formación de endosporas (25).

5. METODOLOGÍA

5.1. Selección de la muestra y tipo de estudio

Este estudio es de tipo analítico, donde se comparan los principales compuestos bioquímicos de las diferentes especies de micobacterias. Se analizarán 10 especies de *Micobacterias* de las cuales *M. intracellulare* y *M. fortuitum* son especies de referencia ATCC (American type culture collection) 13950 y 6841 respectivamente, a su vez *M. flavescens*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. goodii*, *M. triviale*, *M. vaccae*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, son de referencia IP (Instituto Pasteur), enviadas del Instituto de Medicina Tropical de Bélgica., por la doctora Françoise Portals, Tabla 3.

Como control de diferenciación de género se usarán las bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus viridans* ATCC y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; y gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, ATCC 13883 y 4157 respectivamente.

Tabla 3. Clasificación de 10 Especies Micobacterianas (26).

ESPECIE	RIESGO	T° CRECIMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	PIGMENTACIÓN
<i>M. Fortuitum</i>	II	45 °C Rapido	LJ, OK y MK.	No Pigmentada
<i>M. Flavescens</i>	I	25-45 °C Rapido	LJ y OK	Pigmentada (Naranja)
<i>M. smegmatis</i>	II	45°C Rapido	LJ-OK	No Pigmentada
<i>M. chelone</i>	II	38°C Rapido	LJ-OK	No. Pigmentada
<i>M. triviale</i>	II	30°C Rapido	LJ-OK	No. Pigmentada
<i>M. vaccae</i>	II	22-40°C Rapido	LJ-OK	Pigmentada
<i>M. intracellulare</i>	II	37°C Lento	LJ-OK	No. Pigmentada
<i>M. terrae</i>	II	38°C Lento	LJ-OK	No Pigmentadas
<i>M. nonchromogenicum</i>	II	42°C Rapido	LJ-OK	No Pigmentada
<i>M goodii</i>	I	37°C Rapido	LJ-OK	Pigmetada (Nar.-Ama.)

5.2. Medios de cultivo y pruebas de viabilidad

Las especies micobacterianas se recuperarán de congelación (-85°C) sembrando 50 µL de bacteria en medio líquido Dubos Broth Base (Becton Dickinson, microbiology Sistem) suplementado con Ampicilina (Bayer), Penicilina (Sandoz), Cefalotina (Recipe) y Anfotericina

B (Abbott france) y se incubaron, de acuerdo a los requerimientos de temperatura de cada una de las micobacterias analizadas, tabla 3, hasta observar crecimiento por variación en la turbidez del medio (27).

Se realizó coloración de Ziehl Neelsen y se verificó que las muestras estén completamente puras. Luego del medio líquido Dubos Broth Base, se tomaron 100 μL de cada especie y se sembraron en medio sólido Middlebrook 7H11 suplementados con OADC (ácido oleico y complejo albumina-dextrosa), este medio de cultivo es específico para micobacterias. Adicionalmente se realizó decontaminación con ácido sulfúrico al 10% y se pasó por triplicado a medio sólido en tubo inclinado, Lowenstein Jensen. (26).

Las especies de *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* se recuperaron de agar base sangre (Oxoid), *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* ATCC se recuperaron de medio Mac Conkey (Oxoid) también por triplicado (28).

5.3. Preparación de la muestra para la obtención de los espectros

Después de tener el triplicado espectral bacteriano (utilización del mismo medio de cultivo con la misma disposición bacteriana, en tres tubos o en tres cajas de petri diferentes), se procedió a extraer con microespatula de cada caja de petri o tubo una muestra colonial de aproximadamente 10 mg, que se almacenó en un tubo estéril y se preparó una pastilla utilizando 5 mg de suspensión bacteriana, mezclada con 100 mg de KBr (Bromuro de potasio), que se expuso al divisor de haz "beam Splinter" KBr de infrarrojo mediano (400 y 4000 cm^{-1}), a una resolución de 8 cm^{-1} y con 256 escaneos en promedio como se recomienda para esta técnica (18), el accesorio utilizado fue un SMART ID:016-505, con un filtro de paso alto de 20,000 y un filtro de paso bajo de 11000,0000, figura 4 (22). Todas las muestras que se prepararon con el KBr, fueron precedidas por una toma de "background" ó espectro de referencia, para calibrar las cantidades de CO_2 y vapor de agua, presentes en el equipo para evitar errores posteriores en los espectros.

La segunda medida, se tomó colocando 5 mg de cada muestra sobre la base del ATR-ZnSe (*Reflectancia total Atenuada*), que se cubrió buscando uniformidad de esparcimiento de la

muestra, se utilizó un ángulo de incidencia de 45° en infrarrojo mediano (400 y 4000 cm^{-1}) y una resolución de 8 cm^{-1} , y 256 escaneos en promedio. El accesorio utilizado fue un SMART ID: 050-9003, con un filtro de paso alto de 200,0000 y un filtro de paso bajo de 11000,0000. Se tuvo en cuenta para cada muestra analizada la misma profundidad de penetración, por lo que el ATR se calibró y normalizó previamente, para obtener el espectro de referencia (*background*) (22). El equipo usado fue el FT-IR NICOLET 380 de Thermo “Scientific” y su software de funcionamiento EZ- OMNIC, además se utilizó tanto en la primera como en la segunda medición, 4384 puntos de barrido, una frecuencia de laser de: 15798,8 cm^{-1} , un detector: DTGS KBr, un divisor de haz de KBr, una velocidad de 0,6329 del Espejo y 24 Bits del digitalizador, figura 4.

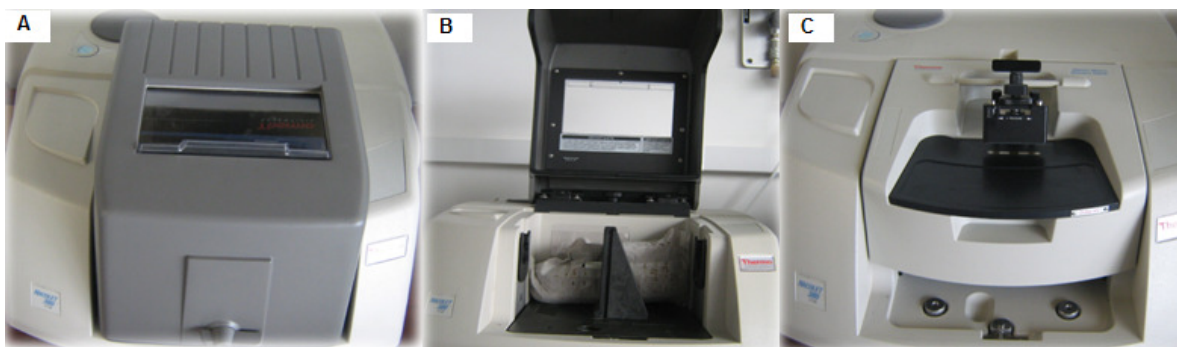


Figura 4. Espectrofotómetro Infrarrojo (FT-IR) NICOLET 380 de Thermo “Scientific”; **A.** Equipo en general, con su cubierta protectora, **B.** Accesorio Smart ID: 016-505 (Soporte universal) instalado en el espectrofotómetro, **C.** Accesorio Smart ID: 050-9003 (Soporte ATR-ZnSe 45°) instalado en el espectrofotómetro.

5.4. Análisis de resultados

Del triplicado obtenido en cada una de pruebas, se tomó uno al azar, debido a que los tres espectros de una misma especie presentaban el mismo comportamiento espectral. El elegido se analizó según el método Silverstein M. Robert *et al* 1999. (29), Pavia L. Donald *et al.* 1996 (30) y Chenxu Yu junto con Joseph Irudayaraj, 2004 (22), de acuerdo a las frecuencias dadas en cada una de las muestras analizadas (regiones analizadas para obtener el “*Fingerprint*”). Se usó el programa TQ. Analyst Ez Edition para calcular la primera derivada “Savitsky Golay” de los espectros procesados en KBr y ATR, esto se realizó para aumentar la resolución de las bandas y disminuir el ruido en estas.

Por otro lado, se calculó la sensibilidad de detección y el nivel de diferenciación del FT-IR frente a trabajos reportados para las metodologías convencionales y moleculares de identificación. (31).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Interpretación espectral

La Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier, identifica únicamente grupos funcionales presentes en los espectros, aclarando que dicha técnica no sirve para elucidar estructuras. Si se desea mostrar los compuestos que hacen parte de algún complejo, sería más factible el empleo de la resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida acoplada a un detector selectivo de masas, cromatografía de exclusión por tamaños o una cromatografía de afinidad. En este análisis espectral se utiliza la tabla 4, que reporta las posibles biomoléculas, en los espectros bacterianos.

Tabla 4. Asignación de bandas de absorción en el IR espectral de bacterias (22).

Longitudes de Ondas (cm ⁻¹)	Asignación grupo Funcional	Posibles Biomoléculas
2957	$\nu(\text{CH}_3)$ Asimétrico	Ácidos Grasos
2919	$\nu(\text{CH}_2)$ Asimétrico	Ácidos Grasos
2872	$\nu(\text{CH}_3)$ Simétrico	Ácidos Grasos
2852	$\nu(\text{CH}_2)$ Simétrico	Ácidos Grasos
1741	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Esteres Lipídicos
1708	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Unión de H	ARN, ADN
~1695, ~1685 y ~1675	Compuestos de Amida I	Proteínas
~1670	$\nu(\text{C}=\text{N})$	Bases ARN/ADN
~1655	Amida I de la estructura α -helicoidal	Proteínas
~1637	Amida I	Proteínas
1548	Amida II	Proteínas
1457	$\delta(\text{CH}_2)$	Lípidos y proteínas
1415	C-O-H	Carbohidratos, ADN/ARN, Proteínas
1402	$\delta\text{C}(\text{CH}_3)_2$ Simétrico	Lípidos, carbohidratos y

		proteínas
1312	Amida III	Proteínas
1284	Amida III	Proteínas
1240	$\nu(\text{P=O})$ Asimétrico	Fosfolípidos
1200-1000	C-O-C, C-O	Carbohidratos
1085	$\nu(\text{P=O})$ Simétricos	Fosfolípidos
900-800	C=C, C=N, C=H	Nucleótidos

ν : Estiramiento, δ : Deformación

6.2. Análisis espectral de las diferentes especies de micobacterias, gram negativas y gram positivas.

El grupo de las bacterias gram negativas y gram positivas, presentan las siguientes regiones espectrales de interés: región de Lípidos ($2.686\text{-}2841\text{ cm}^{-1}$). De hidratos de carbono ($1290\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$) y la denominada “Verdadero *Fingerprint*” ($1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$), estas regiones fueron seleccionadas según Nieto L. Laura *et al.* 2004 (32). En la primera de ellas las diferencias espectrales reflejan la distinta composición lipídica de las paredes celulares de las bacterias, en la segunda las diferencias se asocian con la composición en hidratos de carbono, por ejemplo el polisacárido extracelular, la tercera región analizada refleja características no definidas, asociadas, por ejemplo, a estructuras cuaternarias de las proteínas y otras macromoléculas, que al parecer son específicas para cada una de las especies; permitiendo observar sus diferencias fenotípicas.

A su vez Nieto L. Laura *et al.* 2004 (32). Reportan más regiones de análisis espectral para el grupo de las gram negativas y positivas, como es la región de los $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, donde se aprecia estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-H de las cadenas de ácidos grasos y grupos metilos, estiramiento del enlace O-H de grupos hidroxilos, estiramiento del enlace N-H de proteínas; otra región elegida es la región de los $1800\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, donde se aprecia estiramiento del doble enlace C=O de esteres y grupos carboxílicos, contribución de estructura secundaria de proteínas (Amida I y II). Por último toman la región de 1500-

1200cm⁻¹, que se interpreta como la contribución de proteínas (amida III), estiramiento asimétrico del enlace P-O de grupos fosfatos y de formación del enlace C-H.

En la región comprendida entre los 3600 a 3000 cm⁻¹, se observan absorbancias características a tensiones de enlace O-H (Hidroxilos) y también N-H (aminos) tabla 5, grupos funcionales que son muy variables en el momento del análisis espectral, debido a los compuestos del medio, a la cantidad de agua y a los posibles enlaces y puentes de hidrogeno generados por la resonancia, por este motivo se descarta esta región para el análisis.

Tabla 5. Principales grupos funcionales, utilizados para el análisis espectral (30).

Grupos Funcionales	Tipos de vibración	Frecuencias (cm⁻¹)	Intensidad
C-H	Alcanos (Estiramiento)	3000-2850	S
	-CH ₃ (Inclinación)	1450 y 1375	m
	-CH ₂ - (Inclinación)	1465	m
	Alquenos (Estiramiento)	3100-3000	m
	(Inclinación fuera del plano)	1000-650	s
	Aromáticos (estiramiento)	3150-3050	s
	(Inclinación fuera del plano)	900-690	s
	Alquino (Estiramiento)	3300	s
	Aldehido	2900-2800 2800-2700	w w
C=C	Alqueno	1680-1600	m-w
	Aromatico	1600 y 1475	m-w
C≡C	Alquino	2250-2100	m-w
C=O	Aldehido	1740-1720	S
	Acidos Carboxilicos	1725-1700	s

	Ester	1750-1730	s
	Amida	1680-1630	s
	Anhidrido	1810 y 1760	s
C-O	Alcoholes, esteres, ácidos Carboxílicos, anhídridos	1300-1000	S
O-H	Alcoholes, Fenoles		
	Libres	3650-3600	m
	Unión de Hidrógenos	3400-3200	m
	Ácidos Carboxílicos	3400-2400	m
N-H	Aminos y amidas primarias y secundarias.		
	Estiramiento	3500-3100	m
	Inclinación	1640-1550	m-s
C-H	Aminos	1350-1000	m-s
C=N	Aminas	1690-1640	w-s
C≡N	Nitrilos	2260-2240	M
X=C=Y	Alenos, Quetenos, Isocianatos, isotiocianatos	2270-1940	m-s

s: Fuerte, m: Medio, w: Débil

Las pruebas espectrales por KBr y ATR, que no presentan una claridad entre las especies, principalmente en su "*Fingerprint*", se desarrolla la primera derivada en base al método de KBr y especialmente en base al método de ATR.

Para comenzar el análisis espectral, se tiene en cuenta que la composición del grupo de las micobacterias es muy diferente a la comprendida en el grupo de las gram positivas y gram negativas, de igual manera estas entre sí, compartiendo solamente en sus estructuras el peptidoglicano. Las micobacterias son las que más compuestos lipídicos presentan en sus estructuras, teniendo fuera del peptidoglicano, lipopolisacaridos, arabinogalactano, lipoarabinomananos, ácidos micólicos y glucolípidos, a su vez las especies gram positivas presentan ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos y por último las especies gram negativas son las que menos compuestos lipídicos presentan, ya que tienen lipopolisacaridos y peptidoglicano. Todas las regiones espectrales seleccionadas, $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, $1800-1400\text{ cm}^{-1}$ y $1200-500\text{ cm}^{-1}$ presentan en general un contenido de ácidos y grasas, remarcando la región de los $1800-1650\text{ cm}^{-1}$ (C=O) y $1650-1380\text{ cm}^{-1}$ (C-H), ya que son la regiones más representativas de ácidos grasos en las especies estudiadas, lo que no se puede inferir es que tipo de ácidos grasos son específicamente.

En la figura 5, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, en la prueba con KBr. se aprecia una intensidad en la región de 2800 a 3000 cm^{-1} característica de enlaces C-H (alcanos), de cadenas largas o cortas; en este caso las intensidades mayores están asignadas a la *E. coli*, esta posee mayor absorción en el IR o particularmente contiene cadenas de C-H más largas. Las demás partes de los espectros poseen una similitud coherente, resaltando las características de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque *E. coli* presenta mayor intensidad en la región de los 1400 a los 1800 cm^{-1} , en la posible composición de carbonilos, esterés y aldehídos; con respecto a la intensidad mostrada en *Klebsiella pneumoniae*; por otro lado, se presenta la región del "Fingerprint" situada entre los 600 a 1200 cm^{-1} , como lo reporta Nieto I. Laura *et al.* 2004 (32). Presentando en esa zona una pequeña diferencia entre los 1100 y los 1200 cm^{-1} , porque al parecer *E. coli*, presenta mayor cantidad de enlaces C-H y en general de C-O tabla 5.

El perfil comparativo en prueba de ATR (Reflectancia total atenuada) entre las especies gram negativas figura 6, muestra alta similaridad espectral en relación con el perfil comparativo en prueba de KBr, aunque esta prueba es más selectiva en la resolución de picos, permitiéndole al investigador inferir más similitudes dentro del grupo de las gram negativas y tener diferencias más selectivas entre las especies; las bacterias gram negativas

bajo ATR, permiten corroborar lo anteriormente dicho, donde la especie de *E. coli* sigue presentando mas relación entre C-H y mas carbonilos en la región de 1650 a 1380 cm^{-1} y 1650 a 1800 cm^{-1} respectivamente, por otro lado la región del "Fingerprint" muestra gran diferencia entre las dos especies, debido a que la especie *E. coli*, presenta con claridad un contenido más alto de grupos funcionales carbonilos. Este mismo comportamiento espectral se encuentra reflejado en el perfil comparativo en primera derivada de ATR, mostrando este la mayor selectividad en los picos con respecto a los demás perfiles espectrales comparativos en el grupo de las gram negativas figura 7.

En la primera derivada "Savitsky Golay", bajo KBr en el grupo de las gram negativas, el "Fingerprint", constituye la región de los 600 a los 1200 cm^{-1} , reportado anteriormente, se muestra que para la especie *Klebsiella pneumoniae*, la tendencia de la curva es casi lineal, mientras que para la *E.coli* posee inflexiones simultaneas, diferenciándolas para su interpretación figura 8. Por otro lado, en la región de Flexión entre los 1400-1450 cm^{-1} , la relación C-H sigue presentándose con más intensidad para la especie *E. coli*.

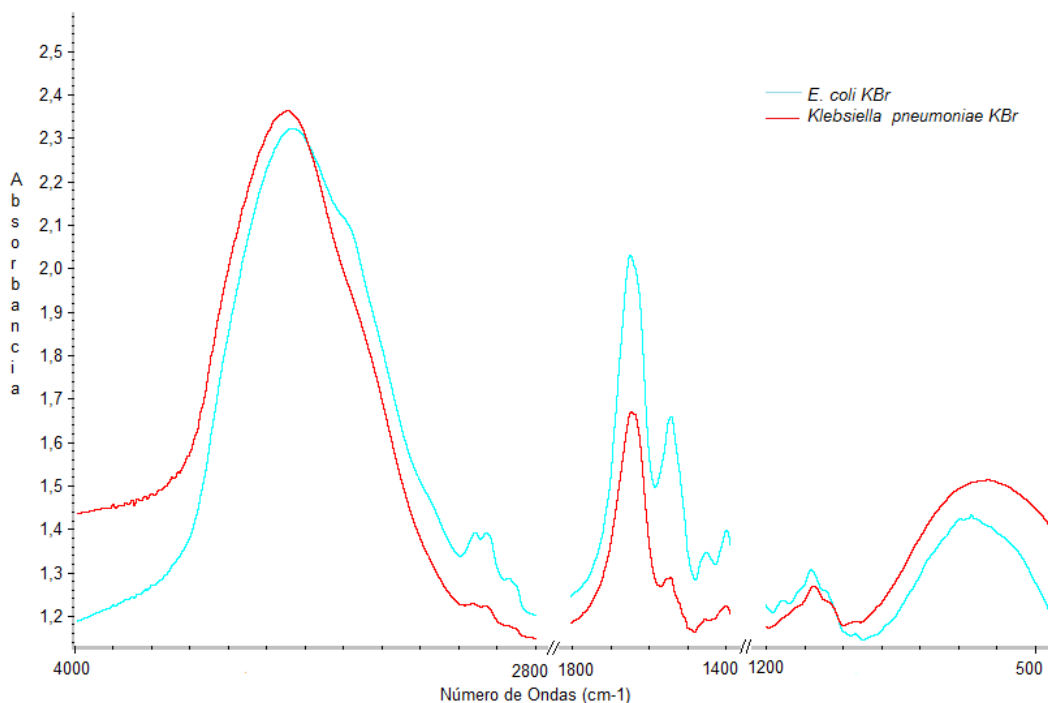


Figura 5. Perfil comparativo en prueba de KBr entre las especies gram negativas.

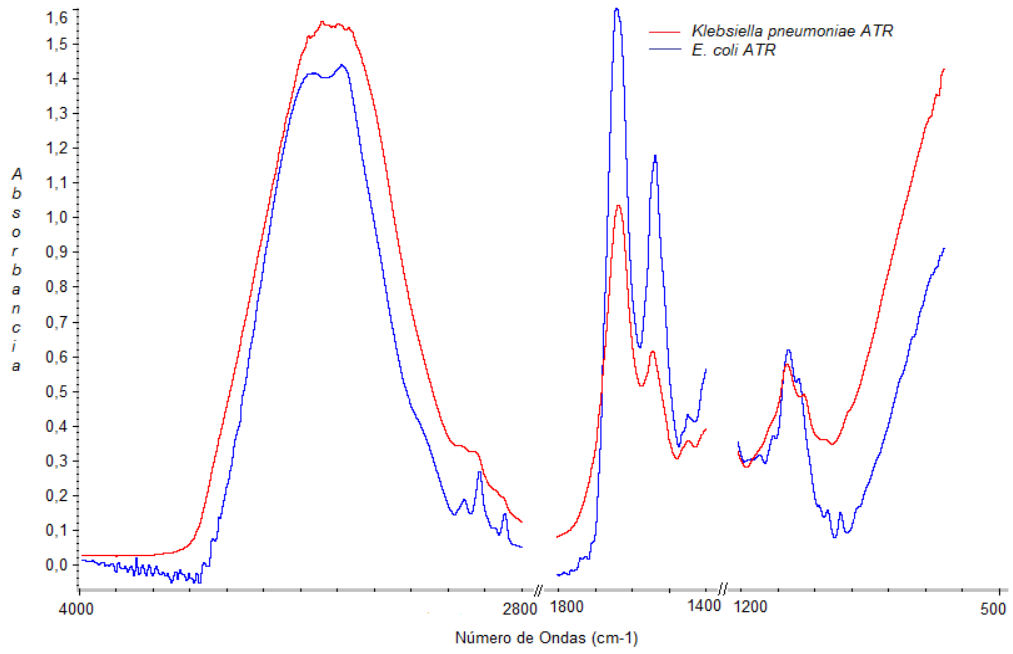


Figura 6. Perfil comparativo en prueba de ATR entre las especies gram negativas.

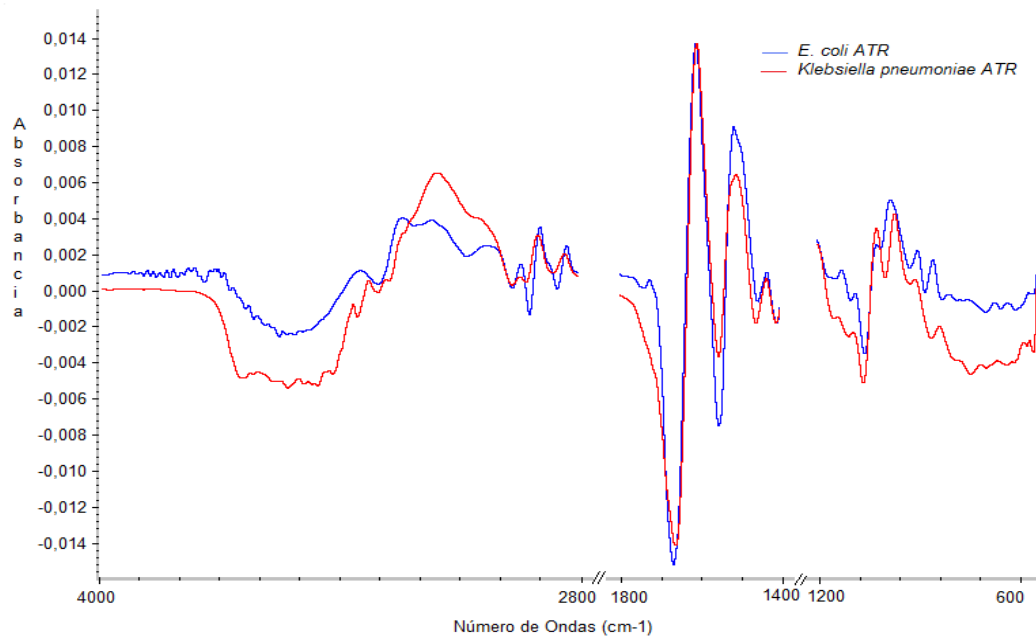


Figura 7. Perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre las especies gram negativas.

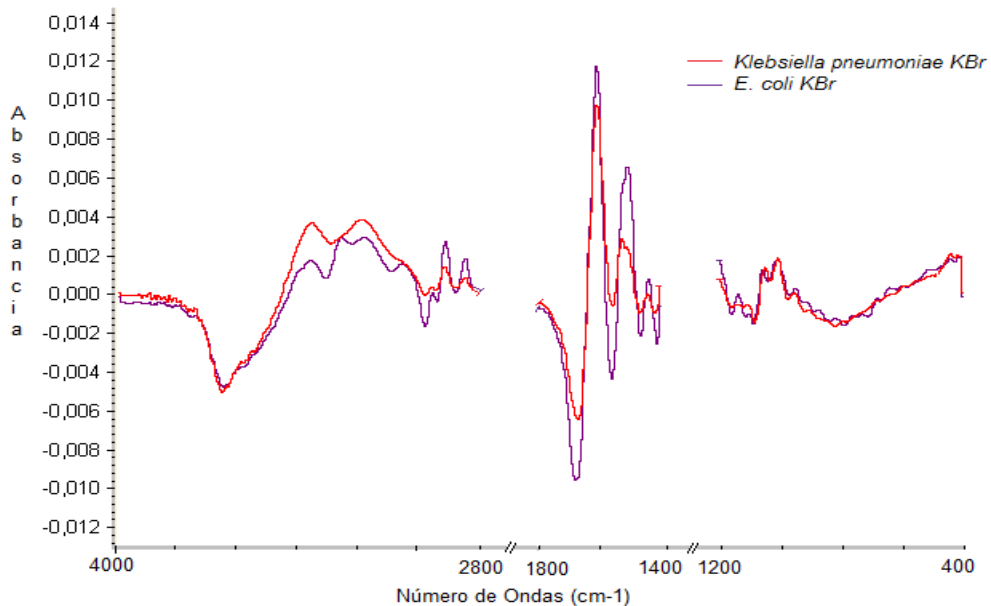


Figura 8. Perfil comparativo en primera derivada de KBr, entre las especies gram negativas.

Las especies gram positivas en el perfil comparativo de KBr figura 9, manifiestan tensiones espectrales a $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ del enlace relación C-H, que componen los ácidos grasos, entre las tres especies analizadas (*S. pyogenes*, *S. aureus* y *S. viridans*); en la región de los $1400-1800\text{ cm}^{-1}$, según la tabla 4 y 5 de asignación de los grupos funcionales, determina la composición de lípidos, ésteres, carbonilos, amidas I,II y proteínas muy similares entre las especies *S. aureus* y *S. viridans*, a diferencia de *S. pyogenes* que presenta baja cantidad. En la región del "Fingerprint" $1200-600\text{ cm}^{-1}$, al parecer hay cantidades iguales de enlaces C-H y C-O entre todas las especies, observándose que la especie *S. viridans*, presenta mayor absorción entre los $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ de enlaces C-O de posibles ácidos.

En el análisis espectral por ATR dentro de las especies gram positivas figura 10, se aprecia el mismo comportamiento, que se obtuvo en el análisis bajo KBr tanto en la región de los $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ como en la de $1800-1400\text{ cm}^{-1}$, en cuanto la región de flexión "Fingerprint" se sigue presentando a *S. viridans* como la de mayor composición al parecer de carbohidratos y la de mayor relación C-O y C-N (Aminos), seguida por *S. pyogenes* tabla 4 y 5. El análisis bajo la primera derivada del ATR, muestra el mismo comportamiento espectral analizado anteriormente, a excepción de la alta relación C-H presente en *S. pyogenes* a los $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, figura 11.

En cuanto a la primera derivada de KBr por el método "Savitsky Golay" en las especies gram positivas figura 12, se observa una presencia muy ajustada en los compuestos y grupos funcionales de las tres especies analizadas, observándose iguales inflexiones en las regiones de $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ y $1650-1350\text{ cm}^{-1}$, especialmente en la relación C-H, C-N y C-O que componen lípidos y proteínas; por otra parte la región de flexión, alrededor de los $1200-600\text{ cm}^{-1}$, se aprecia un comportamiento muy lineal en *S. aureus*, algo que no se presenta en las especies de *S. pyogenes* y *S. viridans*, aunque existe una diferencia marcada en la relación C-O y C-H al parecer en la composición de carbohidratos, tabla 4 y 5.

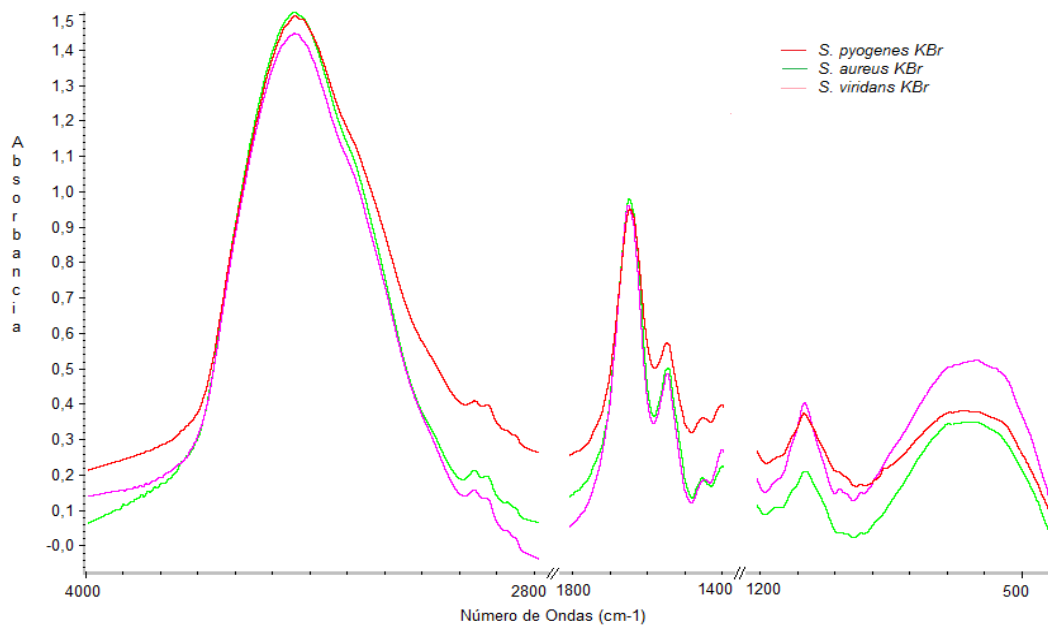


Figura 9. Perfil comparativo en prueba de KBr entre las especies gram positivas.

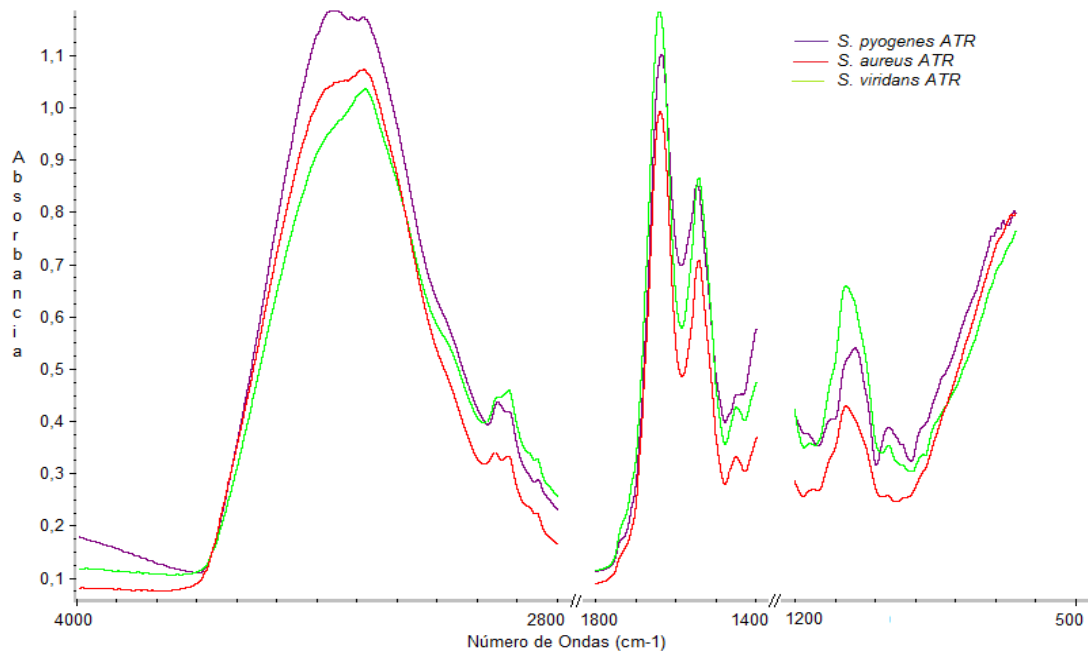


Figura 10. Perfil comparativo en prueba de ATR entre las especies gram positivas.

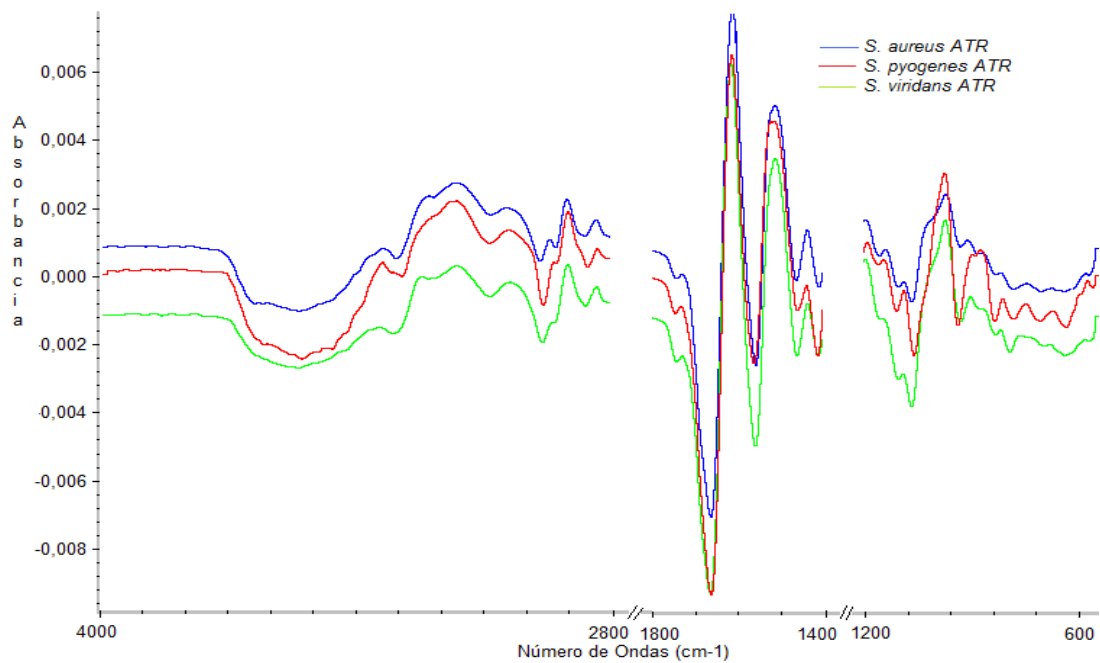


Figura 11. Perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre las especies gram positivas.

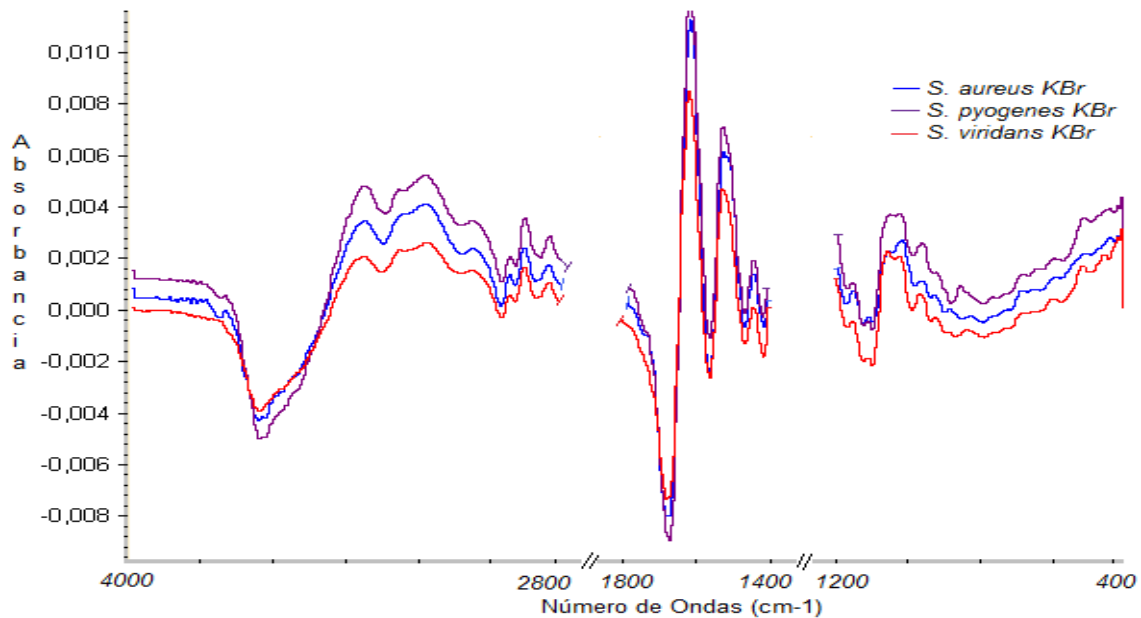


Figura 12. Perfil comparativo en primera derivada de KBr, entre las especies gram positivas.

El perfil comparativo en la prueba de KBr entre las especies de micobacterias figura 13, muestra una alta similitud de las especies de micobacterias en la región de los 3000-2800 cm^{-1} , en la relación C-H y ácidos grasos como tal. Esta región junto con la de 1800-1400 cm^{-1} son las regiones características del género por presentar el mismo comportamiento espectral, teniendo en cuenta que la especie de *M. terrae* muestra el pico característico de género muy atenuado, situado en 1800 a 1700 cm^{-1} , seguida por *M. smegmatis*; donde la relación de carbonilos, aldehídos, ésteres, anhídridos, lípidos, proteínas y carbohidratos son muy similares entre las especies, al igual que la relación C-H, que se encuentra entre los 1400 a los 1500 cm^{-1} , tabla 4 y 5.

Por otro lado la región de los 1200-500 cm^{-1} , expresa igual comportamiento para todas las especies, aunque se encuentran picos característicos para especie "Fingerprint"; a su vez se sigue presentando grandes intensidades como es el caso de *M. terrae* en la zona de los 1200-1100 cm^{-1} , en la relación C-H, C-O y formación de carbohidratos, tabla 4 y 5. Se aclara que *M. terrae* fue la única especie de micobacterias que no creció en medio de cultivo Lj (Lowestein Jensen), por lo que se decidió cultivarla en medio Middlebrook 7H11; este medio cuenta con un alto contenido energético, debido a una suplementación con OADC (Acido oleico, complejo albumina-dextrosa), proporcionando a las micobacterias, la posibilidad de

elaborar altas reservas energéticas, para afrontar positivamente condiciones críticas (33,34,35); infiriendo que la intensidad que se presenta en la especie y en dicha región, puede deberse a las reservas energéticas que crean las micobacterias, por estar en un medio de alto contenido energético (Carbohidratos); comportamiento espectral que no se observa en las demás especies de micobacterias, que crecieron en medio Lj.

El análisis bajo ATR, entre las especies de Micobacterias muestra que *M. intracellulare*, *M. nonchromogenicum*, *M. chelonae* y *M. triviale* figura 14, cuentan con un alto contenido de ácidos grasos y con una mayor relación de alcanos; en cambio la especie de *M. smegmatis* presenta una composición y una relación totalmente diferente en esta región de los 3000-2800 cm^{-1} . En cuanto la segunda región de análisis de los 1800-1400 cm^{-1} , se presenta en general un mismo comportamiento espectral, aunque sigue presentándose el mismo pico atenuado característico del género *Mycobacterium* en la especie de *M. terrae*, exactamente en la región de los 1800-1700 cm^{-1} . Comportándose espectralmente como una gram positiva y una gram Negativa, recordemos que en esta región se encuentra los ácidos carboxílicos, los aldehídos y los esteres; otro comportamiento espectral característico en esta región es la disposición que tiene la especie *M. nonchromogenicum*, exactamente en la región de los 1600-1500 cm^{-1} , por presentar una doble banda o duplete de alta intensidad, esto se interpreta en un alto contenido de proteínas, en especial de amidas tipo III, característico al parecer de esa especie, ya que las demás especies solamente presentan una banda; otra región de importancia es la de 1500-1400 cm^{-1} , que representa la relación C-H, siendo muy similar en todas las especies tabla 4 y 5.

Por último está la región de los 1200-600 cm^{-1} , donde se encuentre el “*Fingerprint*”, en esta zona espectral se observa en cada una de las especies micobacterianas, grandes diferencias en los picos, interpretándose como diferencias en la composición de carbohidratos, alcanos, esteres y en general de carbonilos. En este análisis espectral bajo ATR la especie de *M. terrae* no presenta en la región del “*Fingerprint*” la mayor intensidad como se observaba en el análisis bajo KBr, esto puede deberse al alto nivel de diferenciación y selectividad que proporciona el ZnSe en cada uno de las especies espectrales. En cuanto la primera derivada de las especies micobacterianas, bajo ATR figura 15, muestra el mismo comportamiento espectral, como se analizó anteriormente en el perfil

comparativo de ATR; aunque esta prueba tiene inflexiones y picos más selectivos en la región de flexión, para diferenciar más fácilmente las bacterias, siendo la primera derivada bajo ATR, la prueba apropiada para la elaboración de la biblioteca espectral.

Las especies micobacterianas en el perfil comparativo bajo la primera derivada de KBr figura 16, muestra un igual comportamiento espectral, en las regiones de los 3000-2800 cm^{-1} y 1800-1400 cm^{-1} en relación al contenido de C-H, ácidos grasos y carbonilos respectivamente, siendo estas dos regiones características del género; en cuanto la región de los 1200-600 cm^{-1} , es la que muestra las diferencias entre las especies tabla 4 y 5, resaltando la especie *M. terrae*, por seguir presentando alta intensidad entre 1200-1000 cm^{-1} , situación que también se observó en la prueba de KBr (33,34,35).

Para el género *Mycobacterium*, Rebuffo S.C. *et al.* 2007. Reportan que los ácidos micólicos son más abundantes y variables compuestos lipídicos, que se sitúan en la envoltura de las micobacterias, generando características y bandas intensas entre los 2800 y 3000 cm^{-1} en el espectro infrarrojo. Se establece otra banda en 1745 cm^{-1} , responsable de grupos ésteres y carbonilos, observados también en lípidos (36). El alto contenido de polisacáridos, particularmente arabinogalactano con ácidos micólicos atado a la capa de peptidoglicano, forman la envoltura protectora en micobacterias. Por último establecen la "región polisacárida" de 900 a 1200 cm^{-1} , siendo útil para la caracterización de la especie *micobacteiana*.

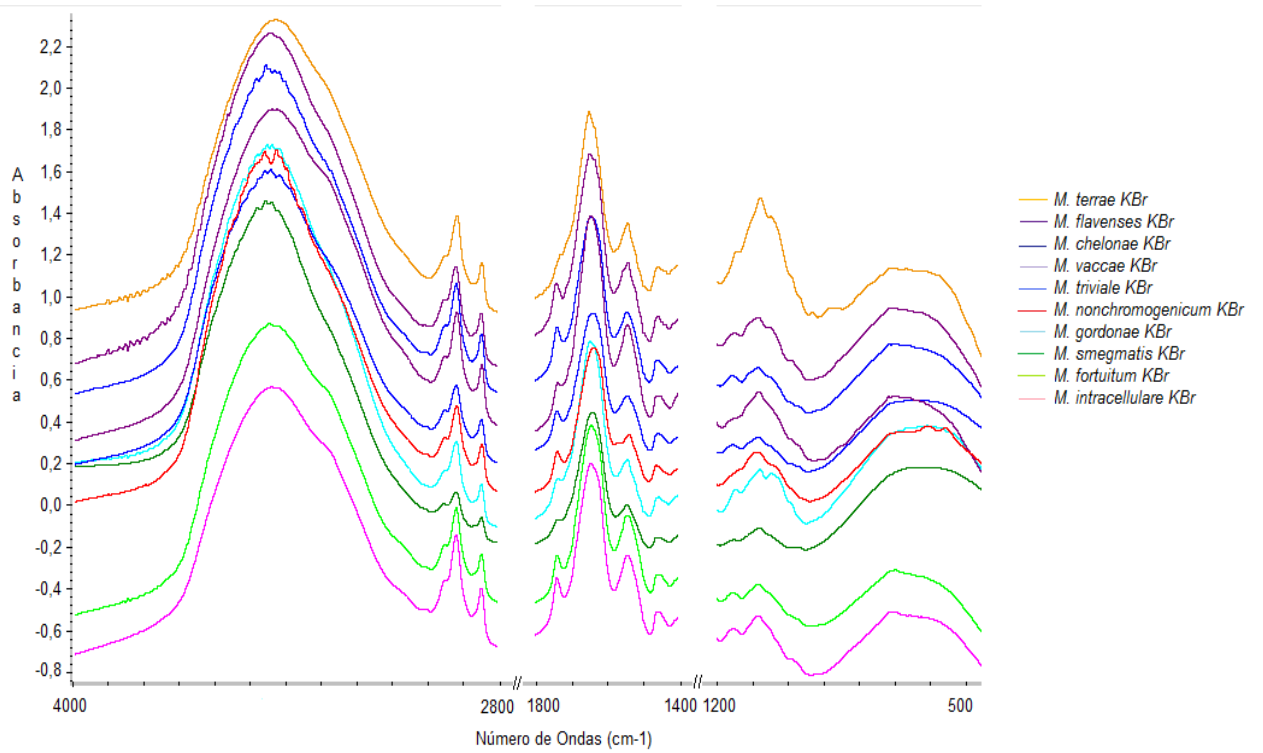


Figura 13. Perfil comparativo en prueba de KBr entre las especies de micobacterias.

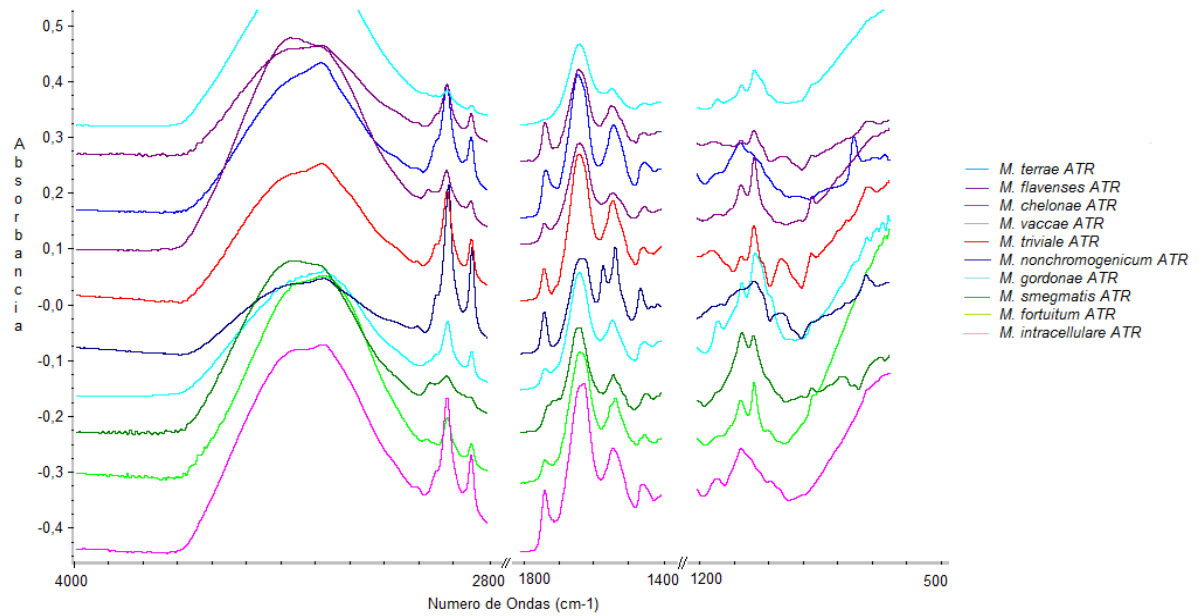


Figura 14. Perfil comparativo en prueba de ATR entre las especies de micobacterias.

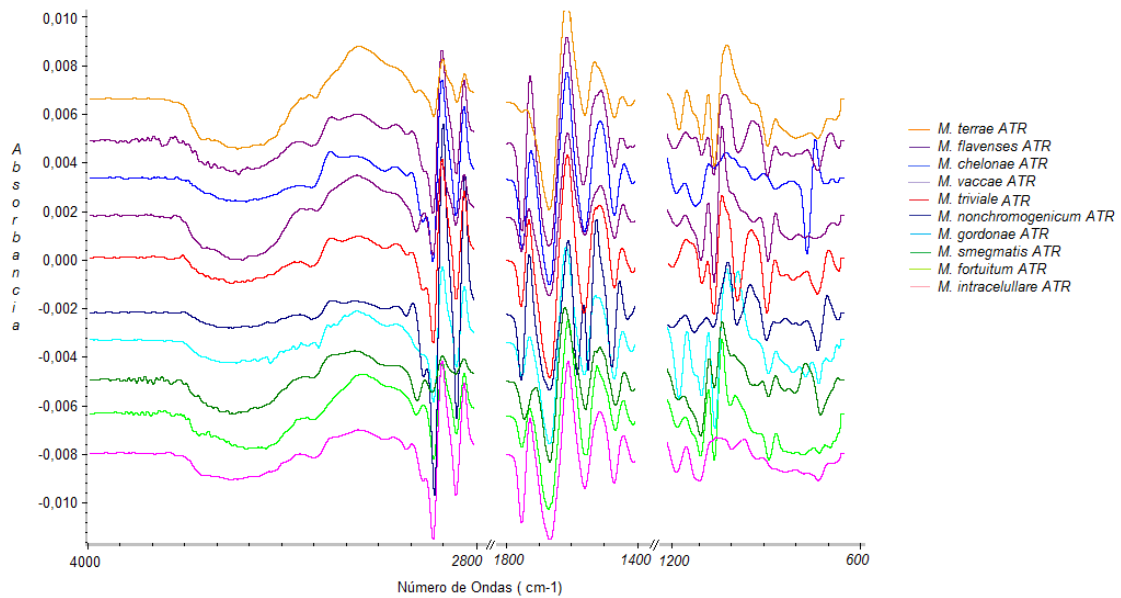


Figura 15. Perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre las especies de micobacterias.

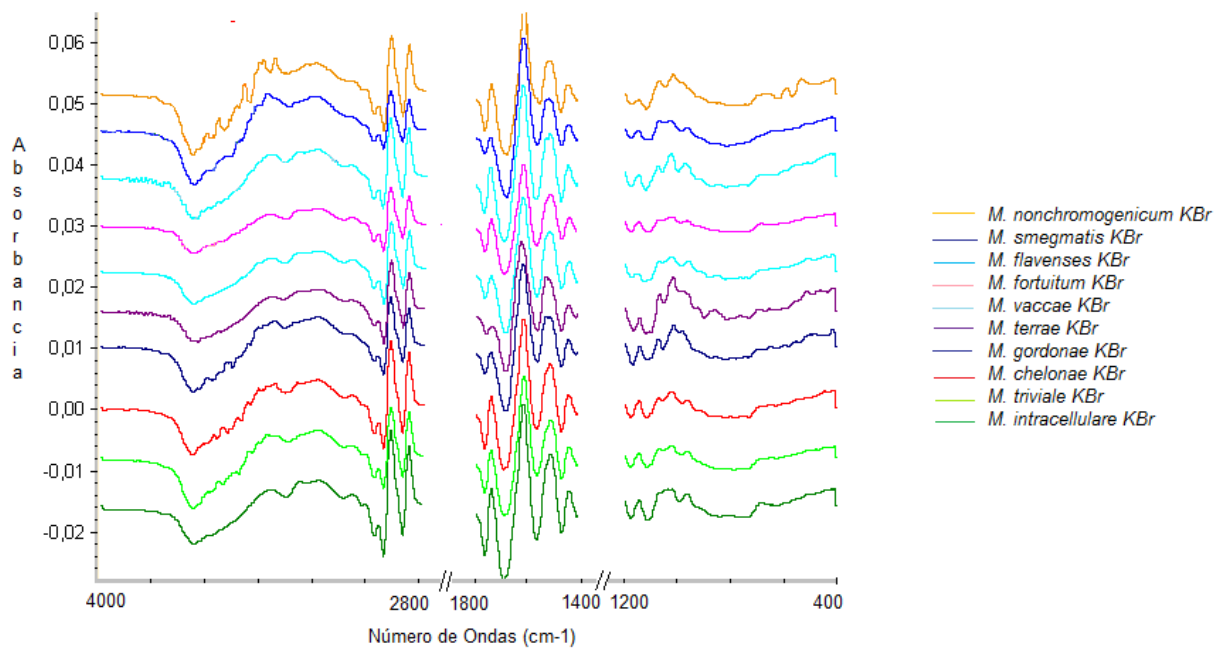


Figura 16. Perfil comparativo en primera derivada de KBr, entre las especies de micobacterias.

El primer perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre los tres grupos trabajados figura 17, muestran claramente la similitud que se presentan dentro de los géneros y las

diferencias que hay entre las especies, lo más relevante es la presencia de picos de alta intensidad en la región de los 3000-2800 cm^{-1} por parte de las micobacterias, seguida por la especie *E.coli*; dichas intensidades se deben a las diferentes relaciones C-H; también se presenta el pico característico de las micobacterias entre los 1800-1700 cm^{-1} , aunque *E. coli* y *S. aureus* lo presentan, pero en muy baja intensidad, interpretándose como una baja concentración de lípidos y de ciertas proteínas; las demás inflexiones y picos de dichos espectros se interpretan mediante las tablas 4 y 5.

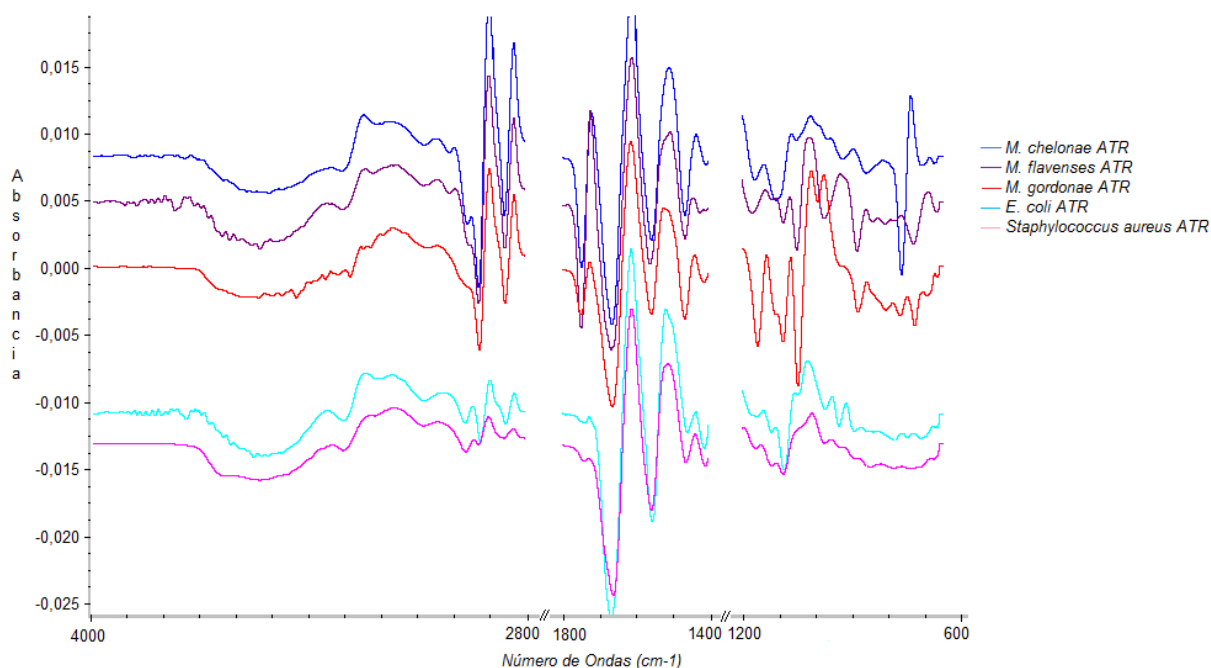


Figura 17. Primer perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre las especies de micobacterias, gram negativas y gram positivas.

El segundo perfil comparativo, bajo la primera derivada de ATR, utilizando diferentes especies de micobacterias y además diferentes representantes del grupo de las bacterias gram negativas y gram positivas, figura 18; muestran un comportamiento espectral, igual como se observó en el primer perfil comparativo, aunque en este perfil se muestra la especie de *Klebsiella pneumoniae*, como la única en presentar bajo contenido de lípidos y proteínas en la región de los 1800-1700 cm^{-1} ; en cuanto a las especies gram negativas, en los dos perfiles comparativos, se observa una mayor intensidad en las inflexiones, en comparación a

las bajas intensidades presentadas en el grupo de las gram positivas; las demás inflexiones y picos característicos se pueden analizar por medio de las tablas 4 y 5.

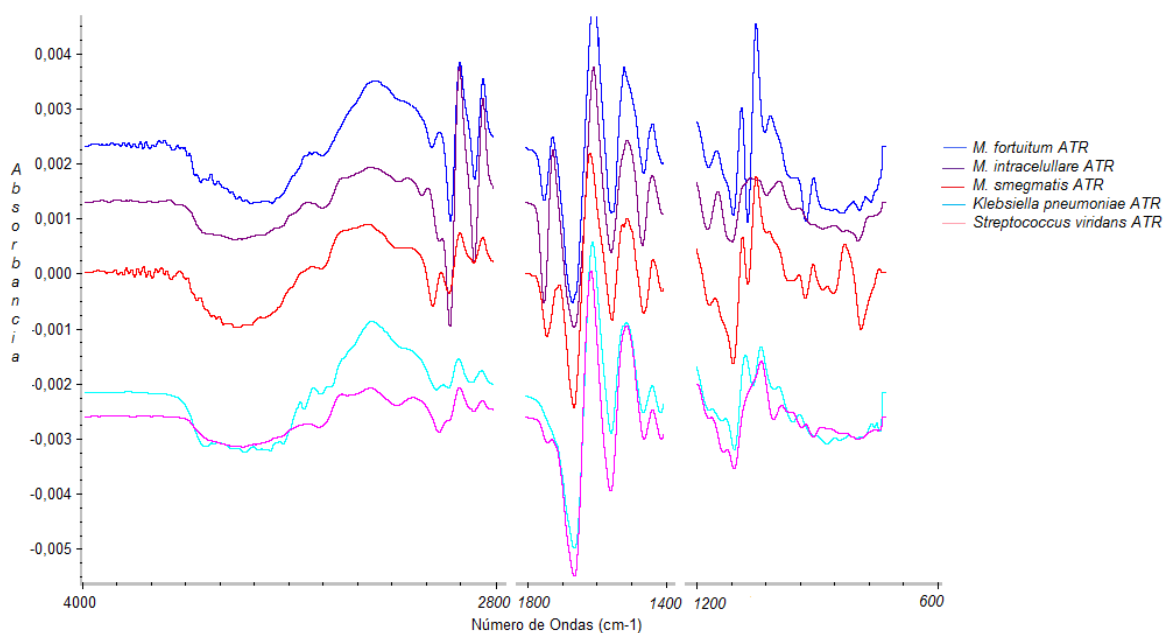


Figura 18. Segundo perfil comparativo en primera derivada de ATR, entre las especies de micobacterias, gram negativas y gram positivas.

6.3. Biblioteca Espectral

Se realizó una biblioteca espectral de las diferentes especies bacterianas analizadas (micobacterias, gram positivas y gram negativas), la biblioteca se creó en base a la primera derivada del ATR por la alta selectividad que presenta, además se crearon bibliotecas alternas con base en solo al ATR y al KBr, aunque esta última poco sirve, por presentar espectros muy generales y similares generando conflictos de interpretación.

Las especies comprendidas en el grupo de las gram negativas y gram positivas son identificadas bajo la prueba general del ATR y bajo su primera deriva; mientras que las micobacterias estrictamente deben ser reconocidas bajo la primera derivada del ATR, debido a los picos tan selectivos que presentan la mayoría de estas especies bacterianas.

6.3.1 Sensibilidad de detección y nivel de diferenciación

Se realizó una prueba de sensibilidad de detección, bajo la prueba general de KBr, figura 19, usando una micobacteria al azar, en este marco se eligió a *M. smegmatis*, mostrando iguales espectros bajo diferentes concentraciones de micobacteria (1 mg, 5mg, 10 mg y 15 mg) con diferentes concentraciones del KBr (100mg, 200mg y 300 mg) respectivamente, repitiendo la concentración de 100 mg de KBr puesto que es la mínima cantidad que se puede preparar para formar la pastilla, estos resultados demuestran que una cantidad de 1 mg de bacteria es suficiente para uso en la prueba de identificación; consecuentemente estos datos sugieren que el tiempo requerido para el cultivo puede ser minimizado al necesitarse menor cantidad de colonia y si se usa un medio de cultivo enriquecido y la técnica de crecimiento de capa delgada; como lo han reportado previos estudios (33); por lo que puede reportarse una sensibilidad de detección del 100 % al trabajar bajo KBr, debido a que las diferentes concentraciones de la muestra bacteriana y del KBr, presentaron el mismo comportamiento espectral, figura 19. Además se reporta para el método PRA y el método convencional una sensibilidad de detección del 100% y una variación del 87,7% a 90,3% respectivamente; siendo la sensibilidad de detección por FT-IR más alta en comparación con el método convencional (12).

En cuanto al nivel de diferenciación se reporta del 100 %, en 3 de las 4 muestras problemas usadas, las que fueron correctamente identificadas por el IR, como *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium vaccae* y *E. coli*, para la última muestra problema se obtuvo un porcentaje de identificación del 86,20% en la prueba de ATR y 86,22% en la primera derivada de ATR, estableciéndose 0,2% de más selectividad en la primera derivada, identificándose la cuarta muestra problema como *Staphylococcus aureus*, tabla 6. Además se reporta un nivel de detección para las pruebas PRA y métodos convencionales del 91,5% a 96,7% (12, 13), sin tener un reporte del 100% de diferenciación bacteriana, porcentaje que la técnica FT-IR, alcanzó en tres de las 4 muestras problemas identificadas espectralmente.

La tabla 6, muestra el mejor porcentaje de similaridad que fue tomado, con base en el triplicado espectral de cada una de las especies, considerándose el 100% como el mejor valor de similaridad y 50% como el punto crítico; si el porcentaje de similaridad se

encontraba muy cerca al punto crítico espectral, se analizó mas replicas de las muestras problema, para encontrar un porcentaje de similaridad más confiable.

Tabla 6. Especies problemas identificadas bajo la biblioteca bacterial espectral.

Especies Problema	Valor Critico %	% de similaridad en base a la biblioteca de ATR, sin derivar.	% de similaridad en base a la biblioteca de la primera derivada del ATR
Problema 1	50	No presente	100% <i>M. gordonae</i>
Problema 2	50	No presente	100% <i>M. vaccae</i>
Problema 3	50	100% <i>E. coli</i>	100% <i>E. coli</i>
Problema 4	50	86,20% <i>S. aureus</i> .	86,22% <i>S. aureus</i>

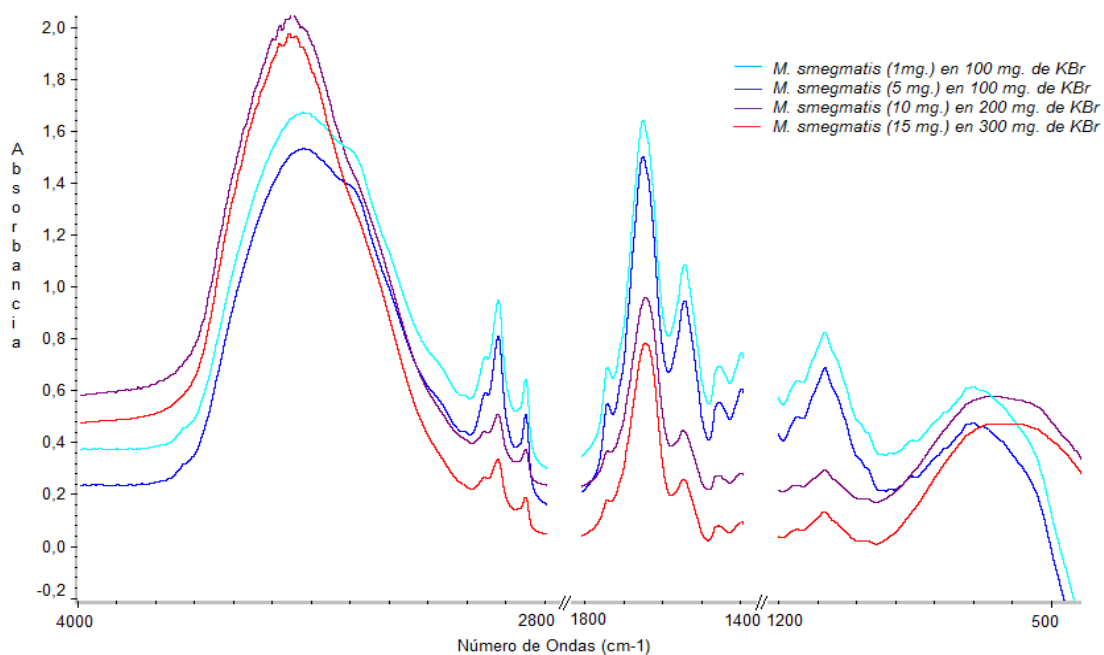


Figura 19. Prueba de sensibilidad de detección, bajo la prueba de KBr, usando la especie de *M. smegmatis*.

7. CONCLUSIONES

La espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) es un método rápido, eficiente y de bajo costo para la identificación bacteriana, en comparación con los métodos bioquímicos y moleculares.

La prueba de ATR (Reflectancia total atenuada), muestra mayor selectividad espectral en comparación con la prueba de KBr, por trabajar directamente en placa de ZnSe.

Los espectros en primera derivada de ATR son los que demuestran mayor selectividad a la hora de establecer las diferencias entre las especies bacterianas, siendo elegidos favorablemente para la realización de la biblioteca espectral.

La sensibilidad de detección bajo la prueba de KBr fue del 100%, y el nivel de diferenciación de 3 muestras problemáticas, elegidas al azar, fueron en este estudio del 100%.

Los espectros bacterianos solo muestran grupos funcionales en sus diferentes longitudes de ondas y solo se pueden especular los diversos compuestos que se pueden presentar espectralmente.

8. RECOMENDACIONES

Al correr un espectro bacteriano, hay que tener en cuenta el tiempo de crecimiento de las bacterias y las condiciones en las que se encuentra el medio de cultivo, se debe ser muy cuidadoso al correr el background, porque las concentraciones de CO₂ y el vapor de agua, pueden cambiar fácilmente el espectro en algunos picos, depende también del investigador que esté haciendo las pastillas y operando el equipo, debido a que una mala configuración del IR al correr una muestra puede cambiar totalmente un espectro bacteriano.

Es recomendado tener el espectrofotómetro en un lugar aislado de cualquier flujo de aire y limpio de cualquier otro microorganismo que no sea del interés del investigador, a su vez se debe tener en cuenta las condiciones en las que está el KBr, ya que cuando está en contacto con el aire, tiende a hidratarse.

Cuando se quiere comparar un espectro con la biblioteca espectral, hay que tener en cuenta que la muestra problema se encuentre en el mismo medio en la que se construyó la biblioteca.

Se recomienda tener un espectrofotómetro con todos sus accesorios solo para bacterias, para evitar contaminación con otros compuestos, a su vez es apropiado que el análisis espectral se haga con más de tres replicas en cada una de las especies (usar técnica de agar en capa delgada), para que la biblioteca tenga un amplio soporte espectral.

Además se recomienda implementar el método de agar en capa delgada, que permite minimizar tiempo y los costos frente a la identificación convencional.

Es conveniente probar el nivel de diferenciación de todas las especies trabajadas. Por último, es muy conveniente como prueba estadística a posteriori, realizar la prueba de hipótesis de similitud de espectros

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por la fuerza que me dio durante toda mi carrera.

A mis padres: Luz Marina Gil Gómez y Jorge Cuellar por su apoyo incondicional.

A mi Abuela: María y a mi hermana: Suean, por aguantar mis pataletas.

A Sandra Milena Coronado por ayudarme en mi formación investigativa y personal.

A Roberto Carlos Arrubla, por su gran apoyo y direccionamiento en los conceptos instrumentales analíticos.

A Diana Carolina Henao, por su apoyo en este trabajo y por escuchar mis locas ideas.

A todas las personas del "ICBM" muchas gracias, por contribuir en mi formación académica y profesional.

Agradezco la disponibilidad que tuvo el Instituto Interdisciplinario de las Ciencias "Optoelectrónica" en ayudarme en la toma de espectros.

Al departamento de Estadística muchas gracias, por guiarme en mi trabajo.

A todos los compañeros y profesores de mi carrera, gracias por sus enseñanzas y consejos.

A todos los Químicos que estuvieron pendientes de este trabajo, en especial a Héctor Fabio Cortes Hernández y a Jorge Sierra Acevedo.

A los tres jurados: Nelsy Loango Chamorro, Jorge Enrique Gómez Marín y Leonardo Padilla Sanabria, muchas gracias por aceptar mi trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rogall T, Wolter J, Flohr T, Bottger EC. Toward a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium* Int J Syst Bacteriol 1990; 40 (4):323-30.
2. Brooks R, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous *Mycobacteria*. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. AM Rev Respir Dis 1983, 130 (4): 630-3.
3. Kaisaer E. Gary, Doc Kaiser's Microbiology Home Page, 2008.
4. Caminero Luna J.A., Micobacterias Atípicas; Hospital General de Gran Canaria "Dr. Negrín". Las Palmas de Gran Canaria. BSCP Can Ped; 25-No.2, 2001.
5. Koneman E.W., Allen S. D, Janda W. M, Schreckenberger P.C, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas. Quinta edición, Editorial Medica Panamericana, 1999.
6. Minnikin DE, Minnikin S, Parlett J, Goodfellow M y Magnusson M.. Patrones de ácidos micólicos de algunas especies de *Mycobacterium*. Arch Microbiol 1984. 139:225-231.
7. Fujimura Leite C, Oliveira de Souza C, Leite S. Identificación de micobacterias por análisis de cromatografía de capa delgada de ácidos micólicos y método bioquímico convencional: Cuatro años de experiencia. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1998. 93 (6): 801-805.
8. Watanabe M, Aoyagi Y, Ridell M, Minnikin DE. Separación y caracterización de ácidos micólicos en micobacteria representativa. Microbiology 2001. 147, 1825-1837.
9. Daffe, M., M. A. Laneelle, C. Asselineau, Levy-Frebault y H. David. Valor Taxonomico de acidos grasos de micobacterias propuesta para un metodo de analisis. Ann Microbiol (Paris) 1983. 134B:241-56.

10. Farmer JJ. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. En: Murray PR, Baron EJ, PfallerMA, TenoverFC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D. C., ASM Press 1999. p. 442-58.
11. Madigan T. Michael, Martinko M. Jhon & Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 10 edición; editorial PERSON- Prentice Hall 2005.
12. Lubasi David, Habeenzu Charity and Mitarai Satoshi. Evaluation of an Ogawa *Mycobacterium* Culture Method Modified for Higher Sensitivity Employing Concentrated Samples Tropical Medicine and Health. Vol 32 No.1, 2004 pp.1-4.
13. Feher C. da SILVA, Mizuka S.Y. UEKI, Pires D. de Cassia GEIGER & Cardoso LEAO. hsp65 PCR-Restricción Enzyme Analysis (PRA) for Identification of Mycobacteria in the Clinical Laboratory Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2001. 43 (1):25-28, January- February.
14. D. Lefier, INRA-URTAL-Poligny, France, B. Beccard, Thermo Fisher Scientific, France, M. Bradley, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI. Classification of Bacteria Using FT-IR. Molecular Spectroscopy, Thermo Scientific. 81 Wyman Street, Waltham, MA, 2007.
15. J.H. Hopkinson, J.E. Newbery, D.M. Spencer, and J.F. Spencer, Biotechnol. and Appl. Biochem. 1988. 10, 118–123.
16. D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski, and P. Giesbrecht, Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, W. Nelson, Ed., ISBN 3-527-28022-7, pp 43–96.
17. J. D. S. Goulden and M.E.J. Sharpe, Gen. Microbiol. 1958. 19, 76–78.
18. Rebuffo S.C., Kirschner C., Staemmler M., Naumann D. Rapid Species and differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. Journal of Microbiological Methods 68, 2007. 282-290.

19. Essendoubi M. *et al.* Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica acta* 1724. 2005. 239-247.
20. Oust J. Astrid, *et al.* FT-IR microspectroscopy: a promising method for the rapid identification of *Listeria species*. *FEMS Microbiol let* 278. 2007. 164-170.
21. Erukhimovitch V. *et al.* FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 2004.1105-1108.
22. Yu Chenxu & Irudayaraj J..Spectroscopic Caracterización of Microorganisms by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Biopolimers*. Vol 77, 368-377, 2005.
23. Burgula Y. *et al.* Rewiew of mid- Infrared Fourier transform-Infrared Spectroscopy Applications for Bacterial Detection. *Journal of rapid methods & Automation in microbiology* 15. 2007,146-175
24. Wenning M., Seiler H. y Scherer S. Microespectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, una herramienta novedosa y rápida para la identificación de levaduras. *Sociedad americana de microbiología*, Vol. 68, No.10, 2002.
25. Garip S., Cetin G. Aysegul & Severcan F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chemistry* 113, 2009. 1301-1307.
26. Cardoso S. LEAO, Martin Anandi, Mejia I. Gloria, Palomino C Juan, Robledo Jaime, Telles S. da silva & Portaels Françoise.. *Practical Handbook For The Phenotypic And Genotypic Identification of Mycobacteria*; 2004. Páginas 1-165.
27. Garzon C. M., naranjo N. O. Sierra R. Cl., Llerena Claudia, Orjuela L. D. *Bacteriología de Mycobacterium tuberculosis y de micobacterias no tuberculosas, manual de procedimieentos*. Instituto Nacional de salud, Subdirección de epidemiología y

laboratorio nacional de referencia- Laboratorio de Micobacterias. Bogotá, D.C, mayo del 2001.

- 28.** Petrick K & Parsch J. Microbioly Manual. 2000. MERCK.
- 29.** Silverstein M. Robert & Webster X. Francis. Identificación espectrometría de compuestos orgánicos. (editorial) Sexta Edición,1999.
- 30.** Pavia L. Donald, Lampman Gary M. & Kriz S. George. Introducción a la espectroscopia, Segunda Edición. Departamento de Química, Universidad de Washington, Bellingham Washington, 1996.
- 31.** Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Pub Health Rep* 1947; 62: 1432-49.
- 32.** Nieto I. Laura, *et al.* Empleo de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. *Microbiología. Acta Bioquim Clin Latinoam* 2004; 38 (3):289-95.
- 33.** Mejía I. G, L. Castrillon, H. Trujillo, J. A. Robledo, Microcolony detection in 7H11 thin layer cultura is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Sección de Bacteriología, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia. 1999. 3 (2) 138-142.
- 34.** Mejía G.I, Guzmán A. Agudelo CA, Trujillo H, Robledo JA. Cinco años de experiencia con el uso de agar de capa delgada para el diagnostico rápido de tuberculosis. *Biomédica* 2004; 24 (Suppl): 52-9.
- 35.** Robledo JA, Mejía G.I, Morcillo N, Chacón L, Camacho M, Luna J. *et al.* Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study-*Int J. Tuberc Lung Dis* 2006; 10:613-9.

- 36.** Naumann, D. FT-Raman spectroscopy in biomedical research. In: Gremlich, H.U., Yan, B. (Eds), *Infrared and Raman Spectroscopy of biological Material*. Marcel Dekker, New York. 2001, pp.223-377.