

# Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica\*

► Laura Inés Nieto<sup>1</sup>, Ana Silvia Donolo<sup>2</sup>, Amadeo Javier Bava<sup>3</sup>,  
Osvaldo Miguel Yantorno<sup>4</sup>

- 
1. Bioquímica. Becaria de Estudio CIC.
  2. Microbióloga. Becaria CONICET.
  3. Doctor en Medicina.
  4. Doctor en Ciencias Bioquímicas.

\* Lugar de trabajo:

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI),  
Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P.  
Calle 47 y 115, La Plata.  
Tel/Fax: 54-221-4833794.  
E-mail: cindefi@quimica.unlp.edu.ar

## Resumen

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) fue empleada para diferenciar 14 cepas bacterianas [*Escherichia coli* ( $n = 2$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $n = 3$ ), *Proteus mirabilis* ( $n = 1$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 2$ ), *Staphylococcus aureus* ( $n = 5$ ) y *Staphylococcus saprophyticus* ( $n = 1$ )], provenientes de la colección del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina y de la *American Type Culture Collection* (ATCC). El fenotipo de cada cepa estudiada fue determinado a partir de cultivos puros, mediante espectros de absorción infrarroja (IR), específicos y reproducibles. Para establecer las diferencias entre las cepas estudiadas se obtuvo un dendograma, mediante análisis de *cluster*, el cual permitió su discriminación a nivel de especie. La FT-IR es una técnica rápida que requiere pequeñas cantidades de biomasa, lo que permite el análisis de un gran número de muestras diarias. Además, su fácil aplicación, el no uso de reactivos y el reducido tiempo de operación hacen de esta técnica una herramienta apropiada para microbiología clínica.

**Palabras clave:** espectroscopia infrarroja \* diferenciación \* microorganismos.

## Summary

### USE OF FOURIER TRANSFORM-INFRARED SPECTROSCOPY TO DIFFERENTIATE CLINICALLY RELEVANT BACTERIA

*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) was employed to differentiate 14 bacterial strains [*Escherichia coli* ( $n = 2$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $n = 3$ ), *Proteus mirabilis* ( $n = 1$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 2$ ), *Staphylococcus aureus* ( $n = 5$ ) and *Staphylococcus saprophyticus* ( $n = 1$ )] from the collections of the "Juan P. Garrahan" Paediatrics Hospital, Buenos Aires City, Argentina, and the American Type Culture Collection (ATCC). For each strain studied, the phenotype was determined from pure cultures as reproducible and specific infrared (IR) absorption spectra. A dendogram was obtained by clustering analysis of the obtained spectra to establish the differences among the studied strains, allowing its discrimination at the species level. FT-IR is a fast technique which requires small amounts of biomass allowing to analyse many samples a day. Moreover, its easy application, the no use of reactive and its reduced time consumption make this technique an appropriate tool for clinical microbiology.*

**Keywords:** Infrared spectroscopy \* differentiation \* microorganisms.

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

## Introducción

A nivel mundial, los procesos infecciosos son responsables de aproximadamente el 25% de las muertes que se producen anualmente. En lo referente a infecciones nosocomiales, los niños menores de 4 años y los adultos mayores de 64 constituyen los grupos de mayor riesgo. En general, los pacientes con procesos infecciosos son preventivamente tratados con antibióticos, situación que en la mayoría de los casos dificulta el desarrollo de los microorganismos en cultivos de laboratorio, para su posterior aislamiento y caracterización. Más aún, en un 10% de los casos estos tratamientos empíricos, al no ser específicos, pueden incrementar el riesgo de resistencia a antibióticos. Por consiguiente, tanto la identificación rápida de agentes patógenos como la determinación de su susceptibilidad a los antimicrobianos son requisitos fundamentales para reducir la tasa de mortalidad y el riesgo de desarrollo de resistencia a antibióticos. La identificación de estos organismos debe realizarse, además, como etapa esencial dentro de una estrategia para un control epidemiológico adecuado, de la cual derivan las correspondientes medidas de prevención.

Los métodos bioquímicos tradicionales de identificación microbiana se basan en el estudio de aspectos fenotípicos y fisiológicos de la población. Por lo general, la identificación comienza con el examen morfológico de las colonias aisladas en medios sólidos después de 24 h de incubación. El estudio continúa con el examen microscópico de un extendido de los microorganismos aislados, coloreados según la técnica de Gram. A partir de aquí se inoculan las pruebas bioquímicas tradicionales. Los resultados de estos métodos se obtienen, como mínimo, después de 1 a 2 días de trabajo, ya que requieren del desarrollo de cultivos puros del microorganismo en cuestión para obtener una biomasa suficiente capaz de evidenciar los cambios en las pruebas utilizadas (sistemas indicadores de pH, formación o degradación de determinadas sustancias, actividades enzimáticas). Muchas veces es necesaria una segunda serie de pruebas para precisar la identificación del agente patógeno. De ser éste el caso, se requeriría un día adicional de incubación. En consecuencia, el proceso de identificación se vuelve tedioso y consume un tiempo excesivo, a veces no disponible para iniciar una antibióticoterapia específica. Además, estos métodos no siempre son concluyentes, y en ocasiones dan lugar a resultados ambiguos o incompletos.

Para revertir esta situación, en la última década se han hecho grandes esfuerzos enfocados al desarrollo de nuevas técnicas de identificación microbiana (1-6). En este sentido la molécula de ADN ha sido la más estudiada entre los distintos componentes celulares (7-10).

Una técnica ideal para lograr una rápida caracterización microbiana debería contemplar: a) mínima preparación de la muestra, b) análisis automático de gran cantidad de muestras en forma seriada, con bajo costo de reactivos, c) disponibilidad de una base de datos estable, de fácil empleo y operación en forma automatizada bajo el control por computadoras.

En los últimos años, técnicas fisicoquímicas basadas en espectroscopia vibracional, tales como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) han demostrado ser una herramienta poderosa para la caracterización microbiana, al permitir la discriminación a nivel de género, especie y aún entre cepas y serotipos (5) (11-15). Esta técnica es rápida, requiere escasa biomasa, es fácil de implementar y puede llegar a ser muy efectiva en lo que se refiere a costos, al reducir la manipulación y el uso de reactivos (13) (14).

El espectro infrarrojo de un microorganismo es considerado una verdadera huella dactilar (16). El mismo es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de las moléculas que componen la célula (ADN, ARN, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, componentes de membrana y pared celular). Por lo tanto, la FT-IR es un método que depende del estado fisiológico del microorganismo analizado ya que el espectro generado refleja la composición bioquímica de las células en estudio. Los resultados de un análisis espectroscópico se muestran como dendogramas o árboles filogenéticos que permiten una clasificación taxonómica a través de la cual los grupos con miembros similares pueden ser rápidamente visualizados. Las distancias espectrales entre grupos presentes en un dendograma pueden ser interpretadas como una medida de las variaciones bioquímicas entre los diferentes organismos analizados.

Un aspecto de fundamental importancia para la identificación de poblaciones microbianas por este método es el desarrollo de bases de datos constituidas por espectros de cepas de referencia. Los espectros contenidos en una base de datos son obtenidos mediante protocolos estrictamente estandarizados en lo referente a las condiciones de cultivo y de medida, y deben ser capaces de comprender las variaciones intrínsecas de la diversidad y heterogeneidad encontrada en las poblaciones bajo estudio.

En el presente trabajo se estudió la aplicación de FT-IR para la diferenciación de cepas de la familia *Enterobacteriaceae* y los géneros *Staphylococcus*, *Proteus* y *Pseudomonas* de interés clínico. La selección de ventanas espectrales realizada permitió una apropiada diferenciación de los organismos estudiados. Estos resultados constituyen la base para la construcción de una librería espectral que podría ser empleada en la identificación posterior de aislamientos bacterianos desconocidos.

## Materiales y Métodos

### CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En la Tabla I se indican las cepas bacterianas empleadas en este estudio. Subcultivos de las mismas fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en glicerol al 20%. Todas las cepas fueron cultivadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 22 h en placas de Petri con Caseína Soja Agar (Merck, Alemania), de acuerdo al método del cuarto cuadrante (11) (16). En el caso de muestras conservadas congeladas o liofilizadas es importante realizar dos pasajes consecutivos en medio sólido para asegurar la reproducibilidad en el estado fisiológico de la bacteria.

### OBTENCIÓN DE ESPECTROS IR

Para la obtención de espectros, muestras de cada cepa fueron extraídas de medio sólido con un ansa de platino calibrada, de 1 mm de diámetro. Se tomaron en cada caso colonias confluentes del tercer cuadrante las cuales fueron suspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. La densidad óptica de las suspensiones medidas a 650 nm ( $\text{DO}_{650}$ ), se ajustó a valores entre 8 y 9. Una alícuota de 80  $\mu\text{L}$  de cada suspensión fue transferida a una celda de 13 mm de diámetro de Zn-Se (Zinc-Seleniuro) y se secó por vacío moderado entre 60 y 70 mm de Hg para obtener una película transparente y homogénea. Todos los espectros fueron re-

Tabla I. Cepas bacterianas empleadas en el estudio.

	Género y especie	Fuente	Nº de cepa
Gram negativos	<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25218
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AT	182
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AT	204
	<i>Proteus mirabilis</i>	AT	202
Gram positivos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AT	157
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AT	181
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	25923
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AT	104
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AT	129
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AT	152
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AT	153
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AT	170

ATCC: American Type Culture Collection, AT: Cepas pertenecientes a la Colección del Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan" de la ciudad de Buenos Aires

gistrados entre 4.000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrómetro Perkin Elmer modelo Spectrum One (EEUU) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). Cada espectro se midió a una velocidad de 1,00  $\text{cm/s}$  con 6  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y resultó del promedio de 128 escaneos. Las lecturas fueron realizadas bajo corriente de aire seco para reducir la contribución del vapor de agua en las mediciones. Para minimizar los problemas de línea de base y aumentar la resolución en las regiones de superposición de bandas, se obtuvieron las derivadas primeras de los espectros empleando el algoritmo de Savitzky-Golay, con un aliado ("smoothing") de 9 puntos. A partir de las mismas se compararon las distintas cepas. Para la comparación se seleccionaron regiones espectrales dentro de las ventanas indicadas en la Tabla II.

### ANÁLISIS DE DATOS ESPECTRALES

Antes de incluirse en el análisis cada espectro fue sometido a una evaluación de calidad espectral, llevada a cabo mediante el empleo de un *test* de calidad espectral. Este *test* establece rangos de aceptabilidad para los valores de absorbancia, ruido, vapor de agua, ruido electrónico ("fringes"), así como para las relaciones

Tabla II. Asignación de absorciones infrarrojas para las ventanas espectrales frecuentemente empleadas para el análisis de muestras biológicas.

Ventana	Rango espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Absorción infrarroja
V1	3.000-2.800	• 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.
V2	1.800-1.500	• Estiramiento del doble enlace C=O de ésteres y grupos carboxílicos, contribución de estructura secundaria de proteínas (amida I y II).
V3	1.500-1.200	• Contribución de proteínas (amida III), estiramiento asimétrico del enlace P=O de grupos fosfatos, y deformación del enlace C-H.
V4	1.200-900	• Deformación de estructura de carbohidratos, estiramiento del enlace C-C y de grupos fosfatos.
V5	900-700	• Región de verdadero <i>fingerprint</i> (huella dactilar).

señal-ruido y señal-agua. Sólo los espectros que pasaron satisfactoriamente este control de calidad fueron empleados en el estudio posterior. Para cada cepa se incluyeron en el estudio 5 mediciones de preparados independientes que superaran el *test* de calidad. A fin de estudiar la reproducibilidad dentro de cada grupo, se calcularon las derivadas primeras de cada espectro, luego se obtuvo a partir de estas derivadas el espectro promedio de cada especie y su desviación estándar (DE). Como resultado se obtuvo la heterogeneidad dentro de cada grupo (medida de similitud entre espectros). La derivada primera de los espectros promedio fue empleada finalmente para la construcción de los grupos jerárquicos en forma de dendograma.

## Resultados

Se analizaron 5 espectros provenientes de aislados independientes de cada cepa que superaron el *test* de calidad espectral. Se obtuvo la derivada primera de cada uno. Sus replicados fueron confrontados para evaluar la reproducibilidad de los mismos en las condiciones de medida (Fig. 1). Para esto se calculó la DE en cada caso. Las distintas poblaciones mostraron valores de DE menores de 10 en todo el rango espectral estudiado (6) (13), evidenciando un alto nivel de reproducibilidad en el fenotipo de los organismos analizados, bajo las condiciones de cultivo empleadas. Además, se observó que la heterogeneidad entre las medias de las distintas especies fue muy superior a las distancias dentro de cada clase (14).

En la Tabla II se muestran las regiones espectrales más frecuentemente usadas en microbiología para di-

ferenciar poblaciones. Luego del estudio comparativo realizado se seleccionaron las siguientes regiones espectrales: ventana de lípidos (V1: 2.986 - 2.841  $\text{cm}^{-1}$ ), de hidratos de carbono (V4: 1,290 - 1,180  $\text{cm}^{-1}$ ) y la denominada de "verdadero *fingerprint*" (V5: 944 - 805  $\text{cm}^{-1}$ ). En la primera de ellas las diferencias espectrales reflejan la distinta composición lipídica de las paredes celulares de las bacterias grampositivas y gramnegativas empleadas en este estudio, mientras que en la segunda ventana, las diferencias se asocian con la composición en hidratos de carbono (por ejemplo del polisacárido extracelular). Finalmente, la tercera ventana refleja características no definidas, asociadas, por ejemplo, a estructuras cuaternarias de las proteínas y otras macromoléculas, pero específicas para cada una de las cepas.

En estas regiones se observó que las diferencias entre los espectros de cada cepa resultaban más notorias. En la Figura 2 se muestra un espectro obtenido de las distintas especies empleadas en este trabajo, y sus correspondientes derivadas primeras, en las 3 regiones espectrales seleccionadas.

El resultado del análisis de grupos se describe en forma de dendograma (Fig. 3), donde el eje superior horizontal muestra el nivel de fusión entre los espectros como un aumento en la varianza o heterogeneidad. La magnitud de esta heterogeneidad se refleja en la distancia a la cual se unen las líneas de los espectros vecinos de cada grupo. Las cepas estudiadas formaron dos grandes grupos, el de bacterias grampositivas y el de gramnegativas, respectivamente, que se unieron a niveles elevados de heterogeneidad. Se observaron 4 subgrupos mayores que se asociaron con los géneros estudiados.

Todas las cepas de *Staphylococcus* estudiadas formaron uno de los grupos mayores, en el cual la cepa de *Staphylococcus coagulasa* (-) quedó separada de las 5 cepas de

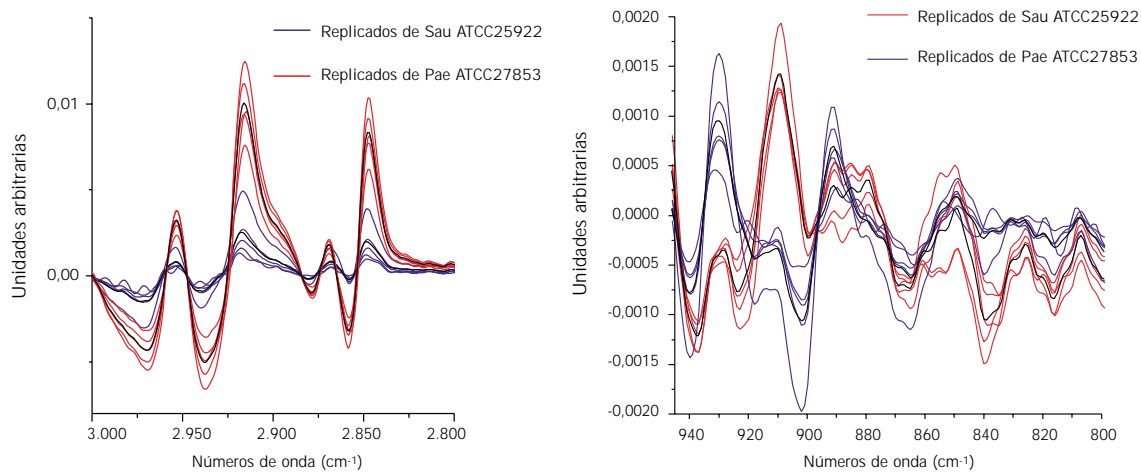


Figura 1. Conjuntos de replicados de dos de las cepas estudiadas. En negro se muestran los espectros promedio de las derivadas primera.

*Staphylococcus coagulasa* (+) con un nivel de heterogeneidad moderado. El grupo mayor de bacterias gramnegativas se dividió en 2 subgrupos bien diferenciados. El primero de ellos agrupó a las 2 cepas de *Escherichia coli* separadas de las 2 cepas del género *Klebsiella pneumoniae* con un alto grado de heterogeneidad. El segundo subgrupo contuvo al resto de las gramnegativas, las 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y la de *Proteus mirabilis*. Sin embargo, la cepa de *P. mirabilis* quedó claramente separada de todos los otros espectros del mismo subgrupo.

## Discusión y Conclusiones

La identificación de los microorganismos a nivel de especie posee indudable importancia para el reconocimiento y control de los agentes causales de infección, tanto en casos clínicos puntuales como en estudios epidemiológicos, y debe ser realizada mediante métodos simples, rápidos y certeros.

La técnica de FT-IR es cada vez más empleada para la discriminación e identificación de microorganismos

(13) (16) (18). Para poder diferenciar fenotipos por espectroscopia infrarroja es esencial establecer en primer lugar el grado de reproducibilidad de los mismos frente a una determinada condición de cultivo. En este caso se comprobó un nivel aceptable de reproducibilidad en los espectros de las cepas en estudio bajo las condiciones de crecimiento empleadas. Con esta condición, el método puede emplearse para generar una base de datos que permita una clasificación no subjetiva, clínicamente relevante y que sea capaz de abarcar la variación natural fenotípica de las poblaciones microbianas de interés clínico. Otro punto a tener en cuenta a la hora de diferenciar microorganismos por esta técnica se refiere a la selección de las regiones espectrales que serán utilizadas para realizar el análisis de grupos. Estas regiones deben ser seleccionadas de manera tal que el agrupamiento obtenido coincida en gran medida con el esperado según la clasificación bioquímica y/o molecular ya establecida. El resultado de este análisis se muestra como un dendograma, en el cual las relaciones entre los espectros se expresan como distancias conectadas en una escala de heterogeneidad y donde los

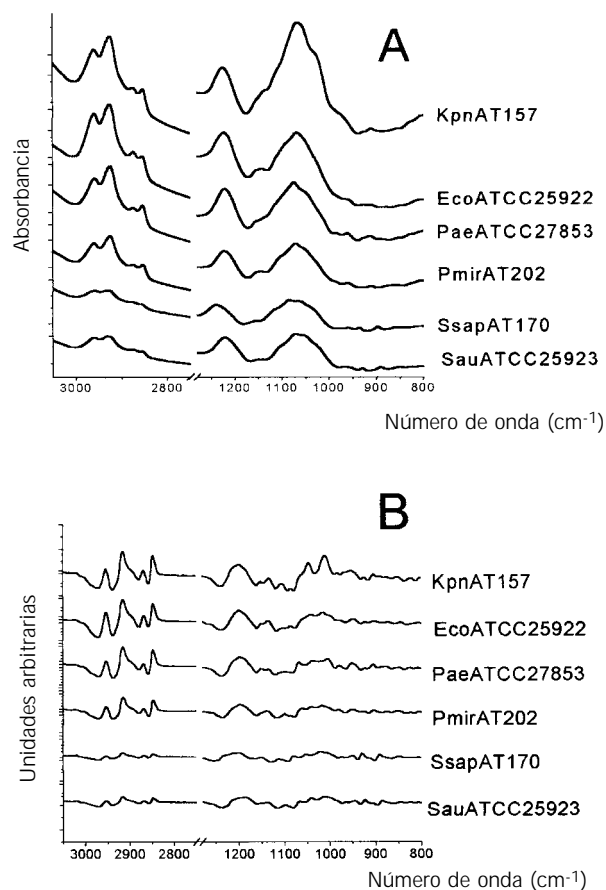


Figura 2. Espectros IR (A) y derivadas primeras (B) de las cepas: *Klebsiella pneumoniae* (AT157), *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Proteus mirabilis* AT202, *Staphylococcus saprophyticus* AT170 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923 en las zonas seleccionadas (ventanas espectrales) para el análisis de grupos.

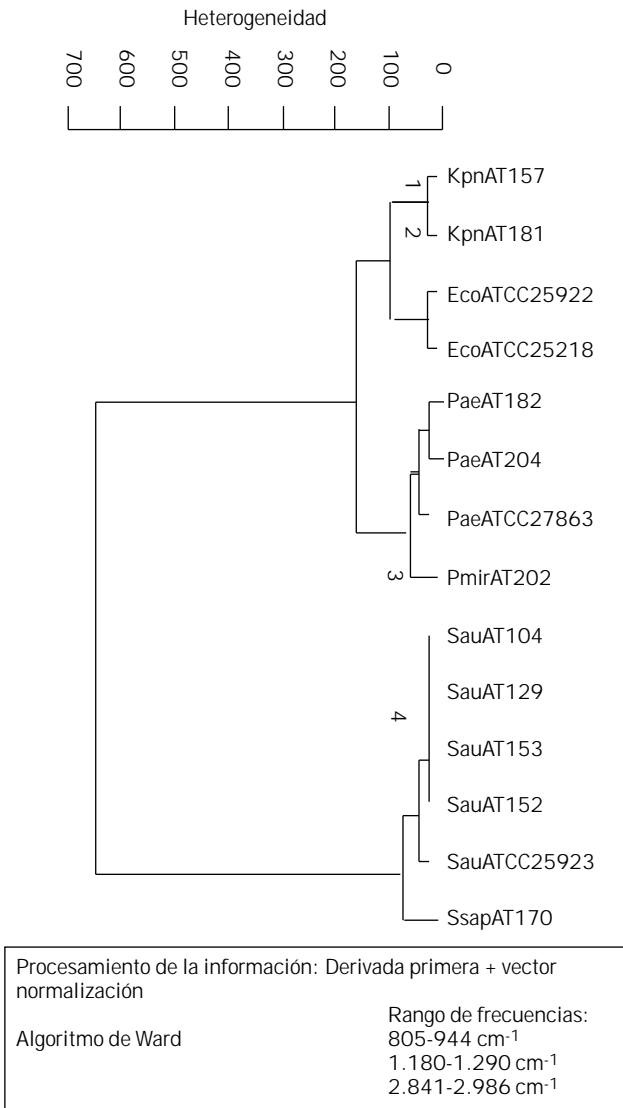


Figura 3. Dendrograma obtenido del análisis de grupo de las cepas estudiadas.

espectros que muestran mayor similitud son los conectados por distancias más pequeñas.

Si bien los espectros obtenidos a partir de los distintos microorganismos pueden ser analizados en términos de sus diferencias bioquímicas, el análisis de grandes grupos de datos puede llegar a ser muy complicado por esta vía. Por el contrario, la comparación de los espectros o sus derivadas mediante el empleo de programas de computación específicos, que toman el contorno global del espectro para la comparación, permite desarrollar modelos de identificación automáticos y rápidos.

La espectroscopia FT-IR puede, por lo tanto, clasificar microorganismos en diferentes niveles taxonómicos sin la necesidad de una selección previa por otros criterios. La disponibilidad de los resultados obtenidos es más rápida que con las técnicas moleculares más mo-

dernas, la preparación de la muestra es simple y se requiere una escasa cantidad de biomasa para las mediciones (13).

El empleo de FT-IR en microbiología ha comenzado a constituir una poderosa herramienta que permite discriminar hasta el nivel de subespecie (6) (11-16) (19-24). Maquelin y col. (6) identificaron correctamente (entre 96 y 100% de certeza) 109 aislamientos bacterianos de hemocultivos en un estudio prospectivo; Johansen y col. (2) analizaron la diversidad de 140 cepas de *Pseudomonas spp.* Y concluyeron que hubo un buen acuerdo entre la clasificación obtenida por esta técnica y la resultante del empleo de REP-PCR (89% de coincidencia). Estudios de clasificación de microorganismos de importancia clínica han sido reportados previamente por Naumann y col. (17) y Maquelin y col. (19). Estos autores obtuvieron resultados satisfactorios al emplear para la diferenciación las regiones espectrales 3.000 - 2.800, 1.500 - 1.400 y 1.200 - 900 cm<sup>-1</sup>. En este caso estudiado si bien se mantienen tres regiones espectrales, la mayor diferenciación entre los distintos organismos estudiados resultó del empleo de rangos espectrales más acotados, no se incluyó la región 1.500 - 1.400 cm<sup>-1</sup> y la región 1.200 - 900 cm<sup>-1</sup> fue desdoblada en dos regiones. Respecto de la rapidez en la obtención de resultados debe destacarse que a partir de un cultivo de 24 horas, la obtención de espectros y el análisis posterior demandan un período de 3 horas. Esto adquiere gran relevancia, ya que permite la administración temprana del tratamiento antibiótico específico, lo cual mejorará ostensiblemente las posibilidades de éxito terapéutico.

Finalmente, en este trabajo se muestra que las técnicas vibracionales no requieren de procesamientos especiales de las células, las cuales sólo se separan y re-suspenden. Esto constituye una ventaja muy importante frente a procedimientos de identificación derivados de la biología molecular o la bioquímica tradicional.

Este estudio permitió definir una estrategia para la diferenciación de microorganismos de interés en microbiología clínica, basada en espectroscopia vibracional que demuestra ser rápida, de bajo costo y apropiada resolución.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, PICT 98-06-03824. Los autores agradecen al Dr. H. Lopardo, por ceder gentilmente algunas de las cepas empleadas en este trabajo.

#### CORRESPONDENCIA:

Dr. OSVALDO M. YANTORNO  
Cindefi  
Calle 47 Y 115  
1900 LA PLATA  
E-mail: yantorno@quimica.unlp.edu.ar

## Referencias bibliográficas

- Booth M, Hatter K, Miller D, Davis J, Kowalski R, Parke D, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* in endophthalmitis. *Infect* 1998; 66: 356-60.
- Johnsen K, Nielsen P. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopic characterization. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 176: 155-62.
- Georghiou P, Hamill R, Wright C, Versalovic J, Koeuth T, Watson D, et al. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 84-94.
- Hermans P, Sluijter M, Hoogenboezem T, Heersma H, van Belkum A, de Groot R. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* Strains *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1606-12.
- Edwards-Jones V, Claydon M, Evason D, Walker J, Fox A, Gordon D. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000, 49: 295-300.
- Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stämmler M, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 324-9.
- Na was T, Hawwari A, Hendrix E, Hebden J, Edelman R, Martin M, et al. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J Clin Microbiol* 2003; 36: 414-20.
- Rademaker J, de Bruijn F. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*. Caetano-Anolles G, Gresshoff P, Editors. 1<sup>st</sup> edition - New York: Wiley-liss; 1998. p. 151-71.
- Shlush LI, Behar DM, Zelazny A, Keller N, Lupski JR, Beaudet AL, et al. Molecular epidemiological analysis of the changing nature of a meningococcal outbreak following a vaccination campaign. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 3565-71.
- Van Couwenberghe C, Cohen S, Tang Y, Gumerlock P, Silva J Jr. Genomic fingerprinting of epidemic and endemic strains of *Stenotrophomonas maltophilia* (formerly *Xanthomonas maltophilia*) by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1289-91.
- Goodacre R, Timmins E, Burton R, Kaderbhai N, Woodward A, Kell D, et al. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* 1998; 144: 1157-70.
- Goodacre R, Timmins E, Rooney P, Rowland J, Kell D. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 140: 233-9.
- Helm D, Labischinski H, Naumann D. Elaboration of procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *J Microbiol Meth* 1991; 14, 127-42.
- Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib Spectrosc* 2001; 26: 151-9.
- Miguel Gómez MA, Bratos Pérez MA, Martín Gil FJ, Dueñas Díez A, Martín Rodríguez JF, Gutiérrez Rodríguez P, et al. Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Meth* 2003, 65 (1): 121-31.
- Naumann D. FT-IR and FT-NIR Raman spectroscopy in biomedical research. J A de Haseth (ed.): "Fourier Transform Spectroscopy: 11th International Conference", American Institute of Physics (AIP) Conference Proceedings 430, Woodbury, New York (1998) p. 96-109.
- Naumann D. *Infrared spectroscopy in Microbiology*. 1<sup>st</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000; p. 1-29.
- Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, Allouch P, Bloy C, Manfait IVL. FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterization of microorganisms. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 261-9.
- Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HPh, Naumann D, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Meth* 2002, 51: 255-71.
- Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopy study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1763-70.
- Timmins E, Howell S, Alsberg B, Noble W, Goodacre R. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 367-74.
- Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1599-608.
- Guibet F, Amiel C, Cadot P, Cordevant C, Desmonts MH, Lange M, et al. Discrimination and classification of *Enterococci* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2003, 33 (1-2): 133-42.
- Ngo-Thi NA, Kirschner C, Naumann D. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *J Mol Struct* 2003, 661-662: 371-80.

Aceptado para su publicación el 29 de junio de 2004