



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar
Autor/es
Lara García Álvarez
Director/es
José Antonio Oteo Revuelta y Jesús Héctor Busto Sancirían
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar, tesis doctoral de Lara García Álvarez, dirigida por José Antonio Oteo Revuelta y Jesús Héctor Busto Sancirán (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar



Tesis doctoral

Lara García Álvarez
2017



TESIS DOCTORAL

Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar

Memoria presentada para aspirar al título de Doctor por la
Universidad de La Rioja

Lara García Álvarez

2017



Don José Antonio Oteo Revuelta, Doctor en Medicina y Cirugía, y Jefe del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro - Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Don Jesús Héctor Busto Sancirián, Doctor en Química, y Profesor Titular de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja.

Por la presente declaran que:

La memoria titulada **“Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar”**, que presenta Dña. Lara García Álvarez, Licenciada en Farmacia, ha sido realizada en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) y en la Universidad de La Rioja bajo su dirección y reúne las condiciones específicas para optar al grado de Doctor.

Lo que hacen constar en Logroño, a 30 de junio de 2017.

Fdo.: Dr. José A. Oteo Revuelta

Fdo.: Dr. J. Héctor Busto Sancirián

A mi familia

Unos vienen y otros se van. A mi hija Sofía y a mi abuelo Ernesto.

AGRADECIMIENTOS

Es un verdadero placer poder utilizar este espacio para expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado y han hecho posible, de una manera u otra, la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer de una manera especial a mis directores. Al Dr. José Antonio Oteo, por sus ideas brillantes, por su apoyo día a día y por ser, además de tan buen profesional, tan humano. Gracias por confiar en mí. Al Dr. Héctor Busto, por su dedicación, por sus conocimientos, por su paciencia, por su motivación y por su tiempo. Ambos sois un gran ejemplo. Gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo con vosotros.

A Pere, porque aunque al final no ha sido director de esta Tesis, lo hubiera merecido igual, y a Alberto Avenoz. Gracias a ambos por vuestra ayuda y por vuestro trabajo.

A mis compañeras de Enfermedades Infecciosas. Gracias a Sonia por su ayuda y por su compañía. A Ana por estar siempre dispuesta a ayudar y por enseñarme cosas nuevas. A Arantza por sus conocimientos y por su participación activa a lo largo de este trabajo. A Lourdes por su disposición. Gracias a todas por haber sido mis manos cuando yo no podía. A Paula por su apoyo y por haber estado siempre ahí. A Patricia, a Emma, a Chus y a Laura. Todas me habéis enseñado. Os echaré de menos en los congresos.

A Yoly muchas gracias por su paciencia y por sus conocimientos. A Beatriz, a Carmen y a Cristina.

A Merche por animarme y por ser tan generosa. A José Ramón por su interés. A Begoña, a Valvanera, a Luis y a Concha.

A Nico por su infinita paciencia. A Marcos y a Blanca por su interés. A Eduardo por brindarme tiempo para acabar esta Memoria.

A mis amigos por saber hacerme desconectar.

Y por último, me gustaría dar las gracias de todo corazón a mi familia. Gracias a mis padres por ser mi ejemplo de vida, por su paciencia y por su cariño. Porque gracias a ellos he llegado hasta aquí. A mi hermana, por ser mi otra debilidad,

por su apoyo, por su ilusión, por su alegría, por todo. A mis abuelos por ser mis otros padres, por transmitirme todo su cariño, por su superación. ¡Por qué poquito no has llegado, qué orgulloso estarías, abuelo! A mis tíos, a mi primo. A todos los demás.

A Julen, gracias por aguantarme, por quererme y por transmitirme la ilusión por el trabajo, y porque a lo largo de los años que me ha llevado realizar esta Tesis Doctoral, hemos dado los pasos más importantes de nuestras vidas.

Y por supuesto, a Sofía, mi debilidad. Porque esta Memoria y ella se han gestado a la vez. Siento haberte dedicado menos tiempo del que merecías. Gracias por haberme hecho tan feliz.

A todos, mil gracias. Esto también es vuestro.

“Nada en el mundo de las criaturas vivas permanece fijo [...]. Las enfermedades infecciosas se encuentran en continuo cambio. Unas se encuentran en proceso de desarrollo mientras que otras están modificándose o desapareciendo”.

(Hans Zinnser- Rats, Lice and History, 1935)

“Hay reglas sencillas para el uso de la penicilina: usarla sólo para los microbios que sean vulnerables a ella, aplicar la dosis indicada y que el tratamiento dure lo suficiente para eliminar la infección”

(Alexander Fleming, 1945)

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	I
Tablas	V
Figuras	vii
RESUMEN/ ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Historia y desarrollo de los métodos de sensibilidad a antimicrobianos	3
2. Métodos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos	6
2.1 Métodos de difusión	6
2.1.1 Método del antibiograma	6
2.1.2 Método de difusión en gradiente o método del Epsilon test (E-test)	8
2.2 Métodos de dilución	8
2.2.1 Dilución en caldo	9
a) Método de macrodilución	9
b) Método de microdilución	10
2.2.2 Dilución en agar	11
2.3 Métodos automáticos	11
2.4 Métodos moleculares	13
2.4.1 PCR	14
2.4.2 Secuenciación del genoma completo	15
2.4.3 Microarrays	15
2.5 Métodos de lisis bacteriana	16
2.6 Microfluidos	17
2.7 Nefelometría	17
2.8 Métodos colorimétricos	18
2.9 Quimioluminiscencia	18
2.10 Citometría de flujo	19
2.11 Inmunofluorescencia indirecta	20
2.12 Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)	21
3. Resonancia magnética nuclear	25
3.1 Introducción	25
3.2 Fundamentos de la RMN	26
3.2.1 Equipamiento	28
3.2.2 Tratamiento de la muestra	30
3.2.3 Tratamiento de datos	31
3.3 Estado actual	32
3.3.1 Estudios de sensibilidad a antifúngicos mediante RMN	32
3.3.2 Estudios en bacterias mediante RMN	34

OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. Estudios de susceptibilidad a antimicrobianos mediante RMN en bacterias habituales	46
1.1 Experimentos con <i>E. coli</i>	46
1.1.1 Preparación de medios de cultivo	46
a) Preparación del medio sólido.....	46
b) Preparación de caldos de cultivo	46
1.1.2 Cultivo de <i>E. coli</i>	46
1.1.3 Antimicrobianos utilizados	47
a) Gentamicina	47
b) Ciprofloxacino	47
c) Levofloxacino	47
1.1.4 Técnica de macrodilución en caldo.....	47
1.1.5 Preparación de muestras para experimentos de ¹ H RMN	48
1.1.6 Análisis de muestras mediante ¹ H RMN	49
1.2 Experimentos con <i>P. aeruginosa</i>	49
1.2.1 Preparación de medios de cultivo	50
1.2.2 Cultivo de <i>P. aeruginosa</i>	50
1.2.3 Antimicrobianos utilizados	50
a) Gentamicina	50
b) Ciprofloxacino	50
1.2.4 Técnica de macrodilución en caldo.....	50
1.2.5 Preparación de muestras para experimentos de ¹ H RMN	51
1.2.6 Análisis de muestras mediante ¹ H RMN	51
1.2.7 Análisis de muestras mediante Análisis de Componentes Principales	51
2. Estudios de cinética mediante RMN en <i>E. coli</i> ATCC 25922	52
2.1 Preparación de medios de cultivo	52
2.2 Cultivo de <i>E. coli</i>	52
2.3 Antimicrobianos utilizados	52
2.3.1 Gentamicina	52
2.4 Incubación directa de <i>E. coli</i> en tubos de RMN.....	52
2.5 Preparación de muestras para experimentos de ¹ H RMN	52
3. Estudios metabólicos mediante RMN en <i>Rickettsia</i> spp.....	53
3.1 Preparación de medios de cultivo	53
3.1.1 Minimum essential medium (MEM) Glutamax [®] (Gibco, Invitrogen TM).....	53
3.2 Preparación de cultivos celulares.....	53
3.3 Cultivo de <i>Rickettsia</i> spp.	54
3.4 Compuestos utilizados para estudios metabólicos	54
3.5 Preparación de muestras para estudios metabólicos	54

3.6 Inactivación de muestras	55
3.7 Preparación de las muestras para experimentos de RMN	55
3.8 Análisis de muestras mediante RMN	55
3.8.1 Experimentos mediante ¹ H RMN	55
3.8.2 Experimentos mediante ¹³ C RMN	55
3.8.3 Experimentos mediante ¹⁵ N RMN.....	56
RESULTADOS.....	57
1. Estudios de susceptibilidad a antimicrobianos por RMN en bacterias habituales.....	59
1.1 Experimentos con <i>E. coli</i>	59
1.1.1 Análisis de muestras control.....	59
1.1.2 Prueba de susceptibilidad de <i>E. coli</i> ATCC 25922 frente a gentamicina	63
1.1.3 Prueba de susceptibilidad de <i>E. coli</i> ATCC 25922 frente a ciprofloxacino.....	66
1.1.4 Prueba de susceptibilidad de <i>E. coli</i> C1550 frente a ciprofloxacino.....	68
1.1.5 Prueba de susceptibilidad de <i>E. coli</i> C1550 frente a levofloxacino	71
1.2 Experimentos con <i>P. aeruginosa</i>	74
1.2.1 Prueba de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a gentamicina	74
1.2.2 Prueba de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a ciprofloxacino.....	78
1.2.3 Prueba de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> W30 frente a ciprofloxacino	82
1.2.4 Prueba de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> W30 frente a gentamicina	87
2. Estudios de cinética por RMN en <i>E. coli</i> ATCC 25922	91
3. Estudios metabólicos mediante RMN en <i>Rickettsia</i> spp.....	94
3.1 Experimentos con ¹ H RMN.....	94
3.2 Experimentos con ¹³ C RMN.....	95
3.3 Experimentos con ¹⁵ N RMN.....	98
DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXO I.....	133
ANEXO II.....	137
ANEXO III.....	143

Abreviaturas y símbolos

%	Porcentaje
>	Mayor
≥	Mayor o igual
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
6-OHNA	Ácido 6-hidroxicotínico
ADN	Ácido d esoxirribonucleico
ARN	Ácido r ibonucleico
ATCC	Colección a mericana de c ultivos t ipo (<i>American type culture collection</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
B ₀	Campo magnético externo
C	Carbono
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMB	Concentración m ínima b actericida
CMI	Concentración m ínima i nhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
Cols.	Colaboradores
CP	Componentes p incipales
d ₁	Tiempo de relajación
D ₂ O	Agua deuterada
EDTA	Ácido e tilend a minotetra a cético
EM	E studios m etabólicos
EMB	Etambutol
ESA	E studios de s ensibilidad a a ntimicrobianos

E-test	E psilon test
ETH	Etionamida
F	Flúor
FID	Decaimiento libremente inducido (<i>Free induction decay</i>)
FT	T ransformada de F ourier
γ	Constante giromagnética
H	Hidrógeno
^1H	Protón
HRMAS	Alta resolución con rotación en ángulo mágico (<i>High resolution magic angle spinning</i>)
I	I ntermedia
IFI	I mmunofluorescencia i ndirecta
ITU	I nfección del t racto u rinario
LDH	L actato d eshidrogenasa
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of flight</i>
MEM	<i>Minimun essential medium</i>
MEP	Punto final metabólico (<i>Metabolic endpoint</i>)
MH	Mueller Hinton
MHz	M egahercios
μ	Momento magnético
μL	Microlitro
mg	M iligramo
mL	M ililitro
mm	M ilímetro
m/z	Carga de masa
Mz	Magntización en el eje Z
N	Nitrógeno
Na	Sodio

NA	Ácido nicotínico
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCCLS	<i>National Committee for clinical laboratory standards</i>
NO ₂ ⁻	Ion nitrito
NO ₃ ⁻	Ion nitrato
NOE	Efecto Overhauser nuclear (N uclear O verhauser effect)
Ns	Número de escans
°C	Grados centígrados
OMS	O rganización M undial de la Salud
P	Momento angular
P	Fósforo
P3	Laboratorio de nivel 3 de bioseguridad
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Proincipal component analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Ppm	P artes p or m illón
R	R esistente
RMN	R esonancia m agnética n uclear
S	S ensible
SHMT	S erina h idrox i metil t ransferasa
spp.	Especies
TSP	2,2'-3,3'- t etradeutero-trimetil-silil- p ropionato sódico
UFC	U nidades f ormadoras de c olonias
ν_0	Frecuencia de resonancia
x g	Fuerza centrífuga
z	Carga

Tablas

Tabla 1. Resumen de los principales métodos de sensibilidad a antimicrobianos (Modificada de van Belkum y Dunne, 2013).....	24
Tabla 2. Relación de los experimentos realizados.....	45

Figuras

Figura 1. Imágenes de algunos documentos emitidos por diferentes instituciones en relación a la lucha contra las resistencias bacterianas (Imágenes tomadas de The White House, 2015; Foro Económico Mundial, 2015; AEMPS, 2015; Gobierno de La Rioja III, 2015; ECDC, 2009).	1
Figura 2. a) Robert Koch. b) Louis Pasteur. c) Paul Erlich. (Imágenes tomadas de http://www.nobelprize.org y http://www.biography.com).	3
Figura 3. a) Alexander Fleming (Imagen tomada de http://mx.tuhistory.com). b) Cultivo en placa mostrando la disolución de las colonias estafilocócicas en las proximidades de una colonia de <i>Penicillium</i> (Imagen tomada de Fleming, 1929).	4
Figura 4. Cartel publicitario del uso de penicilina durante la II Guerra Mundial.	4
Figura 5. Ejemplo del antibiograma (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).	7
Figura 6. Ejemplo del método de E-test (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).	8
Figura 7. Ejemplo del método de macrodilución.	10
Figura 8. Placas de microtitulación empleadas en el método de microdilución (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).	11
Figura 9. Principales métodos automáticos comerciales. a) MicroScan Walkaway. b) Vitek (bioMérieux). c) Phoenix (BD Diagnostics). d) Sensititre ARIS (Trek Diagnostic Systems) (Imágenes tomadas de http://www.slideshare.net/MicrobeswithMorgan/susceptibility-testing-review y de http://www.trekds.com/products/sensititre/c_aris2x.asp).	13
Figura 10. Imagen al microscopio de un preparado por el método de lisis bacteriana. a) Ejemplo de cepa resistente tras incubación con antimicrobiano. b) Ejemplo de cepa sensible tras incubación con antimicrobiano (Imágenes tomadas de Pulido <i>et al.</i> , 2013).	16
Figura 11. a) Espectómetro de masas (Imagen tomada de https://www.bruker.com). b) Espectro de masas.	22
Figura 12. Ejemplo de un espectro de RMN (FID: decaimiento libremente inducido; FT: Transformada de Fourier).	28
Figura 13. Componentes de un equipo de RMN.	30
Figura 14. <i>E. coli</i> ATCC 25922 en placa de agar BHI.	47

- Figura 15.** Tubos de 5 mm de RMN con muestra..... 49
- Figura 16.** Personal trabajando en el laboratorio de nivel 3 de bioseguridad (P3). 54
- Figura 17.** Espectro de ^1H RMN del medio de cultivo (control II). A) Espectro completo en el que se observa la supresión de agua y la referencia de TSP en concentración conocida. B) Ampliación de la zona entre 0,8-4,2 ppm en donde se encuentran aminoácidos y ácidos orgánicos, compuestos susceptibles de verse involucrados en procesos metabólicos..... 60
- Figura 18.** Espectro de ^1H RMN del medio de cultivo con la bacteria. A) Espectro completo en el que se observa la supresión de agua y la región de cambio de metabolitos. B) Ampliación de la zona entre 0,8-4,2 ppm en donde se encuentran aminoácidos y ácidos orgánicos, compuestos susceptibles de verse involucrados en procesos metabólicos. 62
- Figura 19.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* ATCC 25922 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). El espectro del control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) aparece en la parte superior. El espectro del control II (solo medio de cultivo) corresponde al de la parte inferior de la imagen. En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias. 63
- Figura 20.** Diferencias en la turbidez entre las muestras de *E. coli* ATCC 25922 estudiadas y los controles. Los tubos de la “A” a la “H” corresponden a muestras con concentraciones seriadas de gentamicina (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 y 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). La CMI corresponde con el tubo “E”. El tubo “I” corresponde al control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) mientras que el tubo “J” corresponde al control II (solo medio de cultivo)..... 64
- Figura 21.** Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de gentamicina usada para *E. coli* ATCC 25922. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria. La treonina es consumida por *E. coli*. Cuando la concentración de gentamicina es superior a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable. 65
- Figura 22.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* ATCC 25922 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). El espectro del control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) aparece en la parte superior mientras que el del control II (solo medio de cultivo) se muestra en la parte inferior de la imagen. En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos (la treonina del medio es consumida cuando las

bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias). 66

Figura 23. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de ciprofloxacino usada para *E. coli* ATCC 25922. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de ciprofloxacino es superior a 0,004 µg/ml no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable. 68

Figura 24. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* C1550 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias. 69

Figura 25. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de ciprofloxacino usada para *E. coli* C1550. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de ciprofloxacino es superior a 512 µg/ml no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable. 71

Figura 26. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* C1550 incubadas con levofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos (la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias). 72

Figura 27. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de levofloxacino usada para *E. coli* C1550. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de levofloxacino es superior a 128 µg/ml, no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable. 74

Figura 28. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 1,90 a 2,80 ppm sólo se muestran los metabolitos que aumentan su concentración cuando hay actividad bacteriana (redondeados en azul). 75

Figura 29. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA. 77

- Figura 30.** Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN..... 78
- Figura 31.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 1,40 a 2,15 ppm sólo se muestran los metabolitos aumentan su concentración cuando hay actividad bacteriana (redondeados en azul). 79
- Figura 32.** Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA..... 81
- Figura 33.** Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN..... 82
- Figura 34.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 7,35 a 6,75 ppm sólo se muestran los metabolitos que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo). 83
- Figura 35.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul). 84
- Figura 36.** Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA..... 85
- Figura 37.** Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN..... 86
- Figura 38.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul). ... 87
- Figura 39.** Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul). ... 88

Figura 40. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA.	90
Figura 41. Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN.	91
Figura 42. Espectros apilados de ^1H RMN obtenidos de la incubación de <i>E. coli</i> ATCC 25922. En el espectro se pueden apreciar los cambios metabólicos ocurridos en el proceso: el metabolito treonina es consumido cuando las bacterias están activas mientras que el etanol es un metabolito producido por las bacterias.	92
Figura 43. Espectros apilados de ^1H RMN de la muestra de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en presencia de gentamicina a una concentración de 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20 horas.	93
Figura 44. Espectros apilados de ^1H RMN de la muestra de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en presencia de gentamicina a una concentración de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20 horas.	93
Figura 45. Espectro de una dimensión de ^1H RMN en el que se muestra la presencia de ácido láctico y etanol tanto en las muestras infectadas por <i>R. slovacica</i> como en las no infectadas. A) Espectro del medio de cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> . B) Espectro del medio celular no infectado (control).	94
Figura 46. Espectro de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras suplementadas con D-[1- ^{13}C]glucosa. A) Medio de cultivo de células infectadas con <i>R. slovacica</i> en presencia de D-[1- ^{13}C]glucosa. B) Espectro del medio de las células no infectadas suplementadas con D-[1- ^{13}C]glucosa.	95
Figura 47. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras con medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> y sin infectar en presencia y ausencia de [2- ^{13}C]glicina y serina. A) Espectro del medio del cultivo celular suplementado con [2- ^{13}C]glicina. B) Espectro obtenido de la muestra que sólo contenía medio del cultivo celular. C) Espectro del medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> en presencia de [2- ^{13}C]glicina y serina. D) Espectro del medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> en presencia de [2- ^{13}C]glicina. E) Espectro del medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> en presencia de serina pero sin [2- ^{13}C]glicina. F) Espectro del medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> sin [2- ^{13}C]glicina.	96
Figura 48. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras en presencia de L-[2- ^{13}C]leucina. A) Espectro del medio de cultivo celular no infectado suplementado con L-[2- ^{13}C]leucina. B) Espectro de medio del cultivo celular infectado con <i>R. slovacica</i> en presencia de L-[2- ^{13}C]leucina.	97

Figura 49. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras de los cultivos infectados y no infectados con *R. slovacca* en presencia de L-[1- ^{13}C]isoleucina y de las muestras control sin el aminoácido. A) Espectro del medio de cultivo celular infectado con *R. slovacca* en presencia de L-[1- ^{13}C]isoleucina. B) Espectro del medio de cultivo celular suplementado con L-[1- ^{13}C]isoleucina. C) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacca* sin adición de aminoácido..... 98

Figura 50. Espectros de una dimensión de ^{15}N RMN de las muestras suplementadas con L-[^{15}N]tirosina. A) Espectro del medio de cultivo celular suplementado con L-[^{15}N]tirosina. B) Espectro de la muestra del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacca* en presencia de L-[^{15}N]tirosina..... 99

RESUMEN

Existen numerosos métodos estandarizados utilizados para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos. Éstos, a menudo son lentos y laboriosos y frecuentemente muestran problemas tanto en la precisión como en la reproducibilidad. La aparición de resistencias y la posibilidad de utilizar fármacos menos tóxicos, además de la dificultad que supone el manejo de ciertas bacterias de difícil cultivo, hacen más que necesario el desarrollo de nuevos procedimientos que ayuden a conocer mejor el metabolismo bacteriano, su susceptibilidad a antibióticos y su posible manejo terapéutico.

Esta memoria se centra en el uso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para el estudio del metabolismo bacteriano, y su aplicación para determinar la sensibilidad de ciertas bacterias a fármacos antimicrobianos. Este trabajo recoge la puesta a punto de la técnica de RMN para el estudio de la susceptibilidad de dos cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922 y C1550) y de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 y W30) a varios antimicrobianos (gentamicina, ciprofloxacino y levofloxacino). Para ello, se comparan los resultados obtenidos mediante RMN con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) ya establecidas en la literatura y por los Comités pertinentes. Además, y con el objeto de conocer mejor el metabolismo de bacterias de difícil cultivo, se han realizado experimentos con *Rickettsia slovaca*. Estos análisis han permitido detectar marcadores metabólicos que podrían ser utilizados para estudios de sensibilidad y aportan conocimiento sobre el metabolismo de estos agentes de difícil cultivo.

Many standardized methods are used to determine antimicrobial susceptibility. They often slow and laborious and frequently show problems in both accuracy and reproducibility. The emergence of resistances and the possibility of using less toxic drugs, in addition to the difficulty of handling certain fastidious bacteria, make necessary to develop new procedures to better understand bacterial metabolism, their susceptibility to antibiotics and their potential therapeutical management.

This work focuses on the use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy for the study of bacterial metabolism and its application to determine the susceptibility of certain bacteria to antimicrobial drugs. This work sets up the NMR to study the susceptibility of two strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922 and C1550) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 and W30) against several antimicrobials (gentamicin, ciprofloxacin and levofloxacin). For this aim, the results obtained by NMR were compared with the minimum inhibitory concentrations (MIC) already established in the literature and by the pertinent Committees. In addition, and in order to better understand the metabolism of bacteria that are difficult to grow, experiments have been carried out on *Rickettsia slovaca*. These analyzes have allowed to detect metabolic markers that could be used for susceptibility studies and they contribute to the knowledge of the metabolism of these fastidious bacteria.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances y progresos en materia de Salud Pública, y específicamente en el campo de las enfermedades infecciosas y de la microbiología clínica, las enfermedades infecciosas siguen suponiendo un grave problema para la sociedad actual y como tal, un reto profesional e institucional. A nivel global, las enfermedades infecciosas son la primera causa de morbi-mortalidad y, si bien en los países desarrollados como España, estas afecciones no figuran entre las primeras causas, se podría afirmar que contribuyen en un alto grado al desenlace fatal (<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). En la Unión Europea y en otros países ricos como Estados Unidos, se ha identificado el desarrollo de resistencias bacterianas a antimicrobianos como uno de los problemas más importantes de Salud Pública, instando a las diferentes administraciones a luchar frente a este problema (The White House, 2015; Foro Económico Mundial, 2015; AEMPS, 2015; Gobierno de La Rioja III, 2015; ECDC, 2009) (figura 1). Es un hecho conocido que un tratamiento antimicrobiano correcto y precoz salva vidas. Por esta razón, la identificación microbiana, el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos y el desarrollo de nuevos antimicrobianos para luchar contra microorganismos resistentes son aspectos de gran importancia, con un gran impacto en el manejo del paciente infectado.



Figura 1. Imágenes de algunos documentos emitidos por diferentes instituciones en relación a la lucha contra las resistencias bacterianas (Imágenes tomadas de The White House, 2015; Foro Económico Mundial, 2015; AEMPS, 2015; Gobierno de La Rioja III, 2015; ECDC, 2009).

El objetivo principal de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, de modo que en un primer término, su resultado se traduzca en un factor predictivo de la eficacia clínica (SEIMC, 2000). Los estudios de la sensibilidad antimicrobiana son cruciales para determinar el fármaco disponible más efectivo para el tratamiento de un paciente afecto de un proceso infeccioso. Además, son necesarios para confirmar la susceptibilidad de los microorganismos a los tratamientos empíricos seleccionados, así como para estudios epidemiológicos que detecten la presencia de resistencias a antimicrobianos (SEIMC, 2000; Martínez-Martínez, 2003).

El uso de antimicrobianos supuso y ha supuesto una revolución para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el aparente beneficio de su utilización ha llevado a un uso indiscriminado de los mismos, hecho que ya Alexander Fleming apuntó en su discurso de recepción del Premio Nobel (1945): *“No es difícil producir microbios resistentes a la penicilina [...]. Podría venir un tiempo en que la penicilina pueda ser comprada por cualquier persona en una tienda. Entonces, existirá el peligro de que la gente se autoadministre dosis bajas y exponga a los microbios a cantidades no letales de este fármaco, que los vuelvan resistentes”* (Fleming, 1945).

Durante años los antimicrobianos han estado al alcance de la población. Se han utilizado en animales de granja para maximizar su crecimiento e incluso se han utilizado en control de infecciones en agricultura, sin ningún tipo de supervisión. Todo ello, junto a la propia dinámica de las bacterias, que como otros seres vivos no quieren morir, ha contribuido al aumento de resistencias antimicrobianas.

Existen muchos métodos para medir la sensibilidad de microorganismos *in vitro* a antimicrobianos. Sin embargo, y a pesar de esta gran variedad, muchos de los métodos convencionales pueden ser lentos y laboriosos y, en determinadas ocasiones, sufrir problemas de precisión y reproducibilidad lo que conlleva una mala correlación con el resultado terapéutico (Rex *et al.*, 2001; Turnidge y Bordash, 2007a; Turnidge y Paterson, 2007b). Además, la dificultad que supone tratar cierto tipo de infecciones bacterianas, el desarrollo tan preocupante de resistencias y la necesidad de utilizar fármacos más seguros hacen necesario el desarrollo de nuevos procedimientos para paliar estas deficiencias (García-Álvarez *et al.*, 2013).

1. Historia y desarrollo de los métodos de sensibilidad a antimicrobianos

Las primeras descripciones relacionadas con los antimicrobianos datan de finales del siglo XIX de la mano de Louis Pasteur, Robert Koch y Paul Ehrlich (figura 2). Estos pioneros en el campo de la microbiología hacen numerosas referencias al concepto de antibiosis (Wheat, 2001). De hecho, fue Ehrlich quien introdujo por primera vez la idea de atacar los microorganismos sin dañar al hospedador. Así, a principios de 1910, el mismo autor descubre el “salvarsán”, considerado el primer compuesto quimioterápico moderno, capaz de matar el microorganismo causante de la sífilis sin dañar el organismo (Kerr, 2005).



Figura 2. a) Robert Koch. b) Louis Pasteur. c) Paul Erlich. (Imágenes tomadas de <http://www.nobelprize.org> y <http://www.biography.com>).

En 1928, Alexander Fleming determinó el efecto inhibitorio de lo que posteriormente se conocería como penicilina al observar que alrededor de un hongo del género *Penicillium*, considerado un contaminante de las placas de agar, no crecían colonias estafilocócicas (figura 3). Sin embargo, la esencia de este método, que más tarde se conocería como difusión en agar, ya había sido descrito en 1889 por Beijerinck (Beijerinck, 1889). El descubrimiento de la penicilina supuso un antes y un después, ya que permitió el tratamiento de gran variedad de infecciones en la época. Sin embargo, este fármaco no se produjo en grandes cantidades hasta la Segunda Guerra Mundial, lo que propició su uso de forma masiva y supuso el milagro para las infecciones por heridas de guerra (Kerr, 2005) (figura 4). Pero, además de este gran descubrimiento, durante los años 20, Fleming contribuyó al desarrollo de los métodos de sensibilidad a antimicrobianos con otras dos grandes aportaciones. Por un lado desarrolló el método de dilución en caldo usando para

su determinación la turbidez (Fleming, 1929), técnica que se convertiría en la precursora de la metodología actual para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). También introdujo el uso de la técnica de “*ditch plate*” (sin traducción al castellano) (Fleming, 1924).

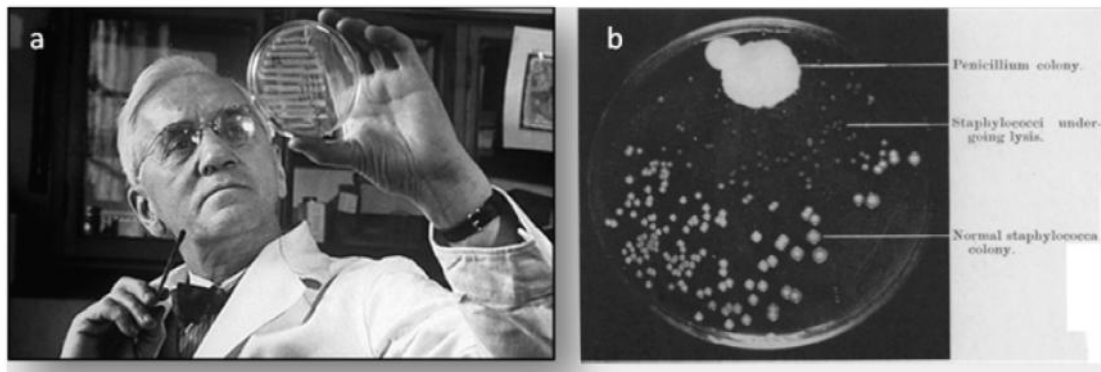


Figura 3. a) Alexander Fleming (Imagen tomada de <http://mx.tuhistory.com>). b) Cultivo en placa mostrando la disolución de las colonias estafilocócicas en las proximidades de una colonia de *Penicillium* (Imagen tomada de Fleming, 1929).



Figura 4. Cartel publicitario del uso de penicilina durante la II Guerra Mundial.

En los años 40, comienzan a desarrollarse métodos de difusión con discos de papel absorbente impregnados en solución antimicrobiana y métodos de dilución en agar para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos, con resultados similares (Schmith y Reymann, 1940; Heatley, 1944; Vincent y Vincent, 1944). En esta época, científicos

como Mohs (precursor del método que más tarde daría lugar a la técnica de Stokes) y Bondi, describen los discos de papel que se utilizan en la actualidad (Mohs, 1945; Bondi *et al.*, 1947). Hoyte y Levine por su parte desarrollan la técnica con pastillas, en vez de con discos de papel, adquiriendo una gran relevancia en el desarrollo de los métodos de difusión (Hoyte y Levine, 1947). Además, Schmith y Reymann describen por primera vez el método de dilución en agar para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos (Schmith y Reymann, 1940).

A finales de la década de los 50, la aparición de distintas variaciones en los métodos para el estudio de la sensibilidad, creó la necesidad de su estandarización tomando las riendas la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 1966, Bauer, Kirby y cols. fomentaron el establecimiento del método de difusión en disco en los laboratorios clínicos (Bauer *et al.*, 1966), método que, en 1975, se convertiría en la base del estándar de difusión en disco del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Durante esos años, son muchos los grupos centrados en la estandarización de los métodos de sensibilidad surgidos hasta el momento. A mitad de los años 70, las limitaciones de las técnicas disponibles hasta la fecha hicieron recomendable el desarrollo de métodos automatizados (Wheat, 2001). Muchos de estos métodos sentarían las bases de los que hay implantados en los laboratorios de microbiología clínica actualmente.

Las técnicas hasta aquí descritas, se basan en la observación de características fenotípicas de los microorganismos para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos. A pesar de ser técnicas con una metodología sencilla, no son rápidas y dependen, en gran medida, de las condiciones experimentales. No obstante, si se conocen bien estas limitaciones y se aplican procedimientos estandarizados, los métodos fenotípicos proporcionan muy buenos resultados con bajo coste (Wheat, 2001). Las desventajas de los métodos fenotípicos y el creciente desarrollo de resistencias favorecieron, que a finales del siglo XX, aparecieran los primeros métodos moleculares basados en características genotípicas de los microorganismos (Courvalin *et al.*, 1991). Estos métodos permitieron la determinación de genes de resistencia.

En los últimos años, el gran avance tecnológico ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos como son la quimioluminiscencia, la espectrometría de masas o la citometría de flujo, entre otros. Sin embargo, y a pesar de la revolución tecnológica en la que estamos inmersos, cabe destacar que, la mayoría de los métodos utilizados hoy en día en los laboratorios de

microbiología siguen basándose en técnicas descritas a principios del siglo XX (Wheat, 2001).

2. Métodos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos

Actualmente, existen muchos métodos para la determinación de la sensibilidad de microorganismos a antimicrobianos. La interpretación de los resultados, que de su aplicación se obtienen, se ajustan principalmente a las normas de organismos reconocidos como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2015) o el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2016) (antiguamente denominado NCCLS). Como ya se ha citado, los métodos más usados se basan en el estudio fenotípico de los microorganismos, es decir, en la observación del crecimiento de una cepa en presencia del antimicrobiano objeto de estudio.

A continuación, se exponen brevemente algunos de los métodos disponibles para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.

2.1 Métodos de difusión

Como se ha descrito en el primer apartado, los métodos de difusión son conocidos desde finales del siglo XIX. Su fundamento se basa en la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano, tras la difusión de un antimicrobiano incluido en una matriz de papel o plástica, a través de una superficie de agar.

2.1.1 Método del antibiograma

El antibiograma es una de las técnicas más antiguas utilizadas para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. Se basa en los estudios de Bauer, Kirby y cols. (Bauer *et al.*, 1966). Este método es uno de los recomendados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad bacteriana a antimicrobianos (SEIMC, 2000; Mandell *et al.*, 2015) y continúa siendo, hoy en día, una de las técnicas más extendidas en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica (EUCAST, 2015).

Se trata de un método simple, que no requiere un equipamiento especial, versátil y bien estandarizado en el que se pueden testar un gran número de antimicrobianos y, además, es aplicable a una gran variedad de bacterias, principalmente a bacterias comunes, de crecimiento rápido, así como a ciertas bacterias fastidiosas (de difícil cultivo) (SEIMC, 2000; CLSI, 2012; EUCAST, 2015).

Se basa en la colocación de discos de papel secante impregnados con concentraciones determinadas de un antimicrobiano en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo objeto de estudio. Al entrar en contacto con la superficie húmeda de agar, el antimicrobiano difunde radialmente desde el disco a través de la gelatina. A medida que la distancia al disco incrementa, la concentración de antimicrobiano disminuye, formándose un gradiente de concentración en el medio alrededor de los discos. Las placas necesitan incubarse durante 16-24 horas y, transcurrido ese tiempo, se pueden visualizar las áreas en las que el antimicrobiano ha impedido el crecimiento bacteriano y los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (figura 5) (SEIMC, 2000; Winn y Koneman, 2006; Jorgensen y Ferraro, 2009; Jenkins y Schuetz, 2012). La lectura de los halos de inhibición proporciona resultados cualitativos que deben interpretarse como sensible (S)ⁱ, intermedia (I)ⁱⁱ o resistente (R)ⁱⁱⁱ, de acuerdo a las categorías establecidas por el CLSI (CLSI, 2016). Aunque éste método no permita la lectura directa del valor de la CMI^{iv}, el tamaño de la zona de inhibición es inversamente proporcional al logaritmo de la CMI de dicho antibiótico. De modo que existen diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano que permiten una correcta interpretación (SEIMC, 2000; Jenkins y Schuetz, 2012).

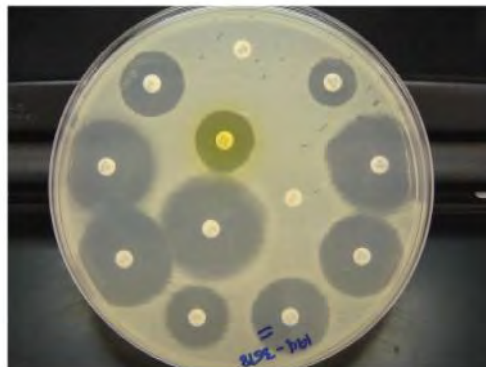


Figura 5. Ejemplo del antibiograma (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).

ⁱ **Sensible:** categoría que implica que la cepa bacteriana es inhibida por las concentraciones habituales de antimicrobiano cuando se usa la dosis recomendada para tratar en el sitio de infección (SEIMC, 2000; CLSI, 2012).

ⁱⁱ **Intermedia:** categoría que incluye las cepas bacterianas cuya CMI a antimicrobianos puede alcanzarse en sangre y tejidos, y para las cuales las tasas de respuesta pueden ser menores que para aislados susceptibles. Esta categoría implica eficacia clínica en localizaciones donde los fármacos están fisiológicamente concentrados o cuando se emplean dosis más altas de lo normal. También incluye casos de antimicrobianos con márgenes estrechos de toxicidad en los que errores técnicos pequeños pueden suponer cambios de interpretación en la categoría (SEIMC, 2000; CLSI, 2012).

ⁱⁱⁱ **Resistente:** categoría que implica microorganismos que no son inhibidos por las concentraciones alcanzables del fármaco a dosis normales y/o que demuestra diámetros que se encuentran en el rango en el que son probables los mecanismos específicos de resistencias, y la eficacia clínica del antimicrobiano frente al microorganismo no se ha demostrado en estudios de forma fiable (SEIMC, 2000; CLSI, 2012).

^{iv} La **CMI** se determina por la concentración más baja de antimicrobiano que impide el crecimiento del microorganismo.

2.1.2 Método de difusión en gradiente o método del Epsilon test (E-test)

El método del E-test (AB BioDisk) es un método comercial basado en el mismo principio que la técnica del antibiograma. Se trata de un método sencillo, aplicable a una gran variedad de bacterias y de antimicrobianos (SEIMC, 2000). El E-test es uno de los métodos más utilizados en los laboratorios de microbiología por su buena concordancia con los métodos de dilución.

La metodología de esta técnica es igual que la del antibiograma con la diferencia de que en el E-test se utiliza una tira de plástico no poroso en la que se incluye un gradiente predefinido de antimicrobiano (figura 6). Destacar que, este gradiente de concentraciones sólo consta en una de las caras de la tira por lo que, en este método, la orientación de tira será determinante para su correcto funcionamiento. Por otro lado, tras la incubación de las placas con la tira, la zona de inhibición presenta forma elipsoidal y simétrica. Este método permite la determinación del valor de CMI mediante lectura directa. La CMI será así el valor indicado en el punto de intersección entre el extremo de inhibición con la tira. La observación directa de los valores de la CMI que se consigue con este método es un avance frente a la técnica del antibiograma, sin embargo, el precio más elevado de las tiras limita su uso (SEIMC, 2000, Martínez-Martínez L, 2003, Winn y Koneman, 2006).



Figura 6. Ejemplo del método de E-test (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).

2.2 Métodos de dilución

Los métodos de dilución se conocen desde principios del siglo XX. Requieren una técnica más compleja que los de difusión y, habitualmente, son más caros. Se basan en la determinación del crecimiento de un microorganismo incubado en un medio de cultivo

(caldo o agar) en el que se encuentra diluido un antimicrobiano en concentraciones crecientes (generalmente en concentraciones crecientes en base 2) (SEIMC, 2000; Mandell *et al.*, 2015). Las concentraciones usadas pueden variar en función del microorganismo y antimicrobiano a estudio así, como de sitio de infección (Jenkins y Schuetz, 2012).

Las técnicas basadas en la dilución permiten determinar la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos a estudio. Además, son los métodos de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos (SEIMC, 2000). Los métodos de dilución se emplean también en sistemas automatizados para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.

2.2.1 Dilución en caldo

El método de dilución en caldo requiere de un medio de cultivo líquido. Según las recomendaciones del CLSI, el más adecuado y utilizado es el caldo Mueller-Hinton (MH) con distintos suplementos según el microorganismo a estudiar (SEIMC, 2000). Para el estudio de microorganismos fastidiosos se pueden utilizar otros medios de cultivo.

a) Método de macrodilución

El método de macrodilución o método de dilución en tubo fue uno de los primeros en utilizarse para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana (Ericsson y Sherris, 1971). Esta técnica utiliza un medio líquido de cultivo en volúmenes iguales o mayores a 1 mL dispensado en una batería de tubos de ensayo. El primero de los tubos se prepara con la concentración más alta de antimicrobiano que se desee estudiar, y a partir de él se preparan diluciones seriadas (Jorgensen y Ferraro, 2009). Posteriormente se inoculan los tubos con una suspensión estándar del microorganismo y se procede a su incubación. Además, se prepara un tubo sin antimicrobiano utilizado como control (SEIMC, 2000). Transcurrido el tiempo necesario, los tubos se examinan por visualización para determinar el crecimiento microbiano que se evidencia por turbidez (figura 7) (Jenkins y Schuetz, 2012).

Esta técnica ofrece resultados cuantitativos en forma de CMI. La metodología que emplea esta técnica es tediosa por la gran cantidad de material y espacio que se necesita para cada prueba, por la cantidad de manipulaciones que requiere y por la posibilidad de errores que de ello pueden derivarse (SEIMC, 2000; Winn y Koneman, 2006; Jorgensen y Ferraro, 2009).

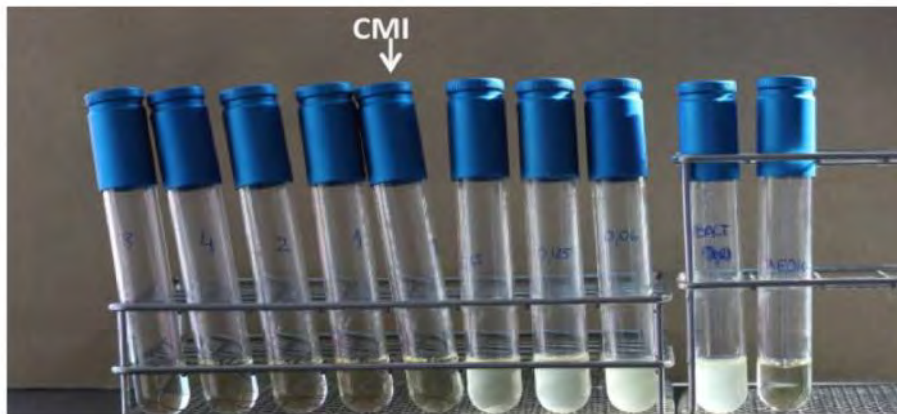


Figura 7. Ejemplo del método de macrodilución.

b) Método de microdilución

La utilización de micropipetas y placas de microtitulación ha permitido la miniaturización y mecanización del método de macrodilución (SEIMC, 2000; Jorgensen y Ferraro, 2009).

Las placas de microtitulación presentan, habitualmente, 96 pocillos en forma de “U” cada uno de los cuales alberga un volumen de 0,1 mL. Este método se desarrolla de la misma manera que el de macrodilución, pero en este caso, cada pocillo representará un tubo de ensayo (figura 8). Las placas de microtitulación se preparan utilizando pipetas multicanal que alicuotan volúmenes muy precisos de forma rápida. Este método también permite obtener resultados en forma de CMI. Dicho valor se interpreta mediante la inspección a simple vista del crecimiento de microorganismos en cada pocillo o mediante métodos automatizados. El uso de dichos sistemas automáticos para la lectura de los resultados supone un incremento en el coste económico (SEIMC, 2000; Winn *et al.*, 2006).

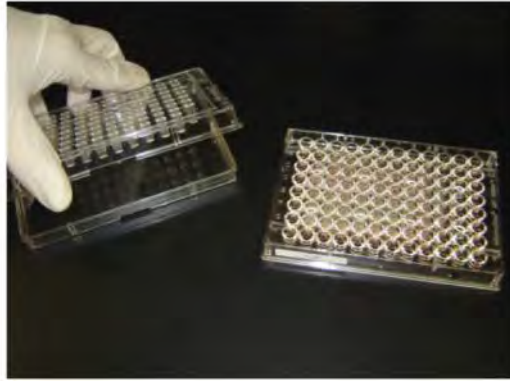


Figura 8. Placas de microtitulación empleadas en el método de microdilución (Imagen tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009).

2.2.2 Dilución en agar

El método de dilución en agar incorpora el antimicrobiano objeto de estudio a un medio con agar cuando aún está fundido. El medio de cultivo más adecuado es agar MH (SEIMC, 2000; Jorgensen y Ferraro, 2009).

La metodología de esta técnica precisa de la preparación de una batería de placas con una determinada concentración de antibiótico en cada una. Una vez solidificado el medio en las placas se inoculan con ayuda de un replicador, que permite la administración de hasta 36 muestras (microorganismos). Se dejan incubar y transcurrido el tiempo necesario se procede a la lectura de las mismas. Este método permite obtener resultados cuantitativos en forma de CMI (SEIMC, 2000; Winn *et al.*, 2006).

La dilución en agar es un método bien estandarizado y reproducible, que permite la evaluación de un gran número de muestras. Sin embargo, la metodología de esta técnica es laboriosa y necesita mucho tiempo para la preparación de las placas, sobre todo cuando se desea estudiar un número limitado de microorganismos y/o testar muchos compuestos. Por estas razones, el método de dilución en agar para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos no suele usarse con frecuencia en los laboratorios de microbiología (Jorgensen y Ferraro, 2009).

2.3 Métodos automáticos

El desarrollo tecnológico junto con ligeras modificaciones en las metodologías disponibles han permitido el diseño de sistemas automáticos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos (Martínez-Martínez, 2003).

La mayoría de los métodos automatizados utilizan la técnica de microdilución y permiten obtener resultados en menor tiempo que con métodos manuales (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016). Además, para la interpretación de los resultados obtenidos con estas técnicas se siguen las normas de antibiograma marcadas por los diferentes Comités (EUCAST (EUCAST, 2015), CLSI (CLSI, 2016)). Entre las limitaciones de estos métodos destacan la complejidad del procesado preanalítico, la variabilidad analítica, el espectro limitado de microorganismos a estudio y, sobre todo, el coste económico (van Belkum y Dunne, 2013).

Los principales métodos automáticos comerciales disponibles son: MicroScan Walkaway (Siemens Healthcare Diagnostics), Vitek (bioMérieux), Phoenix (BD Diagnostics) y Sensititre ARIS (Trek Diagnostic Systems) (figura 9). Los tres primeros permiten la obtención de resultados entre 3,5 y 16 horas, mientras Sensititre ARIS necesita incubaciones de hasta 24 horas (Winn *et al.*, 2006; Jorgensen y Ferraro, 2009). A continuación se exponen brevemente cada uno de ellos.

MicroScan Walkaway (Siemens Healthcare Diagnostics): Este método requiere de la preparación manual de placas de microdilución que una vez inoculadas se colocan en el aparato donde son incubadas el tiempo necesario. Esta técnica realiza exámenes periódicos para la determinación del crecimiento de los microorganismos mediante un fluorómetro o fotómetro y permite el análisis de entre 40 y 96 muestras en un tiempo que oscila entre 3,5 y 18 horas dependiendo del microorganismo en estudio (Jorgensen y Ferraro, 2009).

Vitek (bioMérieux): Existen dos sistemas Vitek, Vitek 1 más antiguo y que permite el análisis de menor número de muestras y Vitek 2, altamente automatizado que permite la realización de hasta 240 análisis. Estos métodos monitorizan el crecimiento antimicrobiano mediante análisis turbidimétricos repetitivos. Los resultados se obtienen entre 4 y 10 horas (Jorgensen y Ferraro, 2009).

Phoenix (BD Diagnostics): Al igual que en el caso anterior requiere de la preparación manual de las muestras. El incubador de este aparato permite el análisis de 99 paneles de estudio. Este método también realiza una inspección periódica, cada 20 minutos usando métodos turbidimétricos y colorimétricos para la detección del crecimiento microbiano. Además, permite la generación de resultados entre 6 y 16 horas (Jorgensen y Ferraro, 2009).

Sensititre ARIS (Trek Diagnostic Systems): Este método permite la inoculación de las placas mediante un autoinoculador. Determina el crecimiento de los microorganismos mediante fluorescencia después de incubaciones de hasta 24 horas. Además, esta técnica permite el análisis de hasta 64 paneles cada uno de los cuales consiste en placas de microdilución de 96 pocillos (Jorgensen y Ferraro, 2009).

Existen otros métodos y variantes de los mismos que son menos utilizados por lo que no se detallan en esta memoria.

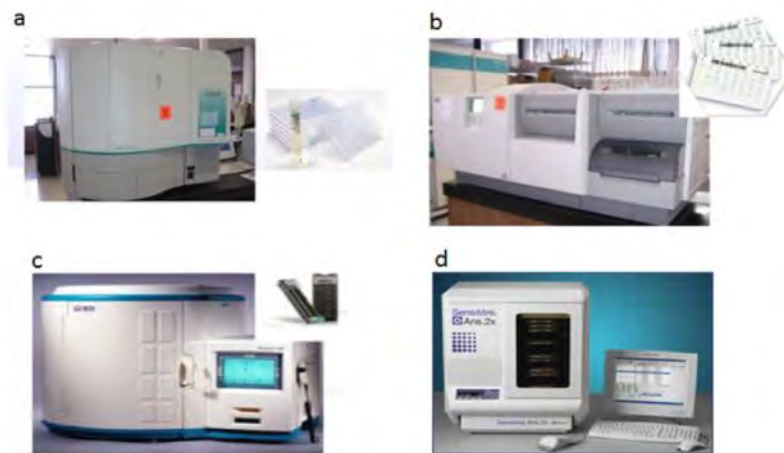


Figura 9. Principales métodos automáticos comerciales. a) MicroScan Walkaway. b) Vitek (bioMérieux). c) Phoenix (BD Diagnostics). d) Sensititre ARIS (Trek Diagnostic Systems) (Imágenes tomadas de <http://www.slideshare.net/MicrobeswithMorgan/susceptibility-testing-review> y de http://www.trekds.com/products/sensititre/c_aris2x.asp).

2.4 Métodos moleculares

El uso de métodos moleculares para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana se orienta principalmente al estudio de mecanismos de resistencia. Estas técnicas no fenotípicas permiten la detección de material genético, tanto de ácido desoxirribonucleico (ADN) como de ácido ribonucleico (ARN) (Martínez-Martínez, 2003; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016; March-Rosselló, 2017).

De entre los diversos métodos moleculares disponibles el que mayor valor diagnóstico presenta es el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (March-Rosselló, 2017).

2.4.1 PCR

La técnica de la PCR, tanto convencional como a tiempo real, se basa en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos.

La metodología consiste en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una cadena simple como molde, mediante la sucesión de ciclos de distinta temperatura. En la PCR se utilizan dos cebadores (iniciadores o “*primers*”) u oligonucleótidos sintéticos pequeños (15-30 bases de longitud), de polaridad opuesta y complementarios a los extremos 3’ de la región que se quiere amplificar. El proceso básico se desarrolla en tres pasos: desnaturalización o separación de las hebras de ADN; apareamiento o unión de los cebadores a sus hebras complementarias; y extensión de la hebra complementaria a partir del cebador respectivo. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana a amplificar. Este proceso cíclico se lleva a cabo en un termociclador, y el ADN así obtenido se carga posteriormente en un gel de agarosa y se puede visualizar por tinción con bromuro de etidio.

Inicialmente, la PCR se utilizó para la identificación genética y cuantificación de microorganismos. Sin embargo, el avance en el conocimiento de las bases genéticas de resistencia a antimicrobianos ha permitido su uso para la detección de genes de resistencia en un gran número de microorganismos (Pulido *et al.*, 2013).

Por su parte, la PCR a tiempo real permite realizar estudios cuantitativos en periodos cortos de incubación. Esta PCR también permite la monitorización de las copias del genoma de un microorganismo en una muestra que se ha incubado en presencia del antimicrobiano a estudio (Pulido *et al.*, 2013). De este modo, se pueden diferenciar cepas sensibles y resistentes. Estas cualidades hacen que esta técnica pueda ser utilizada para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos en bacterias intracelulares y de difícil cultivo o que precisan líneas celulares para el mismo. Así, Rolain y cols., consiguen asignar niveles de inhibición en la síntesis de ADN en presencia de varios antibióticos evaluando la sensibilidad a antimicrobianos de diferentes especies de *Rickettsia* (Rolain *et al.*, 2002). Para ello, utilizan un control negativo compuesto por células no infectadas con antibiótico en el medio de cultivo y un control positivo que consta de células infectadas sin antibiótico. Determinan la CMI como la concentración más baja de antibiótico que causa

la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la determinación del número de copias de ADN que fueron similares al tiempo cero.

La mayor limitación de esta técnica radica en que no siempre la presencia de genes de resistencia se correlaciona con resistencia fenotípica (Pulido *et al.*, 2013). Además, las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de los ácidos nucleicos.

2.4.2 Secuenciación del genoma completo

La secuenciación del genoma completo permite la identificación de genes asociados al desarrollo de resistencias y mutaciones asociadas a las mismas. Gracias a los avances en la secuenciación del material nucleico, estas técnicas se van incorporando en los laboratorios de microbiología clínica lo que puede permitir realizar un “antibiograma rápido”. Este proceso requiere de programas bioinformáticos que permiten el análisis y procesamiento de los datos, mostrando buena correlación con la sensibilidad que se logra con métodos fenotípicos (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016; March-Rosselló, 2017).

Sin embargo, y a pesar de que los costes van disminuyendo, siguen siendo técnicas muy costosas, por lo que la secuenciación del genoma completo no se ha incorporado a la rutina para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos (Torok y Peacock, 2012).

2.4.3 Microarrays

Los sistemas de microarrays se basan en la identificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de oligonucleótidos complementarios. De este modo, los microarrays permiten determinar la secuencia nucleotídica de una muestra, estudiar la expresión génica o determinar variaciones en una secuencia de genes (Pulido *et al.*, 2013).

La metodología de esta técnica consiste en la utilización de una superficie sólida (vidrio, plástico o silicona) a la cual se une una colección de moléculas de ácido nucleico, a las que se denomina sondas, y que suelen ir marcadas mediante fluorocromos, métodos enzimáticos, etc. (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016; March-Rosselló, 2017). Junto a estas sondas se incuban el material nucleico de la muestra a estudio permitiendo, así, medir el nivel de hibridación entre la sonda y la muestra diana. De este modo, el uso de microarrays permite la detección, en un solo ensayo, de un gran número de genes de resistencia con un alto nivel de sensibilidad y especificidad (Pulido *et al.*, 2013).

Es importante destacar que todos los métodos moleculares utilizados para la identificación de genes de resistencia, tienen la posibilidad de detectar mecanismos de resistencia no caracterizados lo que supone una limitación al estudio (Pulido *et al.*, 2013).

Por otro lado, además de los métodos ya descritos, existe una amplia variedad de técnicas comerciales basadas en propiedades moleculares para la detección de genes resistencia de manera rápida y con sensibilidades y especificidades muy altas. Algunos de estos sistemas son: Verigene BC-GP Blood Culture Nucleic Acid Test (Nanosphere), FilmArray Blood Culture Identification Panel (BioFire Diagnostics), Staph ID/R Blood Culture Panel (Great Basin Diagnostics), GENExpert MRSA/SA (Cepheid), GeneOhm Staph SR (Becton Dickinson) o el sistema Hypex BloodScreen PCR ELISA (Amplex Biosystems) (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016; March-Rosselló, 2017).

2.5 Métodos de lisis bacteriana

La determinación de la sensibilidad a antimicrobianos mediante métodos de lisis bacteriana consiste en la incubación de un microorganismo con una concentración determinada de antimicrobiano y su posterior inmovilización en un microgel de agarosa. Este preparado se sumerge en una solución de lisis que dará lugar a la liberación de ADN del microorganismo y a continuación se procede a una nueva incubación en presencia de un fluorocromo SYBR[®] Gold. La observación al microscopio de este preparado permite la visualización de la integridad del material genético (figura 10) (Pulido *et al.*, 2013; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

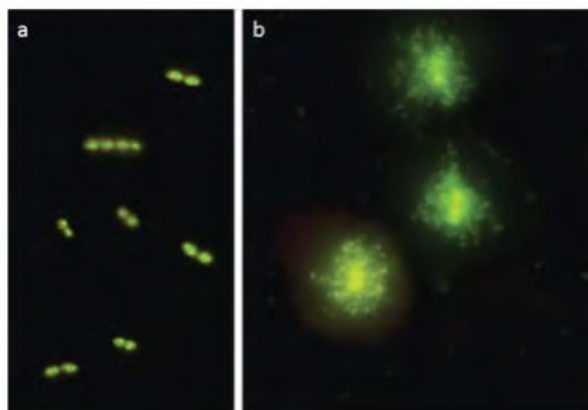


Figura 10. Imagen al microscopio de un preparado por el método de lisis bacteriana. a) Ejemplo de cepa resistente tras incubación con antimicrobiano. b) Ejemplo de cepa sensible tras incubación con antimicrobiano (Imágenes tomadas de Pulido *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo estos métodos se necesita poco menos de dos horas y han mostrado buena correlación con los resultados obtenidos por técnicas de microdilución y de E-test. Además, los métodos basados en la lisis bacteriana, dado que permiten la visualización después de la incubación con diferentes concentraciones antimicrobianas, podrían proporcionar valores aproximados de CMI. Estos métodos, que son válidos para cultivos puros, todavía requieren de más estudios para su aplicación en muestras clínicas (Pulido *et al.*, 2013).

2.6 Microfluidos

El desarrollo de la nanotecnología mediante la creación de chips o plataformas que utilizan volúmenes muy pequeños de reactivos y de muestras (picolitros) ha permitido la miniaturización de ciertas técnicas (Pulido *et al.*, 2013). Así, en función del dispositivo de microfluidos que se utilice para la determinación de resistencias bacterianas o de susceptibilidad a antimicrobianos, los métodos empleados para su detección pueden basarse técnicas bioquímicas, electroquímicas, magnéticas u ópticas, entre otras (por ejemplo, sensores de pH de microfluidos que detectan los cambios de pH que tienen lugar por la acumulación de productos metabólicos en cultivos bacterianos en presencia de antimicrobiano (Tang *et al.*, 2013)). Estas técnicas tienen la ventaja de poder ser automatizadas, proporcionar resultados rápidos y, dado su reducido tamaño, incorporarse en dispositivos portátiles. Además, sus resultados se correlacionan bien con métodos fenotípicos (Pulido *et al.*, 2013).

2.7 Nefelometría

La nefelometría es una técnica basada en la dispersión de luz para la realización de antibiogramas. Entre los métodos que utilizan esta técnica se encuentra el sistema UroQuick (Alifax) o HB&L (Alifax). Este sistema detecta la desviación de la luz de una muestra de orina, que mediante el análisis de un software, determina la concentración microbiana mediante curvas de crecimiento permitiendo la detección fenotípica de resistencias (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016; March-Rosselló, 2017). La preparación manual de alícuotas de orina positivas con el antimicrobiano permite determinar la sensibilidad del microorganismo con buena concordancia respecto a los métodos de difusión (Roveta *et al.*, 2006). Además, la complementación de este método con el sistema VITEK2 permite la realización de un antibiograma directo (Ilki *et al.*, 2010).

2.8 Métodos colorimétricos

Los métodos basados en técnicas colorimétricas se basan en la capacidad redox de determinados indicadores, que presentan diferentes colores según se encuentren en su forma reducida u oxidada.

Uno de los métodos más utilizados y conocidos es el que utiliza el compuesto resazurina. La resazurina es un indicador de color azul (no fluorescente) cuando está en estado oxidado y cambia a un compuesto rojo (fluorescente), denominado resorufina, cuando se encuentra en un ambiente reductor. Este compuesto se añade al medio de cultivo con el microorganismo a estudio y que contiene el antimicrobiano a testar. Así, cuando un microorganismo es sensible a un antimicrobiano, éste inhibe su metabolismo y la resazurina permanece inalterable en su forma azul. Sin embargo, cuando el microorganismo es resistente al antimicrobiano a estudio, la capacidad metabólica del microorganismo origina sustancias reductoras que provocan el cambio de color del indicador al rojo. Se trata, por lo tanto, de un método que permite determinar la sensibilidad antimicrobiana visualmente. Este método colorimétrico es sencillo y barato, ya que no requiere un equipamiento especial y permite la obtención de resultados de manera rápida (entre 2 y 24 horas) (March-Rosselló *et al.*, 2015; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

Otro método colorimétrico utilizado es el ensayo de la nitrato reductasa. Este método se basa en medir la actividad de enzima nitrato reductasa de los microorganismos. Del mismo modo que antes, si el microorganismo es resistente al antimicrobiano a estudio, cuando en el medio se añaden iones nitrato (NO_3^-) se reducen a iones nitrito (NO_2^-), que dan lugar a un indicador de color rojo mediante el test de Griess (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

2.9 Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia es el fenómeno mediante el cual, en una reacción química, tiene lugar una especie electrónicamente excitada que emite radiación al volver a su estado fundamental. La energía emitida no sólo se produce en forma de calor o de energía química, sino que puede emitirse en forma de luz.

La quimioluminiscencia ha demostrado ser un método sensible en estudios de viabilidad celular y de microorganismos, lo que ha permitido su aplicación en la determinación de la

sensibilidad a antimicrobianos. Para ello, es necesario la adición de menadiona, un compuesto luminiscente, a un cultivo microbiano, la cual penetra en el interior de los microorganismos donde se reduce y genera diversos compuestos al medio que, al autooxidarse, provocan la emisión de luz. Esta capacidad permite que se pueda llevar a cabo una comparación de la señal quimioluminiscente de microorganismos incubados con el antimicrobiano a estudio frente a microorganismos incubados sin antimicrobiano, a distintos tiempos. Así, si el microorganismo es sensible al antimicrobiano, la señal detectada será menor que aquella que se obtenga en el cultivo sin antimicrobiano (Manome *et al.*, 2003; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

El uso de esta técnica para estudios de sensibilidad con determinados microorganismos ha permitido la obtención de resultados en poco tiempo y con una concordancia de la CMI de entre el 88 y 100% con otras técnicas (Manome *et al.*, 2003; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

La bioluminiscencia (un tipo de quimioluminiscencia en el que se genera luz a partir de una reacción química que tiene lugar en organismos vivos) también se ha utilizado en el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. Este proceso se basa en la oxidación de una sustancia luminiscente, luciferina, en presencia de adenosín trifosfato (ATP) por acción de la enzima luciferasa. Dado que la cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la reacción, la medida de los niveles de ATP permite determinar la sensibilidad. La determinación de la CMI se realiza mediante la comparación de la señal de ATP obtenida de un cultivo con antimicrobiano frente a la señal que se obtiene del cultivo sin el fármaco a diferentes tiempos (Wheat *et al.*, 1989; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016). Además, las características de esta técnica han permitido el estudio de la sensibilidad a determinados antimicrobianos directamente sobre muestras de orina (Ivanic *et al.*, 2008).

Los resultados que se obtienen mediante el uso de bioluminiscencia también muestran buena correlación con los obtenidos mediante otros métodos (Ivanic *et al.*, 2008; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016).

2.10 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico celular que consiste en hacer pasar una suspensión de células (o partículas microscópicas) alineadas, a gran velocidad (hasta miles de células/segundo), por delante de un haz de láser focalizado

(March Rosselló y Bratos Pérez, 2016). El impacto de cada célula con el haz de láser produce señales recogidas por detectores de manera que permite medir simultáneamente múltiples características físicas y químicas de las células. Estas características permiten, por tanto, utilizar esta técnica para el recuento y clasificación de células, entre otros.

Para el análisis a nivel molecular (análisis de proteínas extracelulares, secuencias de ADN y ARN, etc) se requiere del uso de citometría de flujo fluorescente. Esta técnica se ha utilizado para estudios de sensibilidad a antimicrobianos desde hace más de 30 años (Martínez *et al.*, 1982). El uso de distintos fluorocromos ha permitido llevar a cabo estos análisis en bacterias y en hongos, ya que sólo se tiñen aquellos microorganismos cuyas células presentan alteraciones en la membrana (Ramani y Chaturvedi, 2000; Pina-Vaz *et al.*, 2005). La citometría de flujo fluorescente aplicada al estudio de la sensibilidad a antimicrobianos permite la determinación de CMI y diferenciar entre cepas sensibles, intermedias o resistentes. Además, la obtención de resultados con esta técnica es rápida y reproducible con buena correlación con los métodos de referencia (Cohen y Sahar, 1989; Ramani y Chaturvedi, 2000; Broeren *et al.*, 2013).

2.11 Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica en dos etapas en la que la formación de un determinado complejo es observable al microscopio de fluorescencia. Para ello, se pone en contacto un sustrato conocido (células que contienen un microorganismo) con un suero del que se sospecha la presencia de anticuerpos específicos. En caso de que el suero presente dichos anticuerpos (reacción positiva) se formará un complejo antígeno-anticuerpo no visible. Para conseguir su visualización al microscopio es necesario un segundo paso que comprende la adición de una anti-inmunoglobulina marcada, que reaccionará con el anticuerpo del complejo anterior.

Esta metodología, no habitual para la realización de estudios de sensibilidad a antimicrobianos, se ha utilizado con dicho fin en bacterias para las cuales no se dispone de técnicas estandarizadas. Así, mediante IFI se ha logrado observar la inhibición/disminución de bacterias en presencia de diferentes concentraciones de antimicrobiano y determinar así la CMI (Ives *et al.*, 2000).

2.12 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight*) es una tecnología de alta resolución basada en la comparación de “huellas dactilares” proteicas con una base de datos de espectros de referencia. Aunque en los últimos diez años ha tenido lugar un gran auge de esta herramienta para la identificación rutinaria de microorganismos patógenos, su aplicación para identificación de bacterias se conoce desde hace más de 30 años (Anhalt y Fenselau, 1975).

Para llevar a cabo la identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF es necesario mezclar colonias de microorganismos con una disolución matriz que co-cristaliza cuando el solvente se evapora. Esta mezcla es irradiada mediante un láser en alto vacío, de tal manera que, al absorber la luz láser se produce la sublimación de los componentes. Así, la absorción de energía, por parte de la matriz, se convierte en energía de excitación y en transferencia de protones a la muestra (ionización), que en parte son captados por las proteínas de los microorganismos, generándose fragmentos de proteínas cargados positivamente. De este modo, los iones se guían mediante un campo eléctrico hasta un analizador de masas de acuerdo a su carga de masa (m/z), lo que permitirá la determinación de la masa molecular de cada ion. Ya en el detector, dado que normalmente mediante esta técnica la carga (z) es igual a uno, se generará un espectro de masas representando la intensidad frente a la masa de los iones. Este espectro, conocido también como “huella peptídica”, es único para cada microorganismo y será el que se compare con una base de datos para lograr la identificación del microorganismo (Demirev *et al.*, 1999; Croxatto *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014; March Rosselló y Bratos Pérez, 2016). En la figura 11 se muestra un espectrómetro de masas y un ejemplo de un espectro obtenido mediante esta técnica.

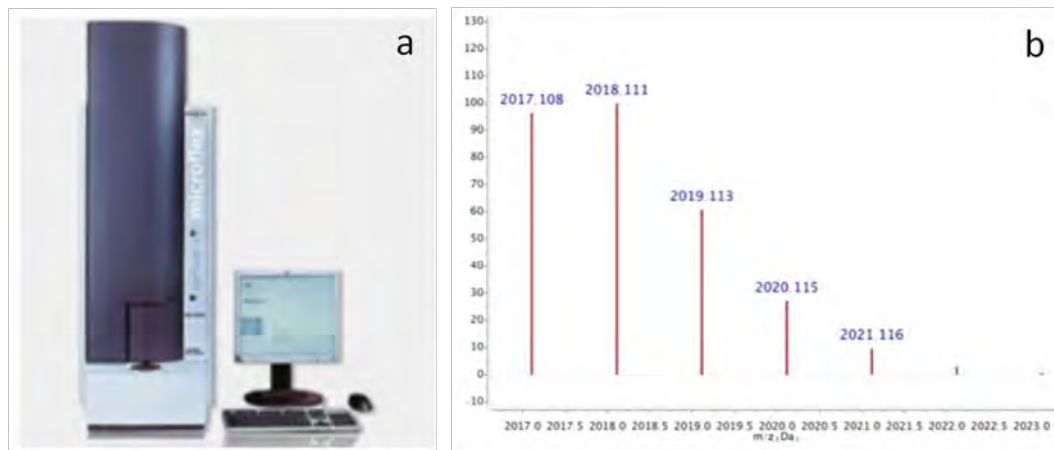


Figura 11. a) Espectrómetro de masas (Imagen tomada de <https://www.bruker.com>). b) Espectro de masas.

A pesar de que la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación de microorganismos está asentada, su uso para el estudio de la sensibilidad de microorganismos a diferentes antimicrobianos es muy reciente y supone una de sus principales limitaciones (Muñoz Bellido *et al.*, 2015). Su aplicación en este sentido permite obtener información respecto a determinados grupos de antimicrobianos, pero no de perfiles globales de sensibilidad. La técnica de MALDI-TOF permite realizar estudios de resistencia a antimicrobianos debidas a la hidrólisis o degradación enzimática de antimicrobianos, sin embargo, dado que muchas veces los mecanismos de resistencia están ligados a mecanismos no hidrolíticos, esta técnica permite llevar a cabo estudios de resistencia pero nunca de sensibilidad (Zboromyrska *et al.*, 2014; Muñoz Bellido *et al.*, 2015). Así, la técnica de MALDI-TOF cuenta como principal limitación para estudios de sensibilidad a antimicrobianos la posibilidad de que un antimicrobiano cuente con un mecanismo de resistencia diferente al de la actividad enzimática, como bombas de expulsión o pérdida de porinas. Para predecir si las bacterias contienen enzimas encargadas de la degradación de antimicrobianos con la metodología de MALDI-TOF se requiere de la incubación previa del microorganismo aislado con el compuesto antimicrobiano durante un determinado tiempo, y posterior análisis mediante espectrometría de masas. El espectro permite observar, en el caso de que el microorganismo presente la enzima, la desaparición del pico correspondiente al antimicrobiano y la generación de picos resultantes de su rotura. Si el microorganismo no hidroliza el fármaco, entonces sólo se observará el pico correspondiente al antimicrobiano (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016). El uso de esta técnica ha permitido detectar

carbapenemasas, diferenciar cepas de enterococos y *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a vancomicina y meticilina, respectivamente, entre otros (Du *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2005; Hrabak *et al.*, 2011; Griffin *et al.*, 2012).

En contraposición a las limitaciones con las que cuenta esta metodología, la espectrometría de masas MALDI-TOF también presenta numerosas ventajas. Tiene bajo coste por muestra (una vez hecha la inversión inicial del aparato) y es rápida (Zboromyrska *et al.*, 2014). Debido a las limitaciones que presenta esta técnica para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos, basada en la hidrólisis de los antimicrobianos, se han desarrollado nuevas estrategias, aún en desarrollo, para llevar a cabo estos estudios con independencia de los mecanismos de resistencia y los antimicrobianos implicados (Muñoz Bellido y González Buitrago, 2015). Una de estas estrategias se basa en que la técnica de MALDI-TOF permite realizar estudios con antimicrobianos marcados isotópicamente, de manera que el aparato podrá detectar el isótopo en aquellos microorganismos que, por ser resistentes al compuesto, hayan incorporado el isótopo (Demirev *et al.*, 2013). Al hilo de ello, está el método *MS-RESIST*, en el que se incorporan aminoácidos marcados al medio donde se incuba el microorganismo con el antimicrobiano, de manera que, dado que los microorganismos resistentes se multiplicarán más activamente, incorporarán mayores cantidades del aminoácido marcado, generando espectros diferentes a los que producirían los microorganismos sensibles. Por otro lado, el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF cuantitativa también permite llevar a cabo estos estudios, mediante la cuantificación de picos en presencia y ausencia del antimicrobiano (Sparbier *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2014; Muñoz Bellido y González Buitrago, 2015).

En la tabla 1 se muestran de forma resumida las características de los principales métodos utilizados para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos descritos en este apartado.

Tabla 1. Resumen de los principales métodos de sensibilidad a antimicrobianos (Modificada de van Belkum y Dunne, 2013).

Método para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos	Descripción	Manual (M)/ Automático (A)
Métodos de difusión		
Método del antibiograma	Medición diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de un disco con concentración determinada de antimicrobiano	M/A
E-test	Medición de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de antimicrobiano	M/A
Métodos de dilución		
Dilución en caldo	Inhibición del crecimiento en medio líquido con antimicrobiano	M/A
Dilución en agar	Inhibición del crecimiento en medio sólido con antimicrobiano	M
Métodos automáticos (MicroScan, Vitek, Phoenix y Sensititre ARIS)	Empleo de métodos de microdilución basados en mediciones fluorimétricas y turbidimétricas	A
Métodos moleculares		
PCR	Amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos	M/A
PCR tiempo real	Asignación de niveles de inhibición de síntesis de ADN en presencia de antimicrobiano	M/A
Secuenciación genoma completo	Secuenciación de todo el ADN y ARN celular	A
Microarrays	Identificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso sondas marcadas	A
Métodos de lisis bacteriana	Detección de fluorescencia al microscopio de la integridad del material genético	M
Microfluidos	Detección electroquímica, magnética u óptica del crecimiento de microorganismos en presencia de antimicrobiano	M/A
Nefelometría	Detección de la desviación de la luz de un cultivo con antimicrobiano	M/A
Métodos colorimétricos	Detección óptica de cambios de color de indicadores en función del metabolismo de microorganismos	M/A
Quimioluminiscencia		
	Detección de la emisión de luz tras reducción por parte de los microorganismos de la sustancia luminiscente	M/A
Bioluminiscencia	Medida de los niveles de ATP de un cultivo tras oxidación de sustancia luminiscente en presencia de ATP	M/A
Citometría de flujo	Detección de señales fluorescentes en microorganismos con alteraciones en la membrana	M/A
Inmunofluorescencia indirecta	Ausencia o disminución de fluorescencia en muestras en presencia de antimicrobiano	M
MALDI-TOF	Detección de productos de degradación del antimicrobiano	A

3. Resonancia magnética nuclear

El avance científico y tecnológico que ha tenido lugar en los últimos años ha permitido desarrollar nuevas técnicas que facilitan y mejoran el estudio microbiológico. En este apartado se describen los fundamentos de la técnica de espectroscopia de RMN y sus aplicaciones en el campo de la microbiología clínica.

3.1 Introducción

El origen de la técnica espectroscópica de la RMN se remonta a 1946 cuando Felix Bloch y Edward M. Purcell observaron por primera vez señales debidas a la RMN. Desde entonces, se ha convertido en una herramienta poderosa e interdisciplinaria, indispensable para químicos, físicos, bioquímicos y más recientemente para la práctica médica, lo que se ha confirmado por la concesión de varios Premios Nobel en los campos de la Física, la Química y la Medicina (Friebolin, 2005; Jaconsen, 2007; Lindon *et al.*, 2007; Powers, 2009).

A pesar de que la aplicación más extendida de la RMN es la determinación estructural de moléculas, por medio del análisis e interpretación de los espectros obtenidos de las muestras, también, y desde hace años, el análisis de mezclas ha constituido una aplicación importante de la espectroscopia de RMN. Además, el auge reciente en el campo del análisis de mezclas metabólicas ha hecho que la RMN tenga un gran impacto en esta área.

Comparada con otras técnicas analíticas, la espectroscopia de RMN tiene unas características especiales que la hacen adecuada para el análisis de mezclas. Por naturaleza, se trata de una técnica cuantitativa, altamente reproducible y robusta, y requiere una simple preparación de la muestra. Además, las muestras pueden ser estudiadas a menudo en su estado natural, sin necesidad de tratamiento previo. Es por ello que la metabolómica y la metabonomía se están convirtiendo en una poderosa fuerza impulsora de desarrollo técnico en el ámbito de la RMN. De esta manera, la posibilidad de analizar mezclas directamente mediante métodos basados en RMN, junto con la introducción de métodos poderosos y sofisticados de análisis estadístico y quimiométrico para estudiar los resultados obtenidos, están haciendo que la espectroscopia de RMN sea el método de elección para el análisis de mezclas complejas biológicas, resultando de gran interés en investigación clínica y médica (Lindon *et al.*, 2007; Powers, 2009).

En lo que respecta a la investigación de sistemas biológicos mediante RMN, se pueden distinguir tres tipos de aplicaciones (Gadian, 1995). En primer lugar, el estudio de la estructura y función de macromoléculas. En segundo lugar, el estudio de los cambios metabólicos en organismos ante estímulos externos, por medio de la identificación y cuantificación de metabolitos (metabolómica/metabonómica). Y por último, la obtención de imágenes *in vivo* con la técnica de tomografía por resonancia magnética de imagen, utilizada en diagnóstico médico.

El uso de la RMN para estudios metabólicos ya fue descrito en 1977, cuando se observaron señales de protón de una serie de compuestos (como lactato, piruvato, creatinina y alanina) en una suspensión de célula sanguíneas (Brown *et al.*, 1977). Desde entonces, se han llevado a cabo, con éxito, análisis por RMN de fluidos biológicos, tejidos y extractos celulares, para la investigación de enfermedades y procesos toxicológicos (Nicholson *et al.*, 2002; Lindon *et al.*, 2003). Para el auge de este tipo de estudios ha sido importante no sólo el aumento de la intensidad de los campos magnéticos, sino también el desarrollo de nuevos programas de pulsos y la mejora en el procesado y análisis de los datos obtenidos.

3.2 Fundamentos de la RMN

El fenómeno de la RMN solo puede describirse rigurosamente y comprenderse en su totalidad a través de la mecánica cuántica; así un entendimiento completo de la técnica requeriría el conocimiento exhaustivo de las propiedades del momento angular en el ámbito de la mecánica cuántica, junto con conocimientos de termodinámica estadística necesarios para describir los procesos fluctuantes en estado líquido. Sin embargo, dado que la teoría y fundamentos de la RMN han sido plenamente desarrollados a lo largo de los últimos años (Ernst *et al.*, 1990; Goldman, 1991) y su descripción detallada se aleja del objetivo de este trabajo, a continuación se describen algunos aspectos de la técnica, que pueden ayudar a la comprensión del equipamiento y metodologías utilizados en las investigaciones metabólicas.

El fundamento de la técnica de RMN consiste en aprovechar las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, que vienen definidas por su momento angular (P) y su momento magnético asociado (μ). Ambos momentos son magnitudes vectoriales y están relacionados entre sí por una constante, denominada constante giromagnética (γ), que es característica de cada tipo de núcleo atómico ($\mu = \gamma P$). De acuerdo con la mecánica

cuántica, ambos momentos están cuantizados y su valor depende de un número cuántico conocido como espín. No todos los núcleos son válidos para obtener señales de RMN, sólo aquellos cuyo espín es mayor que cero. Por otra parte, cuanto mayor sea la constante γ , más sensible será el núcleo activo en RMN. Así, el ^1H ó protón es el núcleo más utilizado en estudios de RMN por su gran abundancia (100%), número de espín 1/2 y alto valor de γ . No obstante, pueden usarse otros núcleos magnéticamente activos de menor sensibilidad, como ^2H (ó D), ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P y ^{23}Na , bien sea por su menor abundancia natural o por su menor γ .

Ciñéndonos al caso del protón, en presencia de un campo magnético externo (B_0), el momento magnético de estos núcleos se intenta alinear con B_0 , resultando dos orientaciones posibles de dicho momento. Al colocar una muestra en el campo magnético del equipo se produce una alineación y acomodamiento de los espines en estos dos estados y un pequeño peso de ellos se ubicará en el estado de energía más bajo, alineado con el campo. Esto genera una magnetización neta M_z . A cada una de estas orientaciones le corresponde un nivel de energía diferente. Es decir, en presencia de un B_0 , los núcleos pueden disponerse en dos nuevos estados con distinta energía. A este fenómeno, desde un punto de vista vectorial, se le conoce también como magnetización.

Para poder obtener una señal de RMN, se irradia la muestra con un pulso de radiofrecuencia perpendicular a B_0 , lo que provoca que se alcance la situación de resonancia, en la que los núcleos giran con una frecuencia de resonancia (ν_0), propia de cada núcleo atómico y denominada frecuencia de Larmor. Por esta razón, los espectrómetros de RMN se denominan por la frecuencia de resonancia del ^1H en lugar del campo magnético (por ejemplo, a un campo de 14,1 Teslas, el ^1H resuena a 600 MHz). Con este pulso de radiofrecuencia se consigue apartar del equilibrio la magnetización neta. Una vez finalizado el pulso, los núcleos excitados vuelven al estado de equilibrio inicial emitiendo una señal de radiofrecuencia, que va decayendo con el tiempo, fenómeno conocido como relajación. La relajación de cada protón de la molécula va a depender del entorno, es decir, de los otros núcleos que tiene alrededor, lo que va a poder dar una importante información estructural. Esta señal es la FID (decaimiento libremente inducido), que llega al receptor y por medio de una operación matemática conocida como Transformada de Fourier, proporciona un espectro formado por líneas que definen frecuencias y amplitudes (figura 12). Las amplitudes se forman con las contribuciones de todos los núcleos de la muestra, por lo que esta cualidad permite realizar determinaciones

cuantitativas. Una línea del espectro de RMN que se obtiene a una determinada frecuencia (o desplazamiento químico), corresponde a un núcleo atómico con un determinado entorno químico, lo que permite obtener información estructural acerca de la molécula a la que pertenece.

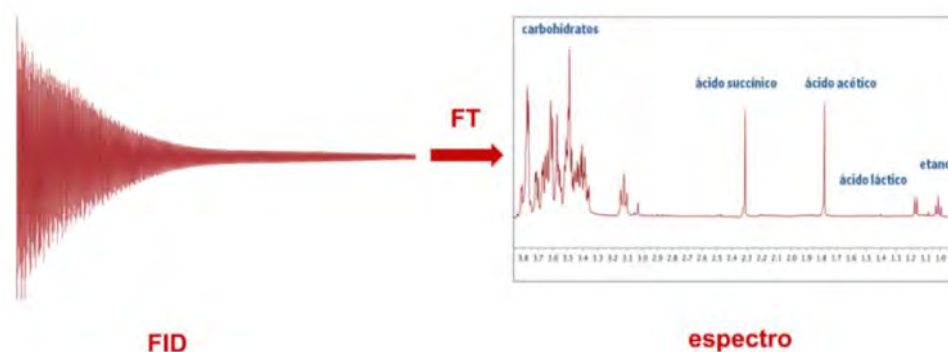


Figura 12. Ejemplo de un espectro de RMN (FID: decaimiento libremente inducido; FT: Transformada de Fourier).

3.2.1 Equipamiento

De forma general, el espectrómetro de RMN consta de varios componentes integrados, capaces de realizar todos los procesos necesarios para obtener un espectro de RMN a partir de una muestra: imán, sonda, consola y ordenador. Debido a la especial naturaleza de los estudios metabólicos (amplio rango de metabolitos para analizar, gran cantidad de muestras disponibles) se requiere un alto grado de automatización en los procesos de preparación de la muestra, realización del análisis y procesado, y evaluación de los datos (que puede incluir trabajar con bases de datos y procesamiento de los mismos). A continuación, se describirá de forma esquemática y desde un punto de vista metabólico, el equipamiento de un espectrómetro de RMN.

- El imán es la parte fundamental del equipo, puesto que genera el campo magnético inductor de la magnetización. En la actualidad se basan en el uso de superconductores realizados con materiales que sólo presentan dicha propiedad a temperaturas cercanas al cero absoluto, por lo que deben estar inmersos en helio

líquido. Cuanto más alto sea el campo magnético, mayor será la frecuencia de resonancia de los núcleos y se resolverán mejor las señales de los distintos metabolitos. En la actualidad, se han alcanzado campos de hasta 23,5 Teslas (o 1000 MHz de frecuencia para ^1H), pero dado su alto coste, la mayoría de estudios metabólicos citados en la literatura se han llevado a cabo en equipos entre 400 y 600 MHz.

- La sonda es el compartimento donde se coloca la muestra, bien en tubos de cristal de diversos diámetros o en continuo a través de un capilar (sonda de flujo). La sonda también posee los sensores para emitir pulsos de radiofrecuencia y recibir las señales de RMN de los núcleos. Recientemente, nuevos desarrollos tecnológicos en la sonda han permitido mejoras en la obtención de datos de la muestra, como las sondas criogénicas (que no congelan la muestra) y el RMN de alta resolución con rotación en ángulo mágico (HRMAS) que permite la RMN en estado sólido.
- La utilización de un sistema automatizado para introducir la muestra en la sonda es un requisito casi indispensable en los estudios de metabonomía, por la gran cantidad de muestras y los pequeños volúmenes disponibles. Para ello se utilizan diversos cambiadores de muestras. En las sondas de flujo las muestras se colocan en una placa de muestras.
- La consola electrónica contiene el transmisor, que genera los pulsos de radiofrecuencia, así como la unidad amplificadora de gradientes, tecnología aconsejable para poder llevar a cabo experimentos metabólicos. También controla la homogeneidad del campo magnético y detecta la señal de la FID proveniente de la muestra, a través del receptor.
- Por último, el ordenador es el encargado de procesar la FID, aplicando la Transformada de Fourier para proporcionar el espectro con las intensidades y frecuencias. También lleva a cabo el procesamiento y evaluación de los datos.

En la figura 13 se muestra un esquema general de los componentes de un equipo de RMN.

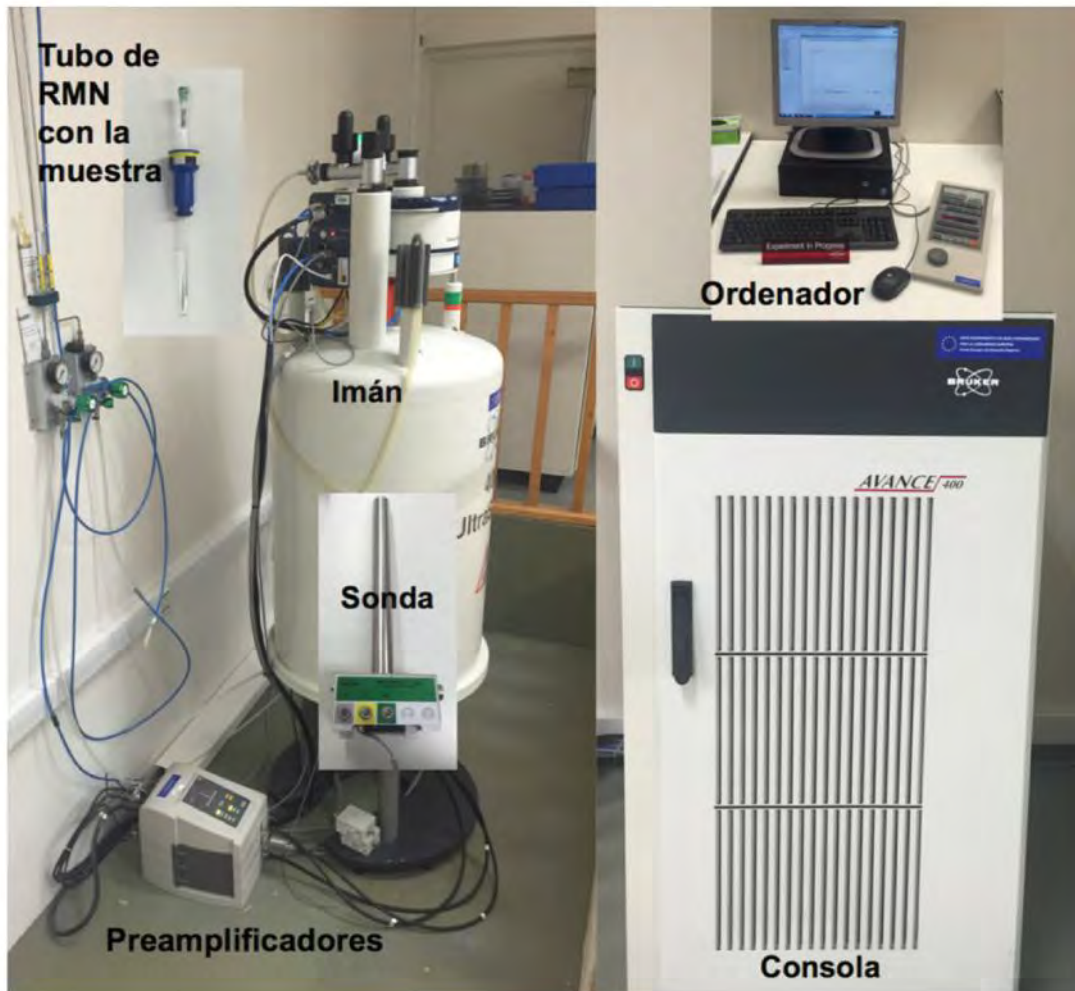


Figura 13. Componentes de un equipo de RMN.

3.2.2 Tratamiento de la muestra

La obtención de espectros de RMN de calidad depende de diversas variables que influyen en el proceso que va desde la recogida de la muestra hasta la obtención de los datos finales. La recogida de la muestra implica muchos parámetros que pueden afectar a la calidad de la muestra, como son: el tipo y el medio de la muestra, los contenedores usados, aditivos (preservantes, estabilizantes) o el tiempo (recogida, transporte, almacenamiento) (Price *et al.*, 2005).

La espectroscopia de RMN de muestras biológicas precisa un pequeño tratamiento previo en función del experimento o programa de pulsos que se ejecute. La preparación de la muestra requiere, por lo general, pocos y simples pasos, para evitar la introducción de compuestos ajenos a ella. Además, se necesita una buena reproducibilidad y robustez en

el proceso, dado el alto número de muestras y la obtención de señales débiles y poco resueltas en algunos casos.

Con cualquiera de los tipos de experimento que se realicen, es preciso obtener una homogeneidad en los desplazamientos químicos de todos los espectros realizados. Para ello, es conveniente adquirir los espectros a un mismo pH, ya que el desplazamiento químico es sensible a esta variable. El pH se puede ajustar con una disolución amortiguadora fosfatada. La presencia de metales en el medio de la muestra, también puede afectar al desplazamiento químico. Es por esta razón por lo que se adiciona ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en algunos casos, que forma quelatos con los metales presentes, no interfiriendo en las señales de RMN.

Una vez realizados estos ajustes se pueden utilizar dos metodologías diferentes para la adquisición del experimento cuando estamos operando con una muestra biológica acuosa:

- A) Concentración de la muestra por medio de liofilización y posterior reconstitución con un disolvente deuterado. Con esta metodología se pueden realizar experimentos de RMN sin supresión de disolvente, permitiendo aumentar la sensibilidad de la técnica y detener la actividad enzimática. Tiene el riesgo de introducir contaminantes y, sobre todo, de pérdida de compuestos volátiles, además de emplear más tiempo en la preparación de la muestra.
- B) Adición de una pequeña cantidad de agua deuterada (D_2O) sobre la muestra acuosa. El experimento de RMN correspondiente se realiza con un programa de pulsos que permite suprimir la señal de agua, que, de otra manera, enmascararía las señales del resto de la muestra. Este método implica una mínima manipulación de la muestra y la posibilidad de detectar compuestos volátiles, siendo el más adecuado para el análisis de metabolitos procedentes de células vivas.

Además de todos estos procesos, al ser los microbios muestras biológicas potencialmente contagiosas, en el transcurso de todos los pasos del tratamiento de muestras, en tanto no estén inactivados los organismos, se debe trabajar en condiciones de seguridad, por medio de protocolos y laboratorios con el nivel de bioseguridad adecuado al organismo.

3.2.3 Tratamiento de datos

El tratamiento de los datos de RMN obtenidos, hasta extraer conclusiones y tendencias, es fundamental para completar los estudios de metabonomía. En primer lugar, se realiza el pre-procesado de los datos de RMN, etapa en la que se refinan los espectros de RMN y se

eliminan interferencias y datos erróneos. Una vez tratados los espectros, se puede obtener información de los metabolitos, bien a través de la cuantificación directa mediante patrones (Avenozza *et al.*, 2006; Lopez-Rituerto *et al.*, 2009; Lopez-Rituerto *et al.*, 2012) o aplicando los métodos de análisis de datos y modelado. En este último caso se utilizan técnicas de quimiometría y análisis multivariante, para poder identificar y cuantificar los diferentes metabolitos presentes en la muestra. La existencia de bases de datos de RMN de metabolitos puede facilitar en gran medida estos últimos procesos.

3.3 Estado actual

No existen estudios realizados con RMN para medir la sensibilidad antimicrobiana de bacterias. Sin embargo, esta técnica analítica de alto rendimiento, aplicable a células vivas, si se ha usado para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos de diversos hongos, para la determinación de metabolitos en mezclas complejas y ha sido ampliamente usada para la identificación y cuantificación de especies bacterianas, entre otras.

3.3.1 Estudios de sensibilidad a antifúngicos mediante RMN

Los métodos estandarizados disponibles en la actualidad para realizar estudios de susceptibilidad con hongos son poco fiables y relativamente lentos. La espectroscopia de RMN puede ser un indicador sencillo, objetivo, rápido (los cambios metabólicos detectados por este método son visibles más rápidamente que la inhibición del crecimiento en el caldo de cultivo) y potencialmente valioso para determinar la composición metabólica de suspensiones de levaduras incubadas con fármaco. Además, se trata de un método automatizado, de alto rendimiento y bajo gasto de funcionamiento, de manera que se reducen considerablemente los costes de reactivos y el tiempo del operador. Tiene, por tanto, gran potencial para consolidarse como método alternativo para la determinación de la susceptibilidad a fármacos antifúngicos de diferentes especies de hongos (Coen *et al.*, 2006; Plummer *et al.*, 2007).

Los pocos trabajos en los que se ha aplicado la técnica de RMN para observar el efecto de microorganismos frente a determinados fármacos se han realizado con hongos de relevancia médica. Las especies fúngicas analizadas han sido *Cryptococcus neoformans*, distintas especies de *Candida* y de *Aspergillus* como *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. flavus*. Estos estudios se basan en la identificación de los metabolitos fúngicos producidos, en la realización de perfiles comparativos de éstos y, en el seguimiento de la utilización de nutrientes desde el medio de incubación en presencia de

determinadas concentraciones de fármaco (caspofungina, anfotericina B y voriconazol). Para la monitorización de las respuestas metabólicas se utilizó la espectroscopia de RMN de ^1H , mediante un espectrómetro Bruker Avance (Bruker Corporation) a una frecuencia de 600 y 360 MHz. Los espectros obtenidos tras someter la muestra a RMN se interpretan en función de los metabolitos producidos (fumarato, malato, etanol...) y/o consumidos (tirosina, fenilalanina, valina...) estableciendo un parámetro medible, el MEP o punto final metabólico, a partir del área de los picos espectrales. Éste se define como la concentración de fármaco más baja en la que la utilización de nutrientes del medio o metabolitos producidos es inhibida $\geq 50\%$ y se compara con las CMI utilizadas en el método de referencia. Los resultados en forma de MEP mostraron, en general, una buena correlación con las CMI, las cuales se determinaron mediante una modificación del método de referencia en caldo de microdilución M27-A del CLSI. Las discrepancias que pueden surgir entre MEP y CMI podrían deberse a diferencias en el medio de cultivo así como en el tiempo de incubación. Además, la espectroscopia de RMN es un método potencialmente valioso en la determinación de la composición metabólica de los microorganismos incubados con fármaco debido a que es un método de fácil reproducción y relativamente rápido (son necesarias 16 horas frente a las 48 horas que requiere el método de referencia) lo que sugiere consolidarse como plataforma para la rápida determinación de la susceptibilidad antifúngica (Coen *et al.*, 2006; Plummer *et al.*, 2007).

Existen estudios en los que se analiza el metabolismo de flucitosina en cepas de *Candida* spp. con diferentes susceptibilidades al fármaco mediante la RMN de ^{19}F , que a pesar de mostrar ciertas desventajas (como la baja concentración de fármaco), es una metodología no invasiva para el análisis directo de muestras biológicas, lo que unido a su aplicación cuantitativa han sido muy útiles para el seguimiento metabólico de este fármaco. Además, el núcleo de ^{19}F es una parte inherente al fármaco y sus metabolitos y, por tanto, no requiere un marcaje previo del antifúngico. El análisis de las muestras por RMN de ^{19}F permitió la identificación y cuantificación de diferentes metabolitos fluorados (nucleótidos de F, nucleósidos de F y 5-fluorouracilo) cuyas concentraciones varían en función de la susceptibilidad o resistencia al fármaco (la concentración de metabolitos fluorados era mayor en la cepa susceptible a flucitosina). De modo que, la metodología de la RMN de ^{19}F aplicada al estudio cualitativo en el metabolismo de la flucitosina, podría

constituir un método para el estudio de la sensibilidad de varias cepas o microorganismos al fármaco (Vialaneix *et al.*, 1986).

3.3.2 Estudios en bacterias mediante RMN

La espectroscopia de RMN no se ha utilizado para estudios de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias. Sin embargo, son muchas las investigaciones en las que se usa dicha técnica espectroscópica para identificación y cuantificación bacteriana y para estudios de rutas metabólicas de las mismas.

Gupta y cols. han realizado numerosas investigaciones para el diagnóstico de bacterias causantes de infecciones en el tracto urinario (ITU) (Gupta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012b). Sus estudios se centran en el uso de la espectroscopia de RMN de ^1H para la identificación y cuantificación de uropatógenos comunes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* en muestras de orina. Las investigaciones se basan en propiedades específicas del metabolismo de la bacteria en estudio. Los resultados de sus estudios mostraron que, el uso de la RMN de ^1H , es una técnica sencilla y rápida comparada con los métodos habituales.

La determinación cuantitativa y cualitativa de *P. aeruginosa* mediante el uso de RMN se basa en la propiedad específica de la bacteria de metabolizar ácido nicotínico (NA) a ácido 6-hidroxinicotínico (6-OHNA). Sólo esta bacteria es capaz de producir esta reacción. La adición de NA a las muestras de orina, tras incubación y posterior análisis por espectroscopia de RMN de ^1H , demostró que las señales de NA desaparecían del medio tras un tiempo de incubación, mientras que la aparición de nuevas señales correspondientes al metabolito 6-OHNA indicaban la presencia de *P. aeruginosa*. A medida que aumentaba la intensidad de las señales del metabolito, junto con la disminución en las señales de NA, aumentaba proporcionalmente en el número de bacterias. Esto demuestra la posibilidad que ofrece esta técnica para la identificación cuantitativa y cualitativa, simultáneamente, de la bacteria (Gupta *et al.*, 2005).

Algo similar ocurre en la determinación de *K. pneumoniae*. En este caso, la reacción metabólica específica es la transformación de glicerol en 1,3-propanodiol, de modo que la sustancia que se añadió al medio fue el glicerol. A pesar de que *Citrobacter freundii* es también capaz de llevar a cabo esta reacción, ambas bacterias son fácilmente diferenciadas por examen microscópico observando su motilidad. *K. pneumoniae* no es

móvil mientras que *C. frundii* sí. Además, *C. frundii* no es un agente nosocomial común en infecciones del tracto urinario. La combinación de ambos métodos mostró una muy buena sensibilidad y especificidad (90% y 100%, respectivamente) sugiriendo la potencial utilidad de la RMN para el diagnóstico bacteriano (Gupta *et al.*, 2006).

El mismo experimento en *E. coli* y *P. mirabilis* reveló que los metabolitos específicos para estas bacterias son el lactato y el ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butírico tras la incubación con lactosa y metionina, respectivamente (Gupta *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos con el uso de esta técnica alternativa proporcionan la justificación para el desarrollo de este método en la identificación y la cuantificación bacteriana, así como de otros microorganismos. El análisis espectral y la interpretación de datos pueden hacerse de forma rápida y fiable (Gupta *et al.*, 2009).

La RMN de ^{13}C se ha aplicado en estudios llevados a cabo con *Lactococcus lactis* en los que se demuestran interrelaciones existentes entre el metabolismo del citrato y el de la glucosa, así como en investigaciones centradas en la utilización de glucosa en una cepa de *L. lactis* deficiente en el enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Ramos *et al.*, 1994; Neves *et al.*, 2000). Otro ejemplo lo constituye el estudio de las capacidades catabólicas de *Helicobacter pylori*. En él, la RMN de ^{13}C permite observar, tanto el metabolismo de la glucosa como el del piruvato, reflejando las adaptaciones fisiológicas sufridas por la bacteria en las condiciones de crecimiento empleadas (Chalk *et al.*, 1994). El uso de esta RMN de ^{13}C se ha extendido también al estudio del metabolismo de fármacos. Esta técnica se ha utilizado para observar el seguimiento intracelular de β -lactámicos y determinar la cinética de las reacciones que sufren éstos (Mobashery *et al.*, 1988).

También se han llevado a cabo estudios con espectroscopia de RMN de ^2H para demostrar su aplicación en la monitorización de rutas metabólicas complejas, como el metabolismo anaerobio, de distintas bacterias. La identificación de productos por este método podría constituir un método potencial para la caracterización de bacterias patógenas a pesar de las limitaciones con las que cuenta (Aguayo *et al.*, 1988).

Hasta la fecha no hay estudios de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias basados en perfiles metabólicos mediante RMN como tal. Sin embargo, esta metodología se ha utilizado con fines similares en algunos estudios.

Uno de ellos investiga una enfermedad bacteriana denominada síndrome de marchitamiento de la oreja de mar o abulón, *Haliotis* spp. (un molusco), importante en la

acuicultura, causada por un patógeno de la familia Rickettsiaceae: '*Candidatus Xenohalotia californiensis*' que infecta las células epiteliales digestivas del animal (Viant *et al.*, 2003). Se trata de la primera aplicación de la espectroscopia de RMN basada en el estudio de perfiles metabólicos en una especie del medio acuático. La metabonomía basada en RMN de ^1H permitió realizar con éxito una clasificación de los animales (sanos, con retraso en el crecimiento y enfermos) mediante los cambios metabólicos asociados a la progresión de la enfermedad a partir de muestras de biofluidos y de extractos tisulares del molusco. Los espectros obtenidos, medidos a 500,11 MHz, mostraron diferencias metabólicas permitiendo identificar los metabolitos más representativos involucrados en el proceso de la enfermedad, así como los cambios porcentuales de éstos. Estos resultados permitieron identificar biomarcadores metabólicos característicos del síndrome. Éstos no sólo proporcionan información sobre la enfermedad, sino que podrían utilizarse para posteriores estudios que evalúen rápidamente la situación sanitaria del abulón así como la eficacia de los antibióticos necesarios para su tratamiento (Viant *et al.*, 2003). Basándose en esto, los mismos autores en años posteriores llevaron a cabo estudios con los mismos organismos para observar los efectos del antibiótico oxitetraciclina en los perfiles metabólicos mediante RMN de ^1H (Roseblum *et al.*, 2006). Éste fármaco, usado para tratar infecciones bacterianas en especies acuáticas, reduce la intensidad y la mortalidad del síndrome de marchitamiento. El objetivo, por tanto, de esta investigación fue observar si la recuperación del metabolismo durante el tratamiento con oxitetraciclina coincidía con la desaparición de la enfermedad causada por la rickettsia. Para ello, se examinaron los constituyentes metabólicos presentes en el músculo del pie del molusco tras tratamiento con oxitetraciclina durante unos determinados días a diferentes temperaturas del agua marina (13,4 °C y 17,3 °C) (Roseblum *et al.*, 2006). Se observaron cambios metabólicos a las dos temperaturas: elevación de los niveles de taurina, homarina y glicina-betaína, así como disminución de los aminoácidos y los hidratos de carbono. La detección de diferencias metabólicas entre los animales tratados y los no tratados con antibiótico se observaron sólo a la temperatura más alta. De modo que, la oxitetraciclina erradica la enfermedad y a su vez reduce el descenso metabólico relativo al síndrome a la temperatura más elevada. Las conclusiones obtenidas de los experimentos sugieren del desarrollo de la RMN basada en estudios metabólicos y su complementariedad con otras técnicas, como la histología, para la identificación de procesos patológicos en especies acuáticas así como para la optimización de tratamientos farmacológicos. Esta herramienta

muestra un alto rendimiento ya que analiza rápidamente y con pocos costes el estado funcional de un organismo (Viant *et al.*, 2003; Roseblum *et al.*, 2006).

El uso de una RMN multidimensional de HRMAS ha permitido también realizar estudios de monitorización del metabolismo de fármacos así como la búsqueda de dianas para el desarrollo de nuevos tratamientos antibacterianos (Li *et al.*, 2006).

La técnica de RMN de HRMAS consiste en una hibridación entre la RMN en disolución y la RMN de estado sólido que permite la obtención de espectros de alta resolución de muestras heterogéneas que no son ni sólidos ni líquidos puros. Esta RMN permite realizar estudios *in vivo* con bacterias de una manera no destructiva de modo que se facilite el estudio de la pared celular bacteriana. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de los componentes estructurales, juegan un papel muy importante en la determinación de dianas para el desarrollo de nuevos fármacos. Además, la pared celular bacteriana es crítica en el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos empleados (Li *et al.*, 2006).

De acuerdo con las características que presenta la técnica, Lee y cols. (Lee *et al.*, 2005) estudiaron, en bacterias vivas (micobacterias), la diferente composición relativa en la estructura de la pared bacteriana con el objetivo de demostrar las dianas en las que actúa el etambutol (EMB), observar las diferencias en la composición entre especies y observar los efectos de mutaciones en la pared celular de estas bacterias. Hasta ese momento, el análisis estructural de la pared celular se realizaba de forma destructiva mediante degradación por aislamiento y fragmentación de los componentes de la pared celular por separado. El estudio se basó en la determinación de los componentes mayoritarios de la pared mediante RMN de HRMAS en dos y tres dimensiones (2D y 3D) de células intactas de *Mycobacterium smegmatis* no tratadas, de bacterias tratadas con EMB, de células con mutación EmbB y en la observación de diferencias en la composición estructural de la pared entre las especies *M. smegmatis* y *M. bovis*. Las estructuras más abundantes encontradas, correspondientes a las señales del espectro, fueron arabinogalactano y lipoarabinomanano. Centrándonos en el efecto del antituberculoso EMB mediante esta técnica, se observa que la reducción o ausencia del pico en el espectro se relaciona con la inhibición de la ruta biosintética de la arabinosa. Se sabe que el EMB actúa inhibiendo las arabinosiltransferasas EmbA-C de la micobacteria, y en particular a la EmbB, enzimas encargadas de la biosíntesis de la pared celular. Los estudios mediante la espectroscopia de RMN revelaron que, al comparar las bacterias *M. smegmatis* tratadas con el antituberculoso frente a las micobacterias control, se producía

la inhibición de las arabinosiltransferasas EmbA-C (reducción drástica de las señales de arabinosa) tras tratamiento con EMB. Un análisis espectroscópico en *M. smegmatis* con una mutación *embB knockout* validó este efecto inhibitorio. El tratamiento con EMB reduce el contenido de arabinano de la pared celular por inhibición de las citadas enzimas (Lee *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Lo más relevante de este estudio fue la posibilidad que ofrecía esta técnica para observar los efectos inhibitorios del fármaco en estudio en la estructura de la pared celular y su correspondiente validación con la micobacteria mutada. La habilidad que presenta la RMN de HRMAS para observar estos efectos es muy significativa ya que permite la observación directa de cambios estructurales en la pared bacteriana debidos a la exposición farmacológica o a la mutación, y podría servir para el desarrollo de nuevos fármacos que tengan efecto inhibitorio a nivel de la pared celular así como estudios de resistencia de antimicrobianos (Lee *et al.*, 2005).

Otra aplicación potencial mediante este tipo de RMN fue la monitorización del metabolismo *in vivo* de etionamida (ETH) realizada por Hanouille y cols. (Hanouille *et al.*, 2005). La ETH es un profármaco que necesita activarse dentro de la micobacteria para lograr su eficacia. Se usó la RMN de HRMAS de ^1H , con un campo magnético relativamente bajo (300 MHz), para investigar el proceso de activación del profármaco ETH a través de la proteína EthA en micobacterias vivas. Esta técnica permitió detectar y localizar el metabolito mayoritario del fármaco en el interior de las bacterias vivas. Este hecho no ha podido ser demostrado por estudios anteriores *in vitro*. La selección de una cepa de la bacteria que sobreproduce la enzima EthA demostró que la presencia del metabolito dependía de la presencia de ETH (Hanouille *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

Los resultados mostrados mediante esta herramienta espectroscópica no invasiva, el uso de un precursor no marcado y la baja frecuencia del espectrómetro, sugieren la posibilidad de la RMN para estudios de seguimiento metabólico de fármacos *in vivo* así como para análisis estructural (Hanouille *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

1. Puesta a punto de la espectroscopia de RMN para la realización de estudios de susceptibilidad a antimicrobianos con bacterias habituales.
2. Utilización de la técnica de RMN para identificar marcadores del metabolismo de *Rickettsia* spp. que puedan servir para estudios de susceptibilidad de estas bacterias a antimicrobianos y mejorar el conocimiento del metabolismo de estas bacterias de difícil cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han realizado diversos experimentos. Dado que la técnica de RMN, con el fin que se busca en esta Tesis no está estandarizada, todos los experimentos se realizaron por triplicado. La tabla 2 muestra una relación de los mismos para facilitar la comprensión y el seguimiento de este apartado.

Tabla 2. Relación de los experimentos realizados.

Bacteria	Cepa/ especie	Tipo de análisis	Antimicrobiano testado	Otros compuestos testados	Tipo de experimento de RMN
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ESA	Gentamicina Ciprofloxacino	—	¹ H RMN
		Cinética	Gentamicina	—	
	C1550	ESA	Ciprofloxacino Levofloxacino	—	¹ H RMN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	ESA	Gentamicina Ciprofloxacino	—	¹ H RMN
	W30	ESA	Gentamicina Ciprofloxacino	—	¹ H RMN
<i>Rickettsia spp.</i>	<i>Rickettsia slovacae</i>	EM	—	D-[1- ¹³ C]glucosa [2- ¹³ C]glicina Serina L-[1- ¹³ C]isoleucina L[2- ¹³ C]leucina L-[¹⁵ N]tirosina	¹ H RMN ¹³ C RMN ¹⁵ N RMN

ATCC: Colección americana de cultivos tipo; ESA: estudios de sensibilidad a antimicrobianos; EM: estudios metabólicos.

1. Estudios de susceptibilidad a antimicrobianos mediante RMN en bacterias habituales

1.1 Experimentos con *E. coli*

Se utilizó una cepa patrón de *E. coli* procedente de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) 25922 y otra cepa de *E. coli* denominada C1550 perteneciente a la colección bacteriana del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja (Rocha-Gracia *et al.*, 2010).

1.1.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las cepas *E. coli* a lo largo de esta tesis fueron: *Brain Heart Infusion agar* (BHI-agar) (Difco™) y *MH broth* (Difco™). Las especificaciones para su preparación se describen a continuación.

a) Preparación del medio sólido

BHI-agar (Difco™):

Según las indicaciones del fabricante es necesario disolver 52 g de polvo para cada litro de disolución en agua destilada. Dicha disolución se calentó hasta ebullición, en agitación, y se introdujo en un autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Se distribuyó en placas de Petri y una vez solidificadas, se almacenaron hasta su uso.

b) Preparación de caldos de cultivo

MH (Difco™):

Según las indicaciones del fabricante es necesario disolver 21 g del polvo para cada litro de disolución en agua destilada. Se calentó hasta ebullición en agitación y se introdujo en un autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

1.1.2 Cultivo de *E. coli*

El cultivo de las cepas de *E. coli* requirió de un primer reaislamiento en placa de agar de BHI para comprobar la viabilidad bacteriana (figura 14) y posteriormente otro para asegurar el cultivo puro a 37 °C durante 24 horas. En una solución salina estéril (NaCl 0,9%) se preparó 0,5 de McFarland y se tomaron 10 µL para posterior recuento en placa. El estándar de McFarland es una solución de diferentes concentraciones de una sal de bario con la que la turbidez de las soluciones bacterianas se compara para obtener

recuentos bacterianos aproximados. De este modo, el estándar de McFarland proporciona orientación en el laboratorio para la estandarización del número de bacterias para test de susceptibilidad u otros procedimientos que requieran un inóculo estandarizado. El 0,5 de McFarland es comparable a una suspensión bacteriana de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

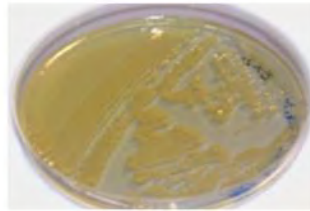


Figura 14. *E. coli* ATCC 25922 en placa de agar BHI.

1.1.3 Antimicrobianos utilizados

a) *Gentamicina*

Se preparó una disolución stock de polvo puro de gentamicina (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ para los experimentos con *E. coli* ATCC 25922.

b) *Ciprofloxacino*

Se prepararon varias disoluciones stock de polvo puro de ciprofloxacino (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 y 0,032 $\mu\text{g/mL}$ para los experimentos con *E. coli* ATCC 25922, y disoluciones seriadas de: 2048; 1024; 512; 256; 128 y 64 $\mu\text{g/mL}$ para los experimentos con *E. coli* C1550.

c) *Levofloxacino*

Se preparó una disolución stock de polvo puro de levofloxacino (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco: 256; 128; 64; 32; 16; 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$ para los experimentos con *E. coli* C1550.

1.1.4 Técnica de macrodilución en caldo

Como se ha descrito en el apartado 1.1.2, en primer lugar se realizó el aislamiento de la bacteria en agar BHI. El inóculo bacteriano para la realización de la técnica de

macrodilución se preparó a partir de una suspensión con una turbidez de 0,5 McFarland utilizando el método de suspensión directa. Para ello, la suspensión bacteriana se preparó en 5 mL de solución salina estéril. Las CMI se determinaron mediante el método de referencia de macrodilución del CLSI (CLSI, 2016). Se prepararon muestras y controles para cada experimento en un volumen final de 2 mL. Las muestras contenían la suspensión bacteriana, el medio MH y el antimicrobiano a estudio (un tubo por cada dilución de antimicrobiano usada). Además, se incluyeron dos controles. El control I constaba del medio utilizado con un inóculo bacteriano (sin antimicrobiano) y el control II contenía sólo el medio de cultivo. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La CMI se definió como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano de forma visible. Para el recuento bacteriano se prepararon placas de cultivo de agar BHI (ver apartado 1.1.1). Se realizaron además diferentes disoluciones de cada muestra y controles en agua estéril y se sembraron en las placas. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y, transcurrido ese tiempo, las colonias bacterianas se contaron manualmente. El recuento de placas para cada disolución se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = (\text{n}^\circ \text{ colonias} \times \text{factor de dilución}) / \text{mL añadidos a cada placa.}$$

El número total de bacterias en cada muestra y control I se determinó calculando la media del recuento obtenido de las diferentes disoluciones.

1.1.5 Preparación de muestras para experimentos de ¹H RMN

Transcurridas 24 horas de la incubación de las muestras y de los controles, para el análisis mediante RMN, se transfirieron 540 µL en tubos de 5 mm de RMN (5-mm high-precision NMR sample tubes, Norell Inc.) (figura 15). En los experimentos iniciales, antes de transferir las muestras a los tubos de RMN se tomó 1 mL de muestra que se centrifugó durante 3 minutos a 9500 *x g*. Del sobrenadante, se transfirieron 540 µL a tubos de RMN. Posteriormente, al ver que la centrifugación no afectaba a los resultados, se obvió dicho paso. Además, a cada tubo se les añadió 60 µL de una disolución de 2,2'-3,3'-tetra-deuterio-trimetil-silil-propionato sódico (TSP) en D₂O a una concentración final de 1,125 mg/mL como control interno.



Figura 15. Tubos de 5 mm de RMN con muestra.

1.1.6 Análisis de muestras mediante ^1H RMN

El equipo empleado para la realización de los experimentos fue un espectrómetro Bruker Avance 400 UltraShield (Avance II 400 MHz, Bruker Corporation). Este equipo está equipado con una sonda BBI H-BB Z-GRD, específica para una adecuada adquisición de protón. La adquisición de los espectros se ha llevado a cabo con el programa TOPSPIN versión 2.1 (Bruker Corporation). Para la obtención de los espectros se ha ajustado el campo para la mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 y todos los experimentos se han realizado a 25 °C. Para el procesamiento de los espectros se ha utilizado el programa MestReNova versión 8.1 y 10.0 (Mestrelab Research). Los espectros de ^1H RMN se registraron con una secuencia de pulsos de presaturación de la señal de agua situada a 1875 Hz usando el programa de pulsos zgpr. Se utilizó un tiempo de relajación d1 de 10 segundos y un número de scans (ns) de 64 para dar un tiempo total de adquisición de 20 minutos. Con este tipo de experimentos se podrían llevar a cabo, si fuera necesario, estudios cuantitativos. Alternativamente, también se emplearon unas condiciones de experimento más cortas con un d1 de 2 segundos y un ns de 8 para un total de 3 minutos de adquisición.

1.2 Experimentos con *P. aeruginosa*

Se cultivó una cepa patrón de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y otra cepa de *P. aeruginosa* denominada W30 perteneciente a la colección bacteriana del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR) (Estepa *et al.*, 2017).

1.2.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* a lo largo de esta tesis fueron: BHI-agar (Difco™) y MH (Difco™). Las especificaciones para su preparación son las descritas en el apartado 1.1.1.

1.2.2 Cultivo de *P. aeruginosa*

El cultivo de *P. aeruginosa* se realizó del mismo modo que con las cepas de *E. coli*. En primer lugar se realizó un primer reaislamiento para comprobar la viabilidad bacteriana y posteriormente otro para asegurar el cultivo puro a 37 °C durante 24 horas. Del mismo modo que con *E. coli*, se preparó un 0,5 de McFarland en solución salina estéril (NaCl 0,9%).

1.2.3 Antimicrobianos utilizados

a) *Gentamicina*

Se preparó una disolución stock de polvo puro de gentamicina (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco: 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/ml para los experimentos con *P. aeruginosa* ATCC 27853 y disoluciones seriadas de: 8; 16; 32 y 64 µg/mL para los experimentos con *P. aeruginosa* W30.

b) *Ciprofloxacino*

Se prepararon varias disoluciones stock de polvo puro de ciprofloxacino (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco: 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/ml para los experimentos con *P. aeruginosa* ATCC 27853 y disoluciones seriadas de 1; 2; 4; 8; 16; 32 y 64 µg/ml para los experimentos con *P. aeruginosa* W30.

1.2.4 Técnica de macrodilución en caldo

La técnica de macrodilución se llevó a cabo del mismo modo que el descrito para *E. coli* (ver apartado 1.1.4). Del mismo modo, para el recuento bacteriano se prepararon placas de cultivo de agar BHI (ver apartado 1.1.1) y se realizaron diferentes disoluciones de cada muestra y controles en agua estéril para siembra en placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y, transcurrido ese tiempo, las colonias bacterianas se contaron manualmente de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\text{UFC/mL} = (\text{n}^\circ \text{ colonias} \times \text{factor de dilución}) / \text{mL añadidos a cada placa.}$

El número total de bacterias en cada muestra y control I se determinó calculando la media del recuento obtenido de las diferentes disoluciones.

1.2.5 Preparación de muestras para experimentos de ^1H RMN

Transcurridas 24 horas de la incubación de las muestras y de los controles, para el análisis mediante RMN, se transfirieron 540 μL a tubos de 5 mm de RMN. Además, a cada tubo se les añadió 60 μL de TSP en D_2O a una concentración final de 1,125 mg/mL como control interno.

1.2.6 Análisis de muestras mediante ^1H RMN

El análisis de las muestras utilizadas para los experimentos con *P. aeruginosa* se realizó del mismo modo que el indicado en el apartado 1.1.6.

1.2.7 Análisis de muestras mediante análisis de componentes principales

Dentro del software MestReNova (Mestrelab Research) existen herramientas que permiten realizar un sencillo estudio de análisis de componentes principales (PCA de sus siglas en inglés). El PCA es un procedimiento para convertir un conjunto de observaciones de variables correlacionadas, en un conjunto de valores de variables linealmente no correlacionadas (denominadas componentes principales) y que permite reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación. Este estudio permite encontrar variables latentes, también llamadas componentes principales (CP). La CP1 es la componente (variable latente) que más variabilidad explica y la CP2 la segunda. Las variables pueden estar correlacionadas positiva o negativamente con estas componentes. Basándose en la semejanza en cuanto a las correlaciones de las muestras, éstas pueden ser clasificadas en grupos.

En este sentido, se seleccionan regiones del espectro que permitan realizar un PCA que diferencie estas muestras en dos grupos. Por un lado, aquellas en las que el antibiótico está funcionando y por otro, en las que la bacteria realiza su metabolismo habitual sin influencia del antibiótico.

2. Estudios de cinética mediante RMN en *E. coli* ATCC 25922

Con objeto de evaluar el potencial de la RMN, se realizaron los mismos experimentos que en el caso de sensibilidad pero utilizando el tubo de 5 mm de RMN para incubación directa de las muestras. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó una cepa patrón de *E. coli* ATCC 25922.

2.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para la realización de estos experimentos fueron: BHI-agar (Difco™) y MH (Difco™). Las especificaciones para su preparación son las descritas en el apartado 1.1.1.

2.2 Cultivo de *E. coli*

El cultivo de *E. coli* se realizó del modo descrito en el apartado 1.1.2.

2.3 Antimicrobianos utilizados

2.3.1 Gentamicina

Se preparó una disolución stock de polvo puro de gentamicina (Sigma-Aldrich Co.) en agua estéril. A partir de ella se prepararon disoluciones seriadas del fármaco de 0,06 y 0,125 µg/ml.

2.4 Incubación directa de *E. coli* en tubos de RMN

Se prepararon dos muestras con gentamicina (0,06 µg/mL y 0,125 µg/mL) y otra sin antimicrobiano para incubación directa en tubos de RMN. Las muestras se prepararon en un volumen final de 2 mL como se ha descrito en el apartado 1.1.4 y 540 µL se transfirieron directamente a tubos de 5 mm de RMN. Además se les añadió 60 µL de D₂O con TSP en a una concentración final de 1,125 mg/mL como control interno.

2.5 Preparación de muestras para experimentos de ¹H RMN

El análisis de las muestras incubadas directamente en tubos de 5 mm de RMN se realizó bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 1.1.6 pero los experimentos se registraron a 37 °C cada 20 minutos.

3. Estudios metabólicos mediante RMN en *Rickettsia* spp.

Los experimentos se realizaron con una cepa establecida en nuestro laboratorio de *Rickettsia slovaca* S8 (previamente aislada de garrapatas *Dermacentor marginatus* de La Rioja en nuestro laboratorio).

3.1 Preparación de medios de cultivo

3.1.1 Minimum essential medium (MEM) Glutamax[®] (Gibco, Invitrogen[™])

El medio utilizado para el crecimiento de *Rickettsia* spp. fue minimum essential medium (MEM) Glutamax[®] (Gibco, Invitrogen[™]) suplementado con un 2% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen[™]).

El medio utilizado para el crecimiento de células Vero (ATCC CCL-81TM) fue MEM Glutamax[®] suplementado con un 5% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen[™]).

3.2 Preparación de cultivos celulares

Para el cultivo de *Rickettsia* spp. se utilizaron células Vero (ATCC CCL-81TM). Se prepararon placas de 6 pocillos con células Vero a partir de células ya crecidas en frascos de cultivo habituales. Para ello, fue necesario retirar el medio del frasco al cual se le quiere dar pase, a continuación añadir de 1 a 2 mL de tripsina e introducirlo en el incubador durante 3-5 minutos. Transcurrido ese tiempo, una vez se ha despegado la monocapa celular (en los casos en los que no se despegaba por completo, se utilizó un “cell scraper”) se resuspendió con ayuda de una pipeta estéril para evitar la formación de grumos. A continuación, se añadió tanto medio limpio de cultivo como pocillos se quieran conseguir, por tanto en un volumen suficiente para distribuir en el nº de pocillos que se vayan a realizar. Se invirtió el frasco con el medio y las células para que se produzca una distribución uniforme del contenido y se distribuyó el volumen en el número de pocillos que se quieran realizar. En los casos en los que fue necesario, se completaron todos los pocillos con más medio de cultivo de acuerdo al volumen final requerido para cada uno (3 mL). Para verificar que en todos los pocillos había células flotando, se observaron al microscopio. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂ el tiempo necesario hasta conseguir la monocapa. Se prepararon el mismo número de placas para infectar que de placas que no se infectaron y que se utilizaron como control.

3.3 Cultivo de *Rickettsia* spp.

El cultivo de *Rickettsia* spp. se realizó en placas de cultivo de 6 pocillos que contenían una monocapa confluyente de células Vero a las que se les añadió un inóculo (200 μ L) de *R. slovacica* S8. El medio utilizado en este caso fue MEM Glutamax[®] (Gibco, Invitrogen[™]) suplementado con un 2% suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen[™]). El cultivo se realizó a 34 °C con un 5% de CO₂ durante 5 días. La preparación de las placas de cultivo con *R. slovacica* se realizó en un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad (P3) (figura 16).



Figura 16. Personal trabajando en el laboratorio de nivel 3 de bioseguridad (P3).

3.4 Compuestos utilizados para estudios metabólicos

Se prepararon disoluciones a una concentración de 25 mg/mL de los siguientes aminoácidos marcados: [2-13C]glicina (Cortec-Net), L-[2-13C]leucina (Cambridge Isotope Laboratories Inc.), L-[1-13C]isoleucina (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) y L-[15N]tirosina (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). Además, se utilizó también D-[1-13C]glucosa (CortecNet) a la misma concentración y serina (Sigma-Aldrich Co.).

3.5 Preparación de muestras para estudios metabólicos

A cada uno de los pocillos de las placas de cultivo celular, tanto a los infectados con *R. slovacica* como a los no infectados, se les añadieron 100 μ L de una de las disoluciones de [2-13C]glicina, L-[2-13C]leucina, L-[1-13C]isoleucina, L-[15N]tirosina y D-[1-13C]glucosa. Los cultivos infectados con *R. slovacica* en presencia de dichos compuestos se incubaron a 34 °C y los no infectados se incubaron a 37 °C, durante tres días. Para comprobar la presencia del aminoácido serina como metabolito de la glicina se llevó a cabo la adición de serina no marcada directamente en el propio tubo de RMN (5 mg).

3.6 Inactivación de muestras

El protocolo de inactivación para las muestras infectadas con *Rickettsia* spp. fue facilitado por Vircell Microbiologists S.L. y comparado con el protocolo facilitado por la Dra. Ereemeva (miembro del Centers for disease control and prevention (CDC)). Ambos hacen constar que, para la inactivación, es necesario adicionar a la muestra formol en una concentración final del 0,1% y almacenarla a 4-5 °C durante al menos 24 horas.

De cada pocillo, se transfirió 1 mL a tubos de plástico de 1,5 mL, se añadió formol* hasta una concentración final de 0,1% y se almacenaron en nevera durante 24 horas.

3.7 Preparación de las muestras para experimentos de RMN

Para llevar a cabo los experimentos, se transfirieron 540 µL a tubos de 5 mm de RMN a los que se les añadió 60 µL de TSP en D₂O a una concentración de 1,125 mg/mL como patrón interno.

3.8 Análisis de muestras mediante RMN

3.8.1 Experimentos mediante ¹H RMN

El equipo usado para la adquisición de espectros fue un espectrómetro Bruker Avance 400 MHz (Avance II 400 MHz, Bruker Corporation) equipado con una sonda BBI H-BB Z-GRD, específica para la correcta adquisición de protón. La adquisición de los espectros se llevo a cabo mediante el programa TOPSPIN (versión 2.1) (Bruker Corporation). El procesamiento de los espectros se realizó mediante el uso del programa MestReNova (versión 6.0.3 y 10.1) (Mestrelab Research). Para la obtención de los espectros, el campo se ajustó para la mezcla H₂O/D₂O y todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Los espectros de ¹H RMN se registraron con una secuencia de pulsos de presaturación de la señal de agua situada a 1875 Hz usando el programa de pulsos zgpr con un tiempo total de adquisición de 20 minutos.

3.8.2 Experimentos mediante ¹³C RMN

El equipo empleado fue un espectrómetro Bruker Avance 400 MHz (Avance II 400 MHz, Bruker Corporation) equipado con una sonda BBO BB-1H Z-GRD, específica para una

* Se añadió formol a todas las muestras que se iban a someter a experimentos de RMN, independientemente de que estuvieran o no infectadas, con objeto de no tener variaciones como consecuencia de este compuesto en los espectros.

óptima adquisición heteronuclear. La adquisición de los espectros se llevó a cabo mediante el programa TOPSPIN (versión 2.1) (Bruker Corporation). Por su parte, para el procesamiento de los espectros se utilizó el programa MestReNova (versión 6.0.3 y 10.1) (Mestrelab Research). Para la obtención de los mismos, el campo se ajustó para la mezcla H₂O/D₂O y todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Se empleó el programa de pulsos “*inverse-gate decoupled*” para la adquisición de ¹³C RMN, desacoplando en protón solo en el periodo de adquisición. En este caso no se usó la transferencia de polarización de ¹H a ¹³C vía efecto Overhauser nuclear (NOE). En estas condiciones el tiempo total de adquisición fue de 50 minutos.

3.8.3 Experimentos mediante ¹⁵N RMN

Los experimentos se llevaron a cabo como los realizados con ¹³C cambiando los parámetros de adquisición. En este caso, se empleó el programa de pulsos “*inverse-gate decoupled*” para la adquisición de ¹⁵N RMN, desacoplando en protón solo en el periodo de adquisición.

RESULTADOS

1. Estudios de susceptibilidad a antimicrobianos por RMN en bacterias habituales

1.1 Experimentos con *E. coli*

1.1.1 Análisis de muestras control

Lo primero que se realizó es el espectro ^1H RMN del medio de cultivo (control II) con objeto de evaluar los metabolitos que pueden ser identificados en dicho medio y el tiempo necesario de acumulación del experimento para su correcta descripción.

La figura 17A muestra el espectro de ^1H RMN del medio de cultivo. Aunque el espectro resulta relativamente complejo debido a la gran diversidad metabólica del medio de cultivo, se puede observar que la supresión del agua se realiza de forma correcta, permitiendo la diferenciación de las distintas señales. Tras el correspondiente tratamiento de la señal con el ajuste de fase y de la línea base existen señales aisladas que son fácilmente integrables. Además, la señal aislada de TSP de concentración conocida podría ser empleada para la cuantificación de algún metabolito si fuera necesario.

En la figura 17B se muestra la zona del espectro correspondiente a los ácidos orgánicos y aminoácidos. En dicha zona se distingue el aminoácido treonina, el cual puede servir como marcador metabólico en el proceso de crecimiento bacteriano. Esta región del espectro es importante ya que los compuestos que ahí aparecen pueden ser susceptibles de cambios debido al proceso metabólico en presencia de las correspondientes bacterias.

Un espectro de calidad similar es obtenido empleando un d_1 de 1 segundo. Esta variación va a impedir la cuantificación de los posibles metabolitos, pero, como se ha comentado en el capítulo de Material y Métodos, reduce el tiempo de adquisición a 3 minutos.

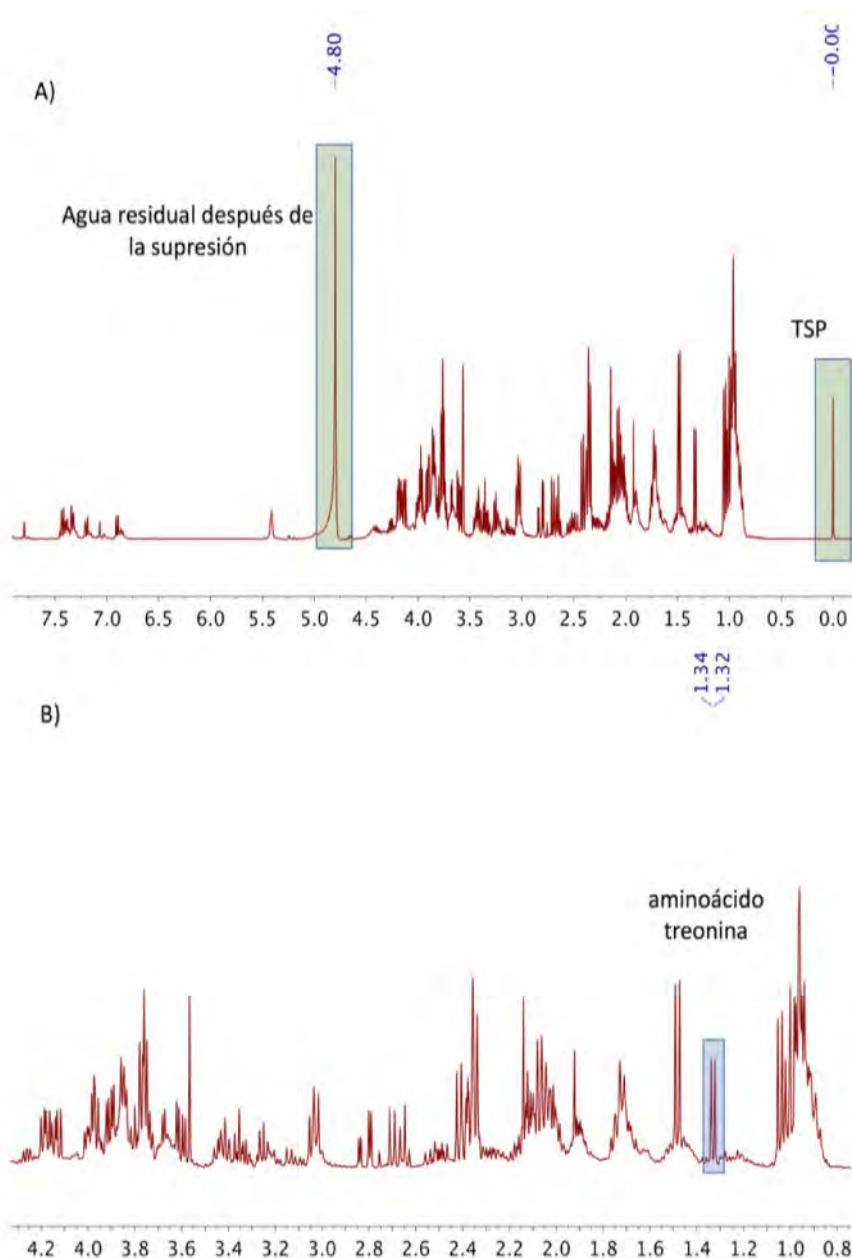


Figura 17. Espectro de ¹H RMN del medio de cultivo (control II). A) Espectro completo en el que se observa la supresión de agua y la referencia de TSP en concentración conocida. B) Ampliación de la zona entre 0,8-4,2 ppm en donde se encuentran aminoácidos y ácidos orgánicos, compuestos susceptibles de verse involucrados en procesos metabólicos.

La figura 18 muestra el espectro, en las mismas condiciones anteriores, de una muestra del medio de cultivo infectado con la bacteria (control I). En el espectro no se observan variaciones significativas en la región superior a 4,2 ppm y que corresponderían con posibles carbohidratos y con compuestos aromáticos. Sin embargo, si se observan variaciones en la región correspondiente a los aminoácidos y a los ácidos orgánicos. Nuevamente, en el espectro se resuelven señales con la suficiente intensidad para poder ser identificadas y sus áreas integradas.

De forma significativa se observa la desaparición de la señal correspondiente al aminoácido treonina. A su vez, se ven nuevas señales correspondientes a nuevos metabolitos que aparecen o que ven incrementada su concentración de forma significativa. Estos nuevos metabolitos son el ácido succínico, el ácido acético y el etanol. Nuevamente este experimento es desarrollado con un d1 de un segundo para acortar el tiempo total de adquisición, no observando pérdida significativa de intensidad en las señales.

Así, con estos dos experimentos se puede apreciar que hay diferencias representativas en cuatro metabolitos, lo que permite diferenciar si el cultivo está infectado y con las bacterias actuando metabólicamente sobre él, o si por el contrario no existen bacterias que modifiquen el perfil metabólico del medio. Estas señales fueron asignadas mediante comparación de sus desplazamientos químicos con los descritos en la literatura (López-Rituerto, 2012) y mediante la adición de patrones de los mismos compuestos en las muestras control. Estos cuatro compuestos, y en los que nos fijaremos de aquí en adelante para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana son: treonina (desaparece cuando hay actividad bacteriana), etanol, ácido acético y ácido succínico (aparecen cuando hay actividad bacteriana).

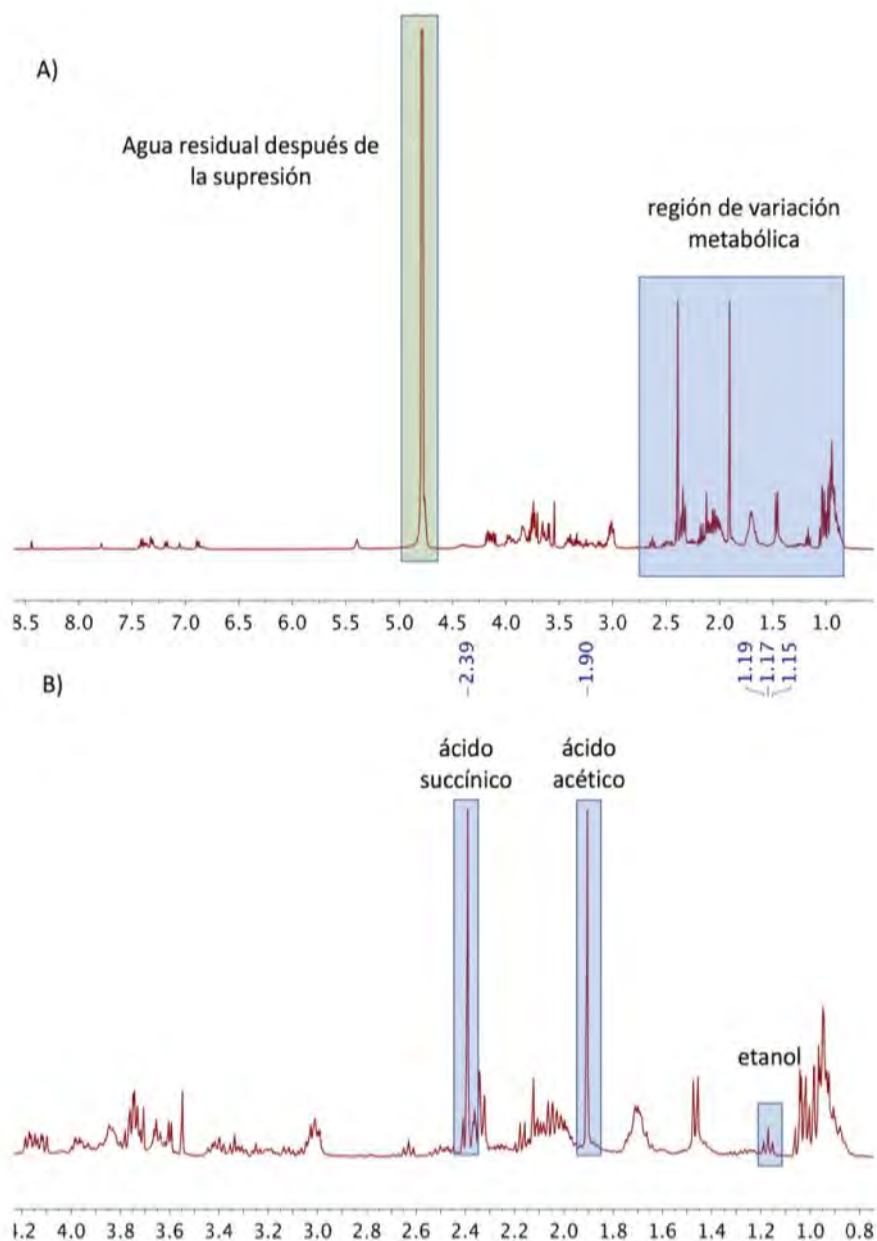


Figura 18. Espectro de ^1H RMN del medio de cultivo con la bacteria. A) Espectro completo en el que se observa la supresión de agua y la región de cambio de metabolitos. B) Ampliación de la zona entre 0,8-4,2 ppm en donde se encuentran aminoácidos y ácidos orgánicos, compuestos susceptibles de verse involucrados en procesos metabólicos.

Una vez se realizaron y se optimizaron estos dos primeros experimentos se procedió a registrar los diferentes espectros de los cultivos infectados con la correspondiente bacteria y con diferentes cantidades de antibiótico. Tal y como se ha indicado en el capítulo de Material y Métodos, se utilizó el programa MestReNova (Mestrelab Research) para realizar el apilamiento de los diferentes espectros que permite una excelente comparativa de los mismos.

1.1.2 Prueba de susceptibilidad de *E. coli* ATCC 25922 frente a gentamicina

En la figura 19 se muestra los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *E. coli* ATCC 25922 frente a diferentes concentraciones de gentamicina. En la misma se recoge la zona del espectro comprendida entre 1,0-2,5 ppm. Además, se muestran los espectros del control I (medio con bacteria sin antibiótico) y del control II (sólo medio de cultivo) anteriormente comentados y denominados “bacteria” y “medio” en la figura 19, respectivamente.

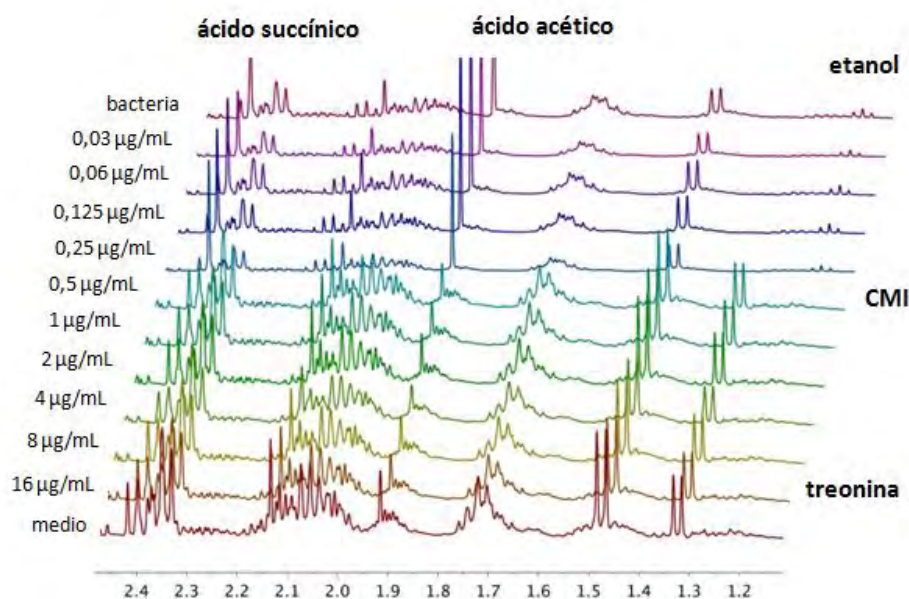


Figura 19. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* ATCC 25922 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). El espectro del control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) aparece en la parte superior. El espectro del control II (solo medio de cultivo) corresponde al de la parte inferior de la imagen. En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias.

De acuerdo a la figura 19, la comparación de los dos controles muestra diferencias en las señales obtenidas en el rango entre 1,0 y 2,5 ppm. En el espectro obtenido del análisis del control I se observa la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol, mientras que en el control II se detecta la presencia de treonina.

El análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores de 0,5 µg/mL de gentamicina muestra la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol. Además,

cuando las concentraciones de gentamicina fueron iguales o mayores a $0,5 \mu\text{g/mL}$, se detectó la presencia de treonina, lo que determina que dicha concentración de antibiótico está inhibiendo el crecimiento bacteriano al no producir los metabolitos de etanol, ácido succínico y ácido acético, es decir, la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento visible (CMI) corresponde con la concentración de $0,5 \mu\text{g/mL}$.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución (figura 20) se observó que la CMI fue de $0,5 \mu\text{g/mL}$ (CMI: $0,25\text{-}1 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2016)). Estos datos sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.



Figura 20. Diferencias en la turbidez entre las muestras de *E. coli* ATCC 25922 estudiadas y los controles. Los tubos de la “A” a la “H” corresponden a muestras con concentraciones seriadas de gentamicina ($8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125$ y $0,06 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). La CMI corresponde con el tubo “E”. El tubo “I” corresponde al control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) mientras que el tubo “J” corresponde al control II (solo medio de cultivo).

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con gentamicina con concentraciones desde 16 a $1 \mu\text{g/mL}$, ambas incluidas. Sin embargo, la placa correspondiente a una concentración de $0,5 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina mostró un crecimiento bacteriano del rango de 10^6 UFC/mL. Las muestras restantes (de $0,25$ a $0,06 \mu\text{g/mL}$, incluyendo el control I) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de $10^{10}\text{-}10^{11}$ UFC/mL. Los datos obtenidos del recuento bacteriano en las placas de agar, permitieron obtener la CMB, definida como la concentración más baja de antimicrobiano que mata la bacteria. En este caso, la CMB fue de $1 \mu\text{g/mL}$.

La figura 21, muestra la evolución en el tiempo de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos (ácidos succínico y acético, y etanol) y al nutriente (treonina) en función

de la concentración de gentamicina usada para la cepa de *E. coli*. Estas áreas son obtenidas mediante la integración de las señales correspondientes de los espectros con el programa MestReNova (Mestrelab Research). Los resultados obtenidos del espectro muestran que *E. coli* es capaz de metabolizar los componentes del medio para producir ácido succínico, ácido acético, y etanol. La intensidad de estas señales varía de acuerdo al recuento bacteriano (UFC/mL) de las muestras, indicando que la intensidad fue mayor en las muestras con concentraciones de gentamicina menores de la CMI (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Además, la treonina sólo aparece en el espectro de aquellas muestras con concentraciones de gentamicina mayores o igual 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Al igual que en los espectros de control, también se logró optimizar el tiempo de adquisición de los experimentos de RMN con gentamicina. Como se ha comentado, se utilizaron sólo 3 minutos por cada experimento, disminuyendo, por lo tanto el tiempo de análisis de manera considerable sin perder información, ya que para la obtención de los datos anteriores no es necesaria la cuantificación.

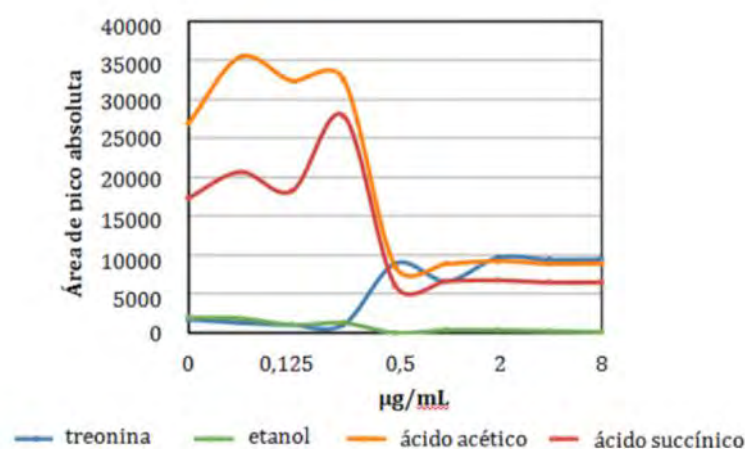


Figura 21. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de gentamicina usada para *E. coli* ATCC 25922. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria. La treonina es consumida por *E. coli*. Cuando la concentración de gentamicina es superior a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable.

1.1.3 Prueba de susceptibilidad de *E. coli* ATCC 25922 frente a ciprofloxacino

En la figura 22 se muestra los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *E. coli* ATCC 25922 frente a diferentes concentraciones de ciprofloxacino. También se muestran los espectros de los controles I (medio con bacteria sin antibiótico) y del control II (sólo medio de cultivo), denominados “bacteria” y “medio” en la figura 19, respectivamente.

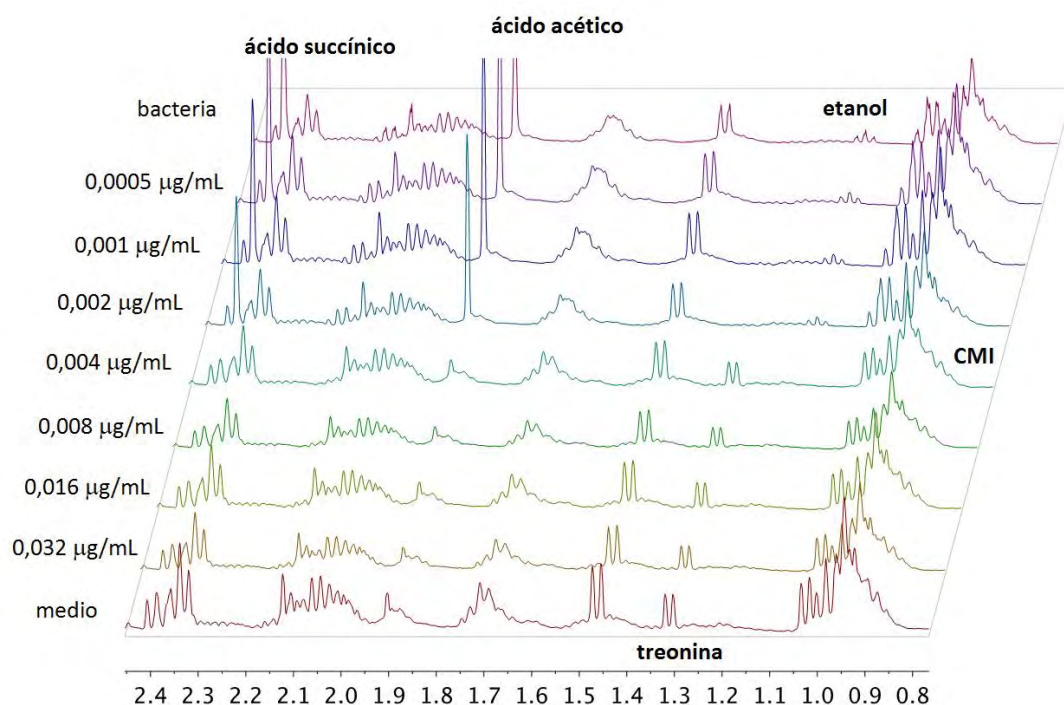


Figura 22. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* ATCC 25922 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). El espectro del control I (medio de cultivo con inóculo bacteriano) aparece en la parte superior mientras que el del control II (solo medio de cultivo) se muestra en la parte inferior de la imagen. En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos (la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias).

De acuerdo a la figura 22, la comparación de los dos controles muestra diferencias en las señales obtenidas en el rango entre 1,0 y 2,4 ppm. Al igual que en el caso anterior, en el espectro obtenido del análisis del control I se observa la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol, mientras que en el control II se detecta la presencia de treonina.

El análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores de 0,004 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino muestra la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol. Además,

cuando las concentraciones de ciprofloxacino fueron mayores o iguales a 0,004 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la presencia de treonina, indicativo de que a esas concentraciones de antibiótico la bacteria no tiene actividad metabólica. De este modo, mediante espectroscopia de ^1H RMN se puede determinar que la CMI correspondería a la concentración de 0,004 $\mu\text{g/mL}$. Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la CMI fue de 0,004 $\mu\text{g/mL}$ (CMI: 0,004-0,015 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2016)). Estos datos sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas cuyas muestras contenían concentraciones de ciprofloxacino desde 0,032 a 0,008 $\mu\text{g/mL}$, ambas incluidas. Sin embargo, la placa correspondiente a una concentración de 0,004 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino mostró un crecimiento bacteriano del rango de 10^2 UFC/mL. Las muestras restantes (de 0,002 a 0,0005 $\mu\text{g/mL}$) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10^9 - 10^{11} UFC/mL. Los datos obtenidos del recuento bacteriano en las placas de agar permitieron determinar una CMB de 0,008 $\mu\text{g/mL}$.

Nuevamente, la integración de las áreas de las señales correspondiente de los espectros permite realizar un análisis de su evolución. La figura 23 muestra la evolución en el tiempo de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos (ácidos succínico y acético, y etanol) y al nutriente (treonina) en función de la concentración de ciprofloxacino usada para la cepa de *E. coli*. Los resultados obtenidos del espectro muestran que *E. coli* es capaz de metabolizar los componentes del medio para producir ácido succínico, ácido acético y etanol. La intensidad de estas señales varía de acuerdo al recuento bacteriano (UFC/mL) de las muestras, indicando que la intensidad fue mayor en las muestras con concentraciones de ciprofloxacino menores que la CMI (0,004 $\mu\text{g/mL}$). Además, la treonina sólo aparece en el espectro de aquellas muestras con concentraciones de ciprofloxacino mayor o igual a 0,004 $\mu\text{g/mL}$. También, se optimizó el tiempo de adquisición de los experimentos de RMN de modo que utilizaron sólo 3 minutos por cada experimento, disminuyendo, por lo tanto el tiempo de análisis de manera considerable sin perder información.

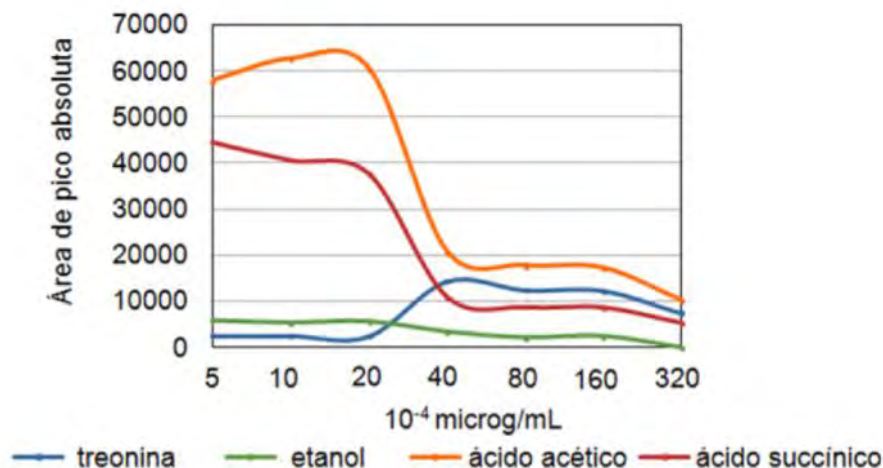


Figura 23. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de ciprofloxacino usada para *E. coli* ATCC 25922. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de ciprofloxacino es superior a 0,004 $\mu\text{g/ml}$ no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable.

1.1.4 Prueba de susceptibilidad de *E. coli* C1550 frente a ciprofloxacino

En la figura 24 se muestra los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *E. coli* C1550 frente a diferentes concentraciones de ciprofloxacino. También se muestran los espectros del control I (medio con bacteria sin antibiótico) y del control II (sólo medio de cultivo), denominados “bacteria” y “medio” en la figura 19, respectivamente.

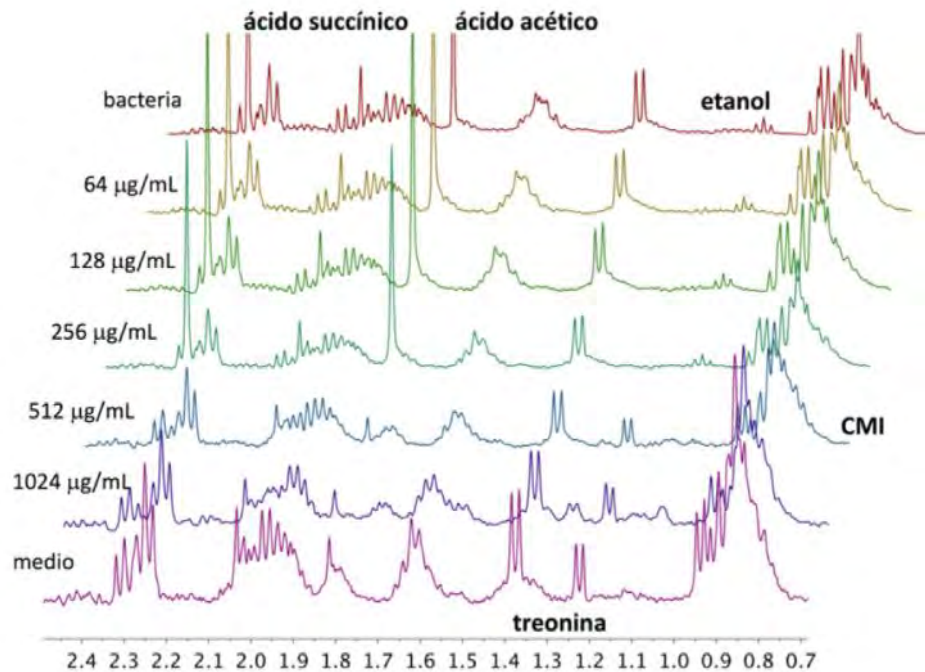


Figura 24. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* C1550 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias.

De acuerdo a la figura 24, la comparación de los dos controles muestra diferencias en las señales obtenidas en el rango entre 1,0 y 2,4 ppm. Al igual que en los casos anteriores, en el espectro obtenido del análisis del control I se observa la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol, mientras que en el control II sólo se detecta la presencia de treonina. Los espectros obtenidos con concentraciones menores de 512 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino muestran la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol. Además, cuando las concentraciones de ciprofloxacino fueron iguales o mayores de 512 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la presencia de treonina. En este caso, mediante ^1H RMN se puede determinar que la CMI correspondería a la concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la CMI fue de 512 $\mu\text{g/mL}$ (CMI >256 $\mu\text{g/mL}$ (Rocha-Gracia, 2010)). Así, los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con ciprofloxacino con concentraciones de 2048 y 1024 $\mu\text{g/mL}$, ambas incluidas. Sin embargo, la placa correspondiente a una concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino mostró un crecimiento bacteriano del rango de 10^5 UFC/mL. Las muestras restantes (de 256 a 64 $\mu\text{g/mL}$) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10^9 - 10^{11} UFC/mL. Los datos obtenidos del recuento bacteriano en las placas de agar permitieron determinar, en este caso, una CMB de 1024 $\mu\text{g/mL}$.

De nuevo, la integración de las áreas de las señales correspondiente de los espectros permite realizar un análisis de su evolución. Al igual que en el caso anterior, la figura 25 muestra la evolución en el tiempo de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos (ácidos succínico y acético, y etanol) y al nutriente (treonina) en función de la concentración de ciprofloxacino usada para la cepa de *E. coli*. Los resultados obtenidos del espectro muestran que *E. coli* es capaz de metabolizar los componentes del medio para producir ácido succínico, ácido acético y etanol. La intensidad de estas señales varía de acuerdo al recuento bacteriano (UFC/mL) de las muestras, indicando que la intensidad fue mayor en las muestras con concentraciones de ciprofloxacino menores que la CMI (512 $\mu\text{g/mL}$). Además, la treonina sólo aparece en el espectro de aquellas muestras con concentraciones de ciprofloxacino mayor o igual a 512 $\mu\text{g/mL}$. También, se optimizó el tiempo de adquisición de los experimentos de RMN de modo que utilizaron sólo 3 minutos por cada experimento, disminuyendo, por lo tanto, el tiempo de análisis de manera considerable sin perder información.

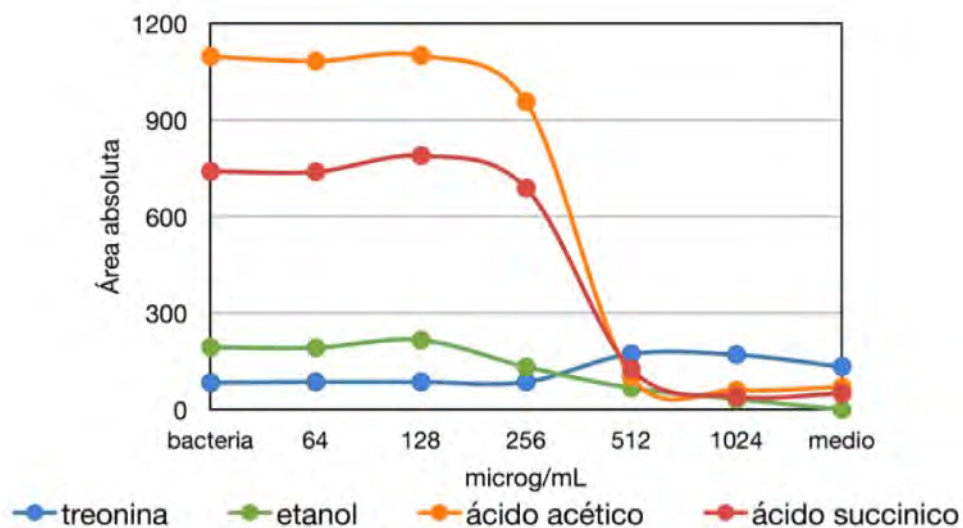


Figura 25. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de ciprofloxacino usada para *E. coli* C1550. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de ciprofloxacino es superior a 512 $\mu\text{g/ml}$ no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable.

1.1.5 Prueba de susceptibilidad de *E. coli* C1550 frente a levofloxacino

En la figura 26 se muestra los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *E. coli* C1550 frente a diferentes concentraciones de levofloxacino. Además se muestran los espectros del control I (medio con bacteria sin antibiótico) y del control II (sólo medio de cultivo), denominados “bacteria” y “medio” en la figura 19, respectivamente.

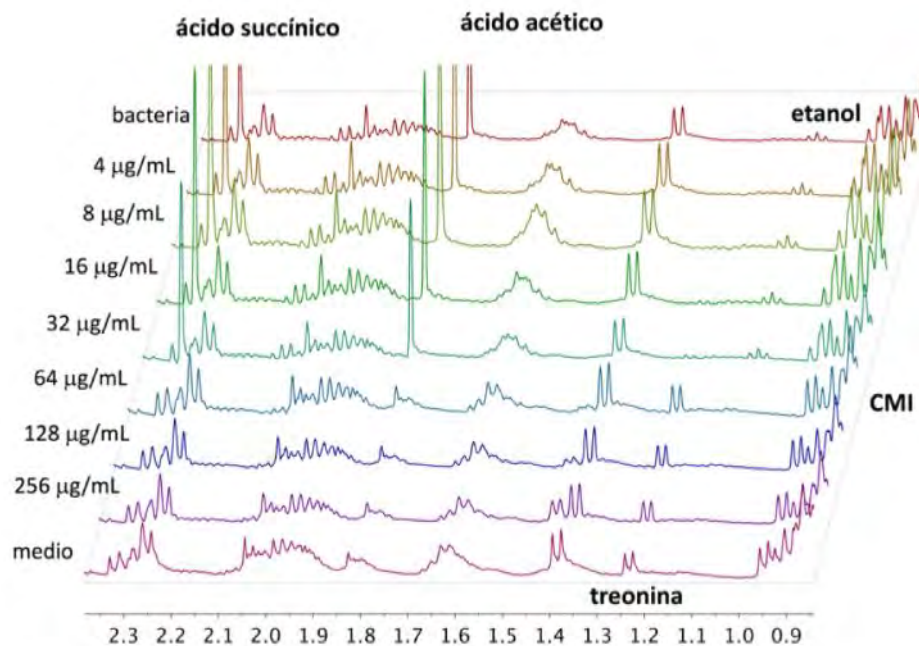


Figura 26. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *E. coli* C1550 incubadas con levofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos (la treonina del medio es consumida cuando las bacterias están activas; mientras que el ácido succínico, acético y el etanol son resultado de la actividad metabólica de las bacterias).

De acuerdo a la figura 26, la comparación de los dos controles muestra diferencias en las señales obtenidas en el rango entre 0,9 y 2,3 ppm. En el espectro obtenido del análisis del control I se observa la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol, mientras que en el control II se detecta la presencia de treonina.

El análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores de 64 $\mu\text{g/mL}$ de levofloxacino muestra la presencia de ácido succínico, ácido acético y etanol. Cuando las concentraciones de levofloxacino fueron superiores o igual a 64 $\mu\text{g/mL}$ se detectó la presencia de treonina.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento visible fue de 64 $\mu\text{g/mL}$ (CMI: 64 $\mu\text{g/mL}$ (Rocha-Gracia, 2010)). Estos datos también sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con levofloxacinó con concentraciones de 256 y 128 $\mu\text{g/mL}$, ambas incluidas. Sin embargo, la placa correspondiente a la muestra con una concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$ de levofloxacinó mostró un crecimiento bacteriano del rango de 10^3 UFC/mL. Las muestras restantes (32 a 4 $\mu\text{g/mL}$) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10^{10} - 10^{11} UFC/mL. Así, en este caso, la CMB fue de 128 $\mu\text{g/mL}$.

Al igual que en los casos anteriores, la integración de las áreas de las señales correspondiente de los espectros permite realizar un análisis de su evolución, así la figura 27 muestra la evolución en el tiempo de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos (ácidos succínico y acético, y etanol) y al nutriente (treonina) en función de la concentración de levofloxacinó usada para la cepa de *E. coli*. Los resultados obtenidos del espectro muestran que *E. coli* es capaz de metabolizar los componentes del medio para producir ácido succínico, ácido acético y etanol. La intensidad de estas señales varía de acuerdo al recuento bacteriano (UFC/mL) de las muestras, indicando que la intensidad fue mayor en las muestras con concentraciones de levofloxacinó menores que la CMI (64 $\mu\text{g/mL}$). Además, la treonina sólo aparece en el espectro de aquellas muestras con concentraciones de levofloxacinó mayor o igual a 64 $\mu\text{g/mL}$. También se optimizó el tiempo de adquisición de los experimentos de RMN de modo que utilizaron sólo 3 minutos por cada experimento, disminuyendo, por lo tanto, el tiempo de análisis de manera considerable sin perder información.

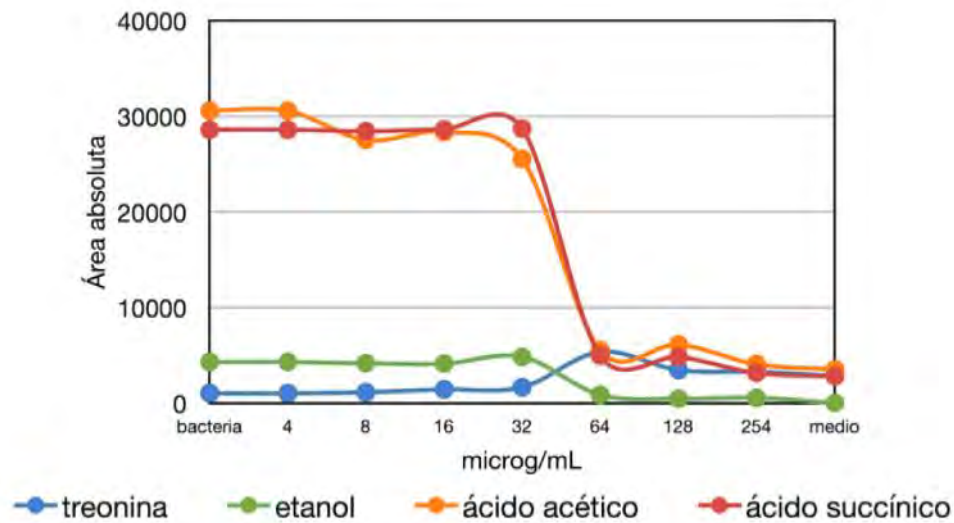


Figura 27. Gráfica de las áreas de los picos correspondientes a los metabolitos o nutrientes en función de la concentración de levofloxacino usada para *E. coli* C1550. El ácido acético, succínico y el etanol fueron producidos por la bacteria, la treonina es consumida por la misma. Cuando la concentración de levofloxacino es superior a 128 µg/ml, no se detectó ni consumo ni producción de los metabolitos, lo que sugiere que la bacteria no es viable.

1.2 Experimentos con *P. aeruginosa*

1.2.1 Prueba de susceptibilidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a gentamicina

En la figura 28 se muestran los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a diferentes concentraciones de gentamicina.

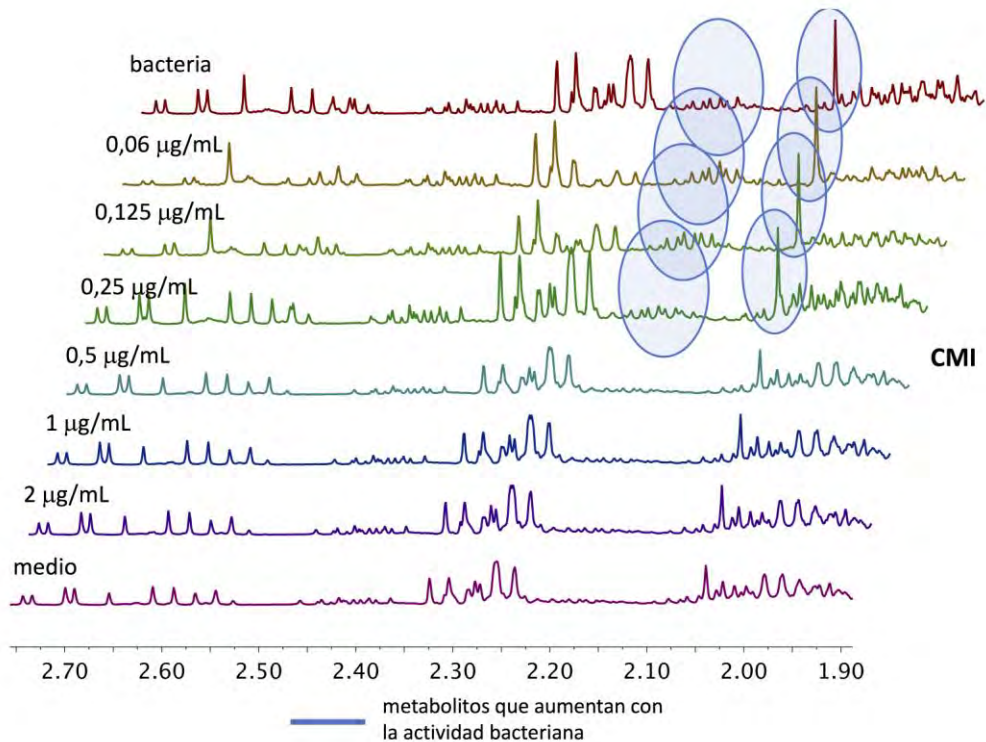


Figura 28. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 1,90 a 2,80 ppm sólo se muestran los metabolitos que aumentan su concentración cuando hay actividad bacteriana (redondeados en azul).

De acuerdo a la figura 28, al comparar los espectros de aquellas muestras con baja concentración de antibiótico, es decir con actividad bacteriana, con los que tienen una alta concentración de antibiótico, y por lo tanto, nula actividad bacteriana, se muestra alguna diferencia apreciable en la región de 2,20 a 2,00 ppm. En el espectro obtenido del análisis de la muestra control sin antibiótico (muestra llamada “bacteria” en la figura 28) se observa la presencia de unos metabolitos característicos (no identificados) y que, como se aprecia en la figura, están en mayor concentración cuando hay actividad bacteriana. Por su parte, en el experimento de la muestra control del medio se detecta la presencia de los mismos metabolitos pero en concentraciones mucho menores, y que, por lo tanto, se muestran así cuando no hay actividad bacteriana.

Así, el análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores e iguales de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina se muestra la presencia de unos metabolitos, que no se han logrado identificar, pero que están en mayor concentración sólo en esas muestras. Sin embargo, cuando las concentraciones de gentamicina fueron mayores a 0,25 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la

presencia de los metabolitos en concentraciones mucho más pequeñas o casi inapreciables. Este hecho sugiere que los metabolitos seleccionados aumentan cuando hay actividad bacteriana.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la concentración más baja de gentamicina que inhibe completamente el crecimiento visible fue 0,5 µg/mL (CMI: 0,5-2 µg/mL (CLSI, 2016)). Estos datos también sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ¹H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con gentamicina con concentraciones de 0,5 µg/mL y superiores. Las muestras restantes (0,25; 0,125 y 0,06 µg/mL) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10¹⁰-10¹¹ UFC/mL.

Para el análisis mediante PCA se seleccionaron las partes del espectro que diferencian las muestras en dos grupos. Por un lado, aquellas en las que el antibiótico está funcionando y por otro, en las que las bacterias llevan a cabo su metabolismo habitual sin influencia del antibiótico. Para ello, una vez realizado el apilamiento de los espectros, eliminamos aquellas regiones que visualmente ofrecen una nula variabilidad. Dichos espectros aparecen en la figura 29.

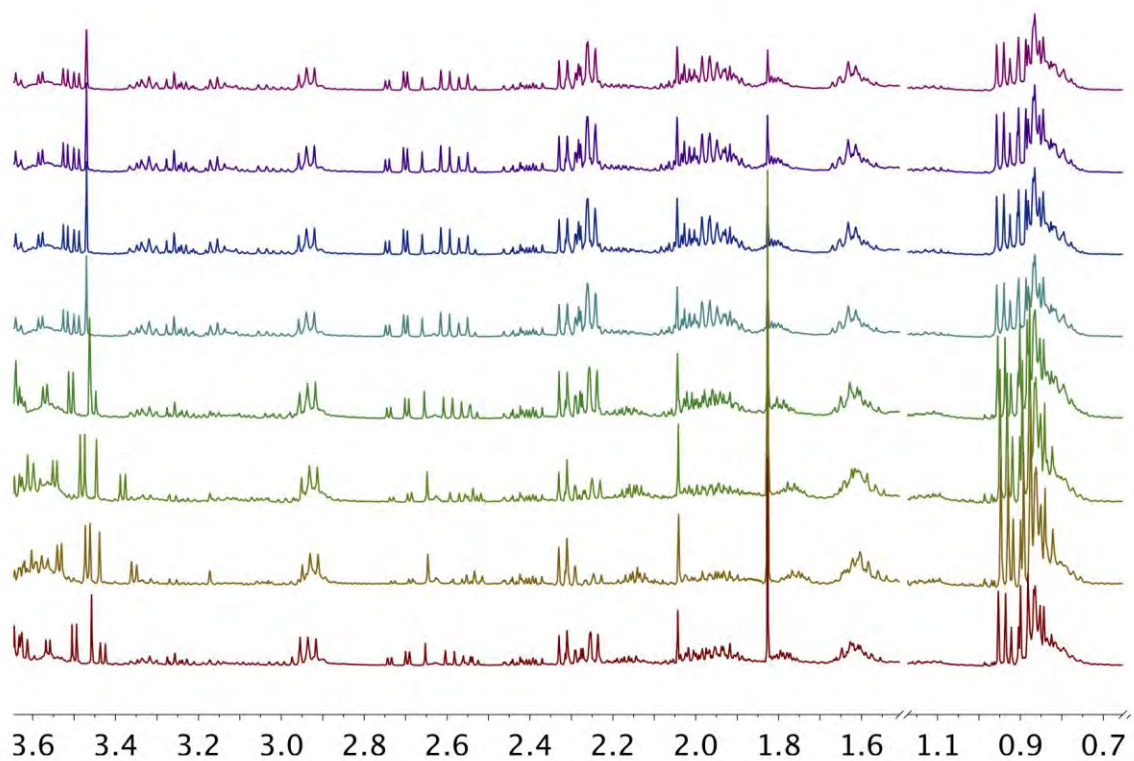


Figura 29. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA.

Para la realización del PCA se utiliza un tamaño de intervalo de 0,1 ppm y aplicando una normalización (sum) y un escalado de Pareto, obteniendo la distribución de componentes principales con una CP1 con un peso relativo de 84,5% y un CP2 con un peso relativo de 9,6%.

Por último, en la figura 30 se muestra la gráfica de componentes principales que explica el 94,1% de la varianza de las muestras. La CP1 muestra una correlación positiva con todas las muestras con alta concentración de antibiótico, incluida la mínima de las mismas que corresponde con la CMI. Sin embargo, muestra una correlación negativa para las muestras con una concentración de antibiótico por debajo de la CMI. Esto permite de una forma fácil y visual analizar la acción del antibiótico en las diferentes concentraciones y separar claramente en dos grupos aquellas muestras que están por debajo de la CMI y aquellas que están en una concentración igual o superior a la CMI.

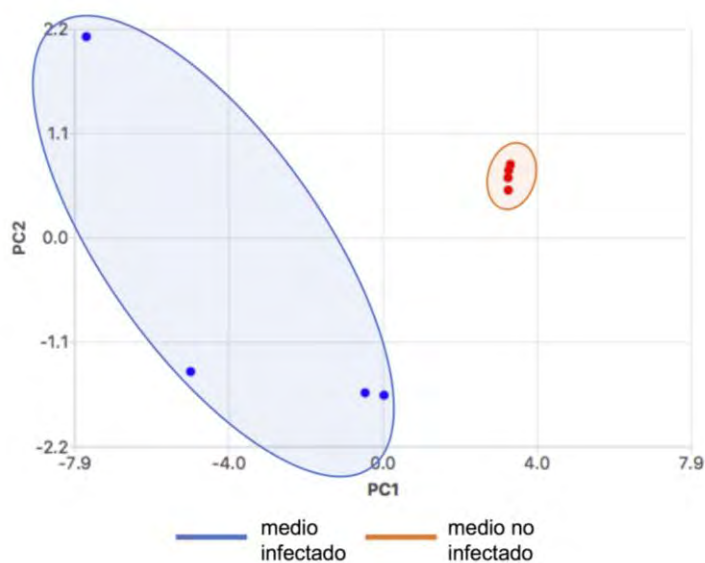


Figura 30. Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN.

1.2.2 Prueba de susceptibilidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a ciprofloxacino

En la figura 31 se muestran los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a diferentes concentraciones de ciprofloxacino.

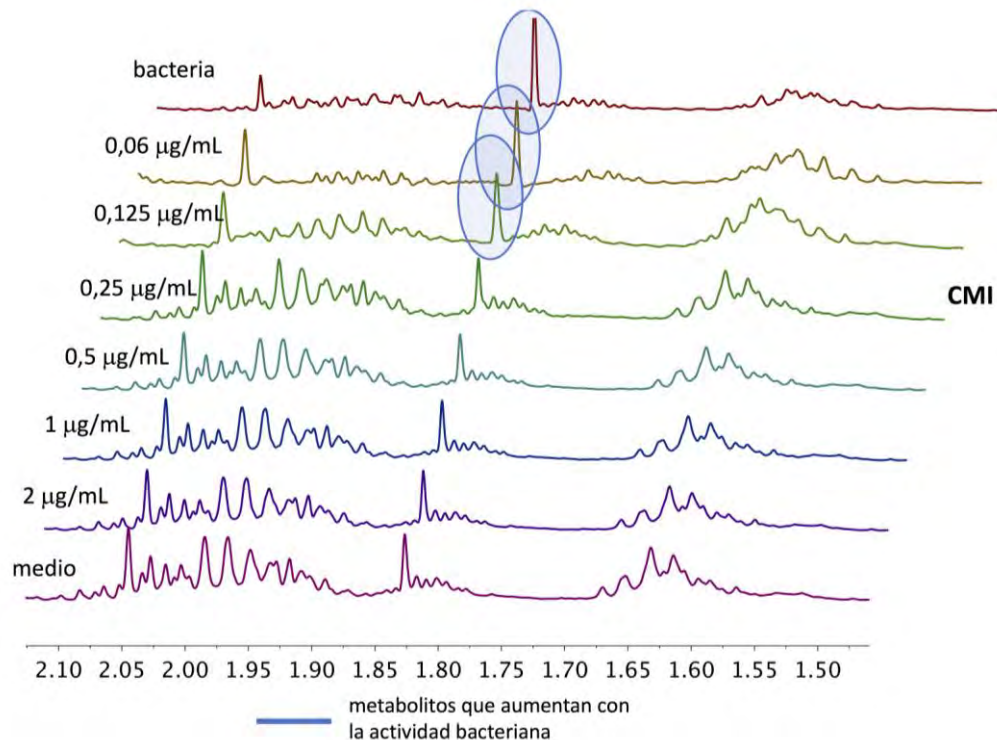


Figura 31. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 1,40 a 2,15 ppm sólo se muestran los metabolitos aumentan su concentración cuando hay actividad bacteriana (redondeados en azul).

De acuerdo a las figura 31, al comparar los espectros de aquellas muestras con baja concentración de antibiótico, es decir con actividad bacteriana, con los que tienen una alta concentración de antibiótico, y por lo tanto nula actividad bacteriana, se muestra alguna diferencia apreciable en la región de 1,90 a 1,75 ppm. En el espectro obtenido del análisis de la muestra control sin antibiótico (llamado “bacteria” en la figura 31) se observa la presencia de unos metabolitos característicos (no identificados) y que están en mayor concentración cuando hay actividad bacteriana, mientras que el experimento de la muestra control del medio se detecta la presencia de los mismos metabolitos, pero en menor concentración cuando no hay actividad bacteriana.

Así, el análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino muestra la presencia de unos metabolitos, que no se han logrado identificar, pero que están aumentados sólo en dichas muestras. Sin embargo, cuando las concentraciones de ciprofloxacino fueron mayores o iguales a 0,25 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la

presencia de los mismos metabolitos pero en menor concentración. Este hecho sugiere que los metabolitos seleccionados aumentan cuando hay actividad bacteriana.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la concentración más baja de ciprofloxacino que inhibe completamente el crecimiento visible fue 0,25 µg/mL (CMI: 0,25-1 µg/mL (CLSI, 2016)). Estos datos también sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ¹H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con ciprofloxacino con concentraciones de 0,5 µg/mL y superiores. La muestra de 0,25 µg/mL mostró un crecimiento del rango de 10⁴ UFC/mL, mientras que las restantes (0,125 y 0,06 µg/mL) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10⁸-10⁹ UFC/mL. Los datos obtenidos del recuento bacteriano en las placas de agar permitieron determinar una CMB de 0,5 µg/mL.

Para el análisis mediante PCA se seleccionaron las partes del espectro que diferencian las muestras en dos grupos. Por un lado, aquellas en las que el antibiótico está funcionando y en las que la bacteria realiza su metabolismo habitual sin influencia del antibiótico. Para ello, una vez realizado el apilamiento de los espectros, eliminamos aquellas regiones que visualmente ofrecen una nula variabilidad. Dichos espectros aparecen en la figura 32.

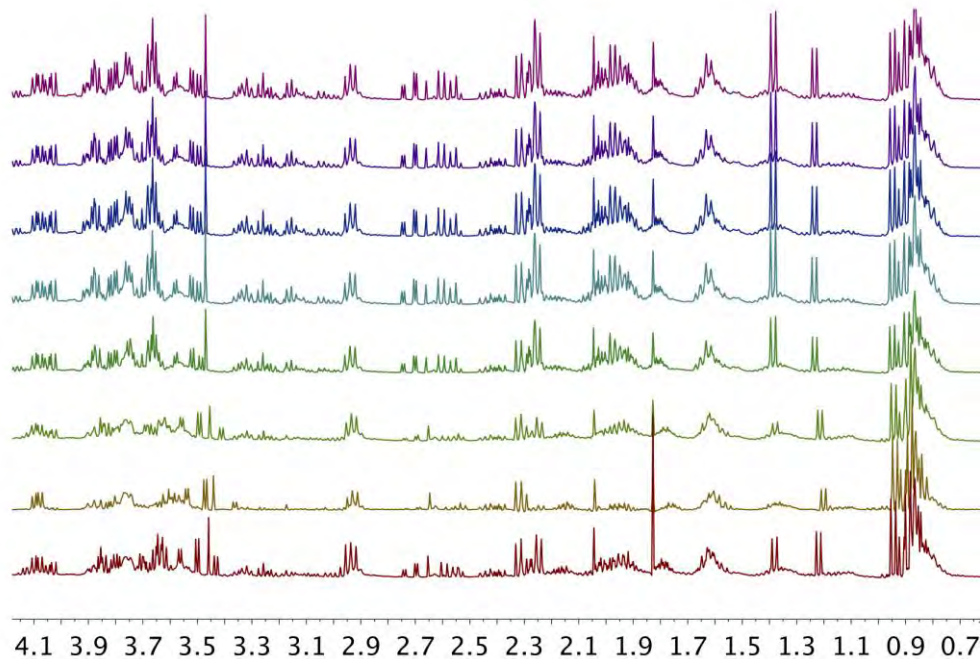


Figura 32. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA.

Para la realización del PCA se utiliza un tamaño de intervalo de 0,2 ppm y aplicando una normalización (sum) y un escalado de Pareto, obteniendo la distribución de componentes principales con una CP1 con un peso relativo de 86,9% y un CP2 con un peso relativo de 11,8%.

Por último, en la figura 33 se muestra la gráfica de componentes principales que explica el 98,7% de la varianza de las muestras. La CP1 muestra una correlación positiva con todas las muestras con alta concentración de antibiótico, incluida la mínima de las mismas que corresponde con la CMI. Sin embargo, muestra una correlación negativa para las muestras con una concentración de antibiótico por debajo de la CMI. Esto permite de una forma fácil y visual analizar la acción del antibiótico en las diferentes concentraciones y separar claramente en dos grupos aquellas muestras que están por debajo de la CMI y aquellas que están en una concentración igual o superior a la CMI.

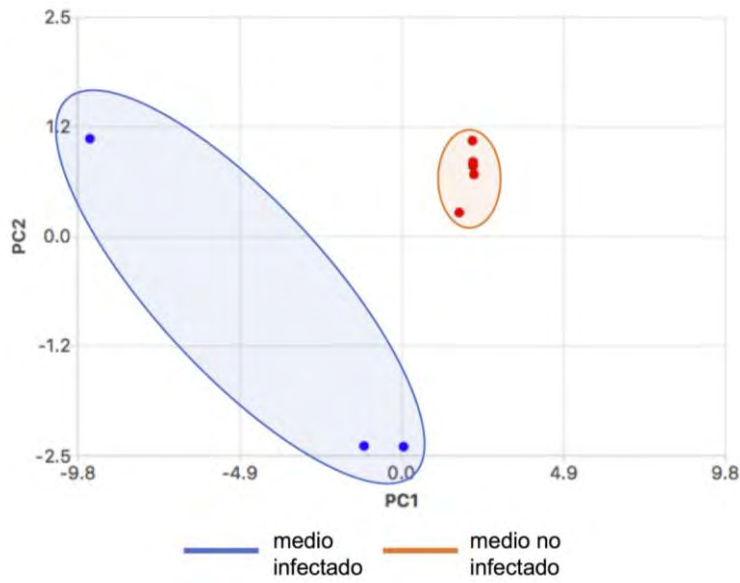


Figura 33. Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN.

1.2.3 Prueba de susceptibilidad de *P. aeruginosa* W30 frente a ciprofloxacino

En las figuras 34 y 35 se muestran los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *P. aeruginosa* W30 frente a diferentes concentraciones de ciprofloxacino.

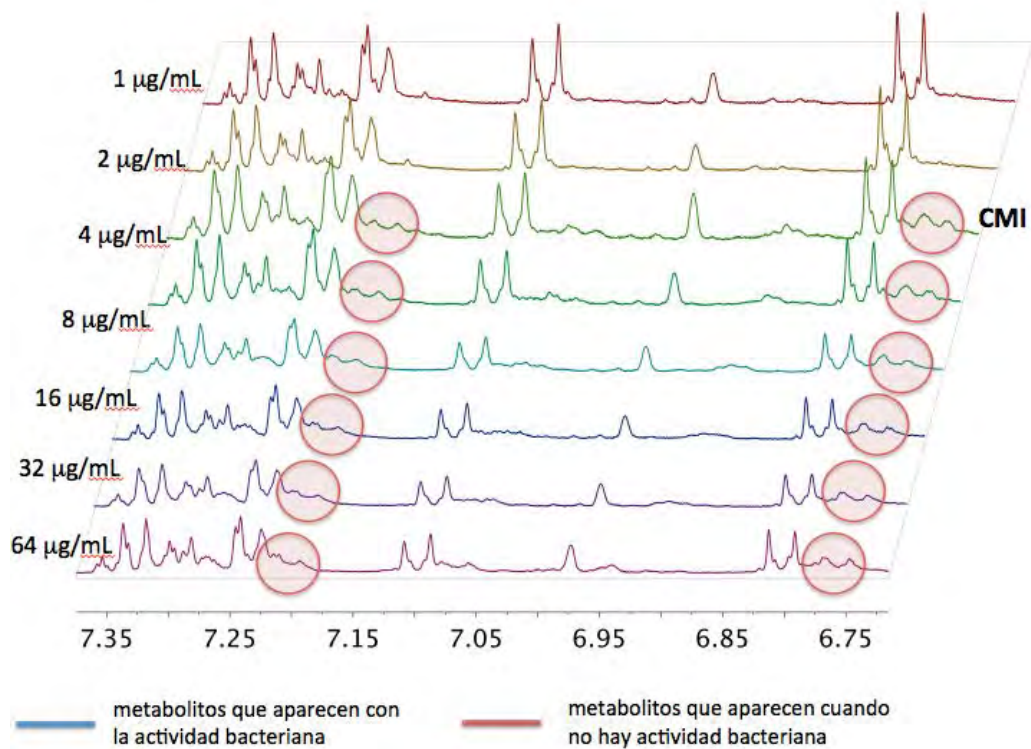


Figura 34. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos. En este rango de 7,35 a 6,75 ppm sólo se muestran los metabolitos que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo).

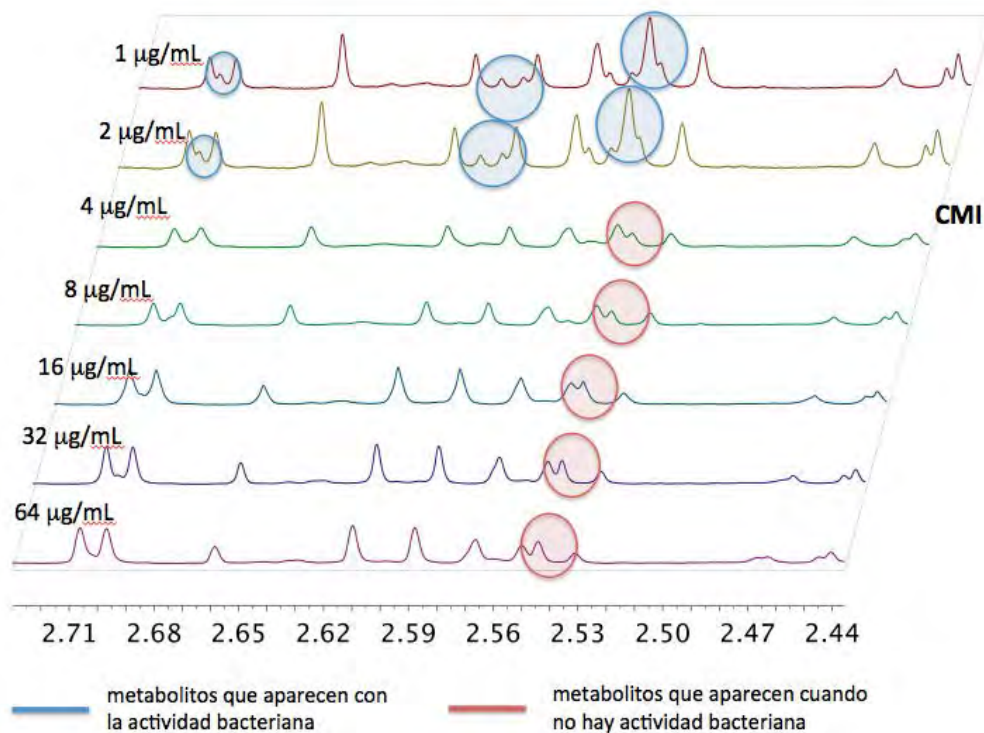


Figura 35. Espectros de ¹H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con ciprofloxacino (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul).

De acuerdo a las figuras anteriores (34 y 35), al comparar los espectros de aquellas muestras con baja concentración de antibiótico, es decir con actividad bacteriana, con los que tienen una alta concentración de antibiótico, y por lo tanto nula actividad bacteriana, se muestra alguna diferencia apreciable en la región de 7,35 a 6,75 ppm y 2,71 a 2,44 ppm. En el espectro obtenido del análisis con concentración de 1 µg/mL se observa la presencia de unos metabolitos característicos (no identificados) y que, por lo tanto, aparecen cuando hay actividad bacteriana, mientras que el experimento con una concentración de 64 µg/mL se detecta la presencia de otros metabolitos, distintos a los anteriores, y que tampoco se han logrado identificar, que aparecen cuando no hay actividad bacteriana.

El análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores a 4 µg/mL de ciprofloxacino muestra la presencia de unos metabolitos, que no se han logrado identificar, pero que son característicos sólo de dichas muestras. Sin embargo, cuando las concentraciones de ciprofloxacino fueron mayores o iguales a 4 µg/mL, se detectó la

presencia de otros metabolitos, diferentes a los anteriores, y que sólo aparecen en estas muestras.

Mediante observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento visible fue 4 $\mu\text{g/mL}$ (cepa de *P. aeruginosa* con resistencia a ciprofloxacino $> 2 \mu\text{g/mL}$ (Estepa *et al.*, 2017)). Estos datos también sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con ciprofloxacino con concentraciones de 4 $\mu\text{g/mL}$ y superiores. Las muestras restantes (2 y 1 $\mu\text{g/mL}$) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10^9 - 10^{11} UFC/mL.

Para el análisis mediante PCA se seleccionaron las partes del espectro que diferencian las muestras en dos grupos. Por un lado, aquellas en las que el antibiótico está funcionando y en las que la bacteria realiza su metabolismo habitual sin influencia del antibiótico. Para ello, una vez realizado el apilamiento de los espectros, eliminamos aquellas regiones que visualmente ofrecen una nula variabilidad. Dichos espectros aparecen en la figura 36.

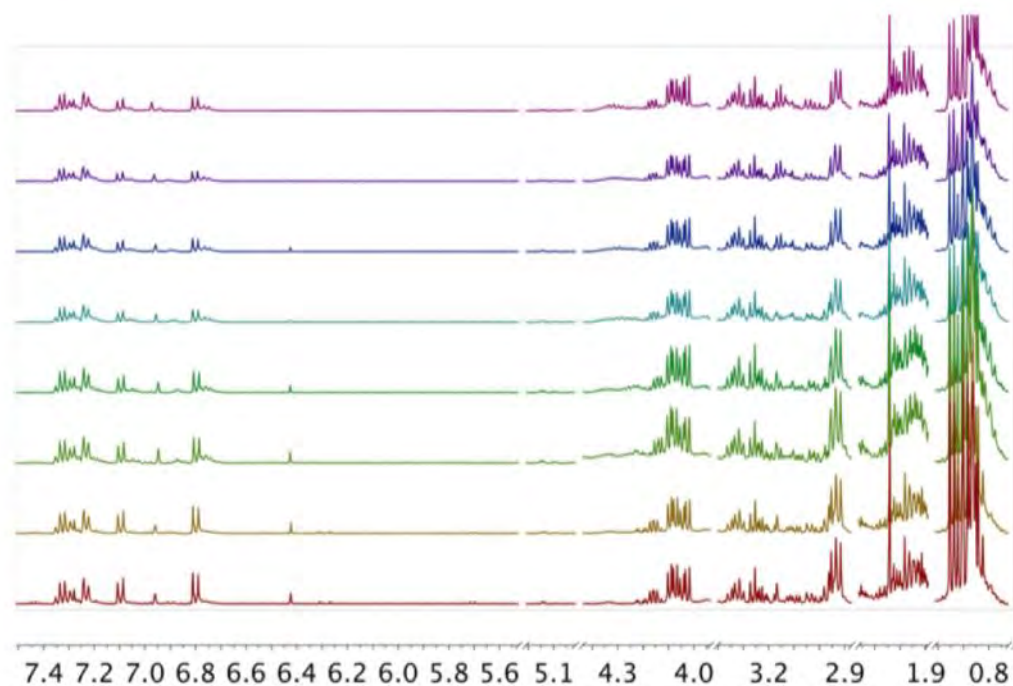


Figura 36. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA.

Para la realización del PCA se utiliza un tamaño de intervalo de 0,01 ppm y aplicando una normalización (sum) y un escalado de Pareto, obteniendo la distribución de componentes principales con una CP1 con un peso relativo de 61,3% y un CP2 con un peso relativo de 21,5%.

Por último, en la figura 37 se muestra la gráfica de componentes principales que explica el 82,8% de la varianza de las muestras. La CP1 muestra una correlación positiva con todas las muestras con alta concentración de antibiótico, incluida la mínima de las mismas que corresponde con la CMI. Sin embargo, muestra una correlación negativa para las muestras con una concentración de antibiótico por debajo de la CMI. Esto permite de una forma fácil y visual analizar la acción del antibiótico en las diferentes concentraciones y separar claramente en dos grupos aquellas muestras que están por debajo de la CMI y aquellas que están en una concentración igual o superior a la CMI.

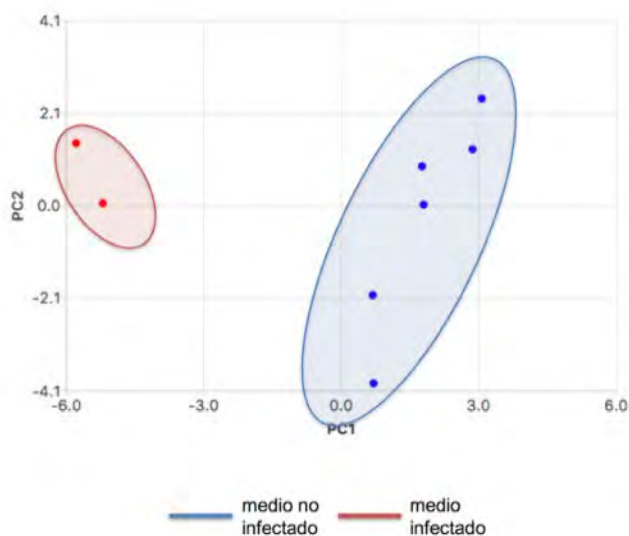


Figura 37. Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN.

1.2.4 Prueba de susceptibilidad de *P. aeruginosa* W30 frente a gentamicina

En las figuras 38 y 39 se muestran los espectros de ^1H RMN obtenidos del estudio de *P. aeruginosa* W30 frente a diferentes concentraciones de gentamicina.

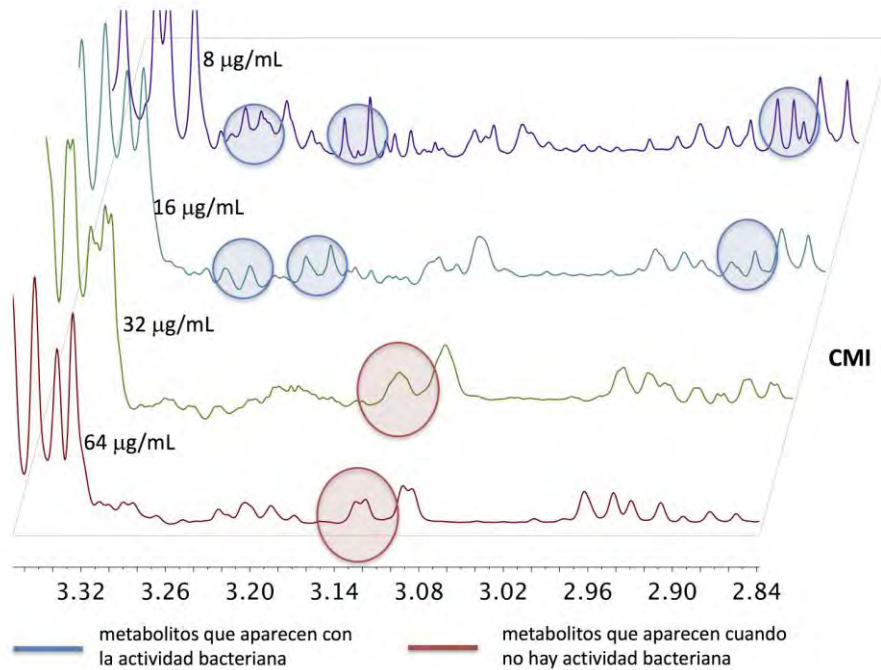


Figura 38. Espectros de ^1H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul).

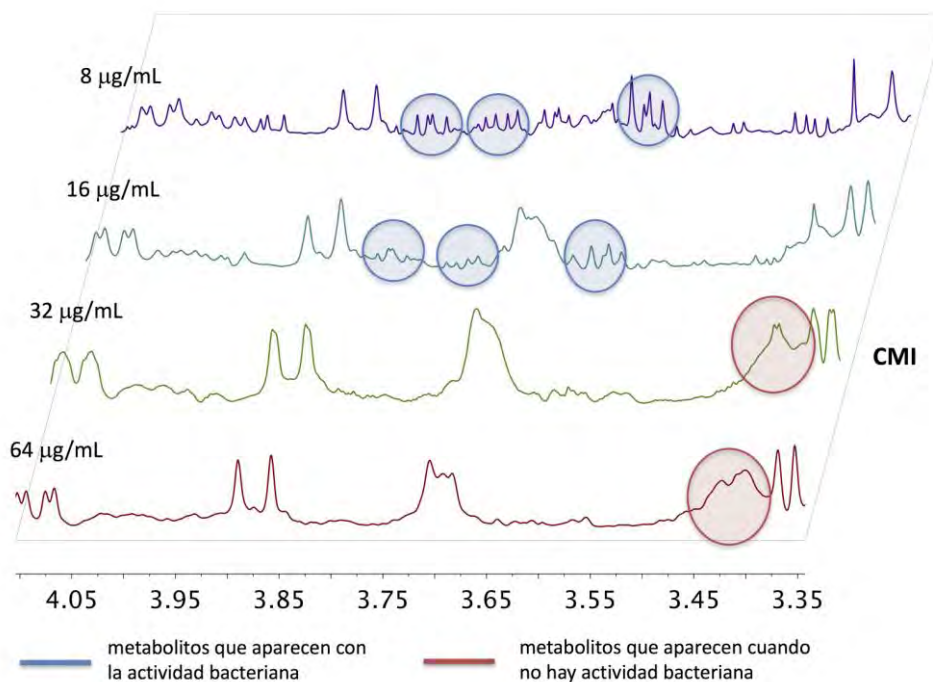


Figura 39. Espectros de ¹H RMN de las muestras de *P. aeruginosa* W30 incubadas con gentamicina (las concentraciones se muestran a la izquierda). En los espectros se aprecian bien los cambios en la concentración de metabolitos: los que aparecen cuando no hay actividad bacteriana (redondeados en rojo) como los que aparecen cuando si hay actividad (redondeados en azul).

De acuerdo a las figuras anteriores (38 y 39), al comparar los espectros de las muestras con baja concentración en antibiótico, es decir con actividad bacteriana, con los que tienen una alta concentración de antibiótico, y por lo tanto nula actividad bacteriana se observa alguna diferencia apreciable en la región de 3,32 a 2,84 ppm y 4,05 a 3,35 ppm. En el espectro obtenido del análisis de la muestra con concentración de gentamicina de 8 µg/mL se observa la presencia de unos metabolitos característicos (no identificados) y que, por lo tanto, aparecen cuando hay actividad bacteriana, mientras que en el de la muestra con una concentración de 64 µg/mL se detecta la presencia de otros metabolitos, distintos a los anteriores, y que tampoco se han logrado identificar, y que aparecen cuando no hay actividad bacteriana. Al igual que en el caso anterior, al no poder identificar los metabolitos que sufren cambios se realizará posteriormente un análisis de PCA en regiones concretas de los espectros.

El análisis de los espectros obtenidos con concentraciones menores a 32 µg/mL de gentamicina muestran la presencia de unos determinados metabolitos (no identificados) pero que son característicos sólo de dichas muestras. Sin embargo, cuando las

concentraciones de gentamicina fueron mayores o igual a 32 $\mu\text{g/mL}$, se detectó la presencia de otros metabolitos diferentes a los anteriores y que sólo aparecen en estas muestras.

Mediante la observación directa de la turbidez en los tubos de macrodilución se observó que la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento visible fue 32 $\mu\text{g/mL}$ (cepa de *P. aeruginosa* con resistencia a gentamicina $> 8 \mu\text{g/mL}$ (Estepa *et al.*, 2017)). Del mismo modo que en los casos anteriores, estos datos también sugieren que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ^1H RMN concuerdan con los obtenidos de visualización directa mediante macrodilución.

El recuento bacteriano de las placas de cultivo no mostró crecimiento bacteriano en las placas con gentamicina con concentraciones iguales y superiores a 32 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras restantes (16 y 8 $\mu\text{g/mL}$) mostraron un crecimiento bacteriano en el rango de 10^9 - 10^{10} UFC/mL.

Nuevamente acudimos al análisis multivariante para confirmar los resultados anteriores. Para ello, una vez efectuado el apilamiento de los espectros eliminamos aquellas regiones que visualmente ofrecen una nula variabilidad. Dichos espectros aparecen en la figura 40.

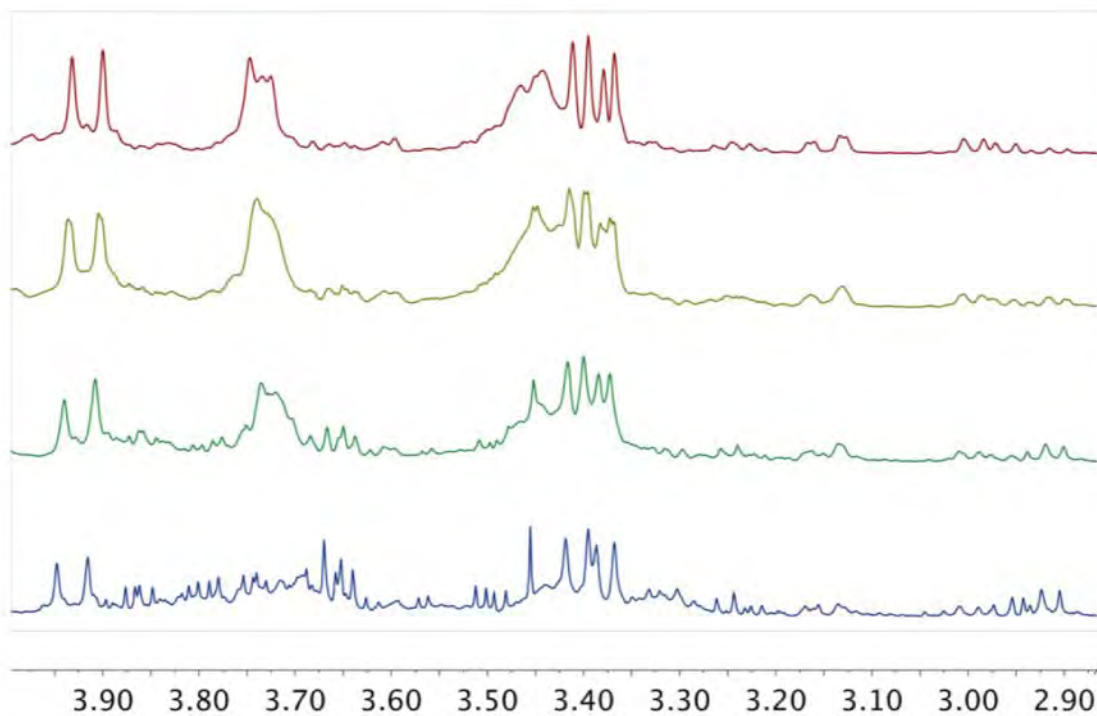


Figura 40. Regiones de los espectros seleccionadas para el análisis de PCA.

Para la realización del PCA se utiliza en esta ocasión un tamaño de intervalo de 0,05 ppm y aplicando una normalización (sum) y un escalado de Pareto, obteniendo la distribución de componentes principales con una CP1 con un peso relativo de 88,6% y un CP2 con un peso relativo de 10,6%.

Por último, en la figura 41 se muestra la gráfica de componentes principales que explica el 99,2% de la varianza de las muestras. La CP1 muestra una correlación positiva con todas las muestras con alta concentración de antibiótico, incluida la mínima de las mismas que corresponde con la CMI. Sin embargo, muestra una correlación negativa para las muestras con una concentración de antibiótico por debajo de la CMI. Esto permite nuevamente de una forma fácil y visual analizar la acción del antibiótico en las diferentes concentraciones y separar claramente en dos grupos aquellas muestras que están por debajo de la CMI y aquellas que están en una concentración igual o superior a la CMI.

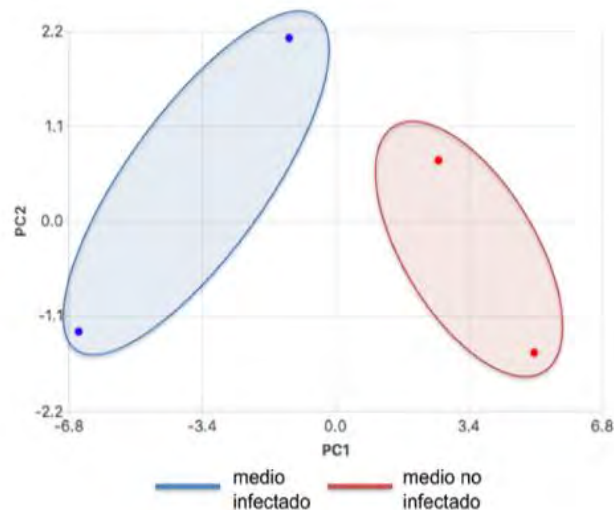


Figura 41. Análisis de componentes principales derivado de las regiones seleccionadas de los espectros de ^1H RMN.

2. Estudios de cinética por RMN en *E. coli* ATCC 25922

Los experimentos llevados a cabo incubando directamente las muestras con *E. coli* ATCC 25922, en ausencia de antimicrobiano, en el tubo de RMN permitieron observar que la señal de etanol aparece a las 3 horas y 40 minutos mientras que la señal de treonina desaparece a las 5 horas y 20 minutos (figura 42). Con estos datos se puede establecer que la actividad bacteriana ocurre dentro del tubo de RMN y que el proceso metabólico comienza alrededor de las 3 horas y finaliza en torno a las 6 horas.

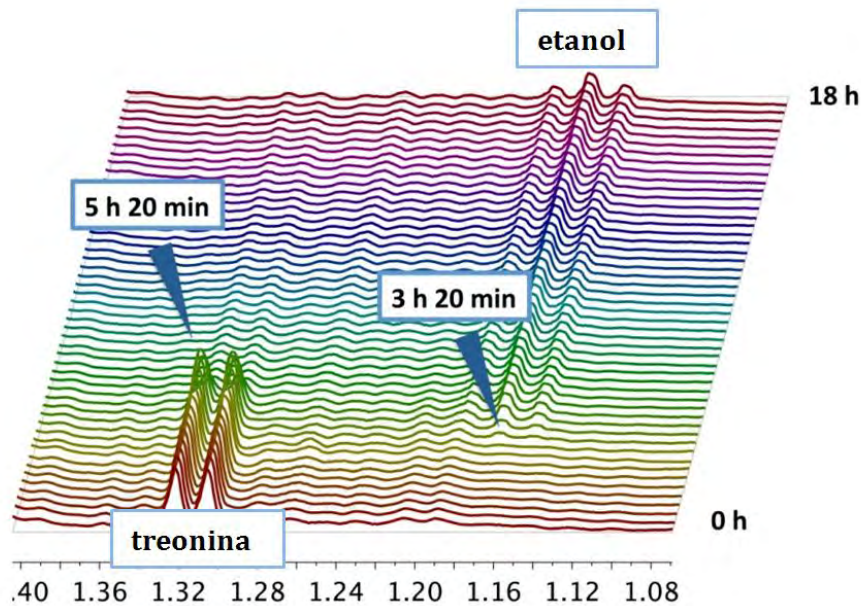


Figura 42. Espectros apilados de ^1H RMN obtenidos de la incubación de *E. coli* ATCC 25922. En el espectro se pueden apreciar los cambios metabólicos ocurridos en el proceso: el metabolito treonina es consumido cuando las bacterias están activas mientras que el etanol es un metabolito producido por las bacterias.

Posteriormente se realizaron los mismos experimentos, directamente en tubos de RMN pero en presencia de diferentes concentraciones de gentamicina. Así, el análisis de las muestras de *E. coli* ATCC 25922 con dos concentraciones de gentamicina inferiores a la CMI (CMI: 0,25-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CLSI, 2016)), una concentración de 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y otra de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se muestran en las figuras 43 y 44, respectivamente. En la muestra con una concentración de gentamicina de 0,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la señal de etanol aparece a las 4 horas y 40 minutos, más tarde que en la muestra sin antimicrobiano, y la misma señal aparece aún más tarde, a las 8 horas y 40 minutos, en la muestra con concentración de gentamicina de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acuerdo al consumo de treonina la señal desaparece más lentamente a medida que aumenta la concentración de gentamicina. Así, como ya se ha citado anteriormente en los experimentos llevados a cabo incubando directamente las muestras con *E. coli* en el tubo de RMN sin antimicrobiano, la señal de treonina desaparece a las 5 horas y 20 minutos (figura 42), sin embargo, esta señal desaparece a las 6 horas cuando la concentración de gentamicina en la muestra es de 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a las 12 horas 20 minutos en la muestra con concentración de gentamicina de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figuras 43 y 44, respectivamente).

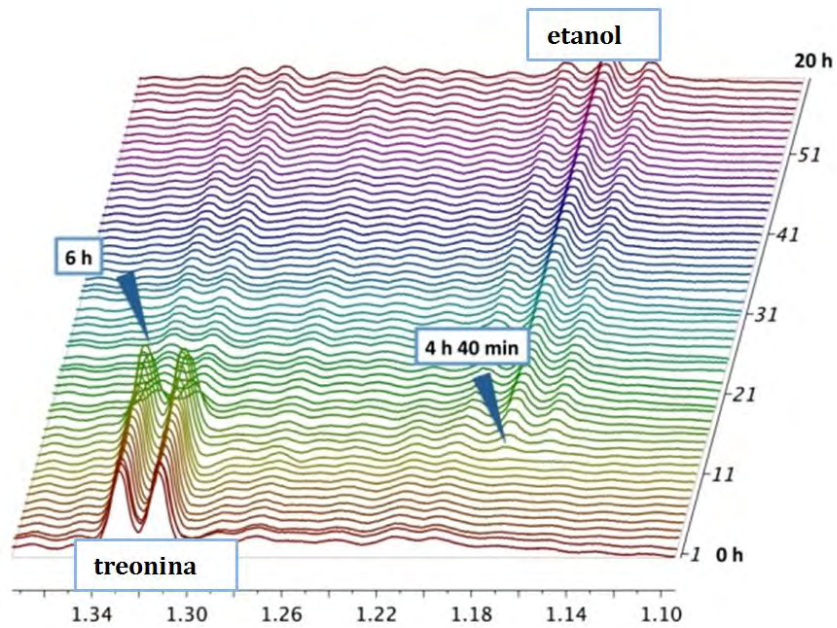


Figura 43. Espectros apilados de ^1H RMN de la muestra de *E. coli* ATCC 25922 en presencia de gentamicina a una concentración de $0,06 \mu\text{g/mL}$ durante 20 horas.

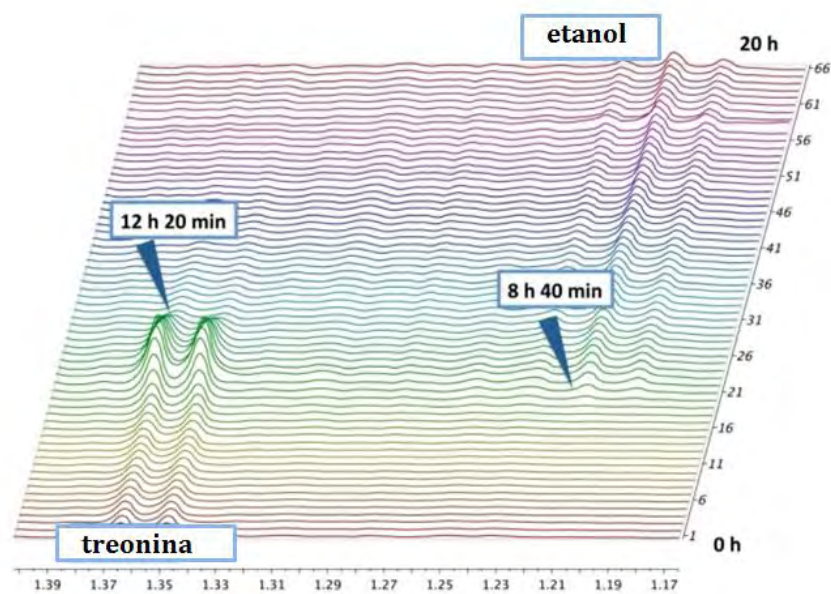


Figura 44. Espectros apilados de ^1H RMN de la muestra de *E. coli* ATCC 25922 en presencia de gentamicina a una concentración de $0,125 \mu\text{g/mL}$ durante 20 horas.

3. Estudios metabólicos mediante RMN en *Rickettsia* spp.

3.1 Experimentos con ^1H RMN

En la figura 45 se muestra el espectro unidimensional del medio de cultivo de las muestras infectadas con *R. slovacica* y el espectro control que sólo contiene medio de cultivo. Ambos espectros, tanto los cultivos celulares infectados con *R. slovacica* como los no infectados, muestran la presencia de etanol y ácido láctico. Además, la repetición de los experimentos mostró que la variación de intensidades de las señales no son representativas de la acción de *R. slovacica*.

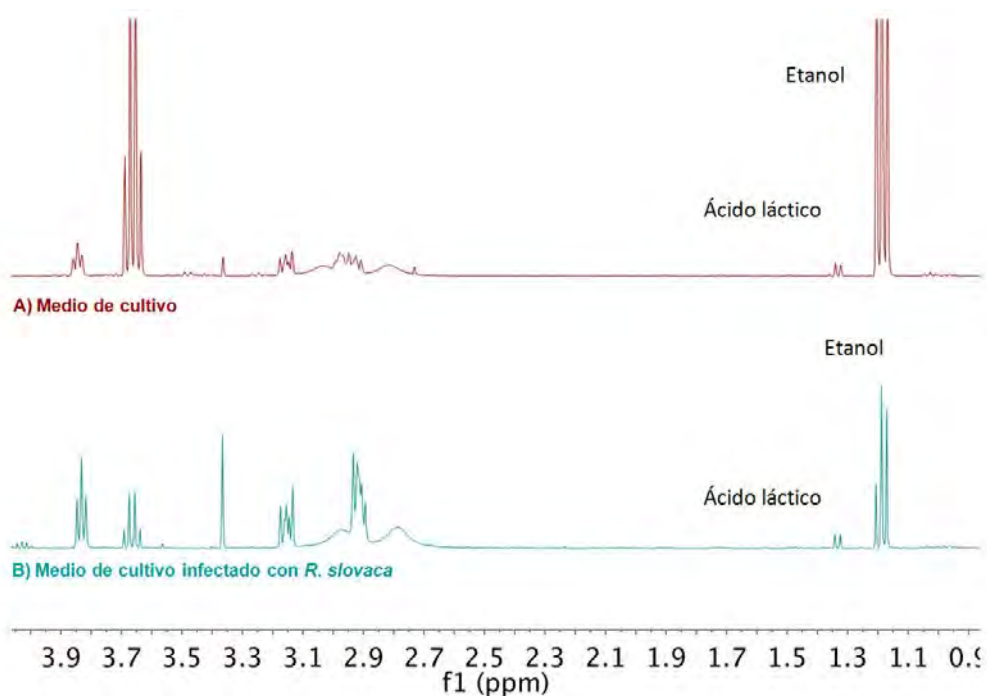


Figura 45. Espectro de una dimensión de ^1H RMN en el que se muestra la presencia de ácido láctico y etanol tanto en las muestras infectadas por *R. slovacica* como en las no infectadas. A) Espectro del medio de cultivo celular infectado con *R. slovacica*. B) Espectro del medio celular no infectado (control).

Al no encontrar diferencias significativas entre los espectros de ^1H RMN del medio de cultivo solo y el medio infectado con *R. slovacica* se decidió abordar otra metodología consistente en añadir un compuesto con marcaje isotópico para poder seguirlo por RMN del correspondiente núcleo, ^{13}C RMN o ^{15}N RMN.

3.2 Experimentos con ^{13}C RMN

Se decidió comenzar por el isótopo 13 del carbono ya que es fácil de seguir mediante ^{13}C RMN y además hay bastantes compuestos disponibles de forma comercial. La figura 46 muestra el espectro de una dimensión de ^{13}C RMN del medio de cultivo de la muestra infectadas con *R. slovacica* y el espectro del control que de la muestra que sólo contiene medio de cultivo, ambas muestras suplementadas con D-[1- ^{13}C]glucosa. No se observan diferencias en los perfiles metabólicos de ambos espectros, tanto si la muestra está infectada con *R. slovacica*, como si no lo está, cuando se analizan mediante ^{13}C RMN. Además, la glucosa se transforma en etanol en ambas muestras.

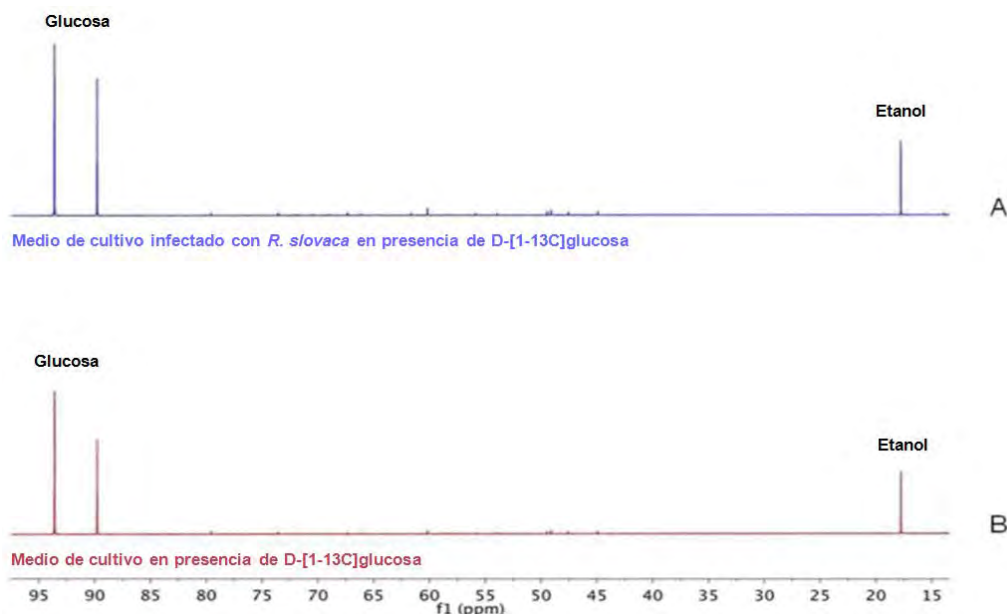


Figura 46. Espectro de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras suplementadas con D-[1- ^{13}C]glucosa. A) Medio de cultivo de células infectadas con *R. slovacica* en presencia de D-[1- ^{13}C]glucosa. B) Espectro del medio de las células no infectadas suplementadas con D-[1- ^{13}C]glucosa.

Dado que la D-[1- ^{13}C]glucosa no permitió observar diferencias entre las muestras infectadas por *R. slovacica* y las no infectadas, se probó a adicionar a las muestras otros sustratos con objeto de observar si su metabolismo era capaz de diferenciar la acción del cultivo celular de la acción de las rickettsias. Para ello se utilizaron diferentes aminoácidos marcados.

Se comenzó con la adición de glicina marcada en el carbono 2 ([2- ^{13}C]glicina). La figura 47 muestra el espectro de una dimensión de ^{13}C RMN del medio de cultivo de *R. slovacica*

y el espectro del que sólo contiene medio, ambos suplementados con [2- ^{13}C]glicina. Además se muestran los espectros obtenidos de esas mismas muestras pero sin adición de glicina. En este caso, los espectros muestran diferencias entre ellos. Como se puede observar en la figura 47, la glicina se transforma parcialmente a serina sólo en los cultivos en los cuales se ha adicionado. Además, la cantidad de serina formada es significativamente mayor en los cultivos infectados con *R. slovacica*. La identificación de serina se realizó mediante la adición de la misma y el desplazamiento de las señales obtenidas.

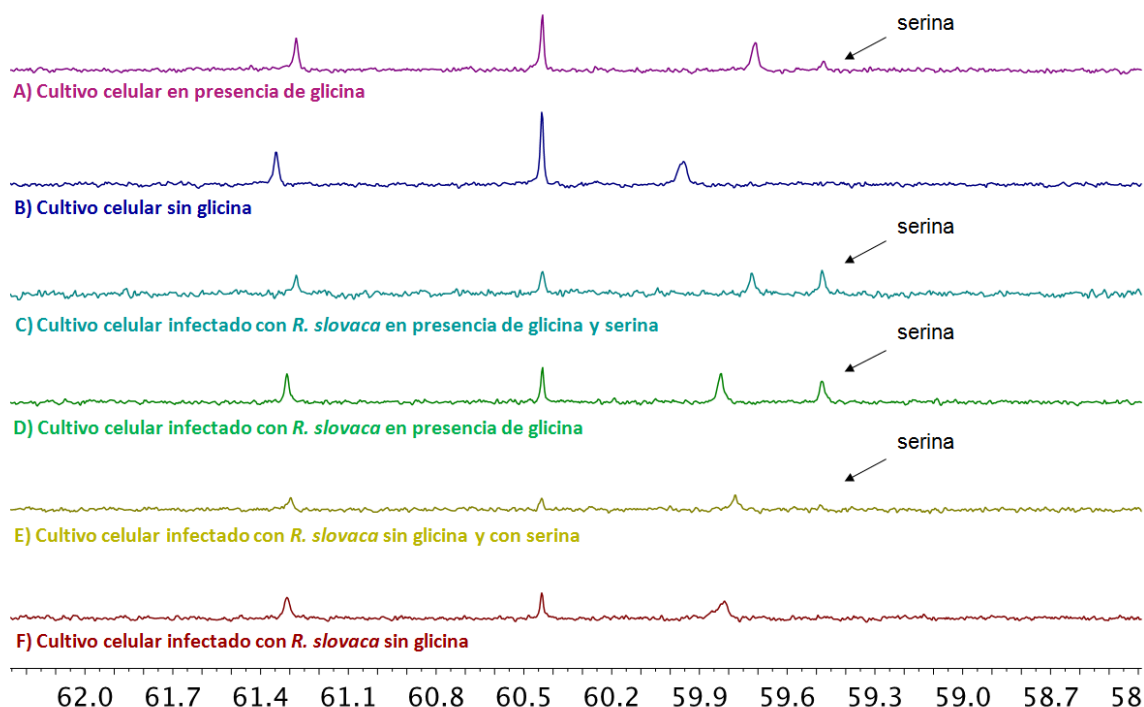


Figura 47. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras con medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* y sin infectar en presencia y ausencia de [2- ^{13}C]glicina y serina. A) Espectro del medio del cultivo celular suplementado con [2- ^{13}C]glicina. B) Espectro obtenido de la muestra que sólo contenía medio del cultivo celular. C) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* en presencia de [2- ^{13}C]glicina y serina. D) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* en presencia de [2- ^{13}C]glicina. E) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* en presencia de serina pero sin [2- ^{13}C]glicina. F) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* sin [2- ^{13}C]glicina.

Otro aminoácido que se probó como sustrato fue L-[2- ^{13}C]leucina. En el análisis de los perfiles metabólicos obtenidos de los espectros de las muestras infectadas con *R. slovacica* y sin infectar suplementadas con L-[2- ^{13}C]leucina no se observan diferencias (figura 48).

Si bien es cierto que, no se observan diferencias en la presencia de nuevos metabolitos sino sólo en las intensidades de algunas señales, este hecho es difícilmente asignable a la infección por *R. slovacica*.

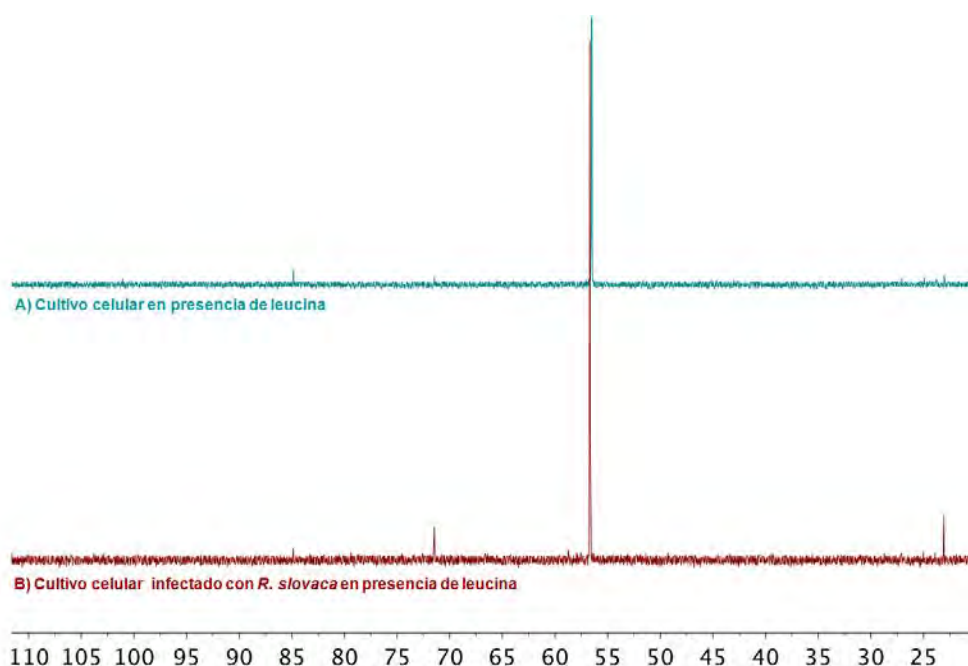


Figura 48. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras en presencia de L-[2- ^{13}C]leucina. A) Espectro del medio de cultivo celular no infectado suplementado con L-[2- ^{13}C]leucina. B) Espectro de medio del cultivo celular infectado con *R. slovacica* en presencia de L-[2- ^{13}C]leucina.

Otro de los aminoácidos empleados para llevar a cabo este tipo de experimentos fue L-[1- ^{13}C]isoleucina. En la figura 49 se muestran los espectros de los medios de cultivo de las muestras infectadas y sin infectar por *R. slovacica* suplementadas con L-[1- ^{13}C]isoleucina. El análisis de los perfiles metabólicos de dichos espectros permite observar que, sólo en la muestra infectada con la bacteria se produce una transformación parcial del aminoácido a otros metabolitos.

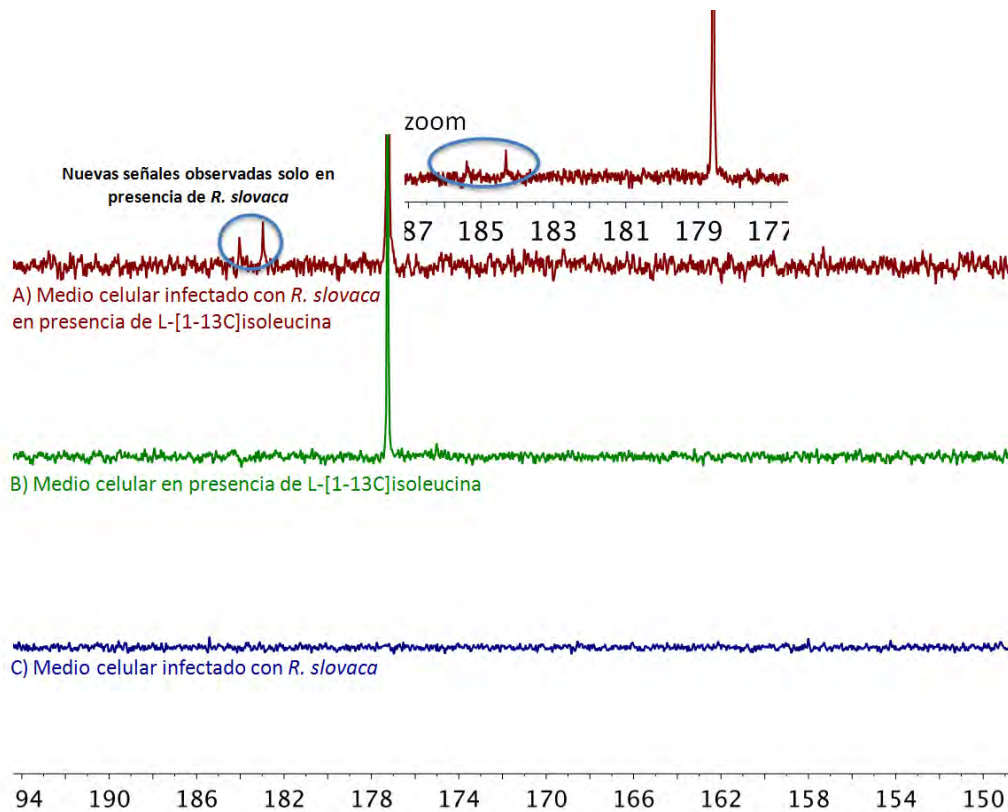


Figura 49. Espectros de una dimensión de ^{13}C RMN de las muestras de los cultivos infectados y no infectados con *R. slovaca* en presencia de L-[1- ^{13}C]isoleucina y de la muestras control sin el aminoácido. A) Espectro del medio de cultivo celular infectado con *R. slovaca* en presencia de L-[1- ^{13}C]isoleucina. B) Espectro del medio de cultivo celular suplementado con L-[1- ^{13}C]isoleucina. C) Espectro del medio del cultivo celular infectado con *R. slovaca* sin adición de aminoácido.

3.3 Experimentos con ^{15}N RMN

Otro de los aminoácidos empleados fue L-[^{15}N]tirosina. En la figura 50 se muestran los espectros de muestras infectadas con *R. slovaca* y sin infectar suplementadas L-[^{15}N]tirosina. En análisis de sus perfiles metabólicos no permitió observar diferencias entre ellos.

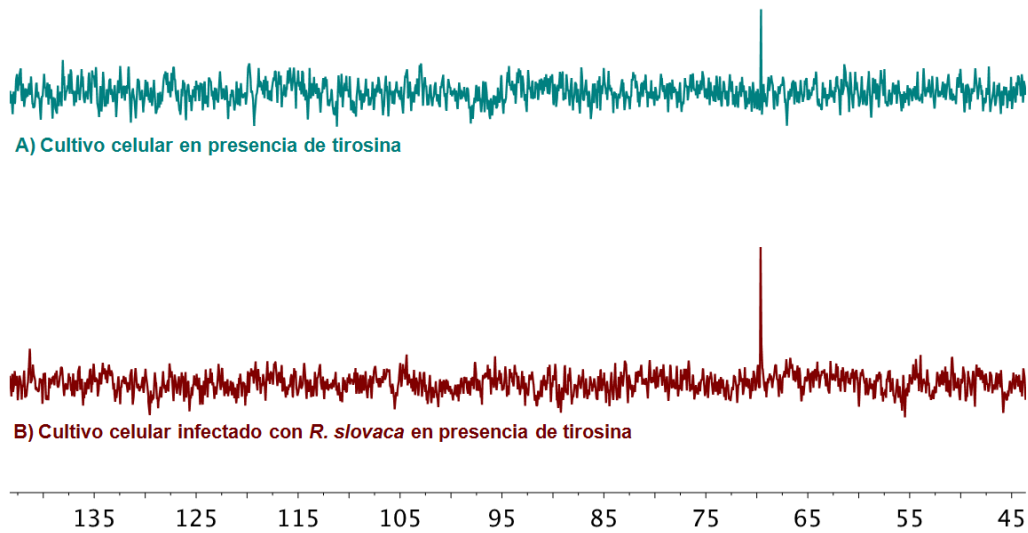


Figura 50. Espectros de una dimensión de ^{15}N RMN de las muestras suplementadas con L-[^{15}N]tirosina. A) Espectro del medio de cultivo celular suplementado con L-[^{15}N]tirosina. B) Espectro de la muestra del medio del cultivo celular infectado con *R. slovaca* en presencia de L-[^{15}N]tirosina.

DISCUSIÓN

En esta memoria se presentan resultados originales del estudio de la susceptibilidad de bacterias a antimicrobianos mediante la técnica de RMN. Además, se muestran resultados preliminares de la utilización de la RMN en el estudio del metabolismo de *Rickettsia* spp.

Desde hace años la espectroscopia de RMN ha sido utilizada para explorar vías metabólicas (Brown *et al.*, 1977; Chalk *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1994; Gadian, 1995; Viant *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2004; Subramaniam *et al.*, A, 2005; Ranjan *et al.*, 2006; Avenozza *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2012b; García-Álvarez *et al.*, 2013; Calvani *et al.*, 2014; Rae, 2014; Larive *et al.*, 2015; García-Álvarez *et al.*, 2016; Markley *et al.*, 2017) y también para el estudio de susceptibilidad a antifúngicos y para la identificación de microorganismos sin gran repercusión en la literatura científica (Gupta *et al.*, 2005; Coen *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2006; Plummer *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012b). Sin embargo, hasta el momento, esta técnica no ha sido utilizada para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos en bacterias. El desarrollo y adaptación de esta técnica para este fin ha requerido de su puesta a punto para que los resultados obtenidos pudieran ser validados mediante la comparación con las técnicas habituales. Así, los estudios preliminares que se presentan en esta Tesis avalan la posibilidad de convertir la espectroscopia de RMN en una nueva alternativa para el estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos.

Este proyecto de investigación nació de la hipótesis de que conocer las rutas metabólicas mediante RMN de los microorganismos de difícil cultivo, como *Rickettsia* spp., permitiría conocer la susceptibilidad de las mismas a antimicrobianos y/o el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. No obstante, parecía pertinente primero validar la técnica en bacterias bien conocidas mediante técnicas convencionales. Así, para la puesta a punto, se eligieron cepas de referencia de bacterias comunes, ampliamente estudiadas, como *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los primeros pasos se dieron en un trabajo realizado previo al desarrollo de esta Tesis mediante el cual se estudió el metabolismo de *E. coli* en diferentes medios de cultivo (García-Álvarez, 2010). Estos estudios permitieron ver diferentes metabolitos en función de los medios de cultivo utilizados pero, dado que el medio de cultivo utilizado por los métodos estandarizados era MH (CLSI, 2016), se decidió que los estudios que se incluyen en esta Tesis se realizaran con dicho medio. Para poder determinar mediante RMN la sensibilidad a los antimicrobianos de las bacterias habituales estudiadas, ha sido necesario determinar los metabolitos producidos por las bacterias así como los consumidos por las mismas mediante la comparación de espectros de diferentes muestras.

Los metabolitos son los reactivos (sustratos y productos) de las reacciones bioquímicas que ocupan todos los aspectos de la vida como el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y la bioenergética (Gupta *et al.*, 2012b). Para ello, en primer lugar, ha sido necesario el estudio de los dos controles preparados en todos los experimentos (ambos sin antimicrobiano): uno compuesto únicamente por el medio de cultivo y otro con el medio de cultivo en presencia de la bacteria a estudio. La comparación entre ambos permite determinar cuáles son los metabolitos producidos por las bacterias y que, por lo tanto, no están presentes en las muestras que no contienen microorganismos, con los metabolitos consumidos por las bacterias presentes en el medio de cultivo en ausencia bacteria y que, por lo tanto, no están presentes en las muestras que contienen el microorganismo. Una vez conocidos los espectros de ambos controles se puede llevar a cabo los estudios de sensibilidad a antimicrobianos de una manera sencilla. Así, las muestras con la bacteria objeto de estudio incubadas en presencia de diferentes concentraciones de antimicrobiano permite distinguir si hay actividad bacteriana o no, es decir, consumo o producción de metabolitos por parte de las bacterias. Aquellas muestras con concentraciones de antimicrobiano cuyos espectros sean iguales al espectro del control sin bacteria, serán clasificadas como concentraciones inhibitorias del fármaco ya que no habrán permitido el crecimiento (metabolismo) bacteriano, ni producir metabolitos nuevos, ni consumir los del medio. De este modo, el espectro de la concentración más baja de fármaco que inhiba el crecimiento de la bacteria ha sido determinado como la CMI. Sin embargo, todas las muestras con concentraciones de antimicrobiano cuyos espectros fueron iguales al espectro del control con bacteria, se han clasificado como concentraciones subinhibitorias del fármaco por haber permitido el crecimiento bacteriano, y por lo tanto, la producción de metabolitos nuevos y el consumo de los del medio. Para evitar la variabilidad inter-experimento se decidió que todos los análisis se realizaran por triplicado.

Así, de acuerdo a lo ya comentado, los análisis realizados con las bacterias habituales cuyas CMI son conocidas por pruebas de sensibilidad estandarizadas, han permitido validar el uso de la espectroscopia de RMN en estudios de susceptibilidad a antimicrobianos.

E. coli es una bacteria aeróbica facultativa capaz de fermentar azúcares mediante un tipo de fermentación ácido mixta en una mezcla de compuestos diferentes entre los que se encuentran los ácidos acético y succínico, entre otros, y el etanol (Schlegel HG, 1995; Arita M, 2004; Todar K; 2006; Castano-Cerezo *et al.*, 2009). Las diferencias en las

intensidades de los picos correspondientes a dichos metabolitos que se observan en los espectros obtenidos, han permitido determinar la CMI de gentamicina, ciprofloxacino y levofloxacino en dos cepas de *E. coli* (ATCC 25922 y C1550) usando la técnica de RMN. De este modo, el consumo del aminoácido treonina, presente en el medio de cultivo, se interrumpe cuando se alcanza la CMI. Es bien conocido que el aminoácido treonina está involucrado no sólo en el metabolismo de *E. coli* sino también en su regulación, siendo uno de los aminoácidos que la bacteria cataboliza rápidamente (Chan y Newman, 1981; Sawers, 1998). Por lo tanto, se supone que el ácido succínico, el ácido acético y el etanol son metabolitos producidos por *E. coli* mientras que la treonina es un metabolito consumido por dicha bacteria. Estos datos indican así que la actividad microbiana cesa para *E. coli* ATCC 25922 cuando la concentración de gentamicina es de 0,5 µg/mL y la de ciprofloxacino de 0,004 µg/mL, y cuando la concentración de ciprofloxacino y levofloxacino es de 512 y 64 µg/mL, respectivamente, para la cepa C1550.

Una ventaja del uso de la RMN frente al método convencional, es que, a pesar de que el tiempo utilizado para llevar a cabo los experimentos de RMN fue el mismo, el uso de la RMN permite observar el metabolismo bacteriano, asegurando la no viabilidad de las bacterias cuando se alcanza la CMI. Además, el uso de la RMN ofrece la posibilidad de determinar el recuento bacteriano de forma más rápida que con el método de referencia mediante la integración de las señales. Cabe destacar que, aunque al realizar el recuento de bacterias viables en las placas en las que se sembraron de las muestras con concentración de antimicrobiano equivalente a la CMI se observa crecimiento bacteriano (*E. coli* ATCC 25922 con gentamicina 0,5 µg/mL: 10^6 UFC/mL, y con ciprofloxacino 0,004 µg/mL: 10^2 UFC/mL. *E. coli* C1550 con ciprofloxacino 512 µg/mL: 10^5 UFC/mL, y con levofloxacino 0,004 µg/mL: 10^3 UFC/mL) la ^1H RMN no detecta metabolismo bacteriano en esos rangos. Estos resultados sugieren que 10^6 UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922 con gentamicina y 10^2 UFC/mL con ciprofloxacino, y 10^5 y 10^3 UFC/mL para *E. coli* C1550 con ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente, podrían estar en el límite de detección del espectrómetro de RMN usado en nuestros experimentos o ser este el límite en el cual la concentración bacteriana activa el metabolismo (García-Álvarez *et al.*, 2015a).

Existe una compleja relación entre las concentraciones de antimicrobiano y las tasas de crecimiento y muerte bacterianas. Esta relación funcional, denominada farmacodinámica, es un parámetro importante en el diseño racional de los protocolos para un tratamiento

antibiótico eficaz (Regoes *et al.*, 2004). El comportamiento bacteriano frente a distintas concentraciones de antibiótico, por lo general, suele examinarse mediante el uso de curvas de muerte o de crecimiento. Las curvas de muerte o crecimiento pueden usarse para estudiar los efectos anti-infecciosos mediante modelos *in vitro*, con la ventaja de proporcionar una información más detallada sobre el curso en el tiempo del efecto antibacteriano (Chalkley y Koornhof, 1985; Mueller *et al.*, 2004). Por su parte, como hemos demostrado con los experimentos realizados, la RMN es una técnica excelente para estudiar el curso de la evolución de un proceso biológico mediante el seguimiento del metabolismo bacteriano, y de cómo este metabolismo puede ser afectado por diferentes concentraciones de antimicrobiano. Además, estos estudios pueden realizarse en poco tiempo, tal y como se ha demostrado, con la realización de experimentos directamente en tubos de RMN (García-Álvarez *et al.*, 2015a).

Los experimentos con *E. coli* ATCC 25922 realizados, desde el inicio, en el tubo de RMN permiten observar la evolución del metabolismo de la bacteria y permiten evaluar el comportamiento cinético de *E. coli* en presencia de gentamicina. Dicho metabolismo es capaz de detectarse en menos de 6 horas (la señal de etanol aparece a las 3 horas y 40 minutos mientras que la señal de treonina desaparece a las 5 horas y 20 minutos). Esos resultados dieron lugar a la posibilidad de evaluar la efectividad del antimicrobiano gentamicina directamente en dicho tubo. A pesar de que la adición de antimicrobiano a las muestras ralentiza el metabolismo bacteriano permite detectar la CMI en un periodo de unas 12 horas. Además, como se puede ver con los espectros mostrados en el apartado de resultados, es muy fácil seguir el crecimiento bacteriano usando la RMN. Teniendo en cuenta que los estudios que utilizan cinética de muerte o crecimiento son costosos en términos económicos y de tiempo, y que no se realizan habitualmente en laboratorios de rutina, este enfoque novedoso mediante el uso de la RMN podría convertir a esta técnica en una herramienta poderosa para el estudio de agentes antimicrobianos (García-Álvarez *et al.*, 2015a).

P. aeruginosa es una bacteria gram negativa, aerobia obligada que presenta metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, capaz de producir aeróbicamente pequeñas cantidades de ácido procedentes de la glucosa. Esta bacteria es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos entre los que se encuentran diferentes azúcares, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos y aminas, además de otros. *P. aeruginosa* también es capaz de

metabolizar la glucosa por la ruta de Entner-Doudoroff, una vía metabólica alternativa que cataboliza glucosa a piruvato usando unos enzimas diferentes a la ruta de las pentosas fosfato y a la glucólisis, en la que son clave las enzimas 6-fosfogluconato deshidrasa y la cetodesoxiglucosa-fosfato aldolasa (Madigan *et al.*, 2016). Parte del piruvato también puede convertirse en ácido acético mediante la enzima acetato kinasa (Auriol *et al.*, 1971) o incluso mediante la actividad de aldehído deshidrogenasa ligada a NAD⁺ (Nosova *et al.*, 1996). Con los experimentos realizados a lo largo de esta Tesis no hemos sido capaces de identificar los metabolitos observados en los espectros. No obstante, se observa la presencia de ciertos metabolitos cuando no hay actividad por parte de *P. aeruginosa* y de otros metabolitos distintos cuando si hay actividad bacteriana. En este sentido cabe destacar dos aspectos relativos a los metabolitos presentes en los espectros de muestras con y sin actividad de *P. aeruginosa*. Por un lado, estos metabolitos son diferentes a los que se observan en el caso de *E. coli*. No aparecen ni el ácido succínico, ni el ácido acético, ni el etanol, y tampoco desaparece la treonina. Esto implica un metabolismo diferente de este tipo de bacterias, al menos, en este medio de cultivo concreto. Por otro lado, no ha sido posible identificar los metabolitos que sufren cambios por la presencia de *P. aeruginosa*. Esto se debe a que la caracterización de los mismos por RMN, en una mezcla compleja, no está exenta de dificultad y como ocurre en este caso, estos metabolitos no están en una concentración elevada, lo que dificulta su resolución. Este hecho también dificulta la posibilidad de que experimentos bidimensionales puedan ser adecuados. Además, no tienen un desplazamiento que pueda ser asignado a compuestos conocidos.

En un contexto amplio los análisis metabolómicos por RMN se pueden dividir en un análisis dirigido y en un análisis no dirigido. Básicamente en el análisis dirigido se conocen los metabolitos que se quieren estudiar y se puede realizar un análisis específico de los mismos. Sin embargo, otras veces no se conocen ni se pueden determinar las moléculas que están siendo afectadas por el metabolismo, como es el caso de los experimentos realizados en este trabajo con *P. aeruginosa*. Ante esta situación, el análisis y el estudio se fundamentan en comparar patrones de espectros. Como ayuda a este tipo de análisis se pueden utilizar herramientas estadísticas que permitan resolver problemas como la diferenciación de espectros. En este caso se ha utilizado la herramienta estadística PCA implementada en el propio programa de tratamiento de espectros MestReNova (Mestrelab Research). Cabe indicar que estos análisis de PCA pueden

suponer una importante automatización del análisis de susceptibilidad antimicrobiana mediante el empleo de la ^1H RMN. Los experimentos realizados con *P. aeruginosa* muestran la potencialidad de esta combinación de técnicas, pero son estudios iniciales que tendrán que ser corroborados con más tipos de bacterias y antibióticos, y con más número de experimentos en cada caso para poder tener datos verdaderamente significativos y robustos.

Como se ha comentado anteriormente, aunque en los experimentos realizados con *P. aeruginosa* los metabolitos no han podido ser identificados, al igual que en el caso de *E. coli*, las diferencias en los mismos que se observan en los espectros, han permitido determinar la CMI de la bacteria a gentamicina y ciprofloxacino usando la espectroscopia de RMN. Al igual que como ocurría para *E. coli*, la ^1H RMN no detecta metabolismo bacteriano en *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a ciprofloxacino cuando el recuento bacteriano es de 10^4 UFC/mL, lo que sugiere que 10^4 UFC/mL podría estar en el límite de detección del espectrómetro de RMN usado en nuestros experimentos o ser este el límite en el cual la concentración bacteriana activa el metabolismo.

Una vez aclarados los anteriores puntos, se puede concluir firmemente que la espectroscopia de RMN es capaz de detectar la CMI correctamente. Por ello, la técnica de RMN puede convertirse en una herramienta muy útil para el estudio de microorganismos que no crecen en los medios de cultivo habituales, para bacterias cuyo metabolismo no es bien conocido, y para aquellos agentes bacterianos para los que no se disponga de test de sensibilidad frente a antimicrobianos estandarizados. Además, el apoyo de herramientas estadísticas puede automatizar y facilitar la obtención de resultados.

Volviendo a la idea primitiva de la utilización de la RMN para el estudio de bacterias de difícil cultivo, se realizaron los experimentos para el estudio del metabolismo de una *Rickettsia* spp., en este caso *R. slovaca*. Estas bacterias son intracelulares y, por lo tanto, no crecen en los medios de cultivo habituales sino que requieren de cultivos celulares, hecho que supone una gran limitación para el estudio de su metabolismo al tener las células en las que crece su propio metabolismo. Debido a que no se observaron diferencias en el metabolismo de las muestras infectadas con *R. slovaca* y en el de las no infectadas mediante ^1H RMN, se decidió trabajar con marcaje isotópico en determinados compuestos y para seguir su evolución mediante ^{13}C RMN o ^{15}N RMN. Así, en los experimentos realizados en *R. slovaca* con D-[1- ^{13}C] glucosa no se detectan metabolitos

derivados de la misma, lo que sugiere que D-[1-¹³C] glucosa no es un buen predictor para seguir el metabolismo de estas bacterias. Sin embargo, este compuesto está implicado en el metabolismo celular independiente de la infección por *R. slovaca*. Estos resultados podrían confirmar que la glucosa no es sustrato metabólico de las rickettsias (Bovarnick y Snyder, 1949; Weiss, 1973). Se cree que estas bacterias no catabolizan la glucosa, por la falta de las permeasas adecuadas, de algunas enzimas glucolíticas o por la totalidad del sistema glucolítico (Weiss, 1973). De acuerdo a los experimentos realizados tras la adición de glicina ([2-¹³C]glicina), se observa un pico de serina que aparece solamente en las muestras suplementadas con dicho aminoácido. Este hecho sugiere que *R. slovaca* y/o las células Vero tienen capacidad para transformar glicina en serina. No obstante, se debe destacar que la cantidad de serina formada fue mayor cuando las células estaban infectadas. Este hallazgo podría deberse a la presencia de una enzima implicada en la transformación. Según Austin y cols., la actividad de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) bacteriana podría proporcionar un mecanismo para interconvertir glicina y serina (Austin *et al.*, 1987). Esta interconversión de glicina y serina catalizada por la SHMT rickettsial favorece la disponibilidad de ambos aminoácidos para el crecimiento de la bacteria (Austin *et al.*, 1987). Por lo tanto, la glicina sí podría servir como biomarcador para determinar el metabolismo de esta bacteria aunque no sería específico, ya que esta vía es utilizada por muchas otras bacterias (García-Álvarez *et al.*, 2015b). También se realizaron experimentos con otros aminoácidos marcados como la leucina y la tirosina (L-[2-¹³C]leucina y L-[¹⁵N]tirosina). Con estos experimentos se observó que ninguno de ellos era metabolizado por *R. slovaca*. Ésto se podría explicar porque las rickettsias no contienen transaminasas para el metabolismo de leucina o tirosina (Hopps *et al.*, 1956). Sin embargo, cuando se analizaron las muestras que contenían el aminoácido isoleucina (L-[1-¹³C]isoleucina), sólo las muestras infectadas con *R. slovaca* mostraron una transformación del aminoácido a un metabolito que no se ha podido identificar. En el espectro de muestras infectadas aparecen dos señales nuevas que, aunque son pequeñas, son significativas. La isoleucina, marcada en el carbonilo, probablemente se metaboliza para dar derivados con estructura cetoacídica por desaminación oxidativa. Sin embargo, la adición externa de este cetoácido no confirma su presencia. Por esta razón, se requieren más estudios para identificar correctamente este compuesto y evaluar el papel real del aminoácido isoleucina en el metabolismo de *Rickettsia* spp.. De hecho, los procesos de descarboxilación podrían dar lugar a la incorporación del carbono marcado en otros procesos metabólicos que hay que

estudiar. En este caso el marcaje isotópico en el aminoácido tiene lugar en el carbono carboxílico, por lo que la correspondiente descarboxilación y generación de dióxido de carbono (CO₂) marcado puede introducir éste CO₂ en otros procesos metabólicos exclusivos de *R. slovacica*. (García-Álvarez *et al.*, 2015b).

Para encontrar un buen predictor del metabolismo de *Rickettsia* spp. es crucial entender su bioquímica endógena, sus necesidades de crecimiento y llevar a cabo estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Por ello, aunque se han demostrado las posibilidades que ofrece la técnica de RMN, tenemos que controlar en futuros estudios las debilidades de la metodología. Una debilidad es el desconocimiento del metabolismo de la mayoría de los aminoácidos en las *Rickettsia* spp.. Por otro lado, el empleo de aparatos de RMN de mayor campo aumentarían la sensibilidad. Es posible que nuevos estudios con otros compuestos marcados con ¹³C puedan servir también como indicadores de la predicción del metabolismo de *R. slovacica*.

El análisis mediante RMN de susceptibilidad a antimicrobianos en *Rickettsia* spp. está suponiendo un gran trabajo y todavía no hemos podido determinar marcadores específicos para esta bacteria. En estudios previos a la realización de esta Tesis se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad con doxiciclina y amoxicilina en especies de *Rickettsia* mediante ¹H RMN (García-Álvarez, 2010). A pesar de que se identificaron señales de ácido láctico, ácido succínico y etanol, no se ve un patrón claro en todas las muestras que indique diferencias en el crecimiento bacteriano como en el caso de *E. coli* o de *P. aeruginosa*. Por ello, la incorporación de compuestos metabolizados por las rickettsias, como es el caso de isoleucina, abre una puerta en este terreno. Los metabolitos que producen pueden servir, en un futuro, como marcadores para estudios de su susceptibilidad a antimicrobianos. En la actualidad se sigue trabajando en su interpretación.

Tras la realización de estos experimentos, y una vez validada la técnica de RMN para conocer la susceptibilidad a antimicrobianos, de al menos ciertas bacterias, quedan muchos interrogantes y experimentos que realizar antes de su incorporación a la rutina de los laboratorios de microbiología clínica. Dado que la aplicación de la RMN a cultivos bacterianos permite detectar cualitativa y cuantitativamente los metabolitos producidos por los microorganismos, queda la tarea de realizar una librería de datos que permita de forma rápida identificar las señales correspondientes al metabolismo bacteriano. A largo

plazo, la creación de estas librerías de datos podría permitir incluso identificar por RMN bacterias directamente a partir de muestras clínicas mediante los productos específicos del metabolismo de una manera relativamente fácil y rápida en comparación con los métodos convencionales. Además, la implementación de métodos estadísticos puede ayudar a la automatización del proceso y favorecer la interpretación de los resultados.

A lo largo del tiempo han sido muchos los métodos que se han utilizado para identificación bacteriana. Entre ellos destacan la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier u otros basados en técnicas colorimétricas o fotométricas (Pezzlo, 1983; Pfaller y Koontz, 1985; Yu y Irudayaraj, 2005). Sin embargo, estas técnicas han mostrado una aceptación clínica limitada, de ahí la necesidad de desarrollar un método rápido, sencillo y sensible para la identificación de bacterias (Gupta *et al.*, 2012b). Utilizando la ^1H RMN con un enfoque metabólico se ha logrado la identificación y cuantificación de aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis* en muestras de orina de pacientes con infección del tracto urinario (ITU) de forma más rápida que utilizando los métodos de cultivo tradicionales. Para el diagnóstico clínico de las ITU por bacterias habituales se requiere de hasta casi 24 horas de incubación para obtener un recuento preciso de colonias, además de otras 12-24 horas necesarias para la identificación del microorganismo y las pertinentes pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, con el consecuente retraso en la instauración del tratamiento antimicrobiano que ello conlleva (Casadevall, 1996; Pappas, 1991; Gupta *et al.*, 2005). Sin embargo, la identificación de microorganismos causantes de ITU mediante RMN ha logrado realizarse en hasta 6-7 horas una vez obtenida la colonia, previo aislamiento de los microorganismos presentes en muestra, y conocido el espectro metabólico de las principales bacterias causantes de ITU (Gupta *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2005). El uso de la RMN para la exploración de perfiles metabólicos en orina proporciona un enfoque alternativo para la detección e identificación de ITUs (Gupta *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012b; Gupta *A et al.*, 2012a; Gupta *et al.*, 2005). Queda por explorar la aplicación directa de la RMN en muestras clínicas para la identificación de especies bacterianas.

A pesar de que la RMN se ha aplicado de manera efectiva para estudios de sensibilidad en hongos (Coen *et al.*, 2006; Plummer *et al.*, 2007) hasta la fecha de finalización de esta Tesis no se ha publicado por otros autores ningún artículo referente a la aplicación de la RMN para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos en bacterias. La aplicación de RMN para la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos constituye una

técnica rápida y reproducible. Actualmente, las técnicas disponibles para estudios de sensibilidad a antimicrobianos para bacterias que no crecen en medios de cultivo estándar, aún no son robustos. Además, y a pesar del hecho de que muchas de estas bacterias, como las rickettsias, no han adquirido todavía mecanismos de resistencia a los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, la adquisición de los mismos es inherente a casi todas las bacterias. El desarrollo de un método eficaz para garantizar el tratamiento adecuado a utilizar, ayudaría a combatir este futuro problema. En todo caso, queda patente, que la espectroscopia de RMN es una herramienta adecuada para ser considerada como una alternativa a los métodos que muestran dificultades tanto en la precisión como en la reproducibilidad.

Los costes de la utilización de la espectroscopia de RMN para estudios de sensibilidad a fármacos antimicrobianos son relativamente altos en comparación con los métodos tradicionales, y pueden ser innecesarios para estudios en bacterias habituales. Sin embargo, esta inversión, que puede parecer alta inicialmente, reduciría los costes a largo plazo, ya que sólo se necesitará un experimento para evaluar la sensibilidad a los fármacos antimicrobianos de todas las bacterias presentes, ventaja importante para todos los laboratorios. Además, la posibilidad de automatización del sistema minimizaría el tiempo de operación. Los costes de la espectroscopia de RMN, incluyendo el hardware y software de instalación, son relativamente altos, pero a largo plazo también se ven disminuidos debido a la reducción de tiempo del operador, el precio de los reactivos, el bajo mantenimiento, y las pequeñas cantidades necesarias por muestra en comparación con los métodos convencionales o con métodos basados en biología molecular (Coen *et al.*, 2006; Plummer *et al.*, 2007). Además, el uso de muy pocos reactivos, baratos, permite utilizar esta técnica en los laboratorios clínicos, de manera similar a cómo se utiliza para el análisis de alimentos en centros de referencia. Por otro lado, la nueva tecnología de imanes de campo bajo que pueden estar en las poyatas de los laboratorios puede proporcionar una gran oportunidad para introducir la metodología de la RMN en la rutina diaria.

En cierta manera, la espectroscopia de RMN puede compararse con la espectrometría de masas MALDI-TOF, ampliamente introducida en los últimos años en los laboratorios de microbiología. Ambas son técnicas con unos costes iniciales de equipamiento altos, pero que a largo plazo suponen un gran ahorro económico y de tiempo. La diferencia principal

entre ellas radica en que la espectroscopia de RMN no es una técnica destructiva lo que permite realizar mediciones dinámicas y de concentraciones y, además, la misma muestra puede ser utilizada tantas veces que sea necesaria. La preparación de muestras para su estudio por RMN requiere aún de menos procesamiento que el necesario para su uso mediante MALDI-TOF. Por otro lado, mientras la técnica de MALDI-TOF está validada para la identificación de microorganismos, su uso para el estudio de la sensibilidad de microorganismos a antimicrobianos es muy reciente y cuenta con numerosas limitaciones como se ha mencionado en la introducción de esta memoria. Otra de las ventajas de la RMN radica en que, dado que la muestra no es destruida durante su análisis, mediante RMN podrían analizarse directamente muestras humanas mostrando la actividad bacteriana en fluidos o tejidos humanos *in vivo*, hecho que podría ser extrapolado directamente a los resultados obtenidos con el comportamiento *in vivo* en el cuerpo humano. Además, espectrómetros de RMN de mayor campo podrían constituir una herramienta poderosa para el análisis de mezclas en las que la cantidad de bacterias es muy baja y para mezclas complejas tales como los fluidos humanos.

En cuanto a las limitaciones de la RMN, se ha visto que en estudios realizados para identificación bacteriana, cuando el número de bacterias es muy bajo ($<10^3$ UFC/mL), determinados metabolitos pueden no detectarse y, por lo tanto, el uso de la espectroscopia de RMN puede mostrar falsos negativos (Gupta *et al.*, 2005). Sin embargo, este problema puede solventarse y mejorar detectando hasta 10 UFC/mL mediante el uso de sistemas de RMN con campos magnéticos más altos (600-900 MHz) y con mayor tiempo de adquisición de datos (Gupta *et al.*, 2012b).

En conclusión, los resultados obtenidos de estos estudios mediante el uso de ^1H RMN para el análisis de susceptibilidad a antimicrobianos indican que la RMN es un método objetivo y reproducible para mostrar el efecto de un fármaco sobre los microorganismos estudiados. La CMI determinada por el método de macrodilución (CLSI) se correspondería con el final del metabolismo bacteriano observado por RMN, que también predice dicha CMI. Queda demostrado que la técnica de RMN puede emerger como una herramienta excelente para estudiar el comportamiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de antimicrobianos. Con estudios adicionales y la automatización de la técnica, la RMN puede proporcionar un método rápido y reproducible para estudiar sensibilidad de los antimicrobianos y para identificar bacterias.

Queda un largo camino hasta que esta técnica esté estandarizada. Se necesitan más estudios que incluyan la identificación de metabolitos, la producción de perfiles metabólicos y la correlación de datos para encontrar modelos predictivos que permitan validar y normalizar la técnica, y elaborar librerías metabólicas. Por el momento, el papel de la RMN queda reservada a centros de investigación aunque en un futuro pueda ser de gran utilidad en laboratorios de microbiología de referencia.

CONCLUSIONES

1. La espectroscopia de RMN permite observar el metabolismo y realizar estudios de susceptibilidad a antimicrobianos en diferentes cepas de *E. coli* y de *P. aeruginosa*.
2. La ^1H RMN permite determinar que *E. coli* produce como metabolitos ácido succínico, ácido acético y etanol mientras que consume treonina del medio.
3. No se han podido identificar mediante ^1H RMN los metabolitos resultantes del metabolismo de *P. aeruginosa*, sin embargo en los espectros se observa que son diferentes los que se consumen, de los que se producen.
4. La determinación de la CMI mediante ^1H RMN en cepas de *E. coli* y de *P. aeruginosa* para distintos antimicrobianos coincide con la obtenida por las pruebas de sensibilidad estandarizadas.
5. La espectroscopia de ^1H RMN permite observar el metabolismo bacteriano, asegurando la no viabilidad de las bacterias cuando se alcanza la CMI.
6. El límite de detección mediante ^1H RMN para las cepas de *E. coli* estudiadas fue de 10^6 UFC/mL.
7. El límite de detección mediante ^1H RMN para las cepas de *P. aeruginosa* fue de 10^4 UFC/mL.
8. La herramienta estadística PCA ha facilitado el estudio del metabolismo de *P. aeruginosa* mediante comparación de patrones de espectros.
9. Los experimentos llevados a cabo incubando directamente en tubos de RMN las muestras con *E. coli* ATCC 25922, en ausencia de antimicrobiano, permiten determinar que la actividad bacteriana ocurre dentro del tubo de RMN, y que el proceso metabólico comienza alrededor de las 3 horas y finaliza en torno a las 6 horas.
10. La ^1H RMN permite evaluar la efectividad de gentamicina para *E. coli* ATCC 25922 directamente en tubo de RMN mediante el comportamiento cinético de la bacteria en presencia diferentes concentraciones del antimicrobiano a estudio.
11. La espectroscopia de RMN permite el estudio del metabolismo de *R. slovacae*.
12. Aunque la ^1H RMN no permite observar diferencias en el metabolismo de *R. slovacae*, la adición de compuestos con marcaje isotópico en el ^{13}C permite su estudio mediante ^{13}C RMN.
13. La adición de diferentes aminoácidos permite conocer parcialmente las rutas metabólicas de *R. slovacae*.

14. Los metabolitos observados en los espectros obtenidos mediante la adición de [2-¹³C]glicina y L-[1-¹³C]isoleucina permiten el estudio del metabolismo de *R. slovacca* mediante ¹³C RMN.
15. La [2-¹³C]glicina se transforma parcialmente en serina en aquellas muestras a las que se añade, lo que sugiere que *R. slovacca* y/o las células Vero tienen capacidad para transformar glicina en serina.
16. La L-[1-¹³C]isoleucina se transforma parcialmente en otros metabolitos sólo en las muestras infectadas con *R. slovacca*, pero se requieren de más estudios para identificar correctamente estos metabolitos y evaluar el papel real del aminoácido en el metabolismo de la bacteria.
17. A pesar de haber encontrado ciertos compuestos que permiten el estudio del metabolismo de *R. slovacca*, no hemos encontrado los marcadores necesarios para conocer la susceptibilidad de esta bacteria a antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 2015. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. 2 ed.

Aguayo JB, Gamcsik MP, Dick JD. 1988. High resolution deuterium NMR studies of bacterial metabolism. *J Biol Chem.* 263: 19552-19557.

Anhalt JP, Fenselau C. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 47: 219-225.

Arita M. 2004. The metabolic world of *Escherichia coli* is not small. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 1543–1547.

Auriol JC, Du Pasquier P, Grimont P. 1971. Demonstration with gas chromatography of acetic acid production by *Pseudomonas aeruginosa*. *C R Seances Soc Biol Fil.* 165: 580-584.

Austin FE, Turco J, Winkler HH. 1987. *Rickettsia prowazekii* requires host cell serine and glycine for growth. *Infect Immun.* 55: 240e4.

Avenoza A, Busto JH, Canal N, Peregrina JM. 2006. Time course of the evolution of malic and lactic acids in the alcoholic and malolactic fermentation of grape must by quantitative ¹H NMR (qHNMR) spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 54 (13): 4715-4720.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493-496.

Beijerinck MW. 1889. L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. *Arch Néerl Sc.* 23: 367-372.

Bondi A Jr, Spaulding EH, Smith DE, Dietz CC. 1947. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am J Med Sci.* 213(2): 221-225.

Bovarnick MR, Snyder JC. 1949. Respiration of typhus rickettsiae. *J Exp Med.* 89: 561e5.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2016. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Benjamin Cummings. 14 ed. UK.

Broeren MA, Maas Y, Retera E, Arents NL. 2013. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect.* 19: 286-291.

- Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC.** 1977. Human erythrocyte metabolism studies by H-1 spin-echo NMR. *FEBS Lett.* 82: 12-16.
- Calvani R, Brasili E, Praticò G, Sciubba F, Roselli M, Finamore A, Marini F, Marzetti E, Miccheli A.** 2014. Application of NMR-based metabolomics to the study of gut microbiota in obesity. *J Clin Gastroenterol.* 48 Suppl 1:S5-7.
- Casadevall A.** 1996. Crisis in infectious diseases-time for a new paradigm. *Clin Infect.* 23: 790-794.
- Castano-Cerezo S, Pastor JM, Renilla S, Bernal V, Iborra JL, Canovas M.** 2009. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 8: 54.
- Chalk PA, Roberts AD, Blows WM.** 1994. Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by ¹³C NMR spectroscopy. *Microbiology.* 140: 2085-2092.
- Chalkley LJ, Koornhof HJ.** 1985. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 28: 331-342.
- Chan TTK, Newman EB.** 1981. Threonine as a carbon source for *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 145: 1150-1153.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 26: 547-603.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. 11 ed. CLSI document M02–A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100S. 26 ed. CLSI publication, Wayne PA, USA.
- Coen M, Bodkin J, Power D, Bubb WA, Himmelreich U, Kuchel PW, Sorrell TC.** 2006. Antifungal effects on metabolite profiles of medically important yeast species measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 4018-4026.

- Cohen CY, Sahar E.** 1989. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. *J Clin Microbiol.* 27: 1250-1256.
- Courvalin P.** 1991. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(6): 1019-1023.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G.** 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 380-407.
- Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C.** 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 71: 2732-2738.
- Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB.** 2013. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 24: 1194-1201.
- Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J.** 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 74: 5487-5491.
- ECDC, EMEA. Technical report.** 2009. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm.
- Ericsson JM, Sherris JC.** 1971. Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 217: 1-90.
- Ernst R, Bodenhausen G, Wokaun A.** 1990. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. Oxford University Press. Oxford.
- Estepa V, Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y.** 2017. Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35(3): 141-147.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** Clinical Breakpoints. 2015. Disponible en: www.eucast.org/clinical_breakpoints

Fleming A. 1924. A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 96: 171-180.

Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 10: 226-236.

Fleming A. 1945. Penicillin. Nobel Lecture, December 11, 1945: Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf

Foro Económico Mundial, Davos, 2015. Disponible en: <https://agenda.weforum.org/espanol/2015/02/13/el-combate-contra-la-resistencia-antimicrobiana/>

Friebolin H. 2005. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.

Gadian DG. 1995. NMR and its applications to living systems. Oxford University Press. Oxford.

García Álvarez L. 2010. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de la Rioja.

García-Álvarez L, Busto JH, Avenoza A, Sáenz Y, Peregrina JM, Oteo JA. 2015a. Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Technique for Gentamicin Drug Susceptibility Studies with *Escherichia coli* ATCC 25922. J Clin Microbiol. 53(8):2433-2438.

García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Avenoza A, Oteo JA. 2016. Applications of ¹H Nuclear magnetic resonance spectroscopy in Clinical microbiology. Ed. Rijeka, Croatia. InTech, pp. 281-294.

García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Fernández Recio MA, Avenoza A, Oteo JA. 2013. Nuclear magnetic resonance applied to antimicrobial drug susceptibility. Future Microbiol. 8(4): 537-547.

García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Santibáñez S, Portillo A, Avenoza A, Oteo JA. 2015b. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a tool for the study of the metabolism of *Rickettsia slovaca*. Microbes Infect. 17(11-12):850-855.

Gobierno de La Rioja. III Plan de Salud La Rioja 2015-2019. Disponible en: <http://www.riojasalud.es/f/rs/docs/3-plan-salud.pdf>

Goldman M. 1991. Quantum description of high-resolution NMR in liquids. Oxford University Press. Oxford.

Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D. 2012. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 50: 2918-2931.

Gupta A, Bansal N, Houston B. 2012a. Metabolomics of urinary tract infection: a new uroscope in town. *Expert Rev Mol Diagn.* 12: 361-369.

Gupta A, Dwivedi M, Gowda GA, Mahdi AA, Jain A, Ayyagari A, Roy R, Bhandari M, Khetrupal CL. 2006. ^1H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Klebsiella pneumoniae*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed.* 19: 1055-1061.

Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Gowda GA, Khetrupal CL, Bhandari M. 2009. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy for identifying and quantifying common uropathogens: a metabolic approach to the urinary tract infection. *BJU Int.* 104: 236-244.

Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Khetrupal CL, Bhandari M. 2012b. Broad identification of bacterial type in urinary tract infection using ^1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res.* 11: 1844-1854.

Gupta A, Dwivedi M, Nagana Gowda GA, Ayyagari A, Mahdi AA, Bhandari M, Khetrupal CL. 2005. ^1H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed.* 18: 293-299.

Gupta A, Mahdi AA, Ahmad MK, Shukla KK, Jaiswer SP, Shankhwar SN. 2011. ^1H NMR spectroscopic analysis of human seminal plasma: A probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal.* 54: 106-113.

Hanoulle X, Wieruszkeski JM, Rousselot-Pailley P, Landrieu I, Baulard AR, Lippens G. 2005. Monitoring of the ethionamide pro-drug activation in mycobacteria by ^1H high resolution magic angle spinning NMR. *Biochem Biophys Res Commun.* 331: 452-458.

Heatley NG. 1944. Method for the assay of penicillin. *Biochem J.* 38: 61-65.

Hopps HE, Hahn FE, Wisseman Jr CL, Jackson EB, Smadel JE. 1956. Metabolic studies of rickettsiae. III. Studies of transamination, oxidative phosphorylation and glutamate-2- ^{14}C incorporation by purified suspensions of *Rickettsia mooseri*. *J Bacteriol.* 71: 708e16.

- Hoyte RE, Levine MG.** 1947. A Method for Determining Sensitivity to Penicillin and Streptomycin. *Science*. 106(2747): 171.
- Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T.** 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 49: 3222–3227.
- Ilki A, Bekdemir P, Ulger N, Soyletir G.** 2010. Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system. *New Microbiol*. 33(2): 147-153.
- Ivancic V, Mastali M, Percy N, Gornbein J, Babbitt JT, Li Y, Landaw EM, Bruckner DA, Churchill BM, Haake DA.** 2008. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol*. 46: 1213-1219.
- Ives TJ, Marston EL, Regnery RL, Butts JD, Majerus TC.** 2000. In vitro susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers. *J Antimicrob Chemother*. 45: 305-310.
- Jacobsen NE.** 2007. NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. WILEY-Interscience.
- Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ.** 2005. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*. 62: 273-284.
- Jenkins SG, Schuetz AN.** 2012. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc*. 87(3): 290-308.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ.** 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 49(11): 1749-1755.
- Kerr JR.** 2005. Antibiotic treatment and susceptibility testing. *J Clin Pathol*. 58(8): 786-787.
- Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K.** 2014. Quantitative MALDI-TOF MS for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol*. 52: 4155-4162.
- Larive CK, Barding GA Jr, Dinges MM.** 2015. NMR spectroscopy for metabolomics and metabolic profiling. *Anal Chem*. 87(1): 133-146.

Lee REB, Li W, Chatterjee D, Lee RE. 2005. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology*. 15: 139-151.

Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AFP. 2003. A ^1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal*. 33: 1103-1115.

Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughesc A, Morrissonc J, Lindbergd H, Locktonc A. 2004. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: A ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal*. 36: 841-849.

Li W. 2006. Multidimensional HRMAS NMR: a platform for *in vivo* studies using intact bacterial cells. *Analyst*. 131: 777-781.

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. 2007. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. ELSEVIER. Amsterdam.

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C. 2003. Contemporary issues in toxicology- The role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Tox Appl Pharm*. 187: 137-146.

Lopez-Rituerto E, Cabredo S, Lopez M, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM. 2009. A Thorough Study on the Use of Quantitative ^1H NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *J Agric Food Chem*. 57 (6): 2112-2118.

Lopez-Rituerto E, Savorani F, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM, Engelsen SB. 2012. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ^1H NMR Metabolomics. *J Agric Food Chem*. 60 (13): 3452-3461.

Mandell, Douglas, and Bennett's. 2015. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edition. Ed. Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R. Churchill Livingstone, Inc., New York, NY. 207-208.

- Manome I, Ikedo M, Saito Y, Ishii KK, Kaku M.** 2003. Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 41(1): 279-284.
- March-Rosselló GA.** 2017. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35(3): 182-188.
- March Rosselló GA, Bratos Pérez MÁ.** 2016. Rapid antibiotic susceptibility test in Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 34(1): 61-68.
- March-Rosselló GA, Gutiérrez-Rodríguez MP, Simarro-Grande M, Orduña-Domingo A, Bratos-Pérez MA.** 2015. A two-hour procedure for determining the susceptibility of enterococci and staphylococci to antibiotics by a colourimetric method. *Rev Esp Quimioter.* 2(5): 247-55.
- Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS.** 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 43: 34-40.
- Martinez OV, Gratzner HG, Malinin TI, Ingram M.** 1982. The effect of some betalactam antibiotics on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry.* 3: 129-133.
- Martínez-Martínez L.** 2003. The future of antimicrobial susceptibility testing. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21: 64-71.
- Mobashery S, Lerner SA, Johnston M.** 1988. Monitoring beta-lactamase activity in vivo by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1196-1203.
- Mohs FE.** 1945. A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria: the “radial streak” method. *J Lab Clin Med.* 30: 800-802.
- Mueller M, de la Pena A, Derendorf H.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 369-377.
- Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM.** 2015. MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Current situation and future perspectives. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 33(6): 369-371.

- Neves AR, Ramos A, Shearman C, Gasson MJ, Almeida JS, Santos H.** 2000. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo ¹³C-NMR. *Eur J Biochem.* 267: 3859-3868.
- Ng EW, Wong MY, Poon TC.** 2014. Advances in MALDI Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Applications. *Top Curr Chem.* 336: 139-176.
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes H.** 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov.* 1: 153-161.
- Nosova, T, Jokelainen K, Kaihovaara P, Somer HJ, Siitonen A, Heine R, Salaspuro M.** 1996. Aldehyde dehydrogenase activity and acetate production by aerobic bacteria representing the normal flora of human large intestine. *Alcohol Alcohol.* 31: 555-564.
- Pappas PG.** 1991. Laboratory in the diagnosis and management of urinary tract infections. *Med Clin N Am.* 75: 313-325.
- Pezzlo MT.** 1983. Automated methods for detection of bacteriuria. *Am J Med.* 75: 71-78.
- Pfaller MA, Koontz FP.** 1985. Use of rapid screening tests in processing urine specimens by conventional culture and the automicrobic system. *J Clin Microbiol.* 21: 783-787.
- Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG.** 2005. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. *J Med Microbiol.* 54: 77-81.
- Plummer R, Bodkin J, Power D, Pantarat N, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrell TC.** 2007. Effect of caspofungin on metabolite profiles of *Aspergillus* species determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 4077-4084.
- Powers R.** 2009. NMR metabolomics and drug discovery. *Magn Reson Chem.* 47: S2–S11.
- Price KE, Vandaveer SS, Lunte CE, Larive CK.** 2005. Tissue targeted metabonomics: Metabolic profiling by microdialysis sampling and microcoil NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 38: 904-909.
- Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ.** 2013 Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 68(12): 2710-2717.

- Rae CD.** 2014. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain ^1H magnetic resonance spectra. *Neurochem Res.* 39(1):1-36.
- Ramani R, Chaturvedi V.** 2000. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 2752-2758.
- Ramos A, Jordan KN, Cogan TM, Santos H.** 1994. C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Citrate and Glucose Cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1739-1748.
- Ranjan P, Gupta A, Kumar S, Gowda GAN, Ranjan A, Sonker A.** 2006. A. Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Liver Int.* 26: 703-707.
- Regoes RR, Wiuff C, Zappala RM, Garner KN, Baquero F, Levin BR.** 2004. Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3670–3676.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW.** 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 14: 643-658.
- Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain P, Somalo S, Palacios-Hernández JM, Caballero-Torres P, Torres C.** 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother.* 65: 169-177.
- Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D.** 2002. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 2747-2751.
- Roseblum ES, Tjeerdema RS, Viant MR.** 2006. Effects of temperature on host-pathogen- drug interactions in red abalone, *Haliotis rufescens*, determined by ^1H NMR metabolomics. *Environ Sci Technol.* 40: 7077-7084.
- Roveta S, Marchese A, Debbia EA.** 2006. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. *J Chemother.* 18(1): 12-19.

Sawers G. 1998. The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. *Arch Microbiol.* 171: 1-5.

Schlegel HG. 1995. Electron transport under anaerobic conditions. *General Microbiology.* 7 ed. Cambridge University Press: Cambridge, pp. 333-356.

Schmith K, Reymann FE. 1940. Expeimentalle og kliniske undersogelser over gonococcers folsomhed overfor sulfapyridin. *Nordisk Medicin.* 8: 2493-2499.

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC). 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.

Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. 2013. MALDI biotyperbased rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol.* 51: 3741-3748.

Subramaniam A, Gupta A, Saxena S, Gupta A, Kumar R, Nigam A, Kumar R, Roy R. 2005 Proton MR CSF analysis and new software as predictors for the differentiation of meningitis in children. *NMR Biomed.* 18: 213-225.

Tang Y, Zhen L, Liu J, Wu J. 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem.* 85: 2787-2794.

The White House. National action plan for combating antibiotic-resistant bacteria. Washington, 2015.

Todar K. Online textbook of bacteriology. 2006. Diversity of metabolism in prokaryotes. Madison, WI, University of Wisconsin-Madison Dept. of Bacteriology.

www.textbookofbacteriology.net/metabolism.html

Torok ME, Peacock SJ. 2012. Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory-pipe dream or reality? *J Antimicrob Chemother.* 67(10): 2307-2308.

Turnidge J, Bordash G. 2007a. Statistical methods for establishing quality control ranges for antibacterial agents in clinical and laboratory standards institute susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 2483-2488.

Turnidge J, Paterson DL. 2007b. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev.* 20, 391-408.

van Belkum A, Dunne WM Jr. 2013. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 51(7): 2018-2024.

Vialaneix JP, Chouini N, Malet-Martino MC, Martino R, Michel G, Lepargneur JP. 1986. Noninvasive and quantitative ^{19}F nuclear magnetic resonance study of flucytosine metabolism in *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 30: 756-762.

Viant MR, Roseblum ES, Tjeerdema RS. 2003. NMR- based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ Sci Technol.* 37: 4982-4989.

Vincent JG, Vincent HW. 1944. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc Soc Exp Biol Med.* 55: 162-164.

Weiss E. 1973. Growth and physiology of Rickettsiae. *Bacteriol Rev.* 37: 259e83.

Wheat PF. 2001. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother.* 48 Suppl 1:1-4.

Wheat PF, Spencer RC, Hastings JG. 1989. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 29: 277-282.

Winn WC, Koneman EW, eds. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 945-1021.

Yu C, Irudayaraj J. 2005. Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers.* 77: 368-377.

Zboromyrska Y, Ferrer-Navarro M, Marco F, Vila J. 2014. Detection of antibacterial resistance by MALDI-TOF mass spectrometry. *Rev Esp Quimioter.* 27(2): 87-92.

ANEXO I

Patente obtenida durante el desarrollo de esta Tesis:



① Número de publicación: **2 373 836**

② Número de solicitud: 201030724

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación:

17.05.2010

④ Fecha de publicación de la solicitud:

09.02.2012

Fecha de la concesión:

01.08.2013

⑤ Fecha de publicación de la concesión:

13.08.2013

⑦ Titular/es:

**FUNDACIÓN RIOJA SALUD
EDIFICIO CIBIR,
C/ PIQUERAS 98
26006 LOGROÑO (LA RIOJA), ES**

⑧ Inventor/es:

**OTEO REVUELTA, José Antonio;
GARCÍA ÁLVAREZ, Lara María;
AVENOZA AZNAR, Alberto;
PEREGRINA GARCÍA, Jesús María;
BUSTO SANCIRIÁN, Jesús Héctor y
PORTILLO BARRIO, Aranzazu**

⑨ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

⑥ Título: **MÉTODO PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA POBLACIÓN MICROBIANA ANTE FÁRMACOS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).**

⑦ Resumen:

Método para evaluar la susceptibilidad de una población microbiana ante fármacos mediante resonancia magnética nuclear (RMN), que comprende: preparar una muestra del medio de cultivo apta para ser analizada por RMN, preparar una muestra apta para ser analizada por RMN de la población microbiana, añadir el fármaco antimicrobiano a una muestra igual que la de la etapa b), y analizar y/o cuantificar por RMN el resultado obtenido de las etapas anteriores utilizando unos controles adecuados.

ANEXO II

Noticias publicadas en los medios de comunicación en relación a esta Tesis:

Clasificados | 11870.com | Vivienda | Empleo | Coches | mujemoy.com | Vino Rioja

Miércoles, 22 octubre 2014 | Hoy 11 35 | Mañana 11 37

larioja.com MEDIA MARATÓN Especial Toda la actualidad de la carrera Ver especial >>

Iniciar sesión con   Registrarse

Portada **La Rioja** Deportes Economía Más Actualidad Gente y TV Ocio Participa Blogs Servicios Hemeroteca

Region Logroño y comarcas Calahorra Alfaro Arnedo Vino **larioja.com** TV

Estás en: larioja.com > Noticias La Rioja > Noticias Región > El CIBIR patenta un sistema para poder combatir mejor a las bacterias difíciles

REGIÓN

El CIBIR patenta un sistema para poder combatir mejor a las bacterias difíciles

El equipo liderado por el doctor Oteo Revuelta utiliza la resonancia magnética nuclear para identificar el tratamiento más adecuado y atajar un proceso infeccioso

06.09.13 - 00:25 - M. MAYAYO | LOGROÑO.

Comenta esta noticia |     0 votos

En la unidad de infecciosos del Hospital San Pedro la lucha contra las bacterias forma parte de la rutina diaria clínica. Lo habitual es que los análisis microbiológicos determinen con precisión el antibiótico que erradicará estos patógenos del cuerpo del enfermo. Pero hay un grupo, unas bacterias 'rebeldes' que no crecen en los cultivos habituales de los laboratorios y, en ocasiones, provocan que el antibiótico recetado no funcione en el paciente. El equipo del doctor José Antonio Oteo abrió una línea de investigación en el CIBIR, junto a la UR, que ahora ha obtenido su recompensa en forma patente (la segunda lograda por este centro en sus cinco años de vida). Básicamente, se trata de un método que utiliza la resonancia magnética nuclear para desentrañar esa 'bacteria difícil', conocer su sensibilidad a antimicrobianos y, de esta manera, determinar el tratamiento más adecuado para atacar ese proceso infeccioso.

El procedimiento es novedoso, muy rápido, sencillo y barato. Aunque aún está en proceso de validación, los resultados conseguidos hasta ahora son muy alentadores, tal y como aseguró ayer el doctor Oteo Revuelta, director del equipo que componen Lara María García Álvarez (CIBIR), Alberto Avenzoza Aznar (UR), Jesús María Peregrina García (UR), Jesús Héctor Busto Sancirrián (UR) y Aránzazu Portillo Barrio (CIBIR).

«Estas bacterias no crecen en los medios habituales y por ello no sabemos a qué antibiótico son sensibles», dijo Oteo. Este sistema -explicó- «nos va a ayudar a dirigir mejor el tratamiento a una persona cuando nos enfrentamos a bacterias difíciles porque nos da una información que no teníamos y pensamos que reproduce muy bien lo que ocurre en el ser vivo».

El consejero de Salud, José Ignacio Nieto, destacó que es la segunda patente que logra el CIBIR desde que inició la actividad investigadora en el 2008. Recordó que este mismo año se concedió otra al área de Oncología y en estos momentos el centro tiene solicitadas otras cuatro patentes más que abarcan áreas tan diferentes como son la neurodegeneración, la regeneración tisular y curación de heridas o el diagnóstico molecular.

Nieto se apoyó en las palabras del presidente regional, Pedro Sanz, para asegurar que «en tan solo cinco años el CIBIR se ha consolidado como un centro de investigación biomédica de prestigio y con futuro».

LAS FRASES

JOSÉ ANTONIO OTEO
DIRECTOR DEL EQUIPO INVESTIGADOR

«Estas bacterias no crecen en los medios habituales y por ello no sabemos a qué antibióticos son sensibles»

JOSÉ IGNACIO NIETO
CONSEJERO DE SALUD

«El CIBIR tiene otras cuatro patentes solicitadas en estos momentos en áreas muy diferentes»



El doctor Oteo Revuelta, junto a la investigadora Lara García Álvarez, miembros del equipo que ha conseguido la patente. © L.R.

<http://www.larioja.com/v/20130906/rioja-region/cibir-patenta-sistema-para-20130906.html>

elcorreo.com
 Edición: Araba/Álava | Ir a Edición Bizkaia Personalizar

TAZAS
te encantarán
Descárgate la cartilla

Iniciar sesión con Registrarte

Portada Local Deportes Economía Más Actualidad Gente y TV Ocio Participa Blogs Servicios Hemeroteca IR

La Rioja Guipúzcoa Miranda Canal Álava / Araba Gunea **elcorreo.tv**

Estás en: Araba/Álava - El Correo.com > Noticias Álava > Noticias La Rioja > El CIBIR obtiene una patente que evalúa la reacción de los microbios ante los fármacos

LA RIOJA

El CIBIR obtiene una patente que evalúa la reacción de los microbios ante los fármacos

A través de la resonancia magnética el nuevo método clínico desarrollado en Logroño permitirá orientar mejor los tratamientos
 06.09.13 - 00:47 - MARÍA CASADO | LOGROÑO.

Comenta esta noticia | 0 0 votos

El Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), en colaboración con la Universidad de La Rioja, ha obtenido una nueva patente, la segunda desde su puesta en marcha en 2008, que va a permitir mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) un mejor tratamiento en caso de procesos infecciosos con bacterias de difícil cultivo. «Sin lugar a dudas, esto puede ayudar a orientar mejor los fármacos porque nos va a dar otra información que no teníamos, otro método bien contrastado, que se correlaciona bien con lo que ocurre en el microorganismo», explicó ayer el doctor José Antonio Oteo, del Área de Enfermedades Infecciosas del CIBIR. Esto ocurrirá especialmente en algunos casos: «cuando nos enfrentamos a bacterias difíciles, de las que no crecen en los medios habituales; no se utilizaría para tratar por ejemplo una infección urinaria simple, eso sería usar mal los recursos».

En concreto, se trata de analizar a través de la resonancia magnética una pequeña muestra de donde esté la infección o de la bacteria y ver cómo reacciona, es decir, la susceptibilidad a antibióticos. Esa sería la patente registrada, pero el avance no queda ahí. «También estamos desarrollándolo para otras cosas, como por ejemplo la identificación de microorganismos, su metabolismo, sus hábitos, y así poder atacarlos mejor», adelantó el doctor Oteo. La idea, convertida ahora en método recién patentado, surgió a raíz del estudio de las 'rickettsias', habituales en las garrapatas, de cuya investigación es referente en España la unidad de Infecciosas del CIBIR.

Entre las ventajas del uso de la resonancia magnética para evaluar la actividad antimicrobiana de los fármacos está, según Oteo, además de ser muy parecido al efecto «en vivo», «es rápido, ya que en unos minutos se puede reconocer la sensibilidad y parece que es muy reproducible y se puede repetir con facilidad». También, «pensamos que nuestro método es tan bueno al menos como el novedoso de la espectrometría de masas y más barato», añadió Oteo.

Tal como indicó en el consejero de Salud y Servicios Sociales, José Ignacio Nieto, la patente es el primer paso de un sistema que traerá importantes beneficios y aplicaciones médicas. «Se seguirá desarrollando y utilizando a partir de ahora. El logro es haber obtenido un nuevo procedimiento de diagnóstico y de análisis de esas bacterias que hasta ahora en el laboratorio no se conseguían».

Por último, el director de la investigación, el doctor Oteo, fue más allá y alertó de la trascendencia a todos los niveles del método patentado: podría ayudar al desarrollo de sistemas para combatir las bacterias, en especial las que ofrecen resistencia a los antibióticos, que como recordó, es uno de los problemas médicos a los que se enfrentan los países europeos y Estados Unidos.

«Es un método rápido, muy reproducible y más barato que otros», asegura el doctor Oteo



Lara Garofa Álvarez y el doctor José Antonio Oteo, en las instalaciones del CIBIR, donde se ha gestado la nueva patente. :: GOBIERNO DE LA RIOJA

<http://www.elcorreo.com/alava/v/20130906/rioja/cibir-obtiene-patente-evalua-20130906.html>



[Portada](#) > [Área Profesional](#) > [Gestión](#)

INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA




Una patente para el estudio de las bacterias con RM

El Cibir desarrolla una técnica estandarizable y reproducible que permite conocer el comportamiento metabólico de las bacterias 'in vivo'.

Rosalía Sierra, Madrid | rsierra@diariomedico.com | 23/09/2013 00:00

compartir    Compartir  Like 0  Twítear

☆☆☆☆ vota! |  0 comentarios

imprimir  | tamaño  



El equipo de investigación está compuesto por miembros del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro-Cibir y del Departamento de Químicas de la Universidad de La Rioja. En la imagen, José Antonio Oteo, Jesús Manuel Peregrina, Aránzazu Portillo, Héctor Busto, Alberto Avenozza y Lara García Álvarez (CIBIR)

ANEXO III

Relación de publicaciones en acceso libre que han surgido de esta Tesis:

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Nuclear magnetic resonance applied to antimicrobial drug susceptibility

Lara García-Álvarez¹, Jesús H Busto², Jesús M Peregrina², Miguel A Fernández-Recio³, Alberto Avenzoza² & José A Oteo*¹

¹Área de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Pedro-Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, E-26006, Logroño, Spain

²Departamento de Química, Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, C/Madre de Dios, 51, E-26006, Logroño, Spain

³Instituto de las Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-UPV-CAR) Complejo Científico-Tecnológico, Universidad de La Rioja, C/ Madre de Dios, 51, E-26006, Logroño, Spain

*Author for correspondence. Tel: +34 941 27 86 70 • Fax: +34 941 27 86 87 • jateo@riajasalud.es

There are many conventional microbiological methods in routine clinical practice to determine the sensitivity of common bacteria. The problem with these methods arises with bacteria that do not grow on habitual media (*Rickettsia* spp., *Coxiella* spp. and *Anaplasma* spp., among others) and for which there are no standardized techniques to determine their antimicrobial susceptibility. In addition, the techniques that are used for the culture of these fastidious bacteria show problems in both accuracy and reproducibility and, in some cases, the *in vitro* antimicrobial susceptibility of bacteria shows poor correlation with therapeutic outcome. Therefore, it becomes difficult to determine the antimicrobial drug susceptibility of some bacteria and, thus, to assess the therapeutic effect of drugs. The scientific breakthroughs that have taken place in recent years have allowed the use of new techniques that facilitate and improve microbiological study. This paper reviews the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy as an alternative tool for determining antimicrobial drug susceptibility.

There are many standardized conventional methods for determining antimicrobial susceptibility. However, most are slow and laborious and some bacteria (intracellular and other fastidious bacteria) cannot be studied by these methods. Sometimes, these types of tests suffer problems regarding precision and reproducibility, which results in a poor correlation with the therapeutic outcome [1–3]. Moreover, the difficulty of treating certain types of bacteria, the development of antimicrobial resistance and the possibility of using safer drugs make it necessary to develop new procedures to overcome such important shortcomings.

The scientific progress made in recent years has enabled the development of new techniques that facilitate and improve microbiological study. We review the use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy as an alternative tool for determining antimicrobial drug susceptibility regarding the study of bacterial metabolism. To do this, we review the characteristics of this technique and its importance as a rapid and efficient tool for assessing antimicrobial drug susceptibility.

Traditional methods for the measurement of antimicrobial susceptibility

The aim of antimicrobial susceptibility studies is to determine the most appropriate specific drug

for the treatment of a patient who suffers from an infectious process. To achieve this aim, there are *in vitro* methods with standardized conditions [4] that are useful in the study of pathogens exhibiting unpredictable drug susceptibility or having acquired resistance mechanisms [5]. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) annually defines and reviews the methods available for performing susceptibility tests for most bacteria [6].

Currently available methods for the study of antimicrobial susceptibility are diverse, and they are summarized in TABLE 1. Historically, these have been classified into manual and automated methods, dilution and diffusion methods, qualitative and quantitative methods, and rapid or overnight methods. Specific methods have been also developed for those bacteria with special characteristics [6].

There are bacteria that require special handling and growth conditions, such as the rickettsial agents (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. and *Coxiella* spp., among others), making it more difficult to perform an antimicrobial susceptibility study on these bacteria. *Rickettsia* spp. are intracellular bacteria that need to be maintained through cell culture; therefore, there are very few *in vitro* antimicrobial susceptibility

Future Microbiology
Review

Keywords

• antimicrobial drug susceptibility • intracellular bacteria • metabolism • NMR • *Rickettsia*

Future Medicine part of fsg



Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Technique for Gentamicin Drug Susceptibility Studies with *Escherichia coli* ATCC 25922

Lara García-Álvarez,^a Jesús H. Busto,^b Alberto Avenoza,^b Yolanda Sáenz,^c Jesús Manuel Peregrina,^b José A. Oteo^a

Infectious Diseases Department, Hospital San Pedro, CIBIR, Logroño, Spain^a; Departamento de Química de la Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, Logroño, Spain^b; Área de Microbiología Molecular, CIBIR, Logroño, Spain^c

Antimicrobial drug susceptibility tests involving multiple time-consuming steps are still used as reference methods. Today, there is a need for the development of new automated instruments that can provide faster results and reduce operating time, reagent costs, and labor requirements. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy meets those requirements. The metabolism and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* ATCC 25922 in the presence of gentamicin have been analyzed using NMR and compared with a reference method. Direct incubation of the bacteria (with and without gentamicin) into the NMR tube has also been performed, and differences in the NMR spectra were obtained. The MIC, determined by the reference method found in this study, would correspond with the termination of the bacterial metabolism observed with NMR. Experiments carried out directly into the NMR tube enabled the development of antimicrobial drug susceptibility tests to assess the effectiveness of the antibiotic. NMR is an objective and reproducible method for showing the effects of a drug on the subject bacterium and can emerge as an excellent tool for studying bacterial activity in the presence of different antibiotic concentrations.

Infectious diseases remain a challenge in terms of mortality and morbidity despite the great progress achieved in public health in recent decades. For this reason, antimicrobial susceptibility evaluations and new antibiotic screenings are a field of great importance (1). Antimicrobial susceptibility testing (AST) studies are crucial to determine the most effective drug available for the treatment of a patient with an infectious disease process. Currently, automated *in vitro* AST systems are used with standardized methods and conditions to determine the MIC of a drug. These tests usually function by visually judging liquid turbidity, and are one of the reference methods still used today. Unfortunately, these tests involve multiple time-consuming steps, which are often slow, laborious, and susceptible to testing sensitivity problems (2, 3). Moreover, these methods should be useful against pathogens whose susceptibility to drugs is not predictable, thus enabling researchers to determine the antimicrobial susceptibility of fastidious organisms (4) and of those microorganisms that have acquired resistance mechanisms. Measuring the susceptibility of microorganisms to antimicrobials began in the early 1920s (5). Subsequently, there was recognition (as early as the late 1950s) that required the standardization of these techniques. Therefore, numerous AST methods have been described (6). However, there is currently a need for the development of new automated instruments that can provide faster results, reduce reagent cost, and minimize labor requirements (7, 8). In this context, several methods were recently established to minimize the time required to complete the test and the number of operation steps (9, 10).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been used as a method to determine structures of synthesized and natural compounds and to analyze the tridimensional structure of biomolecules. The origin of the NMR spectroscopy technique dates back to 1946; however, it was not until the 1970s when NMR spectroscopy was utilized during metabolic studies (11, 12). Subsequently, in the last few years, NMR spectroscopy has been used for many applications in biology (13) fields, including food sci-

ence (14–17), pharmacy, and medicine (18). Within these areas, NMR spectroscopy features in the study of metabolome (19). In this sense, metabolites serve as direct signatures of biochemical activity and the behavior of cells. Thus, the terms metabolomics/metabonomics emerged and were defined as the systematic study of the chemical fingerprints of specific cellular processes (19). NMR technology is based on using the magnetic properties of atomic nuclei. Although, a detailed description of the theory and fundamentals of NMR would detract from the objective of this paper, we will describe some aspects of the technique that can help in understanding the equipment and methodologies used in metabolic studies. To obtain an NMR signal, the sample is irradiated with a radiofrequency, which causes it to reach the state of resonance. The resonance of the excited nuclear magnets is detected as an oscillating current in a coil placed around the sample. This signal is the free induction decay, which arrives at the receiver and provides a spectrum formed by lines that define frequencies and widths by a Fourier transformation. A line in the NMR spectrum obtained at a certain frequency (or chemical shift) corresponds to an atomic nucleus with a given chemical environment, which provides structural information about the molecule it belongs to (17).

Received 4 March 2015 Returned for modification 3 April 2015

Accepted 6 May 2015

Accepted manuscript posted online 13 May 2015

Citation García-Álvarez L, Busto JH, Avenoza A, Sáenz Y, Peregrina JM, Oteo JA. 2015. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for gentamicin drug susceptibility studies with *Escherichia coli* ATCC 25922. *J Clin Microbiol* 53:2433–2438. doi:10.1128/JCM.00604-15.

Editor: R. Patel

Address correspondence to José A. Oteo, jaoteo@riojasalud.es.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00604-15

Escherichia coli is one of the main causes of nosocomial infections in humans, and the selection of antibiotic resistance mechanisms in its pathogenic and nonpathogenic isolates are associated with the widespread use of antibiotics (20). This work focuses on the use of ^1H NMR spectroscopy compared with a broth macrodilution reference method to study the antimicrobial susceptibility of *E. coli* ATCC 25922 (21).

MATERIALS AND METHODS

Organism. The bacterial strain used for the current study was *E. coli* ATCC 25922.

Antimicrobial agent. A stock solution of gentamicin pure powder (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was made up in sterile water. Serial dilutions of the drug (0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were prepared.

Broth macrodilution MICs. The isolation of bacteria was carried out on brain heart infusion (BHI) agar (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain) to check bacterial viability at 37°C for 24 h. After that, reisolation was performed to ensure a pure culture in the same conditions. The inoculum of bacteria was prepared to obtain a suspension with a turbidity of a 0.5 McFarland standard, using the direct suspension method. For this, the bacterial suspension was prepared in 5 ml of sterile saline solution (NaCl 0.9%) by matching its turbidity to a 0.5 McFarland standard resulting in a viable bacterial count of $\sim 10^8$ CFU/ml. MICs were determined by the reference macrodilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (22). Samples and control solutions were prepared in a total volume of 2 ml containing bacterial suspension, antimicrobial gentamicin, and Mueller-Hinton medium (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD). Serial dilutions of gentamicin were tested. A concentration of 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, or 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added into each tube. Control I was the Mueller-Hinton medium with an inoculum of bacteria prepared under similar conditions as the samples but without an antibiotic, and control II was only Mueller-Hinton medium. All samples and controls were incubated at 37°C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of the drug that completely inhibited visible bacterial growth. For the viable cell count, culture plates were prepared with BHI agar medium. From samples and controls, different dilutions were prepared into sterile water and uniformly spread with sterile spreaders on the plates. All plates were incubated at 37°C for 24 h, and after that time, bacterial colonies were counted manually. The total numbers of bacteria in each sample and control I were determined from the average colony count obtained from different dilutions.

Broth macrodilution samples for NMR spectroscopy. After incubation for 24 h, specimens of 0.540 ml from each sample and control were transferred into 5-mm NMR tubes (5-mm high-precision NMR sample tubes, Norell Inc., Mayslanding, NJ). Furthermore, 60 μl of trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionic acid (TSP) (sodium salt; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) diluted in deuterated water (D_2O ; deuterium oxide, Euriso-top, Saint-Aubin, France) to a final concentration of 1.125 mg/ml was added as an internal standard.

^1H NMR experiments. The equipment used for the acquisition of the spectra was a Bruker Avance 400 spectrometer UltraShield (Avance II 400 MHz, Bruker Corporation, Regensburg, Germany) equipped with a BBI H-BB Z-GRD probe, specifically for proper acquisition of the proton. Spectra acquisition was carried out with the program TOPSPIN version 2.1 (Bruker Corporation, Regensburg, Germany). Processing of spectra was carried out under the program MestReNova version 8.1 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). Before spectra acquisition, the magnetic field was adjusted for the mix $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$, and all experiments were performed at 25°C. ^1H NMR spectra were recorded with a pulse sequence signal presaturation of water located at 1,875 Hz using the pulses zgpr program. For a large and quantitative experiment, we used a relaxation time (d1) of 10 s and a number of scans (ns) of 64 to give a total acquisition time of 20 min. For a short experiment, we used a d1 of 2 s and an ns of 8 to give a total acquisition time of 3 min.

Direct incubation of *E. coli* isolates into an NMR tube as incubation reactor and NMR spectroscopy. The inoculum of bacteria was prepared from a suspension of a 0.5 McFarland standard using the direct suspension method. From a total volume of 2 ml containing the bacterial suspension in Mueller-Hinton medium (with and without gentamicin), 0.540 ml was transferred to 5-mm NMR tubes. Furthermore, 60 μl of TSP diluted in D_2O to a final concentration of 1.125 mg/ml was added as an internal standard. NMR experiments were registered at 37°C every 20 min.

All the experiments were carried out in triplicate.

RESULTS

Stack plots of one-dimensional spectra of incubated bacterial media of *E. coli* ATCC 25922 with gentamicin and spectra of control media (control II) and control of the incubated media without an antibiotic in the presence of bacteria (control I) are shown in Fig. 1.

The comparison of the two control ^1H NMR spectra showed different signals in the range of 1.0 to 2.5 ppm. Succinic acid, acetic acid, and ethanol were only detected in the control I spectra and threonine was only detected in the control II medium. These signals were assigned through comparison of their chemical shifts with those reported in the literature (16) and by comprising the spiking with the corresponding compounds in the control samples.

When we registered antibiotic spectra at different concentrations, we detected the presence of succinic acid, acetic acid, and ethanol only in samples with concentrations of gentamicin lower than 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Moreover, when the concentration of gentamicin was greater than 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, we detected the presence of threonine (Fig. 1).

According to the results obtained by visual turbidity, the lowest concentration of drug that completely inhibited visible growth (MIC) was 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MIC, 0.25 to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (22). These data suggested that the results obtained by ^1H NMR spectroscopy were in agreement with those obtained by visual turbidity. A viable count of culture plates showed no bacterial growth on plates with gentamicin concentrations from 64 to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. However, the plate containing 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin showed a viable bacterial number in the range of 10^6 CFU/ml. The remaining samples (0.25 to 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$, including control I) demonstrated a viable bacterial count in the range of 10^{10} to 10^{11} CFU/ml. Data extracted from the counts of viable bacterial growth on the agar plates allowed us to obtain the minimal bactericidal concentration (MBC), that is, the lowest concentration of gentamicin that kills the bacteria. In this case, MBC was observed at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Figure 2 shows the time course evolution of peak areas corresponding to metabolites (succinic acid, acetic acid, and ethanol) or nutrient (threonine) as a function of antimicrobial gentamicin concentration for the *E. coli* strain used. The results obtained from spectra showed that *E. coli* is able to metabolize components of the medium to produce succinic acid, acetic acid, and ethanol. The intensity of these signals varied according to the viable bacteria (CFU/ml) present in the sample, indicating that the intensity was higher in the samples with concentrations of gentamicin lower than the MIC (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the rest of the samples. Furthermore, threonine only appeared in the spectra of those samples with gentamicin concentrations of ≥ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

We were also able to optimize the acquisition time of the NMR experiments. We spent only 3 min on each experiment, conse-

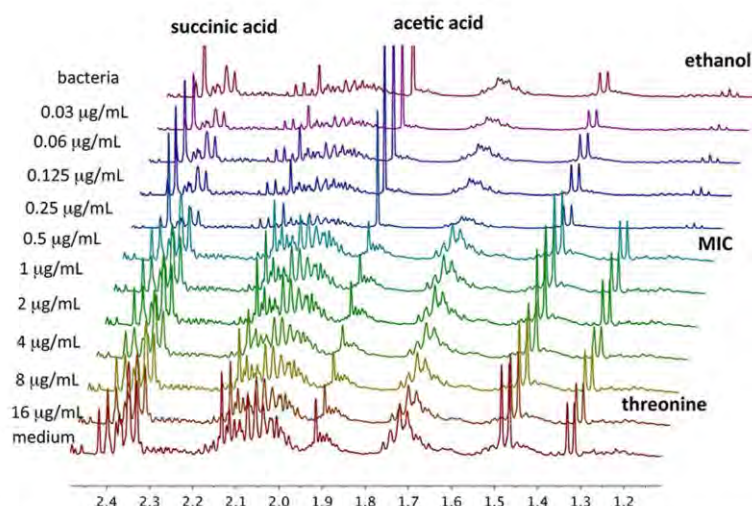


FIG 1 ¹H NMR spectra of samples of *E. coli* ATCC 25922 incubated with gentamicin (concentrations are shown on the left). Control I (growth media with bacterial inoculum) appears at the top of the spectra. Control II (only growth media) appears at the bottom of the spectra. Changes in concentration of metabolites are well shown in spectra (threonine of medium was consumed when bacteria were active; succinic acid, acetic acid, and ethanol were the result of metabolic production of bacteria).

quently decreasing the analysis time considerably without information loss.

To evaluate the potential of this tool, we carried out the same biological experiments but, in this case, using an NMR tube as the incubation reactor. We introduced into the NMR tube the infected culture medium, previously prepared, and registered NMR experiments at 37°C every 20 min. We observed that the ethanol signal appeared at 3 h 40 min while the disappearance of the threonine signal occurred at 5 h 20 min (Fig. 3A). From this data, we can confidently establish that bacterial activity occurred effectively within the NMR tube, and the metabolic process started around 3 h 20 min and ended at 6 h.

Thus, we introduced the infected culture media supplemented

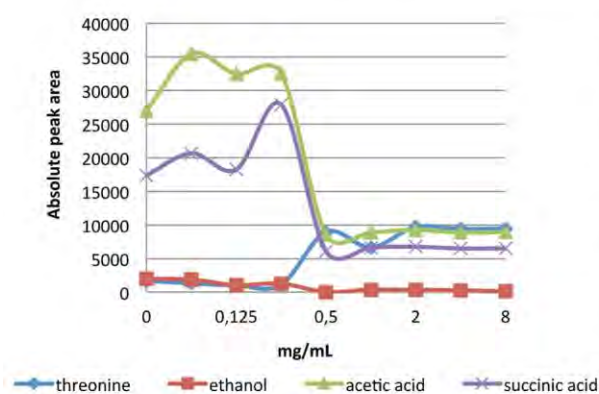


FIG 2 Plots of peak areas corresponding to metabolites or nutrients as a function of antimicrobial gentamicin concentration used for the *E. coli* strain. Acetic acid, succinic acid, and ethanol were produced by bacteria. Threonine is consumed by *E. coli*. When the concentration of gentamicin was higher than 0.5 µg/mL, neither consumption nor production of any metabolites were detected, suggesting that bacteria were not viable.

by several gentamicin concentrations, previously prepared, into the NMR tubes. Stacked plots of the one-dimensional spectra of incubated bacteria in the NMR tube corresponding to concentrations of 0.06 and 0.125 µg/ml are shown in Fig. 3B and C, respectively. The ethanol signal appeared later using 0.06 µg/ml of gentamicin (4 h 40 min) compared with the experiments performed in the absence of the antibiotic (3 h 20 min) and much later (8 h 40 min) when the gentamicin concentration used was close to MIC (0.125 µg/ml). Similarly, threonine consumption by bacteria was delayed when the concentration of antibiotic in the medium was higher.

DISCUSSION

E. coli is a facultative aerobic bacterium able to ferment sugars into a mixture of different compounds, such as acetic and succinic acids, among others, and ethanol by a mixed-acid type fermentation (Fig. 1) (23, 24). Differences in peak intensities for these metabolites observed in spectra allowed us to determine the MIC of gentamicin using NMR spectroscopy. Consumption of the amino acid threonine, present in the culture medium, was interrupted when MIC was achieved. It is well-known that threonine is involved not only in the metabolism of *E. coli* but also in its regulation, and it is one of the amino acids that bacteria quickly catabolize (25, 26). Therefore, we assume that succinic acid, acetic acid, and ethanol are metabolites produced by bacteria and threonine is an amino acid consumed by *E. coli*. These data indicate that microbial activity ceases when the concentration of antibiotic is 0.5 µg/ml.

Although the time taken to perform each experiment (NMR spectroscopy and reference method) was the same, the use of NMR allowed us to observe the bacterial metabolism, ensuring the inactivity of the bacteria when MIC was reached. Furthermore, the use of NMR offered us the possibility to determine the viable bacterial count faster than using the reference method. With our results, we can firmly conclude that NMR is able to detect MIC

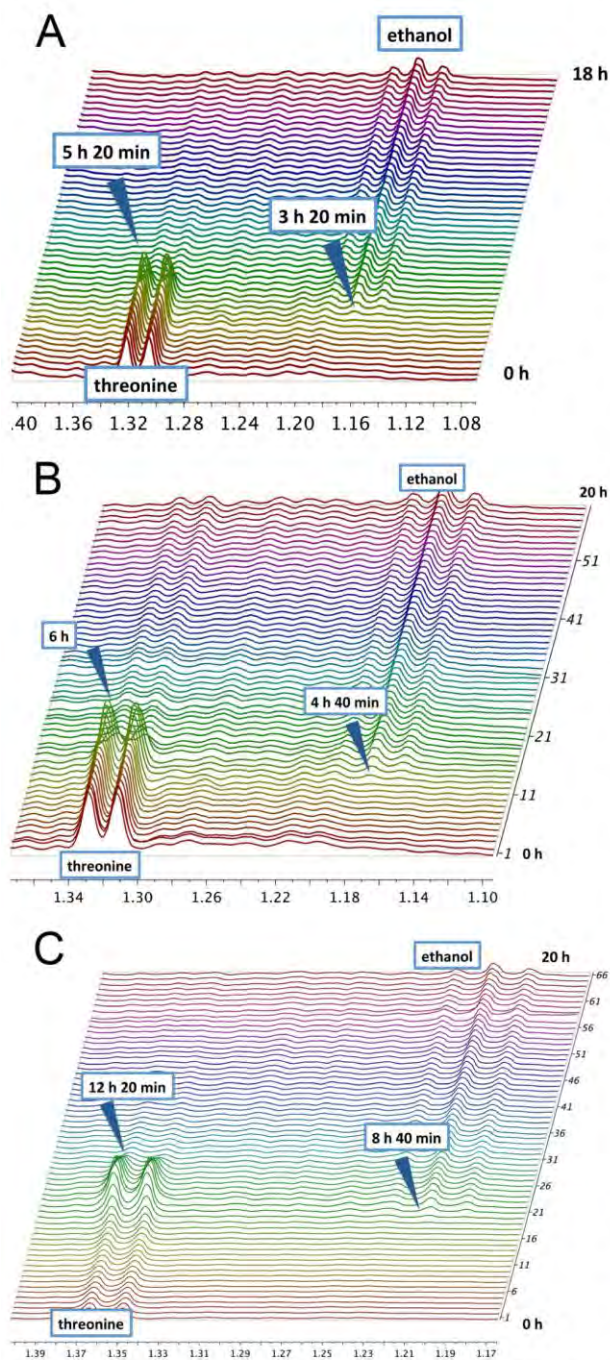


FIG 3 (A) ^1H NMR spectra stacked plot of incubated *E. coli* ATCC 25922. Changes in concentration of metabolites are well shown in spectra. Threonine was consumed when bacteria were active, and ethanol is a metabolite resulting from metabolic production of bacteria. (B) ^1H NMR spectra stacked plot of incubated *E. coli* ATCC 25922 for 20 h at a concentration of 0.06 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin. (C) ^1H NMR spectra stacked plot of incubated *E. coli* ATCC 25922 for 20 h at a concentration of 0.125 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin.

correctly. Although the viable count of the plates showed bacteria in the 0.5 $\mu\text{g/ml}$ agar plate (range of 10^6 CFU/ml), ^1H NMR did not detect bacterial metabolism at this range or at MBC. This result suggests that the range of 10^6 CFU/ml may be the limit of detection for the NMR spectrometer used or the limit in which the population of bacteria activates the metabolism.

The experiments carried out using the NMR tube as an incubation reactor enabled the development of the AST experiments directly in the NMR tube to assess the effectiveness of the antibiotic. This NMR technique can become a useful tool for studying bacteria that do not grow on habitual media, whose metabolism is not well known, and for those bacteria that standardized antimicrobial susceptibility tests are not available.

There is a complex relationship between concentrations of antibiotic and growth and death rates of bacteria. This functional relationship, which is called pharmacodynamics, is an important parameter in the rational design of effective antibiotic treatment protocols (27). The bacterial behavior throughout several concentrations of antibiotic can usually be examined by killing or growth curves, which enables the obtainment of additional information regarding antimicrobial properties of antibiotics *in vitro*, particularly with regard to their initial bactericidal activity against different pathogens (28). Killing or growth curves can be used to study anti-infective effects in *in vitro* models, with the advantage of providing more detailed information about the time course of antibacterial effect (29). As we have shown in the previous experiment, NMR is an outstanding technique to study the time course evolution of a biological process.

Additionally, the introduction of the infected culture media in the presence of several concentrations of the antibiotic in NMR tubes allowed us to evaluate the kinetic behavior of bacteria in the presence of gentamicin. As we can see in Fig. 3, it is very easy to follow the bacterial growth using NMR spectroscopy. Taking into account that studies using kill or growth kinetics are expensive in terms of time and cost and that they are not likely to be performed in a routine laboratory, this novel approach using the NMR technique might become a powerful tool for studying antimicrobial drugs.

NMR spectroscopy is a suitable tool to be considered an alternative to those methods that show difficulties in accuracy and reproducibility (30). Moreover, recently Gupta et al., using the ^1H NMR metabolic approach, identified and quantified *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis* isolates in urine samples from patients with urinary tract infections (UTIs) faster than using culture methods. This NMR method of metabolic profile exploration in urine provided an alternative approach for screening and identification of UTI (31–34). These perspectives, along with the study reported in this paper, suggest the great potential of ^1H NMR for antimicrobial analysis. In the field of fungi infections, drug-induced inhibition of fungal growth is used in the diagnostic laboratory to predict the therapeutic efficacies of antifungal agents. NMR spectroscopy has emerged as a modern and powerful tool for detecting subtle effects on fungal metabolism. Specifically, in the NMR spectra, inhibition of fungal growth through metabolite changes, such as ethanol, glucose, succinate, or acetate, may be detected (35–37). Our team has initiated more complex studies using NMR with fastidious microorganisms such as *Rickettsia* spp. with promising results (38).

Future application of this NMR tool in microbiology requires

large studies involving metabolite identification, obtaining metabolic profile information, and correlating the data to find predictive models for validation and standardization. Costs of this technique (hardware and software installation) are relatively high, but in the long term they are diminished due to the reduced operating time, cost of reagents, low-maintenance, and the small quantities necessary per sample compared with conventional methods or with methods based on molecular biology. The use of few and inexpensive reagents allow for this technique to be used in clinical laboratories, in a similar way to how it is used for the analysis of food in reference centers. Moreover, the new technology of low-field magnets that can be in the benches of laboratories can provide a great opportunity to introduce the methodology in the daily routine. Further antimicrobial susceptibility studies directly applied to clinical samples can show differences in the results compared with *in vitro* studies where the stability and the composition of the culture medium is usually well known and differs from the organism composition.

In conclusion, the results obtained from this study on the use of ¹H NMR in antimicrobial susceptibility analyses indicate that NMR is an objective and reproducible method to show the drug effect on the bacteria studied. MIC determined by the macrodilution method (CLSI) would correspond with the end of the bacterial metabolism observed by NMR, which also predicts the MIC. In addition, we demonstrated that the NMR technique can emerge as an excellent tool for studying the bacterial behavior in the presence of different concentrations of antibiotic. As we have demonstrated, further studies and the automatization of the technique can provide a rapid and reproducible method for studying antimicrobial drug susceptibility and bacterial identification.

ACKNOWLEDGMENT

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Smith PA, Romesberg FE. 2007. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nat Chem Biol* 3:549–556. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.27>.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 26:973–980. <http://dx.doi.org/10.1086/513938>.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49:1749–1755. <http://dx.doi.org/10.1086/647952>.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2000. Antimicrobial susceptibility testing: Special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clin Infect Dis* 30:799–808. <http://dx.doi.org/10.1086/313788>.
- Peterson LR, Shanholtzer CJ. 1992. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clin Microbiol Rev* 5:420–432.
- Wheat PF. 2001. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother* 48(Suppl):1–4. http://dx.doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.1.
- van Belkum A, Dunne WM, Jr. 2013. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 51:2018–2024. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00313-13>.
- Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Pena R, Cisneros JM, McConnell MJ. 2013. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 68:2710–2717. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt253>.
- Zhu C, Yang Q, Liu L, Wang S. 2011. Rapid, simple, and high-throughput antimicrobial susceptibility testing and antibiotics screening. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:9607–9610. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201103381>.
- Mohan R, Mukherjee A, Sevgen SE, Sanpitaksere C, Lee J, Schroeder CM, Kenis PJA. 2013. A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing. *Biosens Bioelectron* 49:118–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.046>.
- Hoult DI, Busby SJW, Gadian DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. 1974. Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Nature* 252:285–287. <http://dx.doi.org/10.1038/252285a0>.
- Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC. 1977. Human erythrocyte metabolism studies by ¹H spin echo NMR. *FEBS Lett* 82:12–16. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80875-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(77)80875-2).
- Nicholson JK, Wilson ID. 1989. High-resolution proton magnetic-resonance spectroscopy of biological-fluids. *Prog NMR Spectrosc* 21:449–501. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6565\(89\)80008-1](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6565(89)80008-1).
- Lopez-Rituerto E, Cabredo S, Lopez M, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM. 2009. A thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *J Agric Food Chem* 57:2112–2118. <http://dx.doi.org/10.1021/jf803245r>.
- Lopez-Rituerto E, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM. 2010. Evidence of metabolic transformations of amino acids into higher alcohols through ¹³C NMR studies of wine alcoholic fermentation. *J Agric Food Chem* 58:4923–4927. <http://dx.doi.org/10.1021/jf904442d>.
- Lopez-Rituerto E, Savorani F, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM, Engelsen SB. 2012. Investigations of La Rioja terroir for wine production using ¹H NMR metabolomics. *J Agric Food Chem* 60:3452–3461. <http://dx.doi.org/10.1021/jf204361d>.
- Spyros A, Dais P. 2012. NMR spectroscopy in food analysis, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Malet-Martino M, Holzgrabe U. 2011. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 55:1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.023>.
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. 2012. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:263–269. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3314>.
- Brinas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3156–3163. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.10.3156-3163.2002>.
- García-Alvarez L, Busto JH, Saenz Y, Peregrina JM, Oteo JA. 2013. Correlación en los resultados obtenidos mediante un método convencional de susceptibilidad antimicrobiana y el uso de resonancia magnética nuclear (RMN). *Futuras aplicaciones. Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:279–279.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI M100-S124. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Arita M. 2004. The metabolic world of *Escherichia coli* is not small. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1543–1547. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0306458101>.
- Castano-Cerezo S, Pastor JM, Renilla S, Bernal V, Iborra JL, Canovas M. 2009. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 8:54. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-54>.
- Chan TTK, Newman EB. 1981. Threonine as a carbon source for *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 145:1150–1153.
- Sawers G. 1998. The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. *Arch Microbiol* 171:1–5. <http://dx.doi.org/10.1007/s002030050670>.
- Regoes RR, Wiuff C, Zappala RM, Garner KN, Baquero F, Levin BR. 2004. Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3670–3676. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.10.3670-3676.2004>.
- Chalkley LJ, Koornhof HJ. 1985. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 28:331–342. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.28.2.331>.
- Mueller M, de la Pena A, Derendorf H. 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 48:369–377. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.2.369-377.2004>.
- García-Alvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Fernández-Recio MA, Avenoza A, Oteo JA. 2013. Nuclear magnetic resonance applied to anti-

- crobial drug susceptibility. *Future Microbiol* 8:537–547. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.8>.
31. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Gowda GAN, Khetrpal CL, Bhandari M. 2009. ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy for identifying and quantifying common uropathogens: a metabolic approach to the urinary tract infection. *BJU Int* 104:236–244. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08448.x>.
 32. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Khetrpal CL, Bhandari M. 2012. Broad identification of bacterial type in urinary tract infection using ¹H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 11:1844–1854. <http://dx.doi.org/10.1021/pr2010692>.
 33. Gupta A, Dwivedi M, Gowda GAN, Ayyagari A, Mahdi AA, Bhandari M, Khetrpal CL. 2005. ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed* 18: 293–299. <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.957>.
 34. Gupta A, Bansal N, Houston B. 2012. Metabolomics of urinary tract infection: a new uroscope in town. *Expert Rev Mol Diagn* 12:361–369. <http://dx.doi.org/10.1586/erm.12.27>.
 35. Coen M, Bodkin J, Power D, Bubb WA, Himmelreich U, Kuchel PW, Sorrell TC. 2006. Antifungal effects on metabolite profiles of medically important yeast species measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4018–4026. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00439-06>.
 36. Plummer R, Bodkin J, Power D, Pantarat N, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrell TC. 2007. Effect of caspofungin on metabolite profiles of *Aspergillus* species determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4077–4084. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00602-07>.
 37. Pawar B, Kanyalkar M, Srivastava S. 2010. Search for novel antifungal agents by monitoring fungal metabolites in presence of synthetically designed fluconazole derivatives using NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1798:2067–2075. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.020>.
 38. García-Álvarez L, Busto JH, Portillo A, Peregrina JM, Avenzoza A, Oteo JA. 2011. Nuclear magnetic resonance (NMR) as tool for the study of *Rickettsia* metabolism. Abstr 6th International Meeting on *Rickettsiae* and Rickettsial diseases. Heraklion, Crete, Greece.

Applications of ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Microbiology

Lara García-Álvarez, Jesús H. Busto,
Jesús M. Peregrina, Alberto Avenzoza and
José Antonio Oteo

Additional information is available at the end of the chapter.

<http://dx.doi.org/10.5772/64450>

Abstract

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) is a spectroscopic technique usually used for structural determination of molecules. In recent years, this technique has been employed for easy and quick recognition of microorganisms, in antimicrobial susceptibility tests and even for the diagnosis of different infectious conditions. Though ^1H NMR shows great potential for expanded applications in microbiological studies, to date applications of proton NMR to microbiological research are not totally standardized. In this chapter, we summarize the state of knowledge about ^1H NMR and its current and potential applications in this field.

Keywords: nuclear magnetic resonance, ^1H NMR, applications, clinical microbiology, microorganisms

1. Introduction

Scientific progress made in the recent years has enabled the development of new techniques that facilitate and improve microbiological study. In this way, nuclear magnetic resonance (NMR) is a spectroscopic technique easy to use and quick to recognize microorganisms and provides sensitivity to antimicrobials. Anyway, to date we have not consensus about the usefulness of these techniques that are not totally standardized. In this chapter, we summarize the state of knowledge about NMR in microbiological studies.

2. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

NMR is a spectroscopic technique initially developed by Felix Bloch and Edward M. Purcell that relies on the magnetic properties of the atomic nucleus. Since 1946, it has become a powerful and extremely valuable tool for chemists, physicists, biochemists and more recently for the medical practitioners [1–5].

Although the most widespread application of NMR is the structural determination of molecules, the technique offers the advantage of direct mixture analysis, and therefore, NMR has demonstrated a unique potential to be used for metabolic mixture analysis, fastidious bacteria included [6]. In comparison with other techniques employed for mixture analysis, NMR can be used to directly investigate biological samples and cell cultures without requiring significant sample preparation. Moreover, the technique allows the determination of compound ratios in a highly reproducible manner. For these reasons, metabolomics and metabonomics are driving new technological advances in the NMR field. Thus, the combination of sophisticated NMR-based methods for mixture analysis with the power of statistical and chemometric methods makes NMR spectroscopy the technique of choice for complex biological mixture analysis, especially in clinical and biomedical researches [3, 4].

In the biological field, the NMR technique [7] is employed to determine the structure and function of macromolecules. Additionally, NMR allows the determination of metabolic changes in organisms in response to external stimuli, through the identification and quantification of metabolites (metabolomics/metabonomics). Metabolomics is the study of global metabolite profiles of a cell under a given set of conditions; however, the terms metabolomics and metabonomics are used in the literature interchangeably [8]. Jeremy Nicholson was the pioneer of the approach, 'the distinction between the two terms metabolomics/metabonomics is mainly philosophical rather than technical' [9].

Since NMR is the only technique that allows to carry out *in vivo* analysis, it has applications in medical diagnosis, for example, magnetic resonance tomography (MRT).

The use of NMR in metabolic studies was reported in 1977, by Brown et al., who determined the presence of lactate, pyruvate, creatinine, and alanine in a blood cell suspension by proton NMR (^1H NMR) [10]. Since then, the analysis of biological fluids, tissues, and cell extracts has been carried out successfully by NMR, especially in the context of research on diseases and evaluation of toxicological processes [11, 12].

2.1. Basics of NMR spectroscopy

The NMR phenomenon can only be carefully described and fully understood using quantum mechanics. Therefore, a complete understanding of the technique would require an exhaustive knowledge of the properties of the angular momentum in the quantum mechanics field, along with statistical thermodynamics knowledge to describe the floating processes needed in the liquid state.

However, since the theory and fundamentals of NMR have been fully developed over the last few years [13, 14] and its detailed description would get away from the objective of this chapter,

we describe below some aspects of the technique, which could help to understand the equipment and methodologies used in metabolic research.

The basis of the technique is to use the magnetic properties of atomic nuclei that are defined by their angular momentum and their associated magnetic moment. Both moments are vector quantities, and they are related by a constant called gyromagnetic constant (γ), which is specific to each type of atomic nucleus. According to quantum mechanics, both moments are quantized and their value depends on a quantum number called spin (I). Not all nuclei are valid to get NMR signals, only those whose spins are greater than zero are valid, but ^1H or proton is the most used nucleus in NMR studies. Moreover, higher the value of constant γ , more sensitive will be the active nucleus in NMR. So, ^1H is the nucleus used in NMR studies because of its great abundance (100%) and high value of γ . However, other magnetically active nuclei with lower sensitivity may be used, such as ^2H (or D), ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P , and ^{23}Na . Focusing on the proton, in the presence of an external magnetic field (B_0), two different energy levels appear. The magnetic moments of these nuclei try to align with B_0 , resulting in two possible orientations at that time. Each of these orientations corresponds to a different energy level. That is, in the presence of B_0 , the cores can be arranged in two new states with different energies. This phenomenon, from a vectorial viewpoint is known as magnetization.

To obtain a NMR signal, the sample is irradiated with a radiofrequency wave, perpendicular to B_0 , which compels it to reach the state of resonance, where the nuclei gyrate with a resonance frequency (f_0), specific to each atomic nucleus and called Larmor frequency. For this reason, NMR spectrometers are designated by the ^1H resonance frequency instead of the magnetic field (for example, on a 14.1 T field, ^1H resonates at 600 MHz). After the pulse, the excited nuclei return to the initial equilibrium state emitting a radiofrequency signal, which decays with the time, a phenomenon known as relaxation. The resonance of the excited nuclear magnets is detected as an oscillating current in a coil placed around the sample. This signal is the FID (free induction decay), which arrives at the receiver and provides a spectrum formed by lines defining frequencies and widths by a mathematical operation known as Fourier transform. The widths are formed from the contributions of all nuclei of the sample, so that this quality allows quantitative measurements. A line in the NMR spectrum obtained at a certain frequency (or chemical shift) corresponds to an atomic nucleus with a given chemical environment, which allows structural information about the molecule it belongs.

2.2. Equipment

The NMR spectrometer involves several parts such as a superconducting magnet, a radio transmitter, a probe, a radio receiver, an analog-to-digital converter (ADC), and finally, a computer. The magnet is the main element and consists of a solenoid of superconducting Nb/Ti alloy wire immersed in liquid helium (4 K) that is charged to generate the essential field strength. The helium is protected with a vacuum jacket and further cooled by an outer dewar of liquid nitrogen (77 K).

The probe head is a coil of wire positioned around the sample (NMR tube) that alternately transmits and receives radio frequency signals. The probe head is usually hosted into the magnet from the bottom and is connected to at least three radiofrequency channels provid-

ing the ^2H lock, ^1H frequency, and one X-nucleus frequency. In general, devices to control temperature (heater, thermoelement, and air) are needed. New developments include the digital transmission of the probe-head parameters to the console.

The computer addresses the transmitter to send a high-power and very short duration pulse of radio frequency to the probe-head. Instantly, after the pulse of radio frequency, a weak signal (FID) from the sample received by the probe-head is amplified and sampled at intervals by the ADC to produce a digital FID signal, which is just a list of numbers. The computer automatically determines the timing and power of pulses output by the transmitter and receives and processes the digitalization. After the computer performs the mathematical processes of Fourier transform in order to convert time domain into frequency domain, the resulting spectrum can be displayed on the computer monitor, transferred to other computers or plotted on a paper.

2.3. Sample preparation

The sample volume should be about 0.6 mL, which gives a 4.0 cm depth in a standard 5 mm NMR tube. Volume of the samples is less important than the concentration of targets. Very small volumes could not be studied by NMR equipment with low magnetic field but once the volume is established, it is more important to ensure that the metabolites to be studied are in

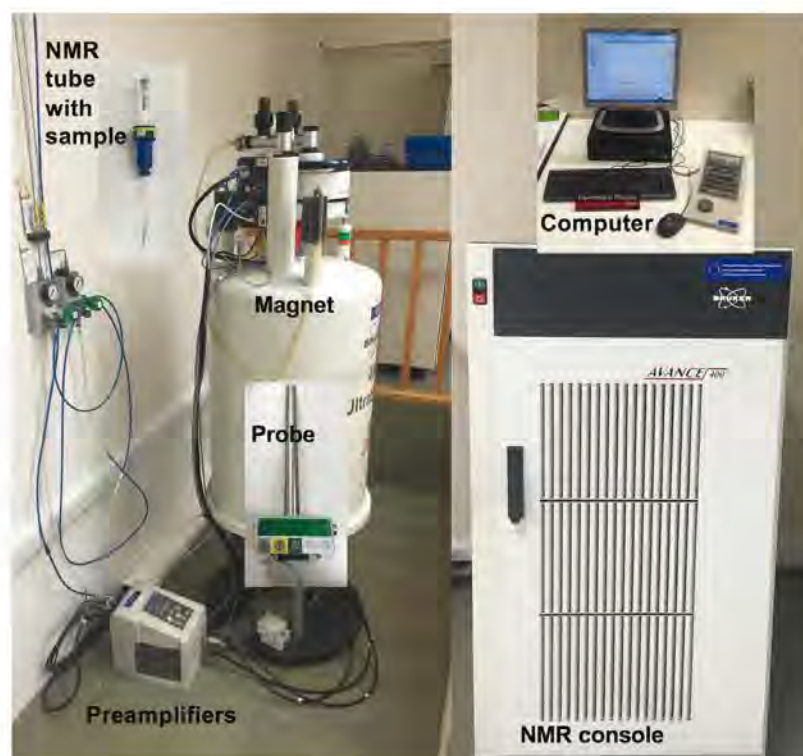


Figure 1. Components of an NMR equipment.

an appropriate concentration. For biological samples, the ideal solvent is D_2O or a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. In this latter case, the ^1H NMR spectra will be recorded using the pulse sequence for presaturation or the equivalent in order to avoid the signals from water. This is the typical and most simple method used to record NMR spectra of biological samples.

Usually, the protocol of preparation for biological and aqueous samples is simple, quick and involves two steps. Samples are prepared from inocula of the microorganisms and the bacterial concentration is adjusted using 0.5–2 McFarland standards [15, 16]. Cultures are incubated at the optimum temperature and time to preserve the same growth conditions than the reference method, if possible. After incubation, the suspensions are removed by centrifugation and the supernatants are decanted and used for NMR experiments. Because the measurements are carried out on supernatants, there is no need to quench cell growth rapidly. Furthermore, pH is measured and fixed by the slow addition of aqueous 1 M HCl and 1 M NaOH solutions or with a buffer solution in order to fix the chemical shifts. Next, a biological sample is added to a 5 mm NMR tube together with D_2O with the addition of the sodium salt (trimethyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid (TSP) for the chemical shift calibration. **Figure 1** shows an overview of the components of NMR equipment.

2.4. Sample treatment

The quality of the obtained NMR spectra depends on several variables that influence the process from sample collection to final data collection. The sample collection involves the sample, containers used, additives (preservatives, stabilizers), and time (collection, transport, storage) [17].

Depending of the source of the biological sample, two different methodologies can be used for the experiment acquisition:

(A) Sample concentration by lyophilization and subsequent reconstitution with a deuterated solvent: using this methodology, NMR experiments can be performed without solvent suppression, allowing an increase in sensitivity and stopping enzyme activity. The risks in using this method include the possibility of introducing contaminants into the sample and more importantly, the loss of volatile compounds.

(B) The addition of a small amount of D_2O to the aqueous sample: the corresponding NMR experiment is performed with a pulse program that can remove the water signal, which would otherwise mask the signals from the rest of the sample. This method involves minimal sample handling and the ability to detect volatile compounds, making it a more suitable method for metabolite analysis of biological samples.

In addition to these processes, due to the infectious potential of microorganisms contained in the sample, all steps of sample processing must be performed safely, through protocols and in laboratories appropriate to the biosafety level for the organism—until the organism is inactivated.

2.5. Data processing

Interpretation of the NMR data is essential to complete metabolomics studies to draw conclusions and trends. The first thing is to perform a pre-processing of NMR data in which NMR spectra are cleaned up in standard ways. After treatment of the spectra, it is possible to get information of metabolites, either through direct quantification by parameters [18, 19] or by applying the methods of data analysis and modelling. In this case, chemometric techniques and multivariate analysis are used to identify and quantify the different metabolites present in the sample. **Figure 2** shows an example of NMR spectrum with the main metabolites obtained. The existence of NMR databases of metabolites can greatly facilitate the latter processes.

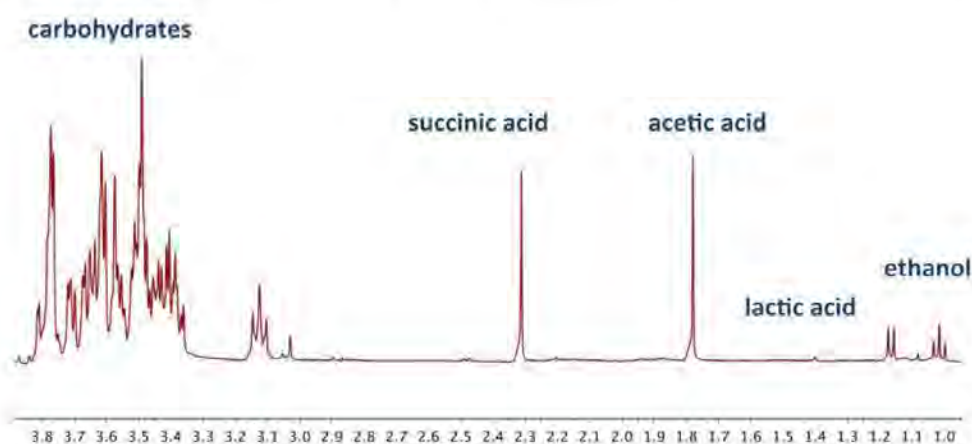


Figure 2. ¹H NMR spectrum showing the main metabolites.

3. Applications of ¹H NMR spectroscopy in clinical microbiology

The application of ¹H NMR to living cells is used to determine metabolites in complex mixtures and has been widely used for identification and quantification of the bacterial species [15, 20]. This technique has also been applied for antimicrobial drug susceptibility studies on different species of yeast, and in the last few years, it has also been developed for bacterial studies. Furthermore, other determinations directly in body fluids have emerged to help in the diagnosis of different diseases and conditions.

3.1. Bacterial identification and metabolic studies

¹H NMR spectroscopy has been used for bacterial identification and quantification and for metabolic pathways studies. Several studies have been conducted for the diagnosis of the bacteria that cause urinary tract infections (UTI). These focus on the use of ¹H NMR spectroscopy for the identification and quantification of common uropathogens such as *Pseudomonas*

aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in urine samples. These studies are based on specific properties of the metabolism of the studied bacteria, and the results showed that ^1H NMR is a simple and fast tool compared with the traditional methods [16, 21, 22].

The qualitative and quantitative determination of *P. aeruginosa* using NMR spectroscopy is based on the specific property of the bacteria to metabolize nicotinic acid (NA) to 6-hydroxynicotinic acid (6-OHNA). Only this bacterium can produce this reaction. The addition of NA to urine samples after incubation and the subsequent analysis by ^1H NMR spectroscopy showed that NA signals disappeared from the medium after some time, while the appearance of new signals of the metabolite 6-OHNA indicated the presence of *P. aeruginosa*. The increase in the intensity of the metabolite signals, together with the decrease in the NA signals, involved a proportional increase in the number of bacteria. This shows the potential offered by this technique for quantitative and qualitative identification, simultaneously, on the bacteria [21].

A similar process occurs in the determination of *K. pneumoniae*. In this case, the specific metabolic reaction is the transformation of glycerol into 1,3-propanediol, so the substance that is added into the medium is glycerol. Despite *Citrobacter freundii* also being capable of carrying out this reaction, both bacteria can be easily differentiated using microscopic examination by observing their motility. *K. pneumoniae* is not mobile while *C. freundii* is. In addition, *C. freundii* is not a common nosocomial urinary tract infection agent. The combination of both methods showed very good sensitivity and specificity (90 and 100%, respectively), suggesting the potential usefulness of NMR for bacterial diagnosis [22].

The same experiment carried out on *E. coli* and *P. mirabilis* revealed that the specific metabolites of the bacteria are lactate and 2-hydroxy-4-(methylthio)butyric acid (MOBA) after incubation with lactose and methionine, respectively [16].

The results obtained using this alternative technique provided the warrant for the development of this method in bacterial identification and quantification and the technical development with other microorganisms. With experience, spectral analysis and data interpretation could be quick and reliable [16].

3.2. Antimicrobial susceptibility assays

The use of ^1H NMR spectroscopy for antimicrobial susceptibility tests has been not highly studied despite its powerful utility in this area of study [5]. Application of ^1H NMR spectroscopy to antimicrobial susceptibility studies was first carried out on different species of yeast. The standardized methods currently available for fungal susceptibility studies are unreliable and relatively slow, so, ^1H NMR spectroscopy can be a simple indicator, an objective and fast method (metabolic changes detected by this method are more easily observed than growth inhibition in broth). ^1H NMR spectroscopy is potentially valuable in determining the metabolic composition of yeast suspensions incubated with a drug. In addition, it is a high performance automated method with low operating costs, so that both operator time and reagent cost are greatly reduced. Therefore, it has great potential to emerge as an alternative method for the antifungal drug susceptibility determination of different yeast species [15, 20].

One of the few studies in which the ^1H NMR technique has been applied to observe the effect on microorganisms upon exposure to several drugs, has been carried out with medically relevant fungi. The fungal species analysed were *Cryptococcus neoformans*, different species of *Candida* and *Aspergillus* spp. These studies are based on the identification of the fungal metabolites produced, on their comparative profile implementation and on the monitoring of the nutrient utilization of the incubation medium in the presence of certain drug concentrations (caspofungin, amphotericin B, and voriconazole). The spectra obtained after subjecting the sample to the ^1H NMR were interpreted based on the metabolites produced (fumarate, malate, ethanol, etc.) and/or the metabolites consumed (tyrosine, phenylalanine, valine, etc.). This interpretation established a measurable parameter, the metabolic end point (MEP), from the spectral peak area. The MEP is defined as the lowest drug concentration at which nutrient utilization from the medium or the production of fungal metabolites is inhibited $\geq 50\%$ and compared with minimum inhibitory concentrations (MIC) used in the reference method. The results of MEP generally showed a good correlation with MICs, which were determined by a modification of the reference method in broth microdilution M27-A of the CLSI. Discrepancies, which may arise between MEPs and MICs, could be due to differences in the culture medium and incubation time. In addition, ^1H NMR spectroscopy is a potentially valuable method for determining the metabolism of microorganisms incubated with the drug because it is a reproducible and relatively quick method (it takes 16 h versus 48 h required by the reference method) suggesting its consolidation as a platform for rapid determination of antifungal susceptibility [15, 20].

In reference to bacteria, there are very few studies based on their antimicrobial susceptibility according to metabolic profiling by ^1H NMR. One of these studies focused on a bacterial disease called 'Withering Syndrome' of abalone (a type of mollusc belonging to *Haliotis* spp. important in aquaculture). It is caused by a pathogen of the Rickettsiaceae family, '*Candidatus Xenohaliotis californiensis*' that infects digestive epithelial cells [23, 24]. On this basis, the effects of the antibiotic oxytetracycline in the metabolic profiles were observed by ^1H NMR. This drug, used to treat bacterial infections in aquatic species, reduces the severity and mortality of the Withering Syndrome. The aim of this study was to observe whether the recovery of the metabolism during treatment with oxytetracycline coincided with the disappearance of the disease caused by the bacteria. To this end, they examined the metabolic constituents present in the foot muscle of the mollusc after oxytetracycline treatment during several established days at two different seawater temperatures (13.4 and 17.3°C) [24]. Metabolic changes were observed at both temperatures: levels of taurine, glycine-betaine, and homarine increased and the amino acid and carbohydrate levels decreased. The detection of metabolic differences between animals treated and untreated with antibiotics was observed only at the highest temperature. Therefore, oxytetracycline eradicated the infection and at the highest temperature it reduced the metabolic changes due to the syndrome. The conclusions drawn from these experiments drive the development of ^1H NMR based on metabolic studies and its complementarity with other techniques, such as the histology for the identification of pathological processes in the aquatic species and for the optimization of drug therapy. This tool displays the performance by analysing quickly and cheaply the functional status of an organism [23, 24].

We have analysed the metabolism and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* ATCC 25922 in the presence of gentamicin using ^1H NMR and compared with a reference method [25]. The MIC, determined by the reference method used in this study, would correspond to the termination of the bacterial metabolism observed using NMR. To carry out these experiments, serial dilutions of gentamicin were tested. Furthermore, two controls were also analysed (one was the medium with an inoculum of bacterium (control I), and the other was only the medium (control II)). The comparison of the two control ^1H NMR spectra showed different signals. Succinic acid, acetic acid, and ethanol were only detected in the control I spectra and threonine was only detected in the control II medium. According to the results obtained by visual turbidity, the lowest concentration of drug that completely inhibited visible growth (MIC) was $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ (MIC: $0.25\text{--}1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) [26]. When we registered antibiotic spectra at different concentrations, we detected the presence of succinic acid, acetic acid, and ethanol only in samples with concentrations of gentamicin lower than the MIC. Moreover, when the concentration of gentamicin was greater than the MIC, we detected the presence of threonine. These data suggested that the results obtained by ^1H NMR spectroscopy were in agreement with those obtained by visual turbidity. These results confirm that *E. coli* is able to metabolize components of the medium to produce succinic acid, acetic acid, and ethanol. Furthermore, threonine only appeared in the spectra of those samples with gentamicin concentrations of $\geq 0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Differences in peak intensities for the metabolites observed in spectra allowed the determination of the MIC for gentamicin using ^1H NMR spectroscopy. Consumption of the amino acid threonine, present in the culture medium, was interrupted when MIC was performed. Therefore, we assume that succinic acid, acetic acid, and ethanol are metabolites produced by the bacteria and threonine is the amino acid consumed by *E. coli*.

Furthermore, to evaluate the potential of this tool, we also performed the same biological experiments but using an NMR tube as the incubation reactor. The bacterial activity occurred effectively within the NMR tube, and the metabolic process started around 3 h 20 min and ended at 6 h. Moreover, when samples containing gentamicin were analysed in the same way the ethanol signal appeared later using the lowest concentration of gentamicin (4 h 40 min) compared with the experiments performed in the absence of the antibiotic (3 h 20 min) and much later (8 h 40 min) when the gentamicin concentration used was close to MIC. Similarly, threonine consumption by bacteria was delayed when the concentration of antibiotic in the medium was higher [25].

3.3. Applications in biofluids

In the last few years, ^1H NMR has been used to directly analyse biofluids and to diagnose different diseases directly from body fluids. In this sense, it has been applied to analyse human microbiota from faeces and urine samples, to study the metabolic implications that take place in sepsis, or even to diagnose hepatitis C virus infection, distinguish HIV-1 positive patients from negative individuals or to diagnose pneumonia from urine [27–33].

As mentioned above, ^1H NMR has been employed to study gut microbiome focusing on the metabolite profiling obtained by the analysis of different human samples. In this sense, Jacobs et al. [27] studied faeces from healthy subjects after consuming placebo, grape juice, or a mix

of grape juice and wine during four weeks by ^1H NMR. The comparison of the NMR profiling of the samples indicated that only the mixture of wine and grape juice was able to modulate gut microbiota assessed by the reduction in isobutyrate observed only in the samples from subjects who had consumed the mixture. These results confirm that ^1H NMR could determine the impact of the nutrition in human microbiome [27]. Furthermore, the use of ^1H NMR to understand gut microbiota has been also extended to the study its impact on obesity by analysing metabolite profiling obtained from urine samples [28, 34].

^1H NMR has been also used to study different conditions as sepsis. Stringer et al. used ^1H NMR to compare the metabolic profile of whole blood from serum. This study revealed that the use of ^1H NMR in whole blood allowed obtaining more metabolic details than serum, and, in some cases, the metabolites detected were in higher concentrations in whole blood than in serum. Furthermore, whole blood allowed the determination of metabolites associated with red blood cell metabolism and observed that alterations in their metabolism could be in relationship with sepsis due to the haemolysis they cause [29]. The same authors have carried out several experiments in the same way. In these experiments, they were able to observe that blood samples of sepsis-induced acute lung injury patients were measurable and distinguishable from healthy blood due to differences in metabolites using ^1H NMR [35]. Other studies have been carried out to evaluate sepsis by ^1H NMR, but in rats [30]. Metabolic profiles obtained from the ^1H NMR analysis reveal changes in the metabolites involved in energy metabolism, especially in the serum of septic rats. From these results, authors concluded that according to the metabolomic approach, ^1H NMR has the potential for the early prognostic evaluation of sepsis [30].

As discussed above, ^1H NMR has been applied to the diagnosis of hepatitis C virus infection [31]. This study performed in urine samples was able to identify infected patients and negative individuals with good sensitivity and specificity using a metabolomics model based on the spectra obtained from the urine samples analysis. In this study, although the differences observed in the spectra allowed comparison of both groups, the chemical structures showed in the spectra are still being analysed [31]. In a similar way, ^1H NMR has been also used to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals [32]. These experiments were carried out in serum samples and differences in the metabolite profiling showed the distinction between the two groups. The authors also suggested that ARV-associated side effects could be monitored using ^1H NMR [32].

Pneumococcal pneumonia is another condition that has been diagnosed using ^1H NMR [33]. The use of the technique applied to urine samples of patients diagnosed with pneumonia has enabled to distinguish pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* from that caused by other microbes such as viruses or other bacteria. This distinction is observed due to the differences in the metabolomic profiles. So the use of ^1H NMR-metabolite profiling could result in a rapid, specific and sensitive tool for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. In this study, it is also observed that the metabolic profile shown in the samples of patients with pneumonia caused by *S. pneumoniae* changed to a more normal metabolite profiling when specific treatment is administered, suggesting that the urinary profiles were specific to the infection [33].

3.4. Other types of analyses

The combination of NMR spectroscopy, with the use of isotopically substituted molecules as tracers is a well-established protocol in microbiology. These NMR analyses appear to be the most appropriate for such studies because of their analytical power (provided that the labelling of products can be easily monitored non-invasively), their non-destructive features, and the large number of compounds that can be analysed simultaneously [6, 36–40]. However, despite the great potential of this combination in clinical practice, these analyses are out of the aim of this chapter.

4. Conclusion

In conclusion, ^1H NMR is an emerging technique in the microbiological field that promises to be a useful tool for the diagnosis of a broad range of conditions, including rapid identification of microorganisms, antimicrobial susceptibility and infectious-related syndromes. It can be also employed for knowing the metabolic pathways used by microorganisms, allowing the performance strategies for fighting against the infection.

Author details

Lara García-Álvarez¹, Jesús H. Busto², Jesús M. Peregrina², Alberto Avenzoza² and José Antonio Oteo^{1*}

*Address all correspondence to: jaoteo@riojasalud.es

¹ Infectious Diseases Department, San Pedro Hospital-Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

² Department of Chemistry, Center for Research in Chemical Synthesis, University of La Rioja, Logroño, Spain

References

- [1] Friebolin H. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005.
- [2] Jacobsen NE. NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. Wiley-Interscience: Cambridge, UK, 2007.

- [3] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier. Amsterdam, 2007.
- [4] Powers R. NMR metabolomics and drug discovery. *Magn Reson Chem*. 2009; 47: S2–S11. DOI: 10.1002/mrc.2461
- [5] García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Fernández Recio MA, Avenoz A, Oteo JA. Nuclear magnetic resonance applied to antimicrobial drug susceptibility. *Future Microbiol*. 2013; 8: 537–547. DOI: 10.2217/fmb.13.8.
- [6] García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Santibáñez S, Portillo A, Avenoz A, et al. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a tool for the study of the metabolism of *Rickettsia slovaca*. *Microbes Infect*. 2015; 17: 850–855. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.09.022.
- [7] Gadian DG. *NMR and its applications to living systems*. Oxford University Press. Oxford, 1995.
- [8] Tang J. Microbial metabolomics. *Curr Genomics*, 2011; 12: 391–403. DOI: 10.2174/138920211797248619
- [9] Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabonomics. *Nature*. 2008; 455: 1054–1056. DOI: 10.1038/4551054a.
- [10] Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC. Human erythrocyte metabolism studies by H-1 spin-echo NMR. *FEBS Lett*. 1977; 82: 12–16.
- [11] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes H. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1: 153–161.
- [12] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, et al. Contemporary issues in toxicology – the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharm*. 2003; 187: 137–146.
- [13] Ernst R, Bodenhausen G, Wokaun A. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. Oxford University Press. Oxford, 1990.
- [14] Goldman M. *Quantum description of high-resolution NMR in liquids*. Oxford University Press. Oxford, 1991.
- [15] Coen M, Bodkin J, Power D, Bubb WA, Himmelreich U, Kuchel PW, et al. Antifungal effects on metabolite profiles of medically important yeast species measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 4018–4026.
- [16] Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Gowda GA, Khetrapal CL, Bhandari M. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy for identifying and quantifying common uropathogens: a metabolic approach to the urinary tract infection. *BJU Int*. 2009; 104: 236–244. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08448.x.

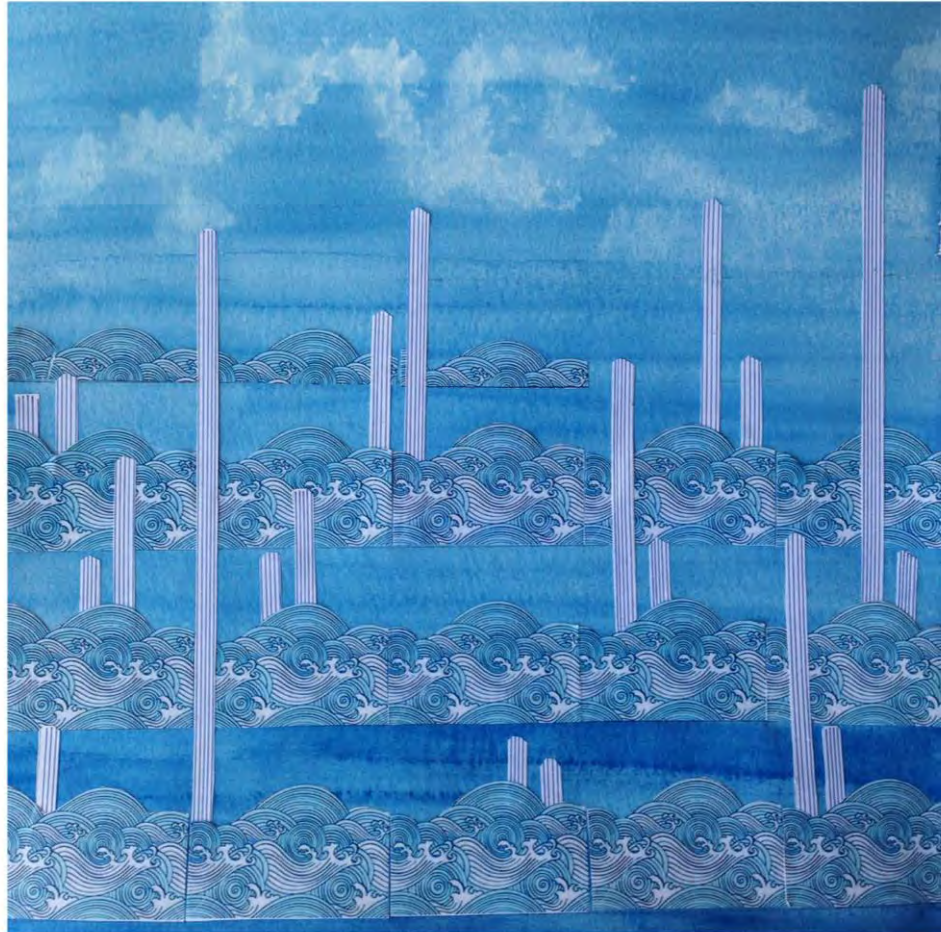
- [17] Price KE, Vandaveer SS, Lunte CE, Larive CK. Tissue targeted metabonomics: metabolic profiling by microdialysis sampling and microcoil NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38: 904–909.
- [18] López-Rituerto E, Cabredo S, López M, Avenoza A, Busto JH, Peregrina JM. A thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 2112–2118. DOI: 10.1021/jf803245r.
- [19] Avenoza A, Busto JH, Canal N, Peregrina JM. Time course of the evolution of malic and lactic acids in the alcoholic and malolactic fermentation of grape must by quantitative ¹H NMR (qHNMR) spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 4715–4720.
- [20] Plummer R, Bodkin J, Power D, Pantarat N, Bubb WA, Kuchel PW, et al. Effect of caspofungin on metabolite profiles of *Aspergillus* species determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 4077–4084.
- [21] Gupta A, Dwivedi M, Nagana Gowda GA, Ayyagari A, Mahdi AA, Bhandari M, et al. ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed.* 2005; 18: 293–299.
- [22] Gupta A, Dwivedi M, Gowda GA, Mahdi AA, Jain A, Ayyagari A, et al. ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Klebsiella pneumoniae*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed.* 2006; 19: 1055–1061.
- [23] Viant MR, Roseblum ES, Tjeerdema RS. NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ Sci Technol.* 2003; 37: 4982–4989.
- [24] Roseblum ES, Tjeerdema RS, Viant MR. Effects of temperature on host-pathogen-drug interactions in red abalone, *Haliotis rufescens*, determined by ¹H NMR metabolomics. *Environ Sci Technol.* 2006; 40: 7077–7084.
- [25] García-Álvarez L, Busto JH, Avenoza A, Sáenz Y, Peregrina JM, Oteo JA. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for gentamicin drug susceptibility studies with *Escherichia coli* ATCC 25922. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 2433–2438. DOI: 10.1128/JCM.00604-15
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI M100-S124. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014.
- [27] Jacobs DM, Deltimple N, van Velzen E, van Dorsten FA, Bingham M, Vaughan EE, et al. (¹H) NMR metabolite profiling of feces as a tool to assess the impact of nutrition on the human microbiome. *NMR Biomed.* 2008; 21(6): 615–626.
- [28] Calvani R, Brasili E, Praticò G, Sciubba F, Roselli M, Finamore A, Marini F, et al. Application of NMR-based metabolomics to the study of gut microbiota in obesity. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 48: S5–S7. DOI: 10.1097/MCG.0000000000000236.

- [29] Stringer KA, Younger JG, McHugh C, Yeomans L, Finkel MA, Puskarich MA, et al. Whole blood reveals more metabolic detail of the human metabolome than serum as measured by ^1H -NMR spectroscopy: implications for sepsis metabolomics. *Shock*. 2015; 44: 200–208. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000406.
- [30] Lin ZY, Xu PB, Yan SK, Meng HB, Yang GJ, Dai WX, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (^1H) NMR and pattern recognition. *NMR Biomed*. 2009; 22: 601–608. DOI: 10.1002/nbm.1373.
- [31] Godoy MM, Lopes EP, Silva RO, Hallwass F, Koury LC, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat*. 2010; 17: 854–858. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01252.x.
- [32] Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 41: 1442–1446.
- [33] Slupsky CM, Rankin KN, Fu H, Chang D, Rowe BH, Charles PG, et al. Pneumococcal pneumonia: potential for diagnosis through a urinary metabolic profile. *J Proteome Res*. 2009; 8: 5550–5558. DOI: 10.1021/pr9006427.
- [34] Calvani R, Micheli A, Capuani G, Tomassini Micheli A, Puccetti C, Delfini M, et al. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabolite type. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34: 1095–1098. DOI: 10.1038/ijo.2010.44.
- [35] Stringer KA, Serkova NJ, Karnovsky A, Guire K, Paine R 3rd, Standiford TJ. Metabolic consequences of sepsis-induced acute lung injury revealed by plasma ^1H -nuclear magnetic resonance quantitative metabolomics and computational analysis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 300: L4–L11. DOI: 0.1152/ajplung.00231.2010.
- [36] Mobashery S, Lerner SA, Johnston M. Monitoring beta-lactamase activity in vivo by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32: 1196–1203.
- [37] Aguayo JB, Gamcsik MP, Dick JD. High resolution deuterium NMR studies of bacterial metabolism. *J Biol Chem*. 1988; 263: 19552–19557.
- [38] Ramos A, Jordan KN, Cogan TM, Santos H. C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Citrate and Glucose Cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 1739–1748.
- [39] Neves AR, Ramos A, Shearman C, Gasson MJ, Almeida JS, Santos H. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo ^{13}C -NMR. *Eur J Biochem*. 2000; 267: 3859–3868.
- [40] Chalk PA, Roberts AD, Blows WM. Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by ^{13}C NMR spectroscopy. *Microbiology*. 1994; 140: 2085–2092.

Relación de publicaciones en acceso restringido que han surgido de esta Tesis:

García-Álvarez L, Busto JH, Peregrina JM, Santibáñez S, Portillo A, Avenzoza A, Oteo JA. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a tool for the study of the metabolism of *Rickettsia slovaca*. *Microbes Infect.* 2015 Nov-Dec;17(11-12):850-5. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.022. Epub 2015 Sep 30. PMID: 26428858

Y la resonancia se hizo arte...



Carlos García Prado

Esta composición ha sido realizada por mi padre expresamente para esta Memoria.

Gracias papá.

