



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO DE FIN DE GRADO
**TÍTULO: Espectroscopía SERS en la
identificación y caracterización de
bacterias.**

Autor: Daniel Heriberto Ruiz Montesdeoca

Fecha: Septiembre 2020

Tutor: María Paz Sevilla Sierra

Índice

1	Resumen.....	3.
2	Introducción.....	3.
3	Objetivos.....	7.
4	Materiales y Métodos.....	7.
5	Resultados y Discusión.....	7.
6	Conclusiones.....	19.
7	Bibliografía.....	19.

RESUMEN

El efecto “Raman” describe las vibraciones que experimentan los enlaces cuando son expuestos a una fuente de excitación lumínica. Cada molécula expresa un patrón de movimiento único, por lo que la detección de esa señal podría emplearse en la identificación de compuestos químicos. Para amplificar esa señal y evitar su solapamiento por otros fenómenos de luminiscencia, se emplea la técnica SERS (“Surface Enhanced Raman Spectroscopy”), basada en la intensificación del campo electromagnético que se produce cuando se sitúa el analito sobre una superficie metálica nanoestructurada. Al tratarse de una técnica de alta sensibilidad y selectividad superficial, se podría emplear para identificar marcadores de infección en diferentes tipos de muestra. La caracterización de las bacterias supone una gran ventaja a la hora de instaurar un tratamiento antimicrobiano, ya que es posible detectar mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Palabras clave: SERS, sustrato, genoserogrupos, mecanismos de resistencia, y antígenos de superficie.

INTRODUCCIÓN

La materia, dependiendo de su naturaleza, puede provocar distintas dispersiones de la luz cuando se le incide una fuente de excitación lumínica. Esto se debe a que ese campo energético oscilante deforma la nube electrónica que rodea el núcleo de la molécula, e irradia ondas electromagnéticas de distinta naturaleza (1).

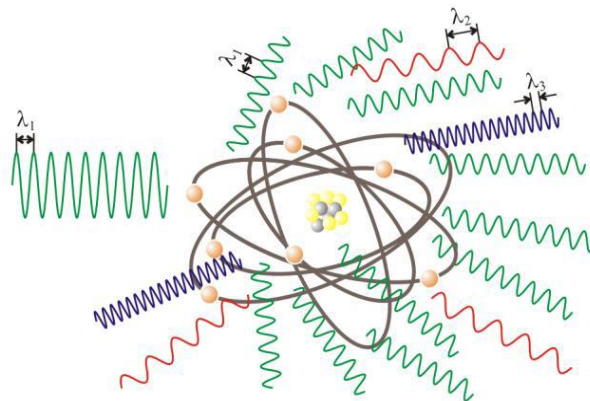


Fig. 1: (a) Esparcimiento Rayleigh. La luz verde (caracterizada por λ_1) incide sobre la molécula y se re-direcciona internamente de manera aleatoria en todas direcciones.) (b) En un esparcimiento Raman incide una longitud de onda λ_1 y se emiten otras longitudes de onda λ_2 y λ_3 . (1)

Al incidir una luz monocromática, el fotón perturba la molécula y esta sufre una transición electrónica. Las moléculas pasan a un estado energético virtual inestable, y después regresan a un estado energético inferior, desprendiendo un fotón. Durante el

proceso, se produce una transferencia de energía vibracional, y se detecta una radiación secundaria de emisión mayor o menor energía que la primaria. La frecuencia del fotón liberado depende del salto energético que haya sufrido la molécula.

Por lo tanto, cuando un fotón interactúa con una molécula, se puede producir dos tipos de dispersiones:

- **Dispersión elástica o esparcimiento de Rayleigh**, donde el fotón emitido tiene la misma longitud de onda (frecuencia y energía) que el fotón incidente. El haz de luz produce un movimiento en la nube de electrones que hace que irradien ondas electromagnéticas con la misma frecuencia de forma aleatoria en todas las direcciones.
- **Dispersión inelástica o esparcimiento de "Raman"**. En este punto, la radiación lumínica incidente produce transiciones energéticas que provocan vibraciones moleculares y posterior dispersión de la luz. Cuando la energía de la radiación dispersada es menor que la incidente, el fotón ha cedido energía a la molécula y se produce la *dispersión de Stokes*. En el caso contrario, el fotón obtiene energía de la molécula y la energía de la radiación dispersada es mayor que la incidente, que se denomina *dispersión anti-Stokes*.

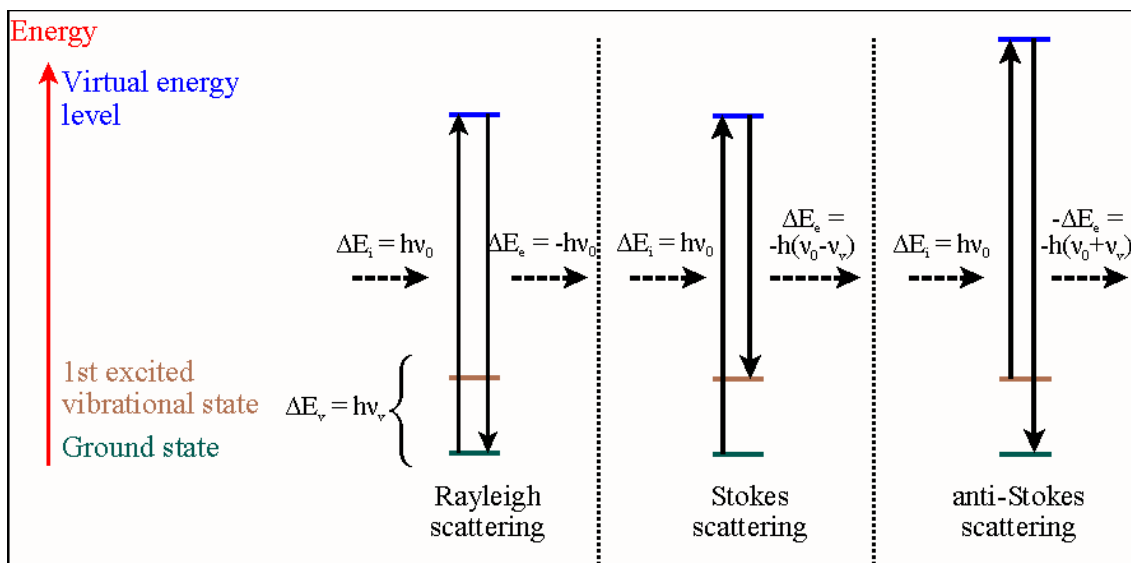


Fig. 2: Diagrama energético de las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética. La molécula alcanza nivel de energía inferior al estado electrónico estacionario excitado, liberando un fotón secundario de los tres tipos (2).

El efecto Raman fue descubierto en 1928 por el Prof. Chandrasekhara Venkata Raman, del cual recibió un Premio Nobel de Física en 1930. Este efecto se basa en la dispersión inelástica de la luz por la materia. Cuando una radiación electromagnética del espectro

visible incide sobre una molécula, pasa de un estado virtual no estacionario, a un estado vibracional excitado cuando desprende un fotón.

La detección e interpretación de esta señal en un compuesto, permite identificar de qué especie química se trata y cómo su estructura se ve afectada al entorno químico que lo rodea, puesto que la información vibracional de los enlaces químicos es específica para cada molécula.

El problema recae en que la intensidad de la señal es bastante débil, y esto se debe a que solo una pequeña fracción de los fotones incididos llega a ser dispersada por el efecto Raman. Este hecho hace que la señal se pueda ocultar por otros fenómenos que ocurren al incidir una fuente de luz sobre un compuesto químico, como la **fluorescencia**. En este punto, la molécula absorbe completamente el fotón incidente, pasando a un estado electrónico excitado, y cuando regresa a su estado electrónico basal, re-emite la radiación a una longitud de onda superior a la incidente (1)

La intensificación de la señal Raman es necesaria para evitar su solapamiento con otras señales, y de esta forma utilizarla como herramienta para la identificación de patrones moleculares dentro de una muestra problema.

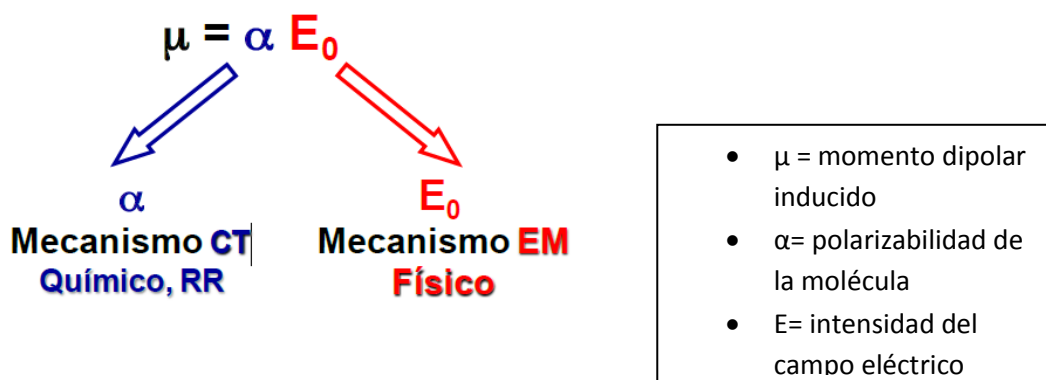
Esta amplificación se produce, por una parte, al utilizar el láser como fuente de excitación lumínica, ya que proporciona una luz intensa, monocromática y coherente, pero con ello también aumenta la emisión de fluorescencia y no soluciona el problema del solapamiento.

La intensificación óptima de la señal, en seis órdenes de magnitud, se produce por el efecto SERS (**“Surface Enhancement Raman Spectroscopy”**). En este fenómeno, los espectros Raman se intensifican cuando las moléculas se encuentran situadas en las proximidades de ciertas superficies metálicas rugosas nanoestructuradas. Para que lleve a cabo, habrá que tener en cuenta los siguientes factores:

- El **tipo de metal** empleado, donde las partículas coloidales de metales nobles (sobre todo Ag) dan lugar a espectros más intensos.
- La **morfología de la superficie**, que requiere presentar irregularidades para amplificar la señal.
- La **naturaleza de la molécula** analizada, donde compuestos aromáticos dan espectros más intensos, mientras que el del agua es muy poco apreciable. Esto permite el análisis de disoluciones acuosas porque el espectro del agua no va a interferir en la señal de los componentes disueltos en la misma.
- **Variables experimentales** tales como; la concentración del sustrato analizado, y la longitud de onda de la emisión láser, entre otros.

Las nanopartículas metálicas suspendidas en un medio o coloide se han convertido en los substratos SERS más empleados, debido a que la agregación parcial de nanopartículas da lugar a intensas señales SERS, sobre todo en el espacio remanente entre ellas ("hot spots"). Aquí se aprecia la máxima amplificación del campo electromagnético. (4)

En la SERS se produce dos mecanismos fundamentales que dan lugar a la amplificación de la señal; la intensificación del campo electromagnético y la transferencia de carga. Estos mecanismos se fundamentan en principios totalmente distintos, pero pueden actuar de forma conjunta o por separado, dependiendo de las condiciones establecidas en el ensayo. (3)



El mecanismo electromagnético explica como el metal amplifica la radiación, la cual se concentra en la superficie de nanopartículas estructuradas, que presentan irregularidades en la misma. La intensificación de la radiación proviene de la excitación de los plasmones de superficie localizados, que aparecen dentro de las alteraciones morfológicas del metal. La concentración de la luz se produce, preferentemente, en los vértices de metales nobles (Au, Ag...).

La transferencia de carga describe como el fotón incidente produce la transferencia de un electrón, desde el metal al adsorbato, o viceversa, y que depende de la polarizabilidad de la molécula. Aquí, se establece resonancia entre el estado fundamental del complejo superficial y los nuevos estados electrónicos cuando se produce la transferencia de carga. (4)

Para que ocurra este fenómeno, hay que tener en cuenta la naturaleza del adsorbato y del metal. Las moléculas que contienen electrones π en su estructura, como las aromáticas, es más probable que se impliquen en la transferencia de carga. Además, la morfología de la superficie metálica contribuye al mecanismo de transferencia, ya que tiene lugar en puntos que existan rugosidades superficiales a escala atómica.

La SERS se considera un método que permite la detección estructural de moléculas en concentraciones traza, e incluso la detección de moléculas aisladas (*single-molecule-detection*). (3)

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es identificar las aplicaciones de la técnica espectroscópica SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) como herramienta para la caracterización de microorganismos patógenos. De esta forma, se podría emplear en el diagnóstico precoz de enfermedades infecciosas, y así seleccionar el tratamiento óptimo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo consiste en una revisión bibliográfica, que utiliza como fuente de información “Google Académico” y “PubMed”. De estos buscadores, se seleccionaron tesis doctorales que pudieran explicar; el fundamento teórico del efecto Raman, y la intensificación de esta señal en superficies de nanopartículas metálicas.

Para cumplir con el objetivo de este estudio, se llevó a cabo una criba de artículos científicos a partir de los buscadores, y se rechazaron aquellos publicados hace más de quince años. De esta forma se obtuvo un número considerable y se analizaron dos artículos de ellos en profundidad, que desarrollan un ensayo de identificación de bacterias patógenas, utilizando como herramienta analítica la espectroscopía SERS. Cada artículo describe el método de caracterización de un solo microorganismo, los cuales son de interés tanto en clínica (*Mycobacterium tuberculosis*) como en industria alimentaria (*Listeria monocytogenes*).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Listeria monocytogenes

El primer proyecto de investigación se centra en la identificación de *Listeria monocytogenes*. Se trata de un microorganismo que actúa como parásito intracelular facultativo, y que entra en el hospedador a través de los intestinos por consumo de alimentos contaminados. Una vez dentro, la infección puede diseminarse por la sangre e invadir el sistema nervioso central, produciendo un cuadro de meningitis y septicemia, además de aumentar el riesgo de abortos en embarazadas.

La listeriosis se puede presentar como epidemias o en forma de casos esporádicos, y es de carácter oportunista, que afecta sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos, e inmunocomprometidos. Al tratarse de una infección transmitida por alimentos, supone un problema para las empresas alimentarias para controlar la presencia del patógeno en las plantas de procesado.

L. monocytogenes, por tanto, es un organismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos en industria alimentaria, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias. (5)

Este estudio propone un método para demostrar que SERS puede lograr diferenciar distintas cepas pertenecientes a la misma especie, no solo las que pertenecen a distintos genoserogrupos, sino aquellas dentro de un mismo genoserogrupo.

En el primer caso, se puede identificar observando las variaciones en cuanto a la presencia de ciertos antígenos de superficie, mientras que en el segundo caso, se procedería a identificar proteínas funcionales en la envoltura de la célula bacteriana, como:

- **CadA1 y CadA2:** proteínas de resistencia a Cd^{2+}
- **BcrB y BcrC:** proteínas de resistencia a cloruro de benzalconio (BC)

Las cepas que presentaran resistencia a Cd^{2+} y BC podría deberse a la presencia del plásmido pLM80 en su material genético, ya que contiene los genes *cadA2* y *bcrABC*. Sin embargo, el gen *cadA1* se encontraba en los serotipos con el transposón Tn5422.

Las proteínas CadA son Cd^{2+} -ATPasas pertenecientes a la subfamilia P_{1B} -ATPasas, las cuales permiten la detoxificación de la bacteria por metales(4).

Por último, las proteínas Bcr pertenecen a la familia de las proteínas SMR (Small Multidrug Resistance), que presentan un sistema de bombeo dependiente de protones. Es importante identificar este mecanismo de resistencia, puesto que el cloruro de benzalconio se emplea ampliamente en la desinfección de plantas industriales alimentarias (4).

La caracterización de cepas dentro de una misma especie, permite explicar la capacidad que tienen para contaminar alimentos, desinfectantes, y si son nocivas para la especie humana. Es importante identificar la cepa desencadenante de la listeriosis para poder seleccionar el tratamiento adecuado, ya que algunas presentan proteínas implicadas en mecanismos de resistencia a antibióticos.

Se llevó a cabo la síntesis de un sustrato bimetálico compuesto por Ag y Au, que serviría como amplificador de la señal Raman.

Para ello, se utilizaron unos discos de plata ($\varnothing = 10$ mm, H = 5 mm) mecánicamente pulidos con suspensiones de Al_2O_3 . Las partículas de óxido que pudieran estar adsorbidas en la superficie, se retiraron con una solución de etanol al 70% asistida por

sonicación. Para aumentar la rugosidad de los discos, se sometieron a ciclos de óxido-reducción en una celda electroquímica, utilizando una solución de KCl 0,1M, y posteriormente fueron lavados con agua ultrapura Millipore®.

Para depositar nanoestructuras de Au en la superficie rugosa, los discos se sumergieron en una solución de HAuCl₄ 0,4mM en HClO₄ 0,1 M dentro de una celda electroquímica, y se aplicó un potencial de 5mV durante 200s. Una vez obtenido el sustrato del ensayo, se lavó con agua ultrapura, y se colocó en una desecadora.

La morfología de la superficie metálica se observó mediante microscopía SEM (4).

Las cepas patrón de *L.monocytogenes* provienen del Departamento de Microbiología Aplicada de la Universidad de Varsovia, que se utilizarán como punto de referencia para caracterizar las cepas presentes en alimentos.

Estos microorganismos se aislaron a partir de brócoli, ensaladas, carne de cerdo, y alimentos procesados, como salmón ahumado, que provienen de distintas empresas alimentarias.

Las cepas resistentes se obtuvieron al sembrarlas en un medio de agar Müller Hinton (MH), enriquecido con un 5% de sangre equina, y que contiene una solución de cloruro de benzalconio (10µg/l) y cloruro de cadmio (75 µg/l). Los microorganismos se incubaron a 37°C durante 24h, y una vez formadas las UFC, se inoculó una colonia aislada en una solución de NaCl 0,9% para obtener una solución pura de células viables que pudieran utilizarse en ensayos de caracterización.

Una vez identificadas las cepas resistentes, se procedió al serotipado mediante PCR, siguiendo el procedimiento descrito por el Laboratorio de Referencia de *L. monocytogenes* de la Unión Europea (ANSES). De esta forma, se pudieron identificar la presencia de genes que codificaran para proteínas de resistencia (bcrABC, cadA1 y cadA2) (4).

El análisis de los espectros se lleva a cabo por un método estadístico de análisis del componente principal (PCA), el cual aumenta la sensibilidad para diferenciar los distintos espectros. Este análisis se realiza en toda la región del espectro que abarca desde 500 a 1630cm⁻¹.

Para proceder a realizar el análisis por PCA, se compararon los espectros de cepas pertenecientes a distintos serogrupos, siguiendo el siguiente protocolo:

- El grupo control, formado por tres cepas de tres genoserogrupos distintos, los cuales no presentaban genes de resistencia.
- Dos cepas de distintos genoserogrupos que contenía, en su genoma, el gen cadA1.
- Dos cepas de distintos genoserogrupos que expresaban el gen de resistencia cadA2.

- Dos cepas de distintos genoserogrupos, que contenían los genes de resistencia *cadA2* y *bcrABC*.
- Tres cepas pertenecientes al mismo genoserogrupo; cepa 02/07 del grupo control, cepa 16/09 con el gen *cadA2*, y cepa 01/07 con genes de resistencia para cloruro de benzalconio y Cd^{2+} .

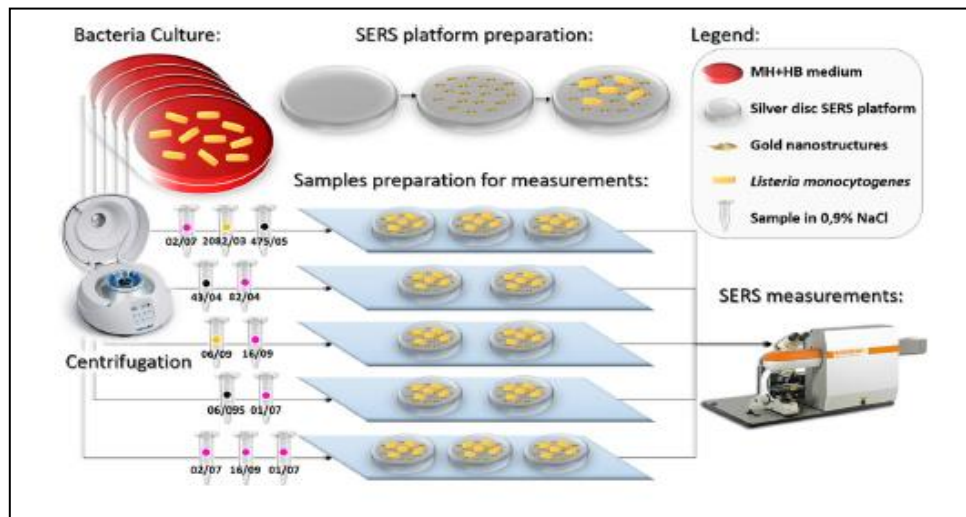


Figura 3: Esquema del ensayo para obtención de los espectros de las distintas cepas para el PCA. Los serogrupos al que pertenece cada cepa se idéntica por colores (grupo IIa negro, grupo IIc amarillo, y grupo IVb rosa) (4)

Para observar, si la expresión de genes de resistencia a cadmio, modificaban los espectros, se realizó una comparación vía PCA de las cepas pertenecientes al genoserogrupo IVb cuando se cultivaban en dos medios distintos:

- Medio 1: Siembra en medio agar MH-sangre equina de las cepas; 02/07 (control), 16/09 (gen *cadA2*), y 82/04 (gen *cadA1*).
- Medio2: Siembra en medio agar MH-sangre equina suplementado con una solución de cloruro de Cd^{2+} de las cepas que contuvieran un gen de resistencia.

El uso del sustrato bimetálico ha demostrado tener la capacidad de detectar analitos a muy baja concentración. Al utilizar esos dos metales, se beneficiaron de la alta estabilidad química del Au y la capacidad de potenciar la señal Raman de la Ag.

El sustrato activo SERS empleado ha conseguido una amplificación uniforme de la señal, donde se ha obtenido datos espectrales estables y reproducibles.

Las cepas pertenecientes al género *Listeria*, se diferencian en cuanto a la variación de los determinantes antigénicos presentes en la superficie de la célula. Estas se pueden identificar mediante serotipado de los antígenos O y H, de los cuales se obtienen 13 serotipos distintos con distinta virulencia. Se ha observado que el 98% de la cepas

aisladas en muestras de paciente con listeriosis, pertenecen a los serotipos 1, 2a, 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, donde el serotipo 1/2a es prevalente en intoxicación por alimentos. Los serotipos que presentaban una composición antigénica superficial muy similar, se agrupaban en un mismo genoserogrupo (4).

Se procedió a realizar un análisis de los espectros de los grupos control, constituido por las cepas 02/07, 475/05, y 2082/03. Es importante destacar que estas no presentaban genes que codificaran para proteínas de resistencia:

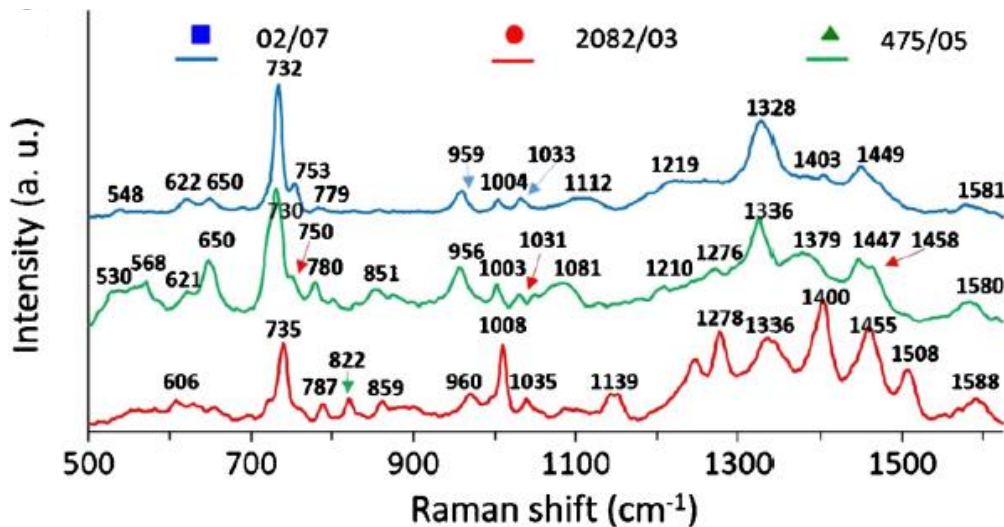


Figura 4: Espectros de grupos control obtenidos por espectroscopía SERS en sustrato bimetálico Au-Ag. Se empleó, como fuente de excitación lumínica, un láser de 0,5mW a una longitud de onda de 785nm (4).

Los picos presentes a 730cm^{-1} y 1330cm^{-1} corresponden a la adenina que forma parte del dinucleótido FAD. La banda a 957cm^{-1} puede describir la deformación del doble enlace C=C o el estiramiento del enlace C-N, mientras que, el estiramiento del enlace C-C de los fosfolípidos, corresponde al pico de 1033cm^{-1} . La banda a 1448cm^{-1} se puede asociar con la deformación del enlace CH₂, y a 1580cm^{-1} describe el estiramiento de los enlaces de anillo aromático en la estructura de flavina y adenina (4).

Las diferencias entre los espectros se describen a continuación:

- La cepa 02/07 presenta una banda a 1112cm^{-1} , que corresponde con el estiramiento del enlace C-O-C de los carbohidratos, y es inexistente en los otros espectros. Los picos a 780cm^{-1} , 1380cm^{-1} , y 1403cm^{-1} son prácticamente inexistentes si se comparan con las otras dos cepas.

- Para 2082/03, se aumenta la intensidad de la señal en la región 530-570 cm^{-1} , y los picos 650 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , y 1080 cm^{-1} .
- La cepa 475/05 expresa una banda adicional a 822 cm^{-1} y 1508 cm^{-1} , además de aumentar la intensidad de los picos a 1400 cm^{-1} y 1455 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos en la PCA afirman que, las bandas 730, 1004, 1278, 1400, y 1450 cm^{-1} , son significativas para diferenciar la composición de antígenos de superficie entre las distintas cepas. Estas bandas son intensas debido a; la vibración del estiramiento del enlace C-C en la fenilalanina (1004 cm^{-1}), el estiramiento del enlace C-N (730 cm^{-1}) y amida (1280 cm^{-1}) de la adenina perteneciente a FAD, y la deformación del CH_2 (1400 cm^{-1} y 1450 cm^{-1}).

La banda de 730 cm^{-1} puede corresponder también con la adenina perteneciente a dinucleótido NAD. Tanto NAD y FAD intervienen en el proceso de respiración celular llevado a cabo en la membrana celular de la bacteria, por lo que demuestra que existe interacción entre substrato metálico y la pared/membrana celular. Cabe destacar que, la formación de metabolitos de degradación de purinas, pueden interferir en la intensidad de esa señal en esa banda.

Por último, las bandas restantes corresponden con los modos vibracionales de las proteínas, y que tienen la mayor contribución en la diferenciación de los espectros por PCA.

Este ensayo también realizó el análisis comparativo, por PCA, de la cepa control 02/07 con una cepa que contiene el gen *cadA2* (16/09), y otra los genes *cadA2* y *bcrABC* (01/07). Este método propone una forma de poder comparar cepas que pertenecen a un mismo genoserogrupo.

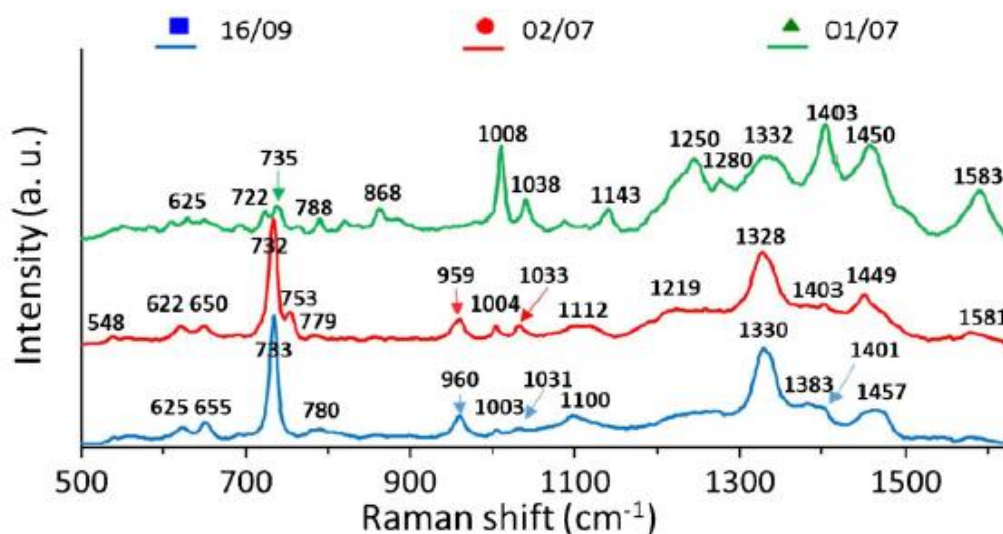


Figura 5: Espectro de las cepas pertenecientes al genoserogrupo IVb. Se obtienen mediante SERS utilizando un sustrato bimetálico Ag-Au, y se emplea un láser de 0,5mW de potencia como fuente de excitación lumínica (4).

A partir de estos resultados, es posible distinguir, con precisión, la cepa que presenta el gen de resistencia para cloruro de benzalconio. En la cepa 01/07, disminuye la intensidad del pico a 730 cm^{-1} , e incrementa los picos en 1008 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1403 cm^{-1} , y 1583 cm^{-1} . Aunque los espectros de las cepas restantes son muy similares, la clave está en la presencia de un pico a 753 cm^{-1} en la cepa 02/07, a diferencia de la 16/09.

Finalmente, se diseñó un ensayo que permitiera ver si la expresión de los genes de resistencia *cadA*, modificaba el espectro SERS. Para ello, se cultivaron las cepas 16/09 (gen *cadA2*) y 82/04 (gen *cadA1*) en un medio agar MH-sangre equina contaminado con una solución de CdCl_2 ($75\mu\text{g/ml}$). Para poder comparar esa expresión de genes con una cepa control, se obtuvo el espectro de 02/07 a partir de un cultivo en el mismo medio sin contaminar. Todas estas cepas pertenecen al genoserogrupo IVb.

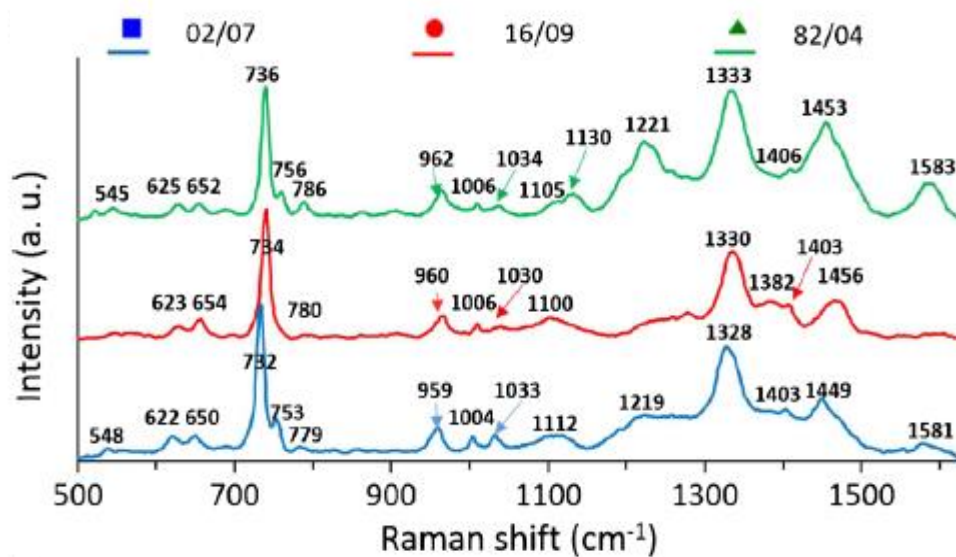


Figura 6: Espectro de las cepas del genoserogrupo IVb. Las cepas resistentes se cultivaron en un medio contaminado con Cd^{2+} . La material instrumental coincide con los ensayos anteriores (4).

Estas condiciones experimentales demuestran que, existen diferencias apreciables entre los espectros cuando se expresa del gen *cadA1*. Se observa un aumento de la intensidad de las bandas a 1221 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , y 1583 cm^{-1} en el espectro de la cepa 82/04. El pico a 1221 cm^{-1} corresponde con las proteínas presentes en la membrana celular y en el citosol, y el pico a 1453 cm^{-1} también corresponde con una banda proteica, concretamente al doblamiento de los enlaces C-H de proteínas estructurales. Por último, el pico a 1583 cm^{-1} se debe al doblamiento del enlace C=C dentro de la

estructura de la fenilalanina, un aminoácido crucial para la formación de proteínas bacterianas.

La expresión de los genes *cadA* se induce cuando la bacteria se encuentra en un medio contaminado por metales, como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{3+} , y Bi^{3+} , donde el principal inductor es cadmio. Esto se debe a que la Cd^{2+} -ATPasa puede llevar a cabo su actividad, como bomba de efluencia, utilizando el Cd^{2+} como sustrato de la reacción (4).

La caracterización de las cepas pertenecientes a la especie *L. monocytogenes*, se ha logrado mediante espectroscopia SERS y aplicando un análisis comparativo por PCA.

Las señales obtenidas por el espectrofotómetro se deben a los componentes antigénicos de la membrana celular, y es posible detectar las variaciones en su superficie, las cuales permiten agrupar a los serotipos dentro de un genoserogrupo.

Esta técnica logró distinguir las cepas dentro de un mismo genoserogrupo, ya que era posible detectar esas proteínas de resistencia. Como se situaban en la superficie de la membrana, no se requería aplicar una técnica de extracción de estos marcadores (4).

Mycobacterium tuberculosis

El agente etiológico de la tuberculosis se caracteriza por ser una bacteria ácido-alcohol resistente debido al alto contenido de lípidos de la pared celular. Este hecho impide que los colorantes utilizados en la tinción de Gram, penetren a través de la pared, por lo que es necesario emplear colorantes especiales. Una vez teñidas, no se decoloran con una mezcla de alcohol y ácido.

Estas micobacterias son capaces de sobrevivir durante meses en la superficie de objetos inanimados, y son más resistentes a los ácidos, álcalis, y desinfectantes que el resto de bacterias no formadoras de esporas. Sobreviven a la desecación y a la congelación, pero la luz UV las inactiva (8).

Para frenar la cadena de transmisión del patógeno, es crucial el diagnóstico precoz del mismo, y de esta forma se consigue instaurar el tratamiento óptimo para el paciente. El protocolo de detección del microorganismo empleado en países endémicos sería observar al microscopio de células viables en el esputo del paciente, y realizar un cultivo de las mismas. Esta técnica presenta baja sensibilidad y especificidad, debido a que no consigue distinguir al agente etiológico del resto de microorganismos que pueden dar lugar a esta sintomatología clínica, además de requerir largos periodos de incubación.

Para este ensayo, se propuso aumentar la sensibilidad de la prueba diagnóstica, identificando marcadores específicos de este patógeno, como son los ácidos micólicos (MA). Se tratan de ácidos grasos de cadena larga presentes en el género *Mycobacterium*, que se consideran de interés diagnóstico debido a sus características; se encuentran en abundancia, son estables, inertes, y específicos de las micobacterias.

Las células humanas no sintetizan MA, por lo que se pueden identificar en distintas muestras humanas.

Estos antígenos se clasifican en tres grandes grupos; α -MA (AMA), metoxi-MA (MMA), y ceto-MA (KMA). Se diferencian por la longitud de la cadena alifática y la presencia de grupos funcionales, y según los tipos MA presentes en la cápsula, se pueden clasificar a las especies dentro de un mismo género. El antígeno mayoritario en *M. tuberculosis* es el α -MA, y metoxi-MA está presente en las cepas patógenas. (6)

Este estudio emplea la espectroscopia SERS como herramienta bioanalítica, debido a la capacidad de incrementar la información vibracional de los enlaces químicos, que es específica para cada molécula.

Se adquiere el espectro de muestras sintéticas de MA, que se adsorben en la superficie de un sustrato de silicio, recubierto de nanopartículas de Ag. Una vez obtenido el espectro, se detecta la presencia de estos antígenos en muestras deslipidadas y no deslipidadas de *M. tuberculosis* y otras bacterias del género *Mycobacterium* spp. Este método se puede realizar directamente a partir de la bacteria atenuada por radiación y, sin tener que extraer el antígeno con disolventes. Para ello se utilizó el ^{137}Cs como fuente de energía ionizante.

El proceso de delipidación se llevó a cabo a partir de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, que fue incubada a 40°C/overnight en una solución de metanol-cloroformo (2:1 v/v). De esta forma, se logra inactivar las bacterias y hacer una extracción parcial de la fracción lipídica.

Una vez incubada y lavada con agua, un volumen de la muestra se somete a ultracentrifugación (14000rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se retira la fase orgánica, y para reducir la tensión iónica causada por fosfolípidos y ácidos grasos, la muestra sufre un segundo ciclo de deslipidación con cloroformo en las mismas condiciones de agitación y temperatura. De este proceso, se guarda la interfase de la muestra donde albergan las bacterias deslipidadas (6). A partir de estas, se extraen los MA siguiendo el protocolo Dluhy (7).

La superficie del sustrato metálico se elabora a partir de SF_6 y O_2 , utilizando un grabador de plasma de acoplamiento inductivo. Controlando el tiempo de grabado y el espesor del óxido de Si, se logró obtener una superficie rugosa con una distribución uniforme. Finalmente, se cubre esta superficie con una capa de Ag de 150nm de espesor, empleando un sistema de evaporación E-Beam.

De las muestras sintéticas de AMA, MMA, y KMA, se obtuvieron los siguientes espectros SERS, que se tomaron como referencia para identificar los MA de varias muestras.

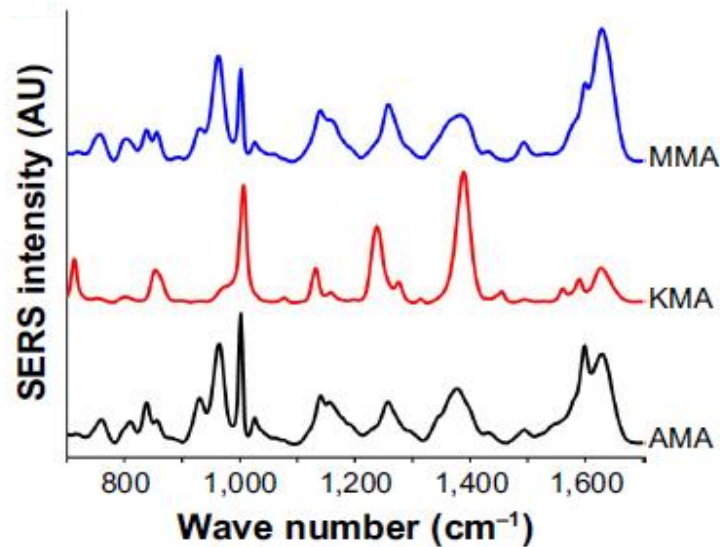


Figura 7: Espectro SERS de los tres tipos de ácidos micólicos puros (6).

KMA presenta un patrón de bandas que difieren de los otros tipos de MA. Los picos de mayor intensidad se observan a 713, 801, 854, 1006, 1132, 1235, 11276, 1338, 1452, 1561, 1589, y 1629 cm^{-1} . Estos picos corresponden con los movimientos vibracionales de los enlaces presentes en el antígeno de superficie, que se describen en la siguiente tabla:

SERS signal (cm^{-1})	Band assignment
713	(CH_2) in-phase rocking
854–857	$\sqrt{(\text{CCO})}$ in-phase stretching mode
932, 964	(CH_2) rocking
1,003–1,006	$\sqrt{(\text{CCO})}$ out-of-phase stretching mode
1,128–1,132	(C–C) stretch
1,159	(C–C) stretch
1,235	(COH) bending mode
1,258	(COH) bending mode
1,354	(CH_2) wagging
1,385–1,388	Symmetric (COO^-) vibration
1,445, 1,452	(CH_2) bend
1,561, 1,572	(C=C) stretch
1,589	(C=O) stretch; (C=C) stretch
1,598	(C=O) stretch; (C=C) stretch
1,629–1,632	(C=N) vibration; amide

Tabla 1: Clasificación del comportamiento de los enlaces cuando se someten a excitación lumínica (6)

En el caso de AMA y MMA, los picos de mayor intensidad se observaron a 760, 808, 838, 857, 932, 964, 1003, 1139, 1159, 1258, 1376, 1493, 1598, y 1632 cm^{-1} . Debido a que el perfil espectral de estos dos antígenos es muy similar, los resultados se

sometieron a un tratamiento estadístico por quimiometría, complementado con un análisis por PCA. De esta forma lograron establecer las diferencias existentes entre los dos espectros, con una precisión del 90%.

Además, se realizó un ensayo para poder identificar los componentes antigénicos de tres tipos de muestras de la cepa H37Rv; muestra deslipidada-MA (DL-MA), muestra no deslipidada (UDL-MA), y muestra de la bacteria completa atenuada (WB-MTB). La primera consiste en un extracto puro que contiene MA unido, por enlace covalente, a la pared bacteriana. Sin embargo, la muestra UDL-MA constituye un extracto más simple, que además contiene fosfolípidos de membrana y MA de interacción débil con la pared.

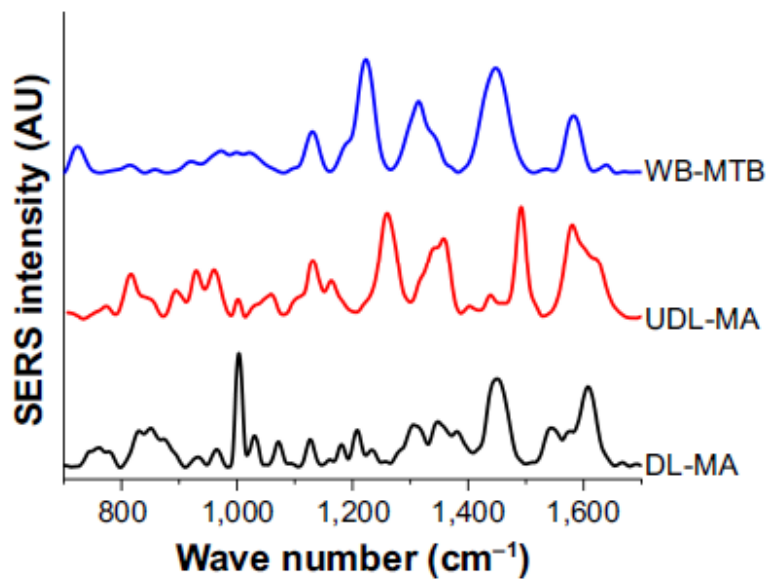


Figura 8: Espectros SERS de los tres tipos de muestra preparadas en el laboratorio (6)

Se identificaron unos picos de mayor intensidad, en la muestra DL-MA, a 857, 932, 964, 1003, 1032, 1073, 1128, 1160, 1207, 1235, 1258, 1348, 1385, 1445, 1572, 1598, y 1632 cm^{-1} . La muestra UDL-MA, a diferencia de la anterior, mostraba picos de intensidad a 1061, 1131, 1231, 1261, 1441, 1492, 1580, y 1630 cm^{-1} , y carecía de los picos que describían la deformación del enlace $-\text{CH}_2$. Los momentos vibracionales de los enlaces se describen en la Tabla 1.

Los datos espectrales de las muestras compartían algunos picos de intensidad correspondientes a los antígenos puros, y para verificar la presencia de estos antígenos en las muestras, se analizaron los extractos por espectrofotometría de masas.

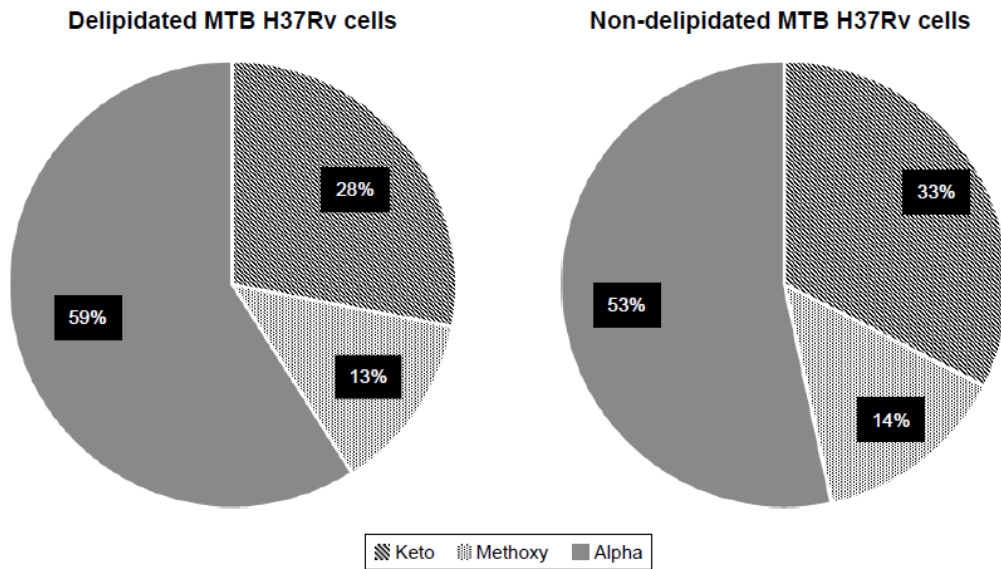


Figura 9: Gráfico circular de los datos obtenidos por espectrofotometría de masas. Se indica la proporción de los tres antígenos en cada tipo de muestra. (6)

El componente antigénico mayoritario corresponde con AMA, que es principal MA de la especie estudiada. El antígeno MMA se expresa en menor cantidad, por lo que cabría esperar que esta cepa no resultara ser patógena. Estos ratios se podrían emplear como indicadores de patogenicidad.

Finalmente se obtuvo el espectro de la bacteria completa, sin aplicar un método que comprometiera a la integridad de la membrana. En la figura 8, se observan picos de intensidad a 714, 857, 918, 1000, 1025, 1130, 1141, 1231, 1245, 1314, 1343, 1450, 1585, y 1636 cm^{-1} . Se pudo apreciar que las bandas espectrales eran más amplias, y esto debía a que, todos los componentes lipídicos de la pared, contribuían en la señal detectada por el espectrofotómetro (6).

Este método ha demostrado que tiene la capacidad de caracterizar el antígeno específico de las micobacterias. Se podría emplear como técnica analítica en la detección de *M.tuberculosis*, directamente de una muestra de esputo y sin tener que llevar a cabo un tratamiento de la muestra.

CONCLUSIONES

La técnica SERS ha demostrado ser un método preciso para identificar y caracterizar patógenos, ya que logra identificar antígenos de superficie implicados en los mecanismos de patogenicidad y de resistencia a distintos bactericidas. Esto es importante en la determinación de los serotipos de *L.monocytogenes*, puesto que existen cepas resistentes a cloruro de benzalconio, que es un desinfectante de amplio uso en industria alimentaria. En este caso, sería conveniente proponer otro sistema de descontaminación de superficies, ya que es un patógeno que se transmite en los alimentos.

Las muestras infectadas por *M. tuberculosis*, no requerían de un tratamiento previo para llevar a cabo el análisis por SERS, sino que se podía analizar, directamente, el esputo de un paciente. Esto se debe a que los antígenos son exclusivos de las micobacterias, por lo que se pueden diferenciar del resto de señales pertenecientes a otros compuestos de la muestra. Por tanto, la técnica sería una alternativa prometedora para el diagnóstico de la tuberculosis en países en vías de desarrollo, donde la enfermedad es endémica, ya que consiste en un método sencillo y de bajo coste.

Cabe destacar que, en determinadas situaciones, cuando los espectros de dos compuestos son similares, se requiere un tratamiento estadístico adicional para poder establecer diferencias significativas entre ambos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro, J., Villanueva, A.E. y Ortiz, C.M. (2013). Espectroscopía Raman y sus aplicaciones. *Sociedad Española de Óptica*, 46 (1), pp. 83-95. Recuperado de: https://www.sedoptica.es/Menu_Volumenes/Pdfs/OPA46-1-83.pdf.
2. Román, J. (2015). *Procesos de Resonancia Raman en Espectroscopía SERS*. [Tesis Doctoral]. Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias Químicas, España.
3. García, A. (2015). *Espectroscopía Raman intensificada por superficie de biomoléculas a través de nanopartículas plasmónicas ultrasensibles*. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, España.
4. Witowska E, Korsak D, Kowalska A, Janeczek A, Kaminska, A. Strain-level typing and identification of bacteria-a novel approach for SERS active plasmonic nanostructures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018; 410: 5019-5031.
5. López, V., Suárez, I., Chico-Calero, I., Navas, J. y Martínez-Suárez, J.V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología*, 38, pp. 224-234. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016794011.pdf>.
6. Perumal J, Bendt A.K, Kazakeviciute A, Fu C, Ong I.L, Olivo M. Identification of mycolic acid forms using surface-enhanced Raman scattering as a fast detection method for tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine*. 2018; 410: 6029-6038.

7. Rivera-Betancourt OE, Karls R, Grosse-Siestrup B, Helms S, Quinn F, Dluhy RA. Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles. *Analyst*. 2013; 138: 6774.
8. Dorronsoro, I. y Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *An.Sist.San.Navar.*, 30, pp. 67-85. Recuperado de:
<http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf>