



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

USO DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE CRIES EN PACIENTES SANOS Y EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CRÓNICAS

R. Avila Rodríguez^a, I. Compeán Martínez^a, M. C. del R. Terrones Gurrola^a, N.L. Vega Estrada^b, R. Salaices Quirino^c, M. Rivera Martínez^d.

^aCoordinación Académica Región Altiplano de la UASLP, Matehuala S.L.P.,
raquel.avila@uaslp.mx, isaac.compean@uaslp.mx, rocio.terrones@uaslp.mx

^bClínica dental Morelos 403 zona centro, Matehuala S.L.P.

noriz.excelente8@hotmail.com

^cFacultad de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma de Zacatecas

rsg_9223@hotmail.com

^dMaestría en Endodoncia de la Facultad de Estomatología de la UASLP
marthariveramtz@yahoo.com.mx

RESUMEN:

En este trabajo, se analizó la relación que existe entre caries con pacientes sanos y pacientes con alguna enfermedad crónica (*Diabetes mellitus*, enfermedades cardiacas, y obesidad), ya que la caries es un factor para muchas enfermedades infecciosas, debido a que en la boca se encuentra una gran cantidad de bacterias. Se colectaron 97 muestras de la cavidad bucal, de los cuales 47 eran pacientes crónicos y 50 eran pacientes sanos. Se realizó un análisis microbiológico y un análisis con espectroscopia Raman, para identificar específicamente *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida Albicans*. La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico o inorgánico [1-3]. Los resultados con espectroscopía Raman muestran que los microorganismos tienen grupos funcionales pertenecientes a su composición bacteriana, la cual está formada por proteínas (20-40 %), polisacáridos y lípidos (30 – 50%). Se encontró también que la *Candida albicans* presenta una forma espectral muy diferente al de las bacterias. En los pacientes con alguna enfermedad crónica, los resultados obtenidos muestran que *Escherichia coli* está en un 6.18% de las muestras en cavidad bucal, y *E. faecalis* en un 10.30% a pesar de que son parte de la microbiota intestinal y no de la cavidad bucal, sin embargo *Candida albicans* se presentó en 28 muestras (28.86%), esto se debe a que los pacientes con *diabetes mellitus*, tienen un factor que favorece su desarrollo en cavidad bucal. En pacientes sanos, *Escherichia Coli* está en un 10%, *E. faecalis* con 0%, y *Candida albicans* con 2%. Los grupos funcionales encontrados en los espectros Raman de las bacterias, muestran que contienen compuestos similares, como proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos, peptidoglucanos y ADN, por lo que podemos decir que la espectroscopia Raman es una técnica factible para realizar caracterización.

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad caracterizada por reacciones químicas y microbiológicas que lleva a la destrucción del diente desde la superficie hasta el interior. La enfermedad periodontal es una patología indolora, lentamente progresiva que consiste en la inflamación de la encía secundaria a la colonización bacteriana de la superficie dental, las lesiones por caries son evolutivas y su prevalencia en pacientes diabéticos es inversamente proporcional al control metabólico [1].



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

Actualmente se utilizan técnicas de análisis microbiológico para determinar el agente etiológico causante de caries, sin embargo se empiezan a utilizar otras técnicas, como las espectroscopias ópticas para el análisis de fluidos biológicos. La espectroscopia es una técnica óptica donde la luz dispersada es la que nos proporciona información de la muestra [2]. La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico o inorgánico. El análisis espectroscópico se basa en el examen de la luz dispersada por la materia al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Algunas de las aplicaciones de la espectroscopia Raman en la medicina ha sido para el estudio de cáncer de próstata, para diagnóstico bioquímico, y para la diferenciación de bacterias que causan gastroenteritis [3-5].

2. TEORÍA

Recientemente se ha encontrado una frecuencia creciente en enfermos diabéticos o con alguna enfermedad crónica para la incidencia de caries, ya que la cavidad oral es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con mayor número y variedad de bacterias aerobias y anaerobias [6]. La bacteria *Escherichia coli* es considerada como miembro fundamental de la microbiota, ya que tiene la útil función en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de peligrosas bacterias y contribuye a la síntesis de las vitaminas. *Escherichia coli* en la actualidad se le considera como un tipo de bacterias entero patógenas de mayor preocupación en la industria alimenticia, debido a que es uno de los principales agentes causales de la contaminación de los alimentos, siendo el responsable de severos trastornos gastrointestinales en niños y adultos mayores. Si bien los primeros reportes referentes a la patogenicidad de los enterococos se remontan a fines del siglo XIX, lo cierto es que estos microorganismos han manifestado su mayor trascendencia clínica en los años más recientes, debido a su incremento en incidencias intrahospitalarias. *Enterococcus faecalis* (antes *Streptococcus faecalis*), a quien se le atribuía una importancia secundaria en las infecciones urinarias, hoy en día protagoniza uno de los más preocupantes problemas de salud al interior de los hospitales. En los últimos años, *E. faecalis* se ha ubicado súbitamente entre los principales agentes etiológicos de bacteremias, infecciones urinarias y otros padecimientos intrahospitalarios, debido al incremento en la virulencia de las cepas implicadas y a la progresiva resistencia a los antibióticos. El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por primera vez por el físico Indio Chandrasekhara Venkata Raman (1928), con lo cual obtuvo el premio Nobel de física.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se colectaron 97 muestras de cavidad bucal de pacientes que acuden a revisión a la clínica dental de ambos sexos, además del Hospital General de Matehuala. A los pacientes dispuestos para la toma de muestra, se les pidió firmar de consentimiento informado dándoles a conocer el procedimiento y objetivo del estudio. La toma y recolección de las muestras se realizaron en cada caso introduciendo un Hisopo Cary Blair, al interior de la cavidad bucal y con este se realizó un barrido por el área lo cual incluía base de los dientes, paladar y lengua. Una vez tomadas las muestras se realizó un análisis microbiológico y análisis por medio espectroscopia Raman. Se realizaron diferentes pruebas a cada una de las muestras como son la Rojo de Metilo, Indol, Voges Proskauer, Citrato, Movilidad, TSI, Hemólisis y Catalasa. Al final se realizó la espectroscopia Raman, con los resultados se hace un análisis estadístico para establecer la exactitud y precisión de los mismos, y por tanto, la validez de todo el proceso analítico. En la Figura 1 podemos observar *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans* después de sacarlos del periodo de incubación. Una vez que fueron aisladas las bacterias se llevó a cabo una tinción de Gram para la identificación de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, siguiendo el procedimiento siguiente: a)



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

se realizó un frotis colocando en un portaobjetos una gota de solución salina estéril, del cultivo aislado se tomó una asada de la colonia sospechosa y se realizó el frotis extendido se dejándolo secar al aire; b) se agregó cristal violeta un minuto y después se lavó con agua corriente; c) a continuación se adiciono lugol durante un minuto y se lavó a agua corriente; d) se agregó alcoholacetona por 10 s; e) se agregó safranina por 1 minuto y se lavó con agua corriente; f) por finalizar se dejó secar al aire y por último se observó en el microscopio a 100x para observar la morfología. Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación y corroborar que se trataba del microorganismo que se estaba buscando, las pruebas realizadas a *Escherichia Coli* fueron Vogues-Proscauer, Rojo de metilo, Citrato de Simmons, Movilidad y Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), se realizaron las pruebas realizadas a *Escherichia coli* y *E. faecalis*, estas pruebas fueron realizadas para confirmar la presencia de *Escherichia coli*; para el microorganismo *E. faecalis* se le realizaron las pruebas de Catalasa, Hemolisis y reducción con azul de metileno. Para realizar la lectura mediante es uso de a Espectroscopia Raman se utilizó la escala de Mc Farland, utilizando el tubo #4 el cual equivale a una concentración de 12.0×10^8 bacterias mL^{-1} , se diluyó la bacteria en la solución salina después de haber realizado un raspado directo de la caja de petri para realizar la medición con el espectrómetro Raman directamente sobre la muestra, de ahí se trasfiere la información a un software llamado Espectra Suite, el cual arroja información mediante graficas; se realizaron tres mediciones para cada muestra, y se procesaron con el programa Origin 8, para identificar los grupos funcionales. En este estudio se utilizó un Espectrómetro Raman Ocean Optics QE65000 con una potencia de 499 mW y una luz láser de 785 nm, el cual se muestra en figura 2.

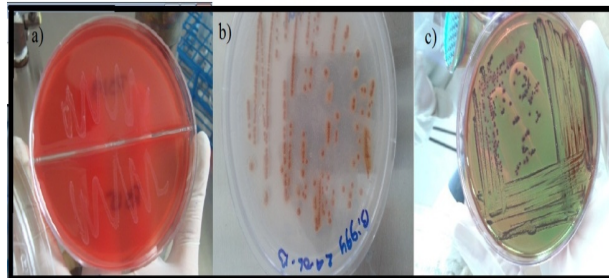


Figura 1. a) *E. faecalis* aislada en agar sangre, b) *Candida albicans* aislada en agar Biggy, c) *Escherichia coli* aislada en Agar EMB



Figura 3. Espectrómetro Raman



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

RESULTADOS

Se analizó un grupo de 97 pacientes entre hombres y mujeres con una edad mayor a los 40 años, de los cuales, 47 pacientes eran crónicos (48.45%) y 50 pacientes eran sanos (51.54%). Se encontró que después de haber incubado las muestras; en el medio McConkey se presentó crecimiento en 37 muestras (38.14%) en las cuales el crecimiento predominante fue *Klebsiella pneumoniae*. En el agar Eosina Azul de Metileno se encontró crecimiento de *Escherichia coli* en 3 muestras (3.09%) de pacientes sanos y 3 muestras (3.09%) de pacientes crónicos, también se encontró que 43 muestras (44.32%) contenía *Klebsiella pneumoniae*. En el medio de crecimiento Verde Brillante se observó crecimiento de *E. faecalis* en 1 muestra (1.03%) de pacientes crónicos y 9 muestras (9.27%) correspondían a pacientes sanos; se encontró que 15 muestras (15.46%) dieron posible crecimiento a *Salmonella spp*, esto debido a las características de crecimiento presentadas, se observó que 79 muestras (81.44%) presentaron crecimiento de algún otra especie de cocos pertenecientes a la microbiota de cavidad bucal. Se encontró crecimiento positivo de *Candida albicans* en 28 muestras, de las cuales 19 muestras (19.58%) pertenecen a pacientes sanos y 9 muestras (9.27%) corresponden a pacientes sanos. De las pruebas realizadas a las 6 muestras que contenían *Escherichia coli*. se obtuvieron resultados positivos. Para las 10 muestras que contenían *E. faecalis* los resultados de las pruebas bioquímicas fueron positivos. Las mediciones realizadas con espectroscopia Raman se muestran en la figura 4, donde se observa la intensidad y el desplazamiento Raman de las bacterias, se muestra una similitud en la forma espectral de las bacterias, y es diferente a la de *Candida albicans*, los grupos funcionales presentes en las regiones de los espectros Raman corresponden a la estructura molecular de las bacterias y el hongo, formadas por proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ADN los cuales se muestran en la figura 4.

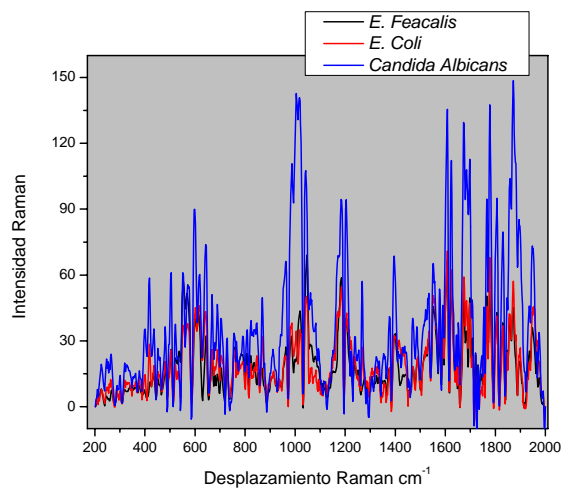


Figura 4. Formas espectrales de *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans*.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

En la Tabla 1 se muestran las frecuencias y los grupos funcionales encontrados en las bacterias *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans*, correspondientes a su estructura molecular.

Tabla 1. Grupos funcionales y frecuencia Raman de *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans*

GRUPOS FUNCIONALES	FRECUENCIA RAMAN cm^{-1}		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
OH ($800-500 \text{ cm}^{-1}$)	480.59 - 522.29	480.59 - 522.29	480.59 - 522.29
N-H ($750-550 \text{ cm}^{-1}$)	551.45 - 689.33	553.87 - 689.33	551.45 - 689.33
C - H Grupo aromático ($900-700 \text{ cm}^{-1}$)	705.63 - 846.97	705.63 - 822.29	705.63 - 846.97
P-O ($1100-830 \text{ cm}^{-1}$)	869.26 - 980.93	838.01 - 985.13	869.27 - 982.98
C - C ($1100-1040 \text{ cm}^{-1}$)	1019.38 - 1082.71	1019.39 - 1061.73	1019.38 - 1044.85
C - O ($1300-1000 \text{ cm}^{-1}$)	1151.05 - 1205.96	1185.73 - 1207.98	1185.73 - 1205.96
P = O ($1300-1140 \text{ cm}^{-1}$)	1238.09 - 1267.93	1238.09, 1275.84	1240.09, 1267.93
C - H ($1350-1150 \text{ cm}^{-1}$)	1307.31 - 1353.94	1305.35 - 1324.87	1307.31 - 1324.87
C - CH ₃ cerca de 1375 cm^{-1}	1377.02 - 1396.12	1377.02 - 1396.12	1377.02 - 1396.12
CH ₂ ($1500-1400 \text{ cm}^{-1}$)	1445.25 - 1469.55	1493.66	
CH ₃ Cerca de 1420 cm^{-1}			
H - C - N Cerca de 1550 cm^{-1}	1534.04	1521.25 - 1552.23	1534.04 - 1550.42
Grupos aromáticos Absorben cerca de 1580 cm^{-1}	1577.51	1577.51	1577.51
C = C ($1680-1600 \text{ cm}^{-1}$)	1607.94 - 1645.12	1607.94, 1623.93	1607.94, 1623.93
NH ₂ ($1660-1590 \text{ cm}^{-1}$)			
C = N ($1690-1630 \text{ cm}^{-1}$)	1673.14	1673.14	1673.14
COOH Absorbe a 1700 cm^{-1}	1697.45 - 1721.57	1699.19 - 1721.57	1697.45 - 1721.57
C = O Absorbe cerca de 1760	1765.85 - 1777.66	1765.85 - 1779.34	1765.85 - 1777.66
C = O Anhídridos ($1850-1800 \text{ cm}^{-1}$)	1806.14 - 1999.61	1806.14 - 1976.13	1806.14 - 1991.8

B. Colthup, Norman; Introduction to infrared and Raman Spectroscopy (Third edition)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que *Escherichia coli* está en un 6.18% de las muestras en cavidad bucal, y *E. faecalis* en un 10.30% a pesar de que son parte de la microbiota intestinal y no de la cavidad bucal, sin embargo *Candida albicans* se presentó en 28 muestras (28.86%), esto se debe a que una gran cantidad de pacientes padecían *diabetes mellitus*, lo cual es un factor que favorece su desarrollo en cavidad bucal. Los grupos funcionales encontrados en los espectros Raman de las bacterias *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans*, muestran que contienen compuestos similares, como proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos, peptidoglucanos y ADN. En la frecuencia de 1607.94 cm^{-1} , se identifica el grupo funcional de N - H₂, el cual está presente en los tres microorganismos ya que forma parte de la estructura de los aminoácidos, lo que demuestra la presencia de proteínas en los microorganismo analizados, en la frecuencia de 1307.31 cm^{-1} podemos encontrar el enlace C - H, y en la frecuencia de 1238.09 cm^{-1} y 1240.09 cm^{-1} el enlace P=O, el cual corresponde a la forma estructural de los fosfolípidos, los cuales también están presentes en *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *Candida albicans*, por lo que podemos decir que la espectroscopia Raman es una técnica factible para realizar caracterización.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

BIBLIOGRAFÍA

1. Paves V., Araya V., Rubio A. Ríos L., Meza P. Martínez B. "Estado de salud periodontal en diabéticos tipo I, de 18 a 30 años de edad en Santiago, Chile. Rev.Med Chile 2002; 130(4):402-408.
2. Skoog A. D., Holler, F. J. Y A. Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental (5ta Ed)*. España: McGraw- Hill
3. Snezana Uskokovic- Markovic, Milena Jelikic Stankov (2013). "*Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool*" ISSN 1452-8258, J. Med Biochem.
4. Snezana Uskokovic-Markovic, Milena Jeñikic-Stankov. "Raman Spectroscopy as a new Biochemical diagnostic tool" J Med Biochem 2013; 32 (2)
5. Mello Cesar, Ribeiro Diórginis, Nocaes Fábio. (2005). "*Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis*". Anal Bioanal Chem (2005) 383:701-706.
6. Juan José Arrieta Blanco, Begoña Bartolomé Villar, "Problemas bucodentales en pacientes con diabetes mellitus (I): Índice de placa y caries dental. Medicina Oral 2003: 8-97-109