BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa*

IMMUNOSENSOR DEVELOPMENT FOR Pseudomonas aeruginosa DETECTION

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
FERNANDO IVÁN RAMÍREZ LUNA

DIRECTOR:
LUIS RAMIRO CASO VARGAS

COODIRECTORA:
NORMA ELENA ROJAS RUIZ

MARZO 2024

La presente tesis titulada "DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa*" realizada por Fernando Iván Ramírez Luna ha sido revisada y aprobada por el siguiente comité revisor para obtener el título de:

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Biológicas

Comité revisor integrado por:

Dra. Leslie Susana Arcila Lozano
Asesor de Tesis

Fecha de examen FIRL

Dra. Abigail Martínez Torres
Asesor de Tesis

Dr. Luis Ramiro Caso Vargas
Director de Tesis

Dra. Norma Elena Rojas Ruiz
Codirectora de Tesis

Puebla, Puebla, México. Mayo de 2024.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista capaz de ocasionar infecciones en personas inmunosuprimidas, pudiendo incluso, en casos graves, ocasionar la muerte. Dado que es de vital importancia desarrollar métodos de detección que permitan la rápida identificación de esta bacteria, en este trabajo de tesis se desarrolló un inmunosensor empleando anticuerpos policlonales biotinilados contra *P. aeruginosa* como elemento de reconocimiento biológico. Las cepas de trabajo fueron previamente aisladas a partir de aguas termales en el municipio de Chignahuapan, Puebla, en el laboratorio de Microbiología 402 del edificio EMA-6, e identificadas como *P. aeruginosa* mediante aproximación filogenética. En el presente estudió se corroboró la identificación de la misma manera que lo realizaron previamente; amplificando y secuenciando la región del gen que codifica para el gen que codifica para el ARNr 16S y posteriormente analizando su proximidad filogenética, empleando análisis bioinformáticos.

Las cepas empleadas en este trabajo fueron sembradas en los medios King A y King B para evidenciar la producción de pioverdina y piocianina. Se realizaron análisis de resistencia a antibióticos con antibiogramas comerciales; las cepas de trabajo presentaron una resistencia de 83.33% (cepa 38) y 92.66% (cepa 39) a los 12 antibióticos evaluados. En la región del infrarrojo medio, las bandas consideradas más importantes que corresponden a las diferentes etapas del proceso de ensamblado fueron: para el SiO_2 silanizado, 1042 y 1126cm^{-1} crecimiento de la red del silano, 1665cm^{-1} flexión N—H del grupo amino, 2936 y 2882 cm^{-1}, tensión C—H de los grupos metilos y metilenos; para el soporte silanizado más el agente reticulante (glutaraldehído), ~3416, tensión O—H, ~1636cm^{-1}, formación de imina; unión covalente de la estreptavidina, 1665cm^{-1}, amida. La miscroscopía electrónica de barrido mostró que *P. aeruginosa* es reconocida por el inmunosensor y permanece adherida al anticuerpo superficial aún después de varios lavados. El análisis de la respuesta del inmunosensor a distintas UFC·mL^{-1} de *P. aeruginosa* evaluado por FT-IR reveló que la banda ~1464cm^{-1} exhibe una respuesta lineal entre la concentración de la bacteria y la absorbancia, detectando hasta 10^{-7} UFC·mL^{-1} con una r^2= 0.9219. Así mismo, los resultados del análisis de los espectros completos mediante clasificador bayesiano ingenuo, redes neuronales artificiales y

análisis de clustering mostraron mayor exactitud hasta diluciones de 10^{-5} UFC·mL^{-1}.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that can cause infection and, in severe cases, death in immunocompromised individuals. Since the development of detection methods that allow rapid identification of this bacterium is crucial, this thesis developed an immunosensor using biotinylated polyclonal antibodies against *P. aeruginosa* as a biological recognition element. The working strains were isolated from hot springs in the municipality of Chignahuapan, Puebla in previous investigations and identified in the Microbiology laboratory 402 of the EMA-6 building. In these investigations, the region of the gene that codes for 16S rRNA was amplified and sequenced; bioinformatic analysis indicated that the isolates belonged to the *P. aeruginosa*. In this work, the identification of a strain was confirmed through the same methodology and a comparative phylogenetic analysis was carried out with other bacteria of the *Pseudomonas* genus. The working stains were examined for the production of pyoverdine and pyocyanin by using King A and King B media. In addition, antibiotic resistance analyzes were performed with commercial antibiograms; the working strains presented a resistance of 83.33% (strain 38) and 92.66% (strain 39) to the 12 antibiotics evaluated. In the mid-infrared region, the most remarkable bands corresponding to the different stages of the assembly process were identified, for silanized silicon: 1042 and 1126 cm^{-1} for the growth of the silane network, 1665 cm^{-1} for the N—H bending of the amino group, 2936 and 2882 cm^{-1} for the C—H stretching of the methyl and methylene groups; for silanized SiO_2 bonded to cross-linking agent (glutaraldehyde): ~3416 cm^{-1} for O—H stretching, ~1636 cm^{-1} for imine formation; covalent bonding of streptavidin, 1665 cm^{-1} for amide. Scanning Electron Microscopy examination showed that *P. aeruginosa* is recognized by the immunosensor and remains bound to the surface antibody even after several washes. Analysis of the response of the immunosensor to different CFU·mL^{-1} of *P. aeruginosa* by FT-IR showed that the ~1464 cm^{-1} band exhibited a linear response between bacterial concentration and absorbance, detecting up to 10^{-7} CFU·mL^{-1} with an r^2= 0.9219. Similarly, the results of analyzing the full spectra using the naive Bayesian classifier, artificial neural networks and clustering analysis showed the most accurate predictions up to

dilutions of 10^{-5} CFU·mL ^{1}.

AGRADECIMIENTOS

En este espacio me gustaría agradecer en primera estancia a mí familia, mis padres que siempre me dieron cariño y amor, apoyo económico y emocional durante toda mi vida, mis hermanos que me han acompañado en todo momento, mis primos y amigos que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, y a mi compañera de vida que constantemente me motiva y me alienta a seguir adelante.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Luis Ramiro Caso Vargas y la Dra. Norma Elena Rojas Ruíz por haberme acogido en este gran proyecto, por brindarme las herramientas y conocimientos para culminar esta investigación. A mis compañeros de servicio social y de prácticas que colaboraron conmigo.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que me proporcionó las instalaciones y formación necesaria para cumplir mis metas. A la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo), en especial al Dr. Efraín Rubio Rosas y al M. en C. Erick Reyes Cervantes por proporcionar el apoyo de equipos de microscopía.

A todos los docentes que dejaron una fracción de su conocimiento y experiencia, que sin duda alguna fueron forjando mi educación.

Contenido

1 Introducción. 1

1.1 Pseudomonas aeruginosa. 1

1.1.1 Factores de virulencia. 2

1.1.2 Multirresistencia a antibióticos. 4

1.1.3 Diagnóstico. 8

1.2 Biosensores. 9

1.2.1 Inmunosensores. 10

1.2.2 Métodos de detección. 13

1.2.3 Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). 13

***2* Antecedentes.** 16

2.1 Funcionalización del silicio. 16

2.2 Biosensores contra patógenos. 18

***3* Justificación.** 22

3.1 Motivación y declaración de problemas. 22

4 Objetivos. 23

4.1 Objetivos generales. 23

4.2 Objetivos particulares. 23

5 Desarrollo de la metodología. 24

5.1 Materiales y reactivos 24

5.2 Cultivo, selección e identificación de *Pseudomonas spp.* 27

5.2.1 Selección de las cepas de *Pseudomonas spp.* 27

5.2.2 Extracción de ADN. 27

5.2.3 Amplificación de ARNr 16s por PCR punto final. 28

5.2.4 Purificación por columna de los productos amplificados. 29

5.2.5 Análisis *in silico* de la secuencia de ADN. 29

5.2.6 Cultivo de *P. aeruginosa* en caldo LB. 29

5.2.7 Diluciones y conteo de *P. aeruginosa*. 29

5.2.8 Determinación de la resistencia o sensibilidad a antibióticos 30

5.3 Inmunosensor. 30

5.3.1 Limpieza de los soportes de SiO_2. 30

5.3.2 Hidroxilación de los soportes. 30

5.3.3 Funcionalización de los soportes hidroxilados con 3-APTMS 31

5.3.4 Unión del agente reticulante (*crosslinker*). 31

5.3.5 Unión covalente de la estreptavidina sobre los soportes reticulados. 31

5.3.6 Fijación del anticuerpo biotinilado. 32

5.4 Evaluación de inmunosensores. 32
5.4.1 Unión bacteria-inmunosensor. 32
5.4.2 Evaluación en FT-IR. 33
5.4.3 Visualización en microscopio electrónico de barrido (SEM). 33
5.4.4 Evaluación de la capacidad selectiva de los inmunosensores. 33
5.4.5 Manejo de datos mediante softwares de análisis 33

6 Resultados. 34

6.1 Cultivo, selección e identificación de *Pseudomonas spp.* 34
6.2 Evaluación del antibiograma. 39
6.3 Construcción y ensamble del inmunosensor. 42
6.4 Inmunodetección de *P. aeruginosa* mediante FT-IR y SEM. 53
6.5 Ensayos de especificidad de los inmunosensores. 61
6.6 Análisis predictivo de espectros mediante redes neuronales artificiales y clasificación por Naive Bayes. 64

7 CONCLUSIONES. 74

8 BIBLIOGRAFÍA. 74

9 DECLARACIÓN. 87

Introducción

1

> *¿Qué es la investigación, sino una cita a ciegas con el conocimiento?*
>
> — **Will Harvey**
> (Empresario estadounidense)

1.1 *Pseudomonas aeruginosa.*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa)* es un organismo Gram negativo, aerobio, con forma de bastón de aproximadamente 0.5-1um de diámetro y 1.5-5 um de largo, flagelado y no esporulado (1). Este organismo es ubicuo, tiene la capacidad de persistir en suelos y agua, sobreviviendo en ambientes con una mínima cantidad de nutrientes (2). *P. aeruginosa* se puede encontrar en cuerpos de agua como los ríos o lagos, en zonas urbanas como piscinas, bañeras, jacuzzis, de igual forma, dentro de ambientes hospitalarios como en fregaderos, desinfectantes, equipos de terapia respiratoria y en endoscopios (1).

Es denominado patógeno oportunista debido a que tiene la capacidad de propiciar infecciones en pacientes con un sistema inmunodeficiente, es capaz de causar infecciones agudas y/o crónicas en los humanos, como puede ser la fibrosis quística, la meningitis, neumonía, infecciones de piel, tracto urinario, huesos, articulaciones e infecciones post cirugía, sin embargo, la infección por *P. aeruginosa* también puede ocurrir en personas sanas, provocando otitis media o externa, foliculitis y queratitis (3–5). En la figura 1 se muestra un esquema de infecciones comunes causadas por *P. aeruginosa.*

P. aeruginosa es considerado el quinto patógeno que más causa enfermedades

generales, el segundo relacionado con neumonía nosocomial, el tercero en infecciones urinarias, cuarto en infecciones quirúrgicas y el séptimo en sepsis (2).

Algunos factores importantes en las infecciones de *P. aeruginosa* son la edad, el estado de salud de la persona y la genética (1–3,6,7).

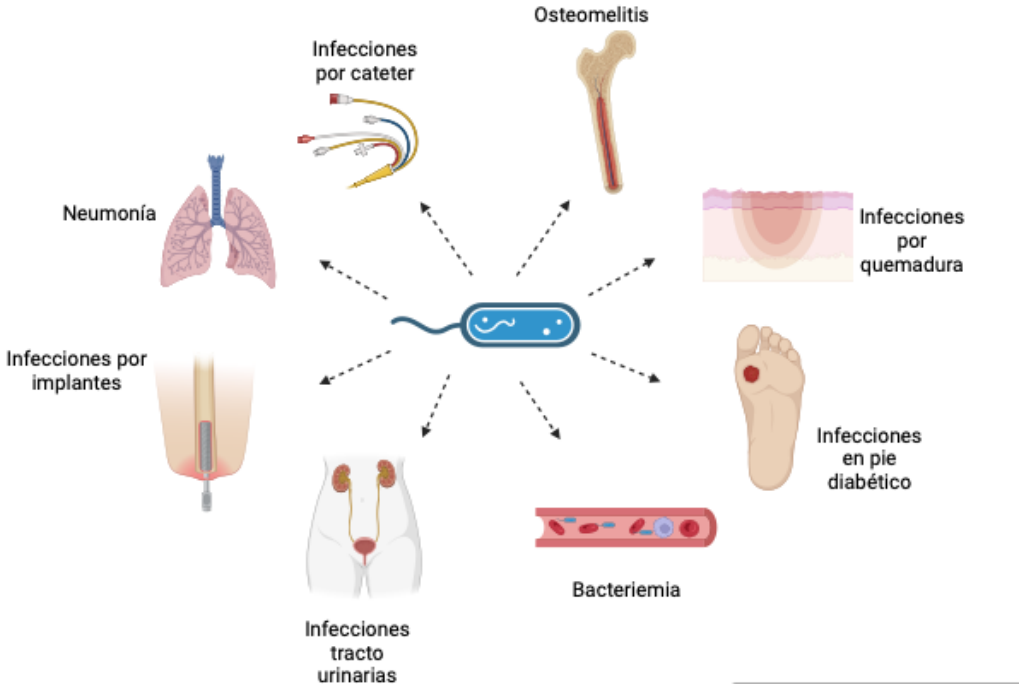


Figura 1. Esquema de infecciones causadas por *P. aeruginosa.* Elaboración propia modificado de Tuon et al., 2022. Elaborado en BioRender.com

1.1.1 Factores de virulencia.

P. aeruginosa tiene la capacidad de adaptarse al ambiente adverso en los huéspedes mediante la secreción de diferentes factores de virulencia como adhesinas, proteasas, sistemas de secreción, formación de biopelículas, entre otros, que provocan el éxito de la infección y la causa de la enfermedad (Tabla 1).

Un paso crucial de la infección es la unión de la bacteria con el tejido blanco, *P. aeruginosa* utiliza componentes de su superficie celular que promueven la adhesión de las bacterias, se reportan al menos 3 factores diferentes de adherencia; los *pili* tipo IV, los flagelos, y los lipopolisacáridos (LPS). El LPS es un componente estructural de las membranas externas que se encuentra en las bacterias Gram

negativas, es un componente importante dentro de la interacción bacteria-huésped (2,8).

P. aeruginosa ha desarrollado un sistema de secreción muy complejo, el cual transloca los factores de virulencia al medio extracelular o los inyecta al citosol del huésped; este organismo cuenta con 5 de los 7 sistemas de secreción que se han encontrado en Gram negativos; tipo I, tipo II, tipo III, tipo V y tipo VI (2). Adicionalmente, *P. aeruginosa* codifica para las proteínas efectoras ExoS, ExoT, ExoU y ExoY que generan diferente citotoxicidad en las células huésped que pueden llegar a inducir la apoptosis.

Un factor característico de este organismo es la producción de piocianina (pigmento azul verdoso), que provocan disrupción sobre la cadena transportadora de electrones y catalasa, fungiendo como protector ante las especies reactivas de oxígeno (2).

P. aeruginosa es capaz de generar biopelículas, una matriz de polisacáridos constituida principalmente por alginato, ácido múrico y ácido glucurónico, que funciona como barrera impidiendo el paso de los antibióticos y de células inmunológicas (9).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa.*

Factor de virulencia	**Efecto**
Proteasas	Dañan los tejidos del huésped por la actividad proteolítica. Por ejemplo: Elastasa A, MucD, proteasa alcalina, aminopeptidasas, entre otras.
LPS	Es reconocido por el huésped generando inflamación y activación de repuesta inmune.
Pili y fimbrias	Proporcionan adherencia y motilidad a *P. aeruginosa.*
Leucocidina	Citotoxinas dirigidas hacia leucocinas y neutrófilos expulsada a través del sistema de secreción tipo III.
Sideróforos	Pioquelina y pioverdina apoyan la producción de otros factores de virulencia mediante la transferencia de hierro. Por ejemplo, biopelículas.
Ureasa	Producen amoniaco y dióxido de carbono mediante la hidrólisis de la urea en una infección urinaria.

Proteínas de la membrana	Esenciales del reconocimiento del huésped, la adherencia y secreción de factores de virulencia.
Exo-toxinas	Citotoxinas que afectan a las células del huésped generando apoptosis.
Biopelícula	Barrera de polisacáridos que impide la interacción del antibiótico con el patógeno.

Adaptado de Quin, et al., 2022 (10).

Los factores de virulencia se regulan dependiendo de la densidad celular mediante el mecanismo conocido como *Quorum sensing* (QS), el cual es empleado como sistema de comunicación química por diversas especies bacterianas (8), las bacterias producen autoinductores que funcionan como moléculas de señalización que se liberan al medio, una vez alcanzado el umbral, son activados para inducir directa o indirectamente la expresión génica de los factores de virulencia (8,10).

1.1.2 Multirresistencia a antibióticos.

A lo largo de la evolución bacteriana, se han desarrollado diversos mecanismos de resistencia genética en contra de compuestos que afectan su supervivencia.

El 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió un comunicado con el fin de promover la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos contra bacterias del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter spp.)*, debido a su multirresistencia a antibióticos (10,11). *P. aeruginosa* destaca en la prioridad 1: Crítica, según la lista de la OMS. La importancia de esta bacteria se centra en su multirresistencia contra antibióticos tipo quinolonas, β - lactámicos y aminoglucósidos (11,12). Existen 3 principales mecanismos de resistencia que las cepas de *P. aeruginosa* emplean contra los antibióticos: intrínseca, adquirida y adaptativa (12).

Intrínseca: contrarresta la eficiencia de un antibiótico específico a través de características estructurales o funcionales inherentes. *P. aeruginosa* tiene un elevado nivel de resistencia intrínseca basada en la membrana externa, bombas de flujo y producción de enzimas inactivadoras (13). Los principales mecanismos de

adaptación intrínseca se muestran en la Tabla 2, mientras que en la figura 2 se muestra un esquema de estos.

Tabla 2. Mecanismos intrínsecos de adaptación a antibióticos.

Mecanismo	Descripción	Ref.
Permeabilidad de la membrana	La mayoría de los antibióticos se dirigen a objetivos intracelulares, por lo que deben cruzar la membrana externa, que actúa como una barrera selectiva. Las porinas ancladas a la membrana forman los canales de flujo. *P. aeruginosa* tiene porinas específicas como OprB (hidratos de carbono), OprP (fosfatos), OprO (pirofosfato) y OprD (aminoácidos básicos). OprD participa en la absorción de antibióticos y tiene sitios de unión para carbapenémicos y β-lactámicos. La ausencia de OprD aumenta la resistencia a esta clase de antibióticos.	12 14 15
Bombas de flujo	Las células utilizan bombas para expulsar compuestos nocivos. Estas bombas se clasifican en 5 familias: superfamilia facilitadora principal (MFS), pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR), casete de unión a ATP (ABC), resistencia-nodulación-división celular (RND) y extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), dónde las proteínas pertenecientes a la familia RND desempeñan un papel clave en la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa*. La sobreexpresión de múltiples bombas de flujo ha contribuido al desarrollo de multirresistencia a antibióticos	12 14 15

Síntesis de enzimas	Las bacterias han desarrollado enzimas que pueden destruir o alterar antibióticos. *P. aeruginosa* posee el gen ampC que codifica para β - lactamasas, enzimas que inactivan compuestos betalactámicos, de igual forma se han encontrado cepas con enzimas aminoglucósido fosfotransferasa (AHP) y nucleotidiltransferasa (ANT) que mediante la modificación de las moléculas inactivan a los aminoglucósidos.	2 12 15

Ref. – Referencia.

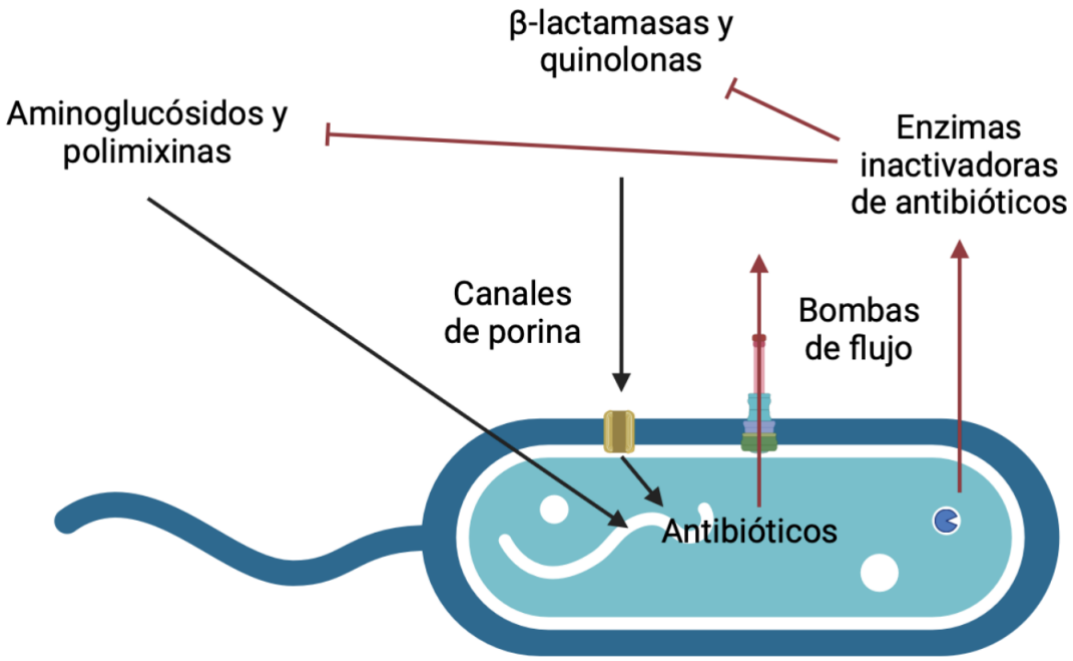


Figura 2. Mecanismos de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa.* Elaboración propia modificado de Pang et al., 2019. Elaborado en BioRender.com

Adquirida: resistencia que se logra mediante mutaciones o adquisición de genes por transferencia horizontal (12). En la Tabla 3 se muestran los principales mecanismos de adaptación adquirida.

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos adquirida.

Mecanismo	Descripción
Mutaciones	Cambios espontáneos dentro del material genético de las bacterias pueden provocar modificaciones en los blancos, disminución en la absorción, sobreexpresión de bombas de flujo y producción de enzimas que afectan la eficiencia de los antimicrobianos.
Genes de resistencia adquirida	La transformación, transducción y conjugación son los mecanismos de transferencia horizontal por los cuales se adquieren genes de resistencia a través de plásmidos, integrones, ADN libre o fagos.

Adaptado de Pang et al., 2019 (12).

Adaptativa: modificación de expresión genética por respuesta a estímulos ambientales que aumentan la capacidad de sobrevivir al medio (13). En *P. aeruginosa* está mejor representada por la formación de biopelículas y aparición de células persistentes (4). La Tabla 4 muestra los mecanismos de resistencia adaptativa.

Tabla 4. Mecanismos adaptativos de resistencia a antibióticos.

Mecanismo	Descripción
Biopelículas	Matriz extracelular de polisacáridos, proteínas, metabolitos y ADN que forman un agregado que protege las bacterias. Las biopelículas previenes la interacción entre antibióticos y bacterias, lo que dificulta el tratamiento de infecciones bacterianas. *P. aeruginosa* produce biopelículas en dos etapas: una etapa inicial donde las bacterias se agregan uniformemente y una etapa madura donde las composiciones bacterianas se separan por canales.
Células persistentes	Variantes de células que son resistentes a elevadas concentraciones de antibióticos. Las células persistentes de *P. aeruginosa* permanecen en un estado latente y son capaces de regenerar las biopelículas mientras que la mayoría de las células son eliminadas por los antibióticos.

Recopilado de Pang et al 2019, Bolivar-Vargas et al 2021, Zowalaty el al. 2015 (12,14,16).

La formación de biopelículas por *P. aeruginosa* está constituido por 6 etapas y estas se pueden observar en la figura 3.

Figura 3. Etapas en la formación de biopelículas. Adhesión: unión al tejido blanco, agregación: aumento de células bacterianas, maduración: formación de biopelícula por producción de polisacáridos, desprendimiento: liberación de un conglomerado de bacterias de la biopelícula, migración: movimiento de células en busca de otro tejido blanco, colonización, adhesión y crecimiento en tejido blanco. Elaboración propia modificado de Bolivar-Vargas *et al.,* 2019 (14). Elaborado en BioRender.com.

1.1.3 Diagnóstico.

Los métodos tradicionales para la identificación de *P. aeruginosa* en el laboratorio se basan en medios de cultivo observando el crecimiento y morfología, existen medios enriquecidos como el King A y King B que permiten visualizar pigmentos,-sin embargo, la detección por esta vía puede ser lenta por los periodos de incubación. El paso siguiente a la identificación del patógeno, es realizar antibiogramas para conocer la resistencia a antibióticos y aplicar un tratamiento adecuado (8).

En la actualidad, han aparecido nuevos métodos de detección para este microorganismo, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la espectrometría de masas. La PCR es empleada principalmente en casos clínicos, pero se necesita de equipos y protocolos específicos, así como personal capacitado. La espectrometría de masas requiere instrumentos altamente sofisticados(17).

1.2 Biosensores.

Los biosensores son dispositivos analíticos que incorporan un elemento de detección biológico que permiten obtener una señal cuantificable a través de la interacción entre el biorreceptor y el analito, por lo tanto, los elementos de biorreconocimiento tienen un papel fundamental (Tabla 5), la efectividad del biosensor depende de la técnica de inmovilización (18).

Tabla 5. Conceptos importantes de los biosensores.

Concepto	Definición
Exactitud	Valor próximo al real.
Especificidad	Selectivo con el analito objetivo.
Sensibilidad	Detectar niveles bajos de analito.
Tiempo de detección	Respuesta en tiempo real.
Resistencia	Soportar condiciones adversas en el entorno circundante.
Reproducible	Brindar resultados precisos en condiciones similares.

Tomada de Coulet 1991. (20)

El objetivo de un biosensor es brindar información rápida, precisa y confiable sobre el analito o microrganismo de interés (19). Un biosensor se constituye por 3 elementos, un biorreceptor, un transductor y un procesador de señal; el biorreceptor consiste en un componente de origen biológico inmovilizado que permite detectar el analito específico, principalmente está compuesto por anticuerpos, ADN, aptámeros, enzimas y células completas (20) (figura 4). La interacción entre el biorreceptor y el analito provoca cambios químicos, de calor, de pH, de flujo de electrones, entre otros, a lo que el transductor transforma la señal bioquímica en una eléctrica, que pasa al procesador de datos dónde se muestra la señal procesada (20,21).

La inmovilización adecuada del biorreceptor sobre el soporte es fundamental para la detección. La adsorción, el confinamiento, el atrapamiento, la unión covalente o el entrecruzamiento son estrategias físicas y/o químicas que permiten inmovilizar el biorreceptor sobre el soporte del biosensor (22). Una correcta inmovilización permite una cobertura eficiente del soporte, manteniendo las propiedades y proporcionando mayor estabilidad (21). La funcionalización de la superficie del soporte es necesaria para la inmovilización. El silicio, el nitruro de silicio y la sílice son materiales comúnmente utilizados, el silano es empleado comúnmente para funcionalizar los transductores ópticos. Existen organosilanos en diferentes estructuras, longitudes, funcionalidades y propiedades fisicoquímicas, predominando los alquil de cadena corta, con terminación amino, tiol, epoxi o carboxílicos (23,24).

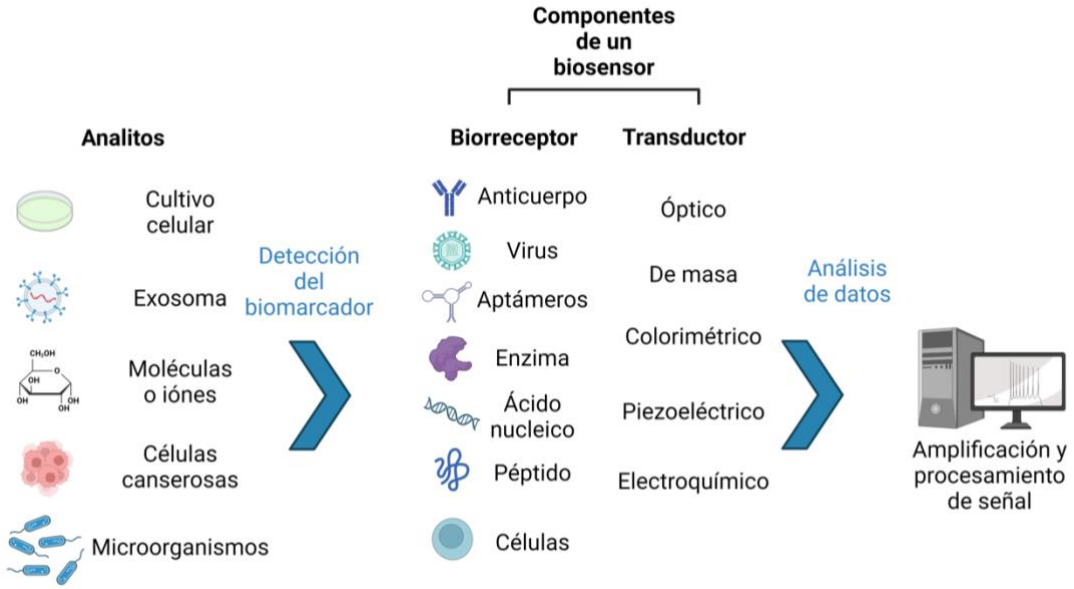


Figura 4. Componentes de un biosensor. Adaptado de Khatami et al., 2022 (20). Elaborado en BioRender.com

El área de aplicación de estos dispositivos se centra en el diagnóstico médico, la seguridad alimentaria y monitoreo ambiental (20).

1.2.1 Inmunosensores.

Los inmunnosensores se fundamentan por la transducción de señales obtenidas por la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno generando un

inmunocomplejo (25).

En los últimos años, esta técnica ha generado interés para herramienta en el diagnóstico clínico, control de alimentos, monitoreo industrial y análisis ambientales. Se han desarrollado una gran cantidad de estrategias para la elaboración de estos dispositivos que varían desde el soporte, tipos de inmunoglobulinas y el tipo de transductor. (26). El rendimiento de este tipo de biosensores depende de cómo se encuentren inmovilizados (27).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas altamente selectivas que solo se unen a sus objetivos mediante unión especifica que les permite distinguir inclusive en muestras complejas (28). Se producen como parte de la respuesta inmune al detectar agentes extraños. Presentan un alto peso molecular (aproximadamente 150 kDa) y son clasificadas en: IgM, IgG, IgE, IgA e IgD. La IgG es la más abundante en las especies y es utilizada comúnmente en los inmunosensores (28). Los anticuerpos están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas; 2 cadenas pesadas iguales que están unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par de cadenas ligeras no glicosiladas. Un puente disulfuro y más uniones que enlazan las cadenas pesadas con las ligeras. Los anticuerpos tienen la fracción de fragmento de unión al antígeno (Fab), que es la involucrada en el reconocimiento, y la fracción cristalizable (Fc) que interviene en las funciones efectoras (29). El esquema general de un anticuerpo se muestra en la figura 5.

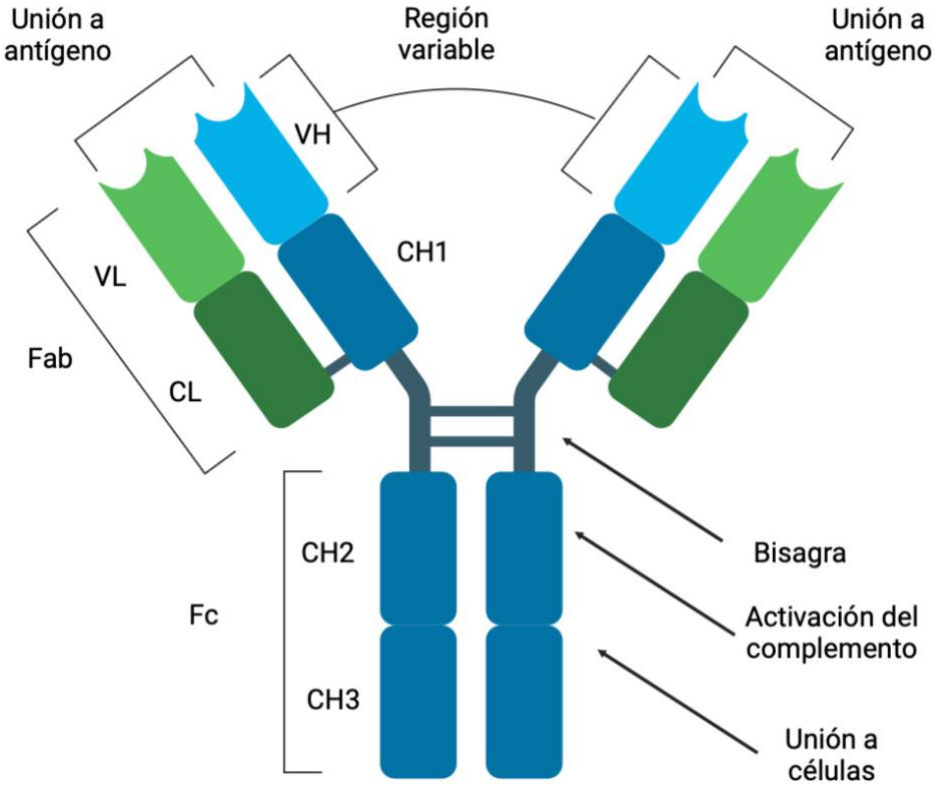


Figura 5. Estructura general de una inmunoglobulina. La cadena ligera se denota de color verde y la pesada de color azul. CH- dominios conservados de la cadena pesada; CL – dominio conservado de la cadena ligera; Fab – Fragmento de unión al antígeno; Fc – fragmento cristalizable; VH- dominio variable de la cadena pesada; VL- dominio variable de la cadena ligera. Elaboración propia modificado de García M. 2011 (29). Creado en BioRender.com

Se pueden emplear 2 tipos de anticuerpos para desarrollar inmunosensores; los anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales son un conjunto de distintas inmunoglobulinas que reconocen uno o varios antígenos, estos son sensibles, pero con menor especificidad ya que pueden reconocer diferentes epítopos (sitio pequeño que reconocen los anticuerpos) dentro de sus objetivos; los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas idénticas que reconocen un solo epítopo elevando su especificidad (28). La elaboración de estos anticuerpos se genera mediante la inyección de microorganismo, macromolécula o péptido purificado en un modelo animal, el sistema inmune genera inmunoglobulinas en contra del agente o péptido extraño, produciendo anticuerpos policlonales que pueden ser purificados mediante cromatografía de afinidad (27).

1.2.2 Métodos de detección.

Los biosensores pueden clasificarse según la manera que transducen la señal: electroquímicos, piezoeléctricos y ópticos. El biosensor electroquímico funciona mediante electrodos que cuantifican la señal eléctrica que resulta de la reacción catalítica o unión, se determina mediante lecturas de potenciometría, amperometría y conductometría, los biosensores piezoeléctricos, cuantifican el voltaje y/o vibración resultado de la interacción con el analito y finalmente los biosensores ópticos analizan mediante fotones, utilizando fibras ópticas empleando mecanismos como colorimetría, fluorescencia, absorbancia o transmitancia (21)

Los biosensores ópticos sirven para la identificación o monitoreo de interacciones de biomoléculas en tiempo real sin uso de etiquetas (enzimas o colorantes fluorescentes). La resonancia de plasmón de superficie (SPR), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y el índice de refracción son las técnicas que se emplean frecuentemente en los biosensores ópticos. Se han diseñado biosensores ópticos para la detección de microorganismos enteros o analitos característicos (30). La detección de microorganismos patógenos es fundamental para controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos, agua o vectores.

1.2.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).

La espectroscopía se ha posicionado como una herramienta para aplicaciones biomédicas y han logrado un progreso en el campo de la evaluación clínica. Las técnicas espectroscópicas son sencillas, reproducibles y solo necesitan una cantidad pequeñade muestra (microgramos a nanogramos), obteniendo información a nivel molecular de los grupos funcionales, tipos de enlaces y conformaciones moleculares (31). Cada banda del espectro representa una vibración que es características de cada moléculay proporcionan información directa sobre la composición bioquímica (32).

La FT-IR es una técnica analítica que permite el análisis rápido, preciso y sensible, dónde las muestras se colocan al infrarrojo (IR) para ser irradiadas e ir impactando sobre las moléculas, dando como resultado la transmisión o absorbancia de energía,

obteniendo bandas espectrales que permiten la determinación específica de la vibración molecular contenida en la muestra (31). El espectro IR está dividido en 3: IR lejana (<400 cm^{-1}), IR media (400-4000 cm^{-1}) e IR cercano (4000-13000 cm^{-1}) dónde IR media es el rango comúnmente empleado para en análisis (33).

Los espectros por FT-IR proporcionan patrones complejos y reproducibles. La frecuencia exacta de cada vibración depende de la fuerza en los enlaces involucrados, la masa de los átomos y el entorno químico de los grupos moleculares (33).

FT-IR es un método no destructivo, rápido, fácil de usar y altamente sensible para el análisis microbiológico (34,35). Para muestras microbianas, los espectros son resultado de la presencia de ADN/ARN, componentes de membrana, pared celular, lípidos y proteínas(36).

Se han reportado ciertas regiones espectrales asociadas a distintos componentes. La región entre 3000 y 2800 cm^{-1} está ligada a la presencia de ácidos grasos; la región entre 1700 y 1500 cm^{-1} está asociada con el residuo carbonilo de las proteínas, específicamente los grupos Amida I y II; información sobre proteínas, ácidos grasos y compuestos portadores de fosfatos se encuentran entre 1500 a 1200 cm^{-1}; los aminoácidos libres y los polisacáridos se pueden encontrar en la región entre 1450 y 1400 cm^{-1}; la región de 1250 a 900 corresponden a carbohidratos de la pared celular, ARN/ADN y fosfolípidos (34,37,38). La región de la huella dactilar se presenta debajo de 900 cm^{-1}, dónde se muestran patrones específicos no asignados (38).

La FI-TR se ha empleado para la identificación de bacterias, levaduras y hongos en muestras de agua o alimentos. La figura 6 se presenta un espectro representativo de las principales bandas de bacterias.

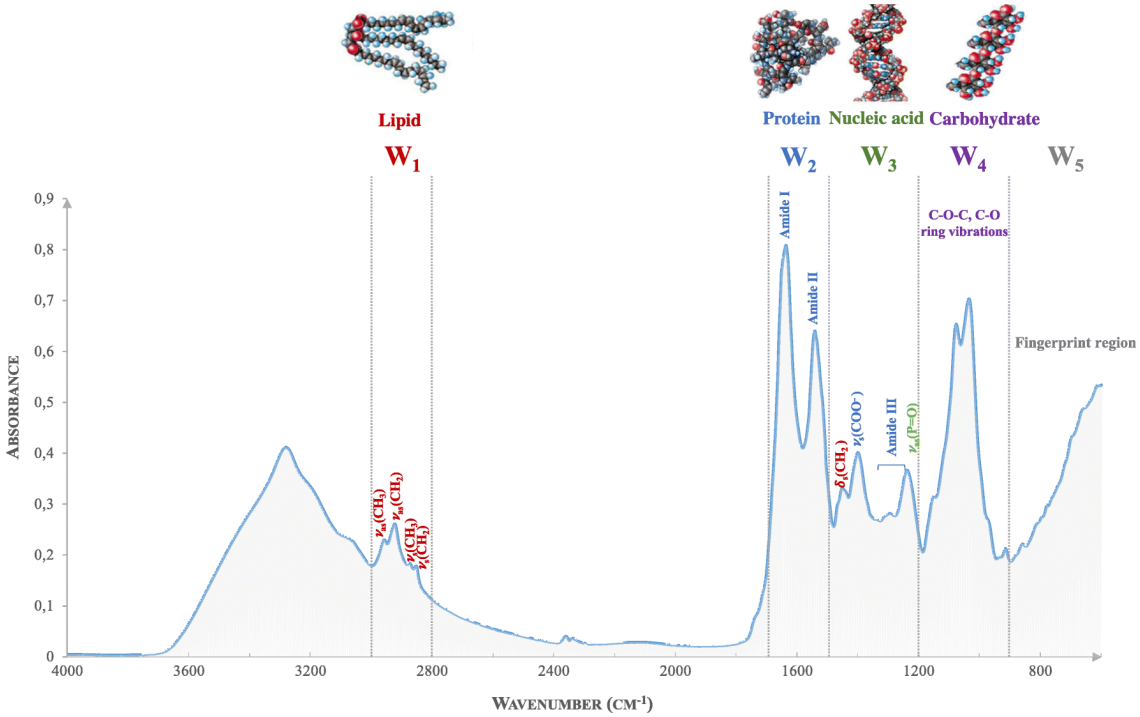


Figura 6. Espectro FT-IR bacteriano típico que muestra las ventanas espectrales y las asignaciones de bandas principales. ν, vibraciones de estiramiento; δ, vibraciones de flexión; as, vibraciones asimétricas y s, vibraciones simétricas. Tomada de Novais et al., 2018 (38).

Antecedentes

2

2.1 Funcionalización del silicio.

Los materiales de silicio se oxidan espontáneamente y forman una capa de óxido de silicio amorfa cuando son expuestos al aire, lo que permite la funcionalización de la superficie (39). Existen diversas estrategias para la modificación de la superficie del silicio, dónde el método de unión covalente es la que tiene mejor potencial; este método consiste en emplear capas ensambladas de organosilanos formando una red en la superficie del silano, con ventajas en la adsorción física y la inmovilización por bioafinidad. Hay diferentes metodologías para la silanización del silicio: a) sumergiendo las muestras en soluciones de silano, b) colocando la solución de silano en las muestras, c) vaporizando la solución de silano en las muestras al vacío o calentamiento, y d) recubriendo por centrifugación la solución de silano en las muestras (40). El proceso de silanización produce capas de silano gruesas y no uniformes, que afecta directamente a la sensibilidad del biosensor, no obstante, (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) se emplean ampliamente para la inmovilización de biomoléculas; sin embargo los etoxisilanos son casi inactivos frente a los grupos –OH del sustrato, por lo tanto, requieren de una hidrólisis previa para poder reaccionar, caso contrario con los metoxisilanos que son más reactivos, reaccionando incluso a un ritmo lento a temperatura ambiente(23).

Dixit et al., 2011 optimizaron el desarrollo de un inmunoensayo ligado a enzimas de alta sensibilidad mediante la inmovilización covalente de los anticuerpos en la superficie polimérica modificada por APTES (41).

Wang y Jin 2004 demostraron que la superficie modificada con APTES y glutaraldehído tiene una mayor capacidad de unión de anticuerpos en comparación con el dicloro dimetilsilano (DDS) (42).

Udomsom et al., 2021 desarrollaron biosensores en silicio dónde combinaron la

silanización APTES con un enlace cruzado EDC/NHS, exhibiendo una densa inmovilización de anticuerpos orientados mejorando la sensibilidad del dispositivo (43).

Ognjanović et al., 2020 elaboraron un nanosensor amperimétrico de dióxido de titanio silanizado con APTES, inmovilizando enzimas en la superficie para evaluar el nivel de glucosa en una gota de muestra (44).

Palimi et al., 2014 recubrieron la superficie de nanopartículas de Cr_2O_3 con APTMS para evaluar los efectos de la modificación de la superficie sobre el comportamiento de fractura y las propiedades mecánicas del recubrimiento de poliuretano. Las propiedades mecánicas del poliuretano mejoraron significativamente mediante el uso de nanopartículas (45).

Zhou et al., 2014 desarrollaron una plataforma de biodetección colorimétrica que utiliza APTMS reticulado como sonda. Este sensor en papel es capaz de detectar una variedad de objetivos, incluidos biomarcadores de H_2O_2, glucosa y proteínas. Los resultados del estudio han demostrado que este sensor puede detectar diferentes analitos con un amplio rango lineal. Debido a su bajo costo y simplicidad, este sensor es muy adecuado para análisis en el punto de atención y puede usarse en diversos campos (46).

Lee et al., 2018 proponen un posible mecanismo para la eliminación de Cr (VI) a través de sílice mesoporosa funcionalizada con APTMS. Consiguieron resultados prometedores para eliminar el Cr (VI) de una solución acuosa. La eliminación de Cr (VI) se debió principalmente a la actividad de los grupos funcionales presentes en la sílice (47).

Zhao et al., 2022 propusieron un nuevo método para detectar la α-glucosidasa (α-glu) y sus inhibidores. Este método se basa en el control de la fluorescencia de nanopartículas que contienen silicio (Si CNPs) en soluto acuoso. Las nanopartículas se producen mezclando APTMS y ascorbato de sodio (AS). Luego, el AS se reemplaza por ácido L-ascórbico-2-O-α-D-glucopiranosilo (AA2G), que puede hidrolizarse mediante α-glu. Esto crea un biosensor de "activación" para la actividad de α-glu y permite la detección de sus inhibidores (48).

Bilgic et al., 2022 desarrollaron un gel de sílice modificado, llamado Si-APTMS-pillar[5]arene, como un absorbente nuevo y eficaz para eliminar iones Cu(II) de soluciones acuosas. Es altamente selectivo para los iones Cu(II) y ha demostrado una

excelente reutilización, manteniendo su alta eficiencia incluso después de 3 a 5 ciclos de regeneración. Este adsorbente es una técnica prometedora, rentable y no tóxica para tratar eficazmente aguas residuales y agua contaminadas con cobre (49).

2.2 Biosensores contra patógenos.

Los análisis clínicos tradicionales basados en ensayos bioquímicos son confiables, pero generalmente requieren de mucho tiempo para obtener los resultados. Hay una necesidad de nuevas herramientas para el diagnóstico microbiológico que puedan proporcionar resultados e información de manera rápida, sencilla y de acceso económico que permitan tomar la mejor decisión para el tratamiento o manejo del problema (15).

En los humanos, las infecciones por bacterias Gram negativas son un desafío particular para la salud en todo el mundo, se han desarrollado diferentes biosensores para obtener una detección temprana de estas bacterias (21).

Starodub et al., 2013 diseñaron biosensores de alta especificación basados en SPR y TIRE (elipsometría de reflexión interna total) fundamentado en reacciones antígeno-anticuerpo para la detección de *Salmonella spp*. En estos dispositivos se emplearon reacciones Ag-Ab junto con una capa de unión superficial como componente reactivo. El biosensor SPR exhibió una sensibilidad de 10^{-1} a 10^{-6} UCF/mL, mientras que el TIRE demostró una mayor sensibilidad, detectando células en 10 mL (50).

Xiao et al., 2014 inmovilizaron covalentemente una sonda de ADN en biosensores de fibra óptica capaces de hibridar con un ADN complementario marcado fluorescentemente para detectar *Shigella spp.* El biosensor de fibra óptica podría detectar 10^2 UFC/mL de *Shigella spp* (51).

Suaifan et al., 2017 desarrollaron un biosensor capaz de detectar *S. aureus,* basado en la actividad proteolítica de las proteasas patógenas en un sustrato específico, lo que brinda resultados en pocos minutos. Los resultados experimentales indicaron límites de detección de 7, 40 y 100 UFC/mL para *S. aureus* en cultivos de caldo, productos alimenticios y muestras ambientales, respectivamente (52).

Narmani et al., 2018 desarrollaron un biosensor de ADN de fluorescencia ultrasensible y selectivo basado en nanopartículas de oro (AuNP) y nanopartículas (NP) magnéticas para la determinación de *Vibrio cholera.* El límite de detección fue de 2,34 ng mL^{-1}(53).

Elahi et al., 2019 descubrió un método de detección temprana de *Shigella spp.* usando sondas de ADN de AuNP. El trabajo presento un límite de detección de 90 $CFUmL^{-1}$. Se confirmó la especificidad del nanobiosensor en presencia de otras bacterias (54).

Para *P. aeruginosa* se han desarrollado en los últimos años biosensores con receptores basados en aptámeros, con enfoques ópticos, electroquímicos y detección de señales (55).

Yue et al., 2017 desarrollaron un biosensor utilizando el fago PaP1 como agente de reconocimiento altamente específico. Construyeron un biosensor electroquimioluminiscente que puede identificar células enteras de *P. aeruginosa*; se basa en la unión de la pared celular de la bacteria a la placa mediante el atrapamiento de fagos. El biosensor demostró un límite de detección de 56 UFC/mL y el proceso dura alrededor de 30 minutos (56).

Wen et al., 2017, utilizaron biología sintética para desarrollar un biosensor codificado por ADN. El biosensor se basa en la expresión de proteínas libres para la detección de moléculas involucradas en el mecanismo de *quorum sensing* empleando como biomarcador 3-oxo-C_{12}-HSL en muestras de esputo de pulmones con fibrosis quística. Este biosensor permite la cuantificación a nivel nanomolar (57).

Cernat et al., 2018, desarrollaron un sensor electroquímico utilizando una plataforma de nanomateriales híbridos que permitió la detección de pioverdina con el fin de identificar *P. aeruginosa*. El dispositivo demostró un límite de detección de 0.33 µM y una alta selectividad en muestras de suero, saliva y agua del grifo humanos (58).

Hu et al., 2018 desarrollaron una plataforma de detección basada en resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) para detectar la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* utilizando un aptámero confinado en la superficie como reactivo de afinidad. Esta plataforma de detección LSPR tarda 3 horas, es muy sensible, ya que puede detectar incluso una sola célula bacteriana, y selectiva para la detección de la cepa PAO1

sobre otras cepas (59).

Sarabaegia et al., 2019, desarrollaron un aptasensor electroquímico que emplea nanopartículas de quitosano para la detección ultrasensible de *P. aeruginosa*. Los aptámeros están unidos covalentemente a la superficie de electrodos de carbón vítreo modificados con partículas de quitosano. La detección en esta plataforma se mide mediante espectroscopia de impedancia electroquímica y métodos de voltamperometría cíclica. El límite de detección fue de 3 UFC/mL (60).

Das et al., 2019, diseñaron un aptasensor electroquímico altamente sensible basado en NanoZyme para la detección rápida de *P. aeruginosa* en agua. En esta plataforma de nanosensores se implementó la característica NanoZyme similar a la peroxidasa de las nanopartículas de oro y se integró con aptámeros específicos contra *P. aeruginosa*. Se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono para la detección electroquímica. El sensor tiene un límite de detección de aproximadamente 60 UFC/mL (61).

Alhogail et al., 2019, diseñaron un biosensor colorimétrico utilizando partículas magnéticas que pueden detectar la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* mediante el uso de un sustrato de proteasa específico. In vitro, el biosensor pudo detectar específica y cuantitativamente la presencia de *P. aeruginosa* con un límite de detección de 10^2 UFC/mL en menos de un minuto (62).

Zhang et al., 2019 desarrollaron un biosensor electroquímico libre de enzimas para la detección de *P. aeruginosa*. El biosensor utiliza amplificación de señal en la actividad catalítica de Cu-ZrMOF y la conductividad de super P y AuNP. El equipo logró un límite de detección de 2 UFC/mL en 120 minutos; sin embargo, las limitaciones del trabajo son portabilidad y estabilidad de almacenamiento del biosensor (63).

Visaggio et al., 2021 mediante ingeniería genética construyeron un biosensor bioluminiscente en células completas que permite la detección de pioquelina. El biosensor se implementó como herramienta de detección para identificar cepas de *P. aeruginosa* por producción de pioquelina en medios sólidos; presentaron un límite de detección de aproximadamente 1.64 nM de pioquelina, además de ser altamente selectivos (64).

Xie Y. et al., 2022, construyeron un biosensor de fluorescencia basado en la reacción

en cadena de hibridación (HCR) inducida por la migración de la rama de ADN de doble cadena y un circuito de retroalimentación de DNAzyme para la identificación de *P. aeruginosa*. El biosensor presentó un límite de detección de 37 UFC/mL (17).

El FT-IR se ha empleado para la detección e identificación de distintos microrganismos, Martak D., et al., 2019 demostraron que la espectroscopía FT-IR permitía la identificación y agrupación de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (65) Maity J, et al., 2013 lograron identificar y diferenciar organismos entre *Bacillus flexus y Stenotrophomonas maltophilia* a partir de sus huellas específicas (66). El grupo de Bagcioglu M, et al., 2019 mediante FT-IR asistido por *machine learning* lograron la identificación de *Bacillus cereus* con la diferenciación de otras especies de *Bacillus* (67).

Los diferentes enfoques para la detección de biosensores de bacterias patógenas han tenido éxito y actualmente están siendo considerados por muchos gobiernos de salud e instituciones de investigación, principalmente debido a su rápida respuesta, rendimiento de alta calidad y resultados confiables (68).

Justificación

3

3.1 Motivación y declaración de problemas.

Las enfermedades causadas por bacterias son una preocupación actual, las bacterias han evolucionado durante las últimas décadas adquiriendo multirresistencia, lo que resulta preocupante ya que los tratamientos tradicionales ya no son efectivos. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que afecta principalmente a personas con un sistema inmunodeficiente. Las infecciones pueden volverse crónicas y/o agudas, casos graves, pueden provocar la muerte. En 2017, la Organización Mundial de la Salud declaró a *P. aeruginosa* como organismo prioritario para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.

Actualmente, el método más común para detectar *P. aeruginosa* es mediante medios de cultivo y técnicas moleculares, sin embargo, algunos métodos tardan varios días y otros presentan costos elevados. La detección de *P. aeruginosa* en cuerpos de agua puede alertar a las comunidades cercanas sobre posibles brotes de infección. La detección temprana de este patógeno en infecciones permite intervenir y proporcionar un tratamiento antes de la formación de biopelículas, por lo que es importante el desarrollo de biosensores específicos y sensibles para este microorganismo.

Los biosensores se consideran la próxima generación de dispositivos de detección.

Objetivos

4

4.1 Objetivo general

Desarrollar un inmunosensor basado en la inmovilización de anticuerpos a través del mecanismo estreptavidina-biotina sobre soportes de SiO_2 funcionalizados con 3-APTMS, para la detección de *Pseudomonas aeruginosa.*

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar cepas de la bacteria *P. aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas, moleculares y espectroscópicas (FT-IR).

2. Estandarizar y optimizar las condiciones del ensamblado del inmunosensor: funcionalización, reticulación, unión covalente de la estreptavidina, e inmovilización del anticuerpo biotinilado.

3. Analizar la respuesta del inmunosensor a distintas $UFC \cdot mL^{-1}$ de *P. aeruginosa* y posible reconocimiento inespecífico con otras bacterias Gram negativas y positivas, empleando FT-IR y distintos algoritmos de clasificación.

Desarrollo de la metodología

5

5.1 Materiales y reactivos.

Reactivos.

Sigma-Aldrich
(3-Aminopropil)trimetoxisilano >98%
Tolueno anhidro 99.8%
Sulfato de magnesio
Maltosa
Glutaraldehído (25%)
Sarcosil

Termo Fisher Scientific
Agua libre de nucleasas
Dream Taq Green supermix
Bacto agar

Meyer
Ácido sulfúrico
Glicerol

J. T. BAKER
Alcohol etílico absoluto
Cloruro de sodio, cristal
Fosfato de potasio dibásico
Sulfato de potasio
Citrato de sodio
Cloruro de potasio

Karal
Fenol
Cloroformo
Alcohol isoamílico

Química mercurio
Peróxido de hidrógeno 30%
Alanina - DL

Lizosima (NORGEN)
(MEYER)
Extracto de levadura (MCD LAB)
Peptona de carne (BD Bioxin)
Acetona (GOLDEN BELL)
Estreptavidina conjugada con tetrametilrodamina (TRITC) 1 mg/mL (ab136223) Abcam
Agua tridestilada (HERCOTEC)
Antibiograma *MULTIBAC GRAM NEGATIVO, serie 2, MARCA ID*
Kit de purificación

Materiales y equipos.

Obleas de silicio dopado con boro de 100 mm de diámetro, tipo P, de 355-395 µm de grosor a Pure wafer (California, EE. UU.)

EQUIPO BIO RAD
Termociclador T100
Generador PowerPac basic
Cámara de electroforesis de ADN

Witeg
Incubador
Minicentrifuga CF-10

Autoclave AV28L (LORMA)

Horno (LUZEREN)
Espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 (Ettlingen, Alemania)
Limpiador ultrasónico SB-5200DT (SCIENTZ)
Depositor de película delgada Denton Desk V
Microscopio de barrido JEOL , modelo JSM-6610 LV

Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas de trabajo se emplearon medios de cultivo, los cuales se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Medios de cultivos empleados.

Medio	Función	Componentes por 1 L
Caldo Luria – Bertani (LB)	Crecimiento y mantenimiento de cepas	5 g extracto de levadura 10 g NaCl 10 g peptona
Agar Luria-Bertani (LB)	Crecimiento y mantenimiento de cepas	5 g extracto de levadura 10 g NaCl 10 g peptona 15 g agar
King A (agar P)	Detección y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* en base a la producción de piocianina.	20 g peptona 2 g Alanina DL 10 g citrato de sodio 8.6 g sulfato de potasio 1.4 g KCl 1.4 g $MgSO_4$ 10 mL glicerol 15 g agar
King B (agar F)	Detección y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* (de entre otras *Pseudomonas*) en base a la producción de pioverina.	20 g peptona 10 g maltosa 1.5 g K_2HPO 0.73 g $MgSO_4$ 10 mL glicerol 15 g agua

Cepas utilizadas.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se aislaron previamente en la tesis de Ríos Vázquez, 2019 (69) y pertenecen a la colección del Laboratorio de microbiología 402-EMA 6, a cargo de la Dra. Norma Elena Rojas Ruíz (Tabla 7).

Tabla 7. Información de las bacterias empleadas para este trabajo.

Cepa	Género	Origen
2	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
3	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
5	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
6	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
9	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
10	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
11	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
12	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
14	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
16	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
18	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
21	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
22	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
24	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
25	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
27	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
28	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
29	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
30	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
31	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.

32	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
34	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
36	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
37	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
38	*Pseudomonas spp.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.
39	*Pseudomonas aeruginosa.*	Aguas termales, Chignahuapan, Puebla, México, 2019.

5.2 Cultivo, selección e identificación de *Pseudomonas spp.*

5.2.1 Selección de las cepas de *Pseudomonas spp.*

Se emplearon cepas de la colección de microorganismos aislados de agua de origen termal del trabajo de Tesis de Ríos-Vázquez en 2019, algunos de ellos se identificaron presuntivamente como pertenecientes al género Pseudomonas. La colección de microorganismos está conformada por diversas especies incluyendo *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. Previamente el genoma de la cepa 39 fue secuenciado y se corroboró que pertenecía a la especie *P. aeruginosa*. Para el cultivo de los microorganismos se prepararon los medios de cultivo King A (Agar P)(70) y King B (Agar F)(71) siguiendo las indicaciones de del fabricante. Las bacterias fueron sembradas por estría cruzada y se dejaron en incubación a 28°C por 24 horas. Las bacterias fueron resembradas cada 8-10 días en agar LB para mantenerlas viables durante toda la etapa experimental del proyecto.

5.2.2 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN genómico de las cepas empleadas se realizó el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se colocaron 1.5 mL del cultivo líquido de aproximadamente 12 horas en tubos de microcentrífuga. Se centrifugaron

a 11,000 rpm, el precipitado se resuspendió con 150 µL de buffer de lisis, 30 µL de lisozima y se incubaron por 10 minutos a 37°C. Para completar la lisis se adicionaron 22 µL de sarcosil al 20%. Después, se añadieron 175 µL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1 v/v), se mezcló por inversión suave por 5 minutos. La emulsión se centrifugó por 5 minutos a 11,000 rpm y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. Se adicionaron nuevamente 175 µL del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1 v/v) mezclando por inversión suave por 5 minutos; los tubos fueron centrifugados a 11,000 rpm y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. Se adicionó un volumen de cloroformo y nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 11,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se agregó un volumen de cloroformo repitiéndose el proceso de agitación y centrifugación. La fase acuosa que contiene el ADN se colocó en hielo. Se adicionó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 7 y 1 volumen de etanol absoluto frío, se incubaron a -20°C por 10 minutos, finalmente, la mezcla se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 min.

La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas. Las muestras fueron almacenadas a - 20°C.

Se realizó la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa 1% y visualizado en transiluminador para confirmar la presencia de ADN. La banda de ADN genómico extraído mostró alta concentración por lo que se realizó una dilución 1:5.

5.2.3 Amplificación ARNr 16S por PCR punto final.

Para la a amplificación del gen ARNr 16S se utilizó un termociclador, Dream Taq Green supermix y oligonucleótidos tipo universal para el gen ARNr 16S, TXBA1: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCA3' Y TXBA 101: 5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3' utilizados previamente por Ríos 2019 (69).

Para la PCR cada tubo contenía 12.5 µL de Dream Taq Green supermix, 0.5 µM del primer TxBA 1, 0.5 µM del primer de TxBA 101, 0.5-1 µg de ADN y agua libre de nucleasas para 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 1:30 minutos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 2 minutos; con un total de 30 ciclos.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%, los productos de amplificación fueron visualizados con luz ultravioleta en transiluminador.

5.2.4 Purificación por columna de los productos de amplificación.

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la purificación del ADN, 3 µL de la muestra purificada fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y visualizados en transiluminador.

5.1.1 Análisis *in silico* de la secuencia de ADN.

El fragmento amplificado del gen ARNr 16 S fue secuenciado y se analizó utilizando el software MegaX versión 10.2.6 (72) (https://www.megasoftware.net). Para ello se realizó la búsqueda de distintas secuencias del fragmento parcial del ARNr 16S de distintas cepas de *P. aeruginosa*, otras especies de *Pseudomonas* y bacterias alejada filogenéticamente como *Escherichia coli.* Las secuencias se alinearon utilizando el algoritmo de ClustalW (73), posteriormente se creó un árbol filogenético por máxima verosimilitud (*maximum likelihood*). La consistencia de la posición de las ramas fue evaluada con 100 repeticiones de *bootstrapping*.

5.1.2 Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo LB.

Se preparó caldo LB (3 mL) en tubos Falcon. En campana de flujo laminar se inocularon los tubos conteniendo el medio LB con una asada de cultivo fresco en caja Petri de *P. aeruginosa* y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas.

5.1.3 Diluciones y conteo de *P. aeruginosa*.

Para realizar el conteo de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en cultivo en medio líquido de la bacteria, se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-7} bajo condiciones de esterilidad. Se sembraron 20 µL de las diluciones 10^{-5} a 10^{-7} en placas

de agar LB, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 horas.

5.1.4 Determinación de la resistencia o sensibilidad a antibióticos.

Se determinó la resistencia o sensibilidad a 12 antibióticos comerciales empleando P-35 Multibac I.D de la serie 2 para Gram Negativos en cepas de P. aeruginosa. La bacteria se incubó en caldo LB durante toda la noche, posteriormente se realizaron factores de dilución seriados y se empleó la dilución que fuera similar al tubo 0.5 de la escala McFarland, se tomaron 100 µL de la dilución y se realizó la siembra por extensión en placa en agar LB, se incubó durante 30 minutos a 28°C y posteriormente se colocó el disco con antibióticos sobre la placa asegurando que todos los antibióticos estuvieran en contacto con el medio. Las placas con los sensidiscos se incubaron a 28°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición. Los halos se compararon con tablas estandarizadas por la NCCLS (74).

5.2 Inmunosensor

5.2.1 Limpieza de los soportes de SiO_2.

La limpieza, hidroxilación, funcionalización con 3-APTMS y unión del agente reticulante se realizó siguiendo la metodología mencionada por *Caso Vargas (2016.)* (75). En todos los casos se utilizó agua desionizada.

Los soportes de SiO_2 de 0.8 cm^2 se enjuagaron tres veces con agua. Posteriormente, fueron sonicados durante 5 minutos en agua, al finalizar, esta fue desechada y los soportes fueron enjuagados nuevamente con agua tres veces más. Después de eso, se reemplazó el agua con acetona y los soportes fueron sonicados durante 20 minutos. Finalmente, los soportes se enjuagaron tres veces con agua y fueron secados en horno a 100°C por 10 min.

5.2.2 Hidroxilación de soportes.

Los soportes fueron hidroxilados por 30 minutos utilizando solución piraña (H_2SO_4 y H_2O_2 3:1 v/v) dentro de un vaso de precipitado. Se colocaron de modo tal que el lado pulido fuera el expuesto al agente oxidante. Transcurrido el tiempo, los soportes se lavaron 5 veces con agua. A partir de esta etapa los soportes se

manipulaban con el lado hidroxilado hacia arriba.

5.2.3 Funcionalización de los soportes hidroxilados con 3-APTMS.

La silanización por deposición en fase gaseosa se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Caso Vargas, et al., 2023 (76). En un frasco de vidrio de boca ancha de 250 mL se introdujeron lo soportes con el lado hidroxilado hacia arriba. Se colocaron 50 µL de 3-APTMS junto con los soportes, el frasco se cerró e incubó en horno a 140°C por 20 horas. Al finalizar la incubación, los soportes se sonicaron con tolueno anhidro durante 5 minutos para eliminar el agente silanizante no unido covalentemente a los soportes. Finalmente, los soportes se secaron en horno a 50°C.

5.2.4 Unión covalente del agente reticulante (*crosslinker*).

Se preparó una solución de glutaraldehído (GA) al 10% disuelto en alcohol absoluto en donde los soportes hidroxilados fueron sumergidos y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente en campana de extracción de gases. Al finalizar, la solución fue desechada; los soportes fueron enjuagados 3 veces con alcohol absoluto y secados en horno a 50°C.

5.2.5 Unión covalente de la estreptavidina sobre los soportes reticulados.

GA reacciona con las aminas expuestas de las proteínas formando enlaces iminas para su inmovilización. La unión GA - estreptavidina se basó en la metodología de Corregidor D., et al., (2022) (77) modificando ciertos parámetros. Para ello, emplearon dos concentraciones de estreptavidina conjugada con TRITC (STV) en buffer de monofosfato sódico (PBS) 100 mM pH 7.2: 0.01 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ y 0.001 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$. Sobre cada soporte se colocaron 20 µL de la disolución de proteína, teniendo cuidado que toda la superficie quedara cubierta; los soportes fueron incubados durante 24 horas a 4°C. La aplicación de estreptavidina se realizó en campana de flujo laminar para evitar la contaminación de la proteína. La estreptavidina estaba conjugada con TRICT (tetrametilrodamina), por lo consiguiente se analizaron en microscopía de fluorescencia para detectar la concentración adecuada.

5.2.6 Fijación del anticuerpo biotinilado.

Se diluyó el anticuerpo policlonal en PBS quedando a una concentración de 0.04 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$. Dentro de campana de flujo los soportes fueron lavados dos veces con solución PBS para remover el excedente de STV. Se les colocó 20 µL de la dilución de anticuerpo. La gota de la dilución del anticuerpo era esparcida por todo el soporte cuidadosamente. Los inmunosensores se colocaron dentro del horno por 1 hora a 37°C como lo menciona Arcila L., et al., (2016)(78). Finalmente, se almacenaron a 4°C hasta su uso.

El esquema general del ensamble del inmunosensor se presenta en la figura 7.

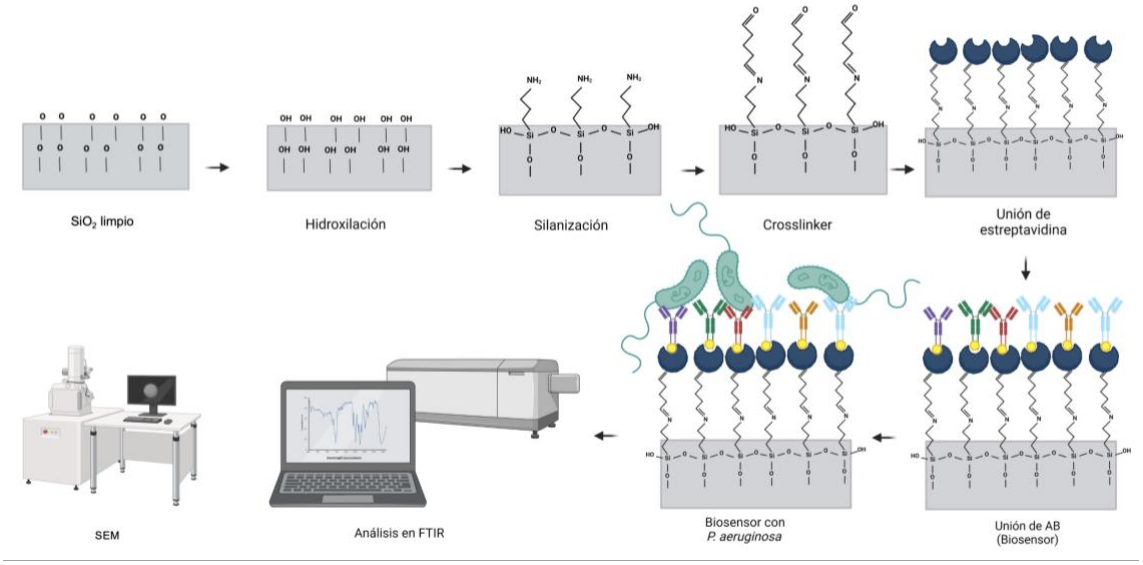


Figura 7. Esquema de la metodología para el desarrollo del inmunosensor y su análisis. Elaboración propia. Elaborado en Biorrender.com

5.3 Evaluación de inmunosensores

5.3.1 Unión bacteria-inmunosensor.

Las condiciones de tiempo y temperatura se basaron en lo reportado por Arcila L., et al., (2016)(78). Se adicionaron 20 µL de las bacterias a diferentes diluciones, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se enjuagaron tres veces para remover las bacterias que no se adhirieron al inmunosensor. Se dejaron en campana de flujo laminar hasta el secado.

5.3.2 Evaluación en FT-IR.

Los soportes se caracterizaron en el espectrómetro FT-IR, Bruker Tensor 27. La absorbancia de los inmunosensores se registró en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} efectuando 60 barridos. Para restar los picos no deseados se realizaron 20 barridos del *background* (silicio seco limpio) antes de medir cada muestra.

5.3.3 Visualización en microscopio electrónico de barrido (SEM).

A los inmunosensores con bacteria se les recubrió con una capa fina de oro en el Denton Desk V, preparadas las muestras, se observaron bajo el microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol, modelo JSM-6610 LV.

5.3.4 Evaluación de la capacidad selectiva de los inmunosensores.

Con el fin de evaluar la capacidad selectiva del inmunosensor se emplearon 3 cepas de bacterias Gram negativas y Gram positivas como controles falsos negativos: *E. coli, S. aureus y B. subtilis.* Las bacterias se crecieron por 24 horas a temperatura ambiente en 3mL de caldo LB por 24 horas. Transcurrido el tiempo se realizó una dilución 10^{-1} para cada bacteria y se realizó la misma metodología de los punto 5.3.1 y 5.3.2 de esta sección.

5.3.5 Manejo de datos mediante softwares de análisis.

Los espectros obtenidos se analizaron mediante OriginPro (Version 2021, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) y a través de Qasar versión 1.9.1 (79). Se empleo el programa de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ2) versión 2.13.0/1.54f (80,81), dónde se ajustó el brillo/contraste a 150-255 de las micrografías de fluorescencia y se graficó en escala de grises la región delimitada del recuadro amarillo, siguiendo las mismas condiciones para todas las imágenes. En OriginPro se normalizaron los ejes Y en conjunto y se graficaron.

Resultados y discusión.

6

6.1 Cultivo, selección e identificación de *Pseudomonas*.

Los medios de cultivo contienen los elementos químicos que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos y permiten observar la morfología de las colonias. Existen medios que por su composición favorecen la síntesis de compuestos que ayudan a la identificación de una especie en particular. El agar F permite detectar la producción de pioverdina, un pigmento característico de ciertas *Pseudomonas*; este compuesto emite fluorescencia cuando se observa bajo luz UV. Aunque *P. aeruginosa* sintetiza este compuesto, *P. fluorescens* produce una mayor cantidad, por lo tanto, cuando se observan bajo luz UV, se observa una mayor intensidad en *P. fluorescens* (como se muestra en la Fig. 8A). En agar F, la bacteria *P. aeruginosa* tiene una coloración amarillo-verdosa más intensa que *P. fluorescens* al observarlas en fondo negro, como se puede observar en la figura 8B.

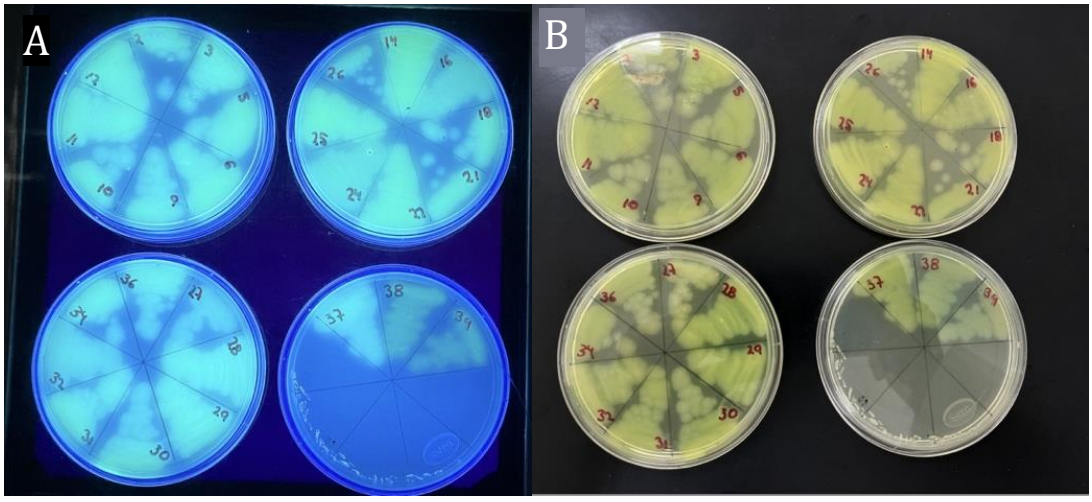


Figura 8. Crecimiento de las cepas del género *Pseudomonas* recolectadas en el laboratorio en agar F. A) Cepas del género *Pseudomonas* en agar F bajo luz UV. B) Cepas del género *Pseudomonas* en medio agar F en fondo negro.

En el agar F, la presencia de sulfato de magnesio proporciona los cationes para incrementar la producción de pioverdina, proporcionando un color amarillo verdoso al medio (71), en este medio *P. aeruginosa* presenta un color amarillo

verdoso, mientras que *P. fluorescens* presentará la misma coloración, pero con una tonalidad débil.

En el agar P se favorece la producción de piocianina y piorrubina y se inhibe la síntesis de fluoresceína(82). *P. aeruginosa* en agar P realiza la síntesis de la piocianina, pigmento de color azul verdoso característico de este microorganismo. Este fenómeno se logra observar en la figura 9, donde las cepas 38 y 39 presentan la síntesis de este pigmento en comparación con las otras cepas, por lo que se identifica que estas cepas corresponden a la especie *P. aeruginosa.*

Figura 9. Cepas 16, 24, 27 32, 38 y 39 de *Pseudomonas* pertenecientes a la colección del laboratorio cultivadas en agar P.

En agar P, la piocianina torna al agar de color azul-verdoso, en este medio de cultivo, *P. aeruginosa* presentó una coloración verde, mientras que las cepas de *P. fluorescens* fueron incoloras (70). La coloración azul-verdosa por la producción de la piocianina comienza después de las 10 horas de incubación, la síntesis de este compuesto está favorecida por temperaturas de incubación de 37°C (82,83).

La figura 10 muestra la fluorescencia en luz ultravioleta de las cepas de *P. aeruginosa* empleadas en este trabajo.

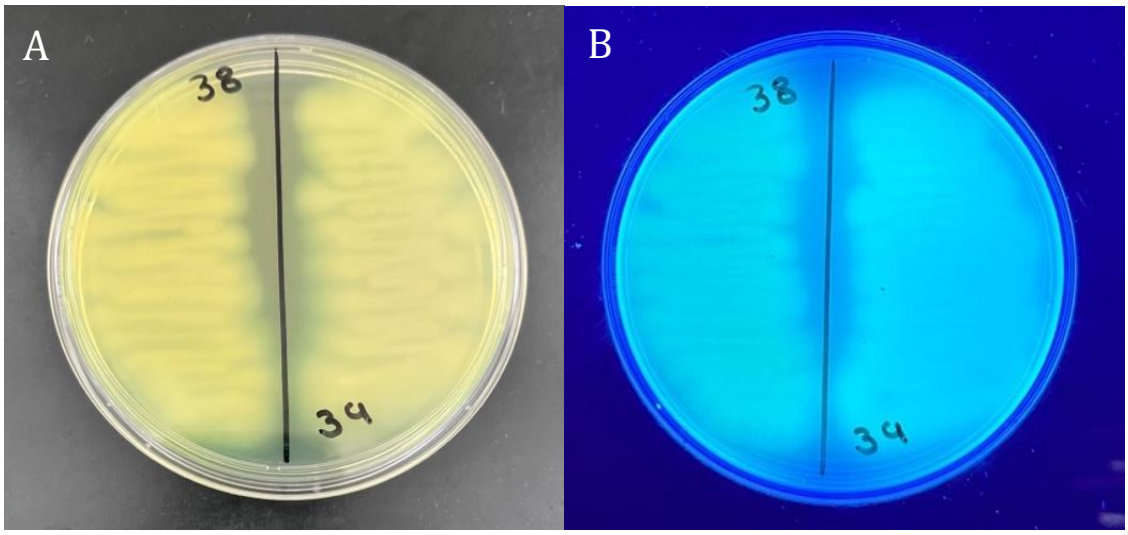


Figura 10. *P. aeruginosa* cultivada en agar F. A) Medio en fondo negro. B) Medio bajo luz UV.

Para corroborar que la cepa 38 pertenece a la especie *P. aeruginosa*, se realizó la extracción de ADN genómico y la amplificación por PCR (figura 11) del gen que codifica para ARN ribosomal 16s (1500 pb aproximadamente de acuerdo con David 2019 (69)), posteriormente el producto de PCR se purificó a través del método por columna, finalmente se envió a secuenciar al laboratorio de LANGEBIO del CINVESTAV. Irapuato.

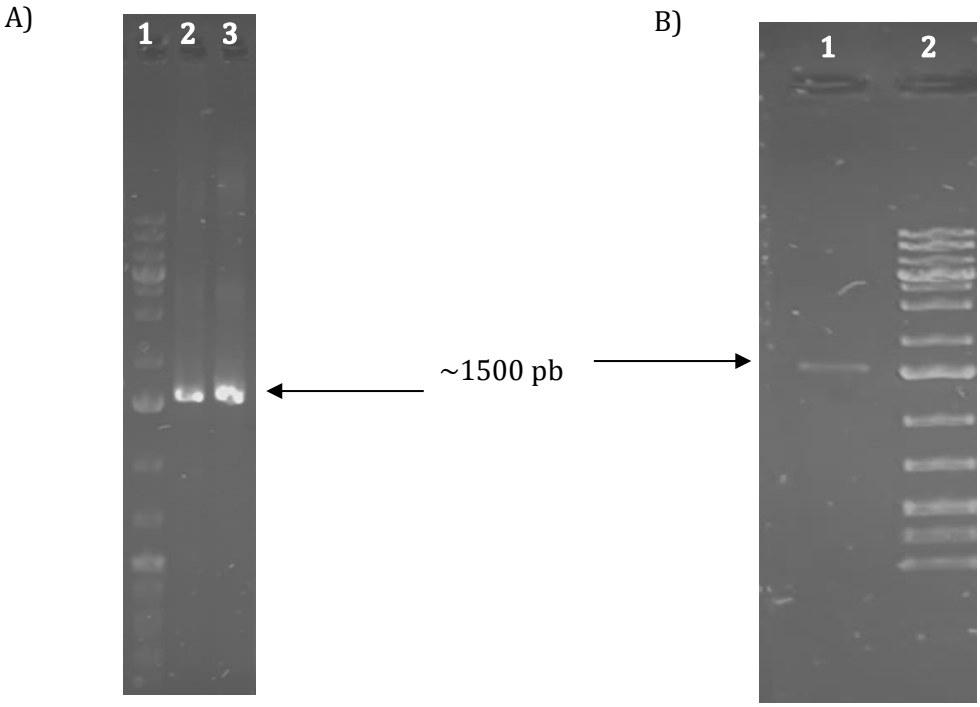


Figura 11. Amplificación por PCR de la región que codifica para el ARNr 16s de la cepa 38. A) Electroforesis en gel de agarosa del amplificado por PCR: carril 1- marcador de peso molecular, carril 2 y 3 - producto de amplificado. B) Electroforesis en gel de agarosa del amplificado purificado; carril 1 – amplificado purificado y carril 2- marcador de peso molecular.

El gen ARNr 16s secuenciado se analizó con el software MEGAX, se realizó el alineamiento y la elaboración del árbol filogenético a través de la máxima verosimilitud (figura 12) con secuencias de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas solani, Pseudomonas argentinensis, Pseudomonas morbsilactucae, Pseudomonas cyclaminis, Pseudomonas lactis, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas alcaligenes* y *Escherichia*. El árbol filogenético muestra valores Bootstrap en cada nodo. Los porcentajes de Bootstrap indican la confiabilidad del clúster sobre el nodo. De acuerdo con *Hall B., 2013, Moraes R.,* et al., 2018*,* un valor mayor implica que la estimación de los taxones en el nodo es confiable; por lo que nodos con valores mayores al 70% representan confiabilidad del resultado (84,85). La cepa 38 muestra un Bootstrap de 77% en relación con *P. aeruginosa FJ972534.1* y un 100% con todas las secuencias de *P. aeruginosa*, lo que infiere que, de 100 repeticiones, se asignó 100 veces a la rama de la especie *aeruginosa*.

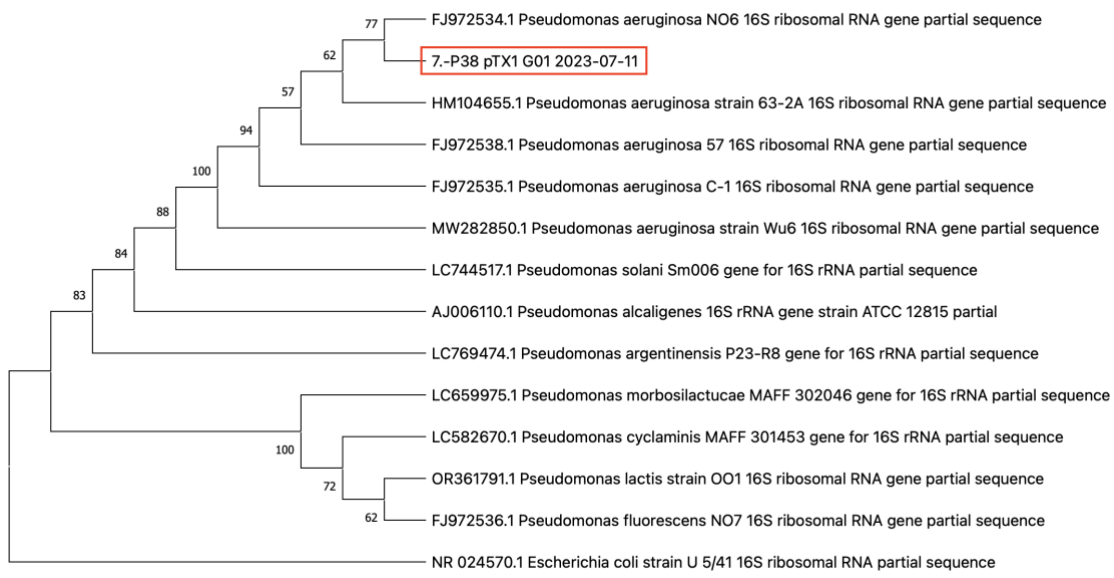


Figura 12. Árbol filogenético de la cepa 38 secuenciada. La secuencia de interés se encuentra dentro de un recuadro rojo, el árbol permite la comparación de la región 16s con especies del mismo género y especie de otro género.

El gen que codifica para el ARNAr16S se utiliza comúnmente como marcador molecular en ecología microbiana. Sin embargo, pueden existir múltiples copias de este gen dentro de una sola bacteria; estas copias pueden diferir en su secuencia precisa, lo que da como resultados múltiples ribotipos dentro de un solo organismo (86). Esto se observa en el árbol diseñado en este trabajo, pues no se presenta un valor tan elevado de Bootstrap, sin embargo, se encuentra dentro los valores de confianza.

Mulet et al., 2010 (87) realizaron un experimento multigénico de genes constitutivos (ARNr16s, *gryB*, *rpoB* y *rpoD*) de 107 cepas de *Pseudomonas*. Emplearon los métodos de *Jukes-Cantor; maximum likelihood; maximum parsimony;* y *minimum evolution,* sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los árboles independientemente del método empleado. Caso opuesto en los genes, el ARNr 16s presentó una agrupación menos clara de las especies. Las cepas se agruparon en nodos definidos y ramas independientes con valores bootstrap superiores a 500 de 1000. Gomila et al., 2015 (88) por el método de Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) realizaron el alineamiento de 4 genes constitutivos (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*) de 112 especies de *Pseudomonas,* las cuales se analizaron

con 133 secuencias ya publicadas. Se analizaron mediante alineamiento múltiple de ClustalX, basándose en un análisis bootstrap de 1000 repeticiones, agrupando solo los valores mayores al 50%. Los resultados indicaron que el 30 % de los genomas secuenciados de las cepas no se asignaron correctamente a nivel de especie en la taxonomía aceptada del género y el 20 % de las cepas no se identificaron a nivel de especie, destacando la necesidad de secuencias genómicas completas para construir una taxonomía filogenética acertada.

En nuestro trabajo, tomando en cuenta los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y moleculares, se determinó que la bacteria de trabajo es *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2 Evaluación del antibiograma.

P. aeruginosa es de interés clínico debido a su resistencia a múltiples antibióticos. El uso del antibiograma permitió identificar la resistencia de las cepas 38 y 39; el sensidisco empleado contenía 12 antibióticos (AK-Amikacina, Am-Ampicilina, CB-Carbemicina, CF-Cefalotina, CFX-Cefotaxima, CPF-Ciprofloxacino, CL-Cloranfenicol, GE-Gentamicina, NET-Netilmicina, NF- Nitrofurantoína, NOF-Norfloxacino y STX-Sulfametoxazol/Trimetoprima). En la figura 13 se observan las placas LB con los sensidiscos; se observan diferentes halos de inhibición, ellos destacando NOF, dado que produjo el halo de inhibición de mayor tamaño debido a la eliminación de la bacteria.

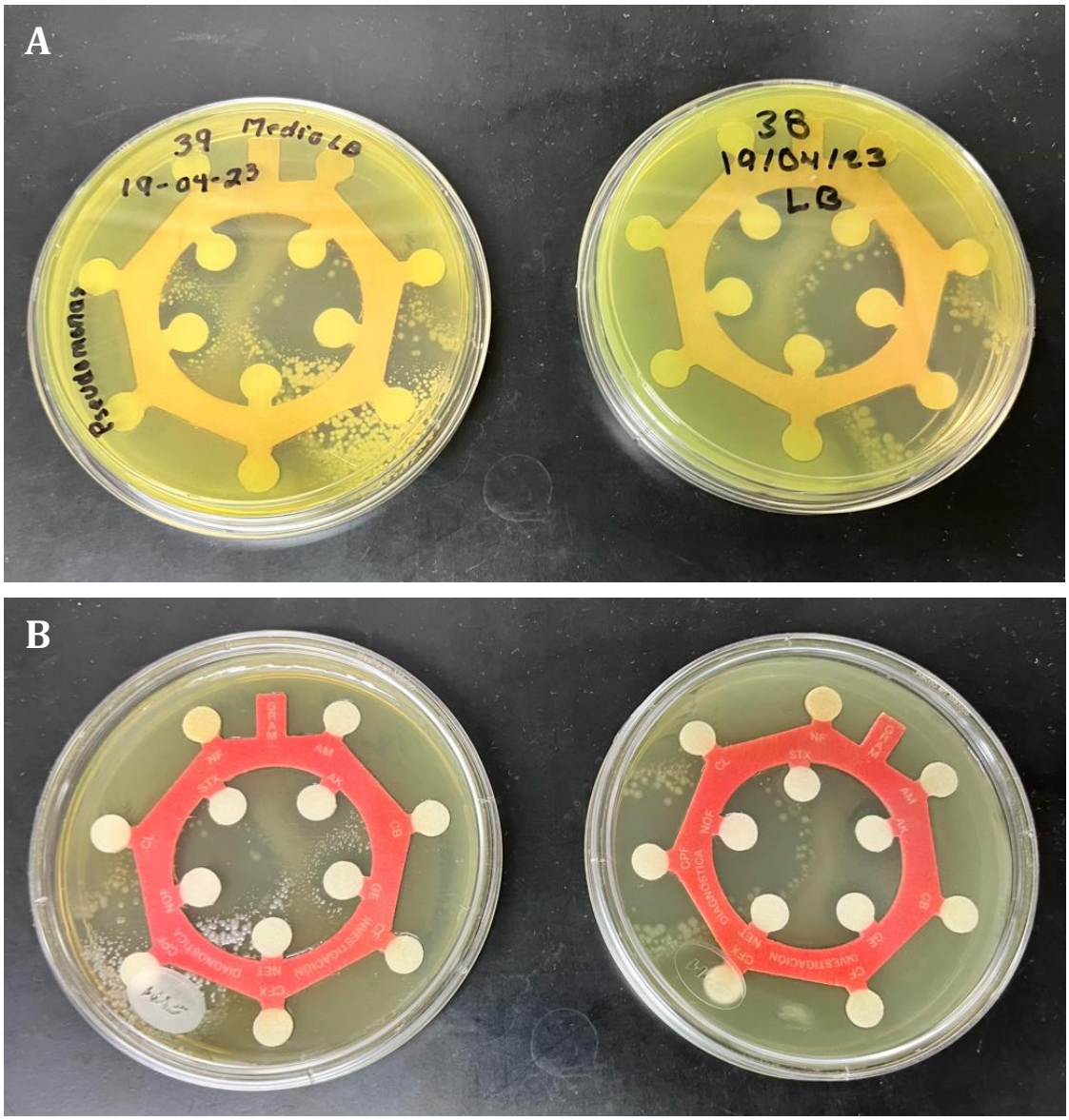


Figura 13. Fotografías de los antibiogramas de las cepas de *P. aeruginosa* 38 y 39. En la figura 13A se aprecian los halos de inhibición del antibiótico. En la figura 13B observan el nombre los antibióticos en el disco. Del lado izquierdo observamos la placa de la cepa 39 y del lado izquierdo observamos la placa de la cepa 38.

En la Tabla 8, se enlistan los antibióticos presentes en el antibiograma, exhibiendo la alta resistencia (R), resistencia intermedia (I) y susceptibilidad (S) de cada uno ante *P. aeruginosa* basada en el protocolo de estandarización para la sensibilidad de antibióticos empleado por Manceda 2024 (89) con las mismas cepas. La cepa 38 presentó alta resistencia contra AM, CB, CF, CFX, NET, CL, STX y NF, y una resistencia intermedia para AK y GE. La cepa 39 presentó resultados similares a la cepa 38, con la diferencia que la cepa 39 presentó alta resistencia contra CPF, estos resultados

indican una resistencia de un 83.33 % para la cepa 38 y un 92.66% para la cepa 39 contra los antibióticos totales del disco. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de actividad antimicrobiana concuerdan con el trabajo previo (89).

Tabla 8. Listado de la resistencia a los antibióticos por *P. aeruginosa* a los discos del antibiograma (AK - Amikacina, Am - Ampicilina, CB - Carbencilina, CF - Cefalotina, CFX - Cefotaxima, CPF - Ciprofloxacino, CL - Cloranfenicol, GE - Gentamicina, NET - Netilmicina, NF- Nitrofurantoína, NOF - Norfloxacino y STX- Sulfametoxazol / Trimetroprim).

	Cepa	
Antibiótico	**38**	**39**
AM	R	R
AK R ≤14, I 15-16, S ≥ 17 (mm)	I 15mm	I 15mm
CB	R	R
GE R≤12, I 13-14, S≥15(mm)	I 13mm	I 13mm
CF	R	R
CFX	R	R
NET	R	R
CPF R≤15, I 16-20, S≥21(mm)	S 22mm	R
NOF R≤12, I 13-16 y S≥17(mm)	S 23mm	S 22mm
CL	R	R
STX	R	R
NF	R	R

Reportes indican que *E. coli, S, aureus, K. pneumoniae y P. aeruginosa* son las bacterias que más muertes causan alrededor del mundo. Arias, et al., 2016 (90), analizaron 48,377 muestras biológicas dónde *P. aeruginosa* presentó una

prevalencia del 10.9%; México presenta el mayor consumo de antibióticos en Latinoamérica, lo que resulta en una mayor tasa de resistencia a antibióticos y una prevalencia en hospitales de bacterias más resistentes, como en este caso, *P. aeruginosa*. Guerrero, et al., 2023 (91) realizó una actualización sobre la prevalencia de bacterias en Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora. Los pacientes presentaron principalmente infecciones por *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, K. pneumonie spp, H. haemolyticus y S. hominis*. Lo que se destaca de este trabajo, es que se observó una mayor resistencia a antibióticos β-lactámicos.
Jorge, et al., 2021 (92) evaluaron la farmacorresistencia en el hospital general de Chilpancingo, Guerrero; evaluaron 14 antibióticos contra *P. aeruginosa* de los cuales 6 presentaron una resistencia mayor al 88%, los fármacos a los que expusieron menor resistencia fueron el meropenem (22.7%), cefepima (7%) y gentamicina (6.1%), por lo que constituyen las mejores alternativas para el tratamiento.

A través de los resultados del antibiograma, se comprobó que *P. aeruginosa* es una bacteria multirresistente a antibióticos, tal y como se menciona en la literatura.

6.3 Construcción y ensamble del inmunosensor.

En la construcción y caracterización del inmunosensor se empleó la técnica espectroscópica de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y las técnicas de microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia de fluorescencia.

FT-IR generan vibraciones de estiramiento (υ) y (δ) flexión en las los átomos de la muestra, con movimientos asimétricos (as) y simétricos (s).

Los primeros espectros obtenidos por FT-IR fueron los del anticuerpo IgG (figura 14) y la proteína estreptavidina conjugada con TRITC (STV) (figura 15); ya que ambos se encuentran disueltos en soluciones buffer, las mediciones se realizaron depositando las muestras directamente sobre el cristal de ATR dejando evaporar la muestra para eliminar la señal del agua. En algunos casos, se requirió de concentrar la muestra repitiendo el procedimiento de depósito y evaporación para obtener espectros con bandas bien definidas.

El espectro de infrarrojo del anticuerpo (figura 14) presenta la banda amida A en

3283 cm^{-1}. Esta corresponde a la ν de los enlaces N—H (93). Las bandas situadas en 1641 y 1547 cm^{-1} corresponden a la amida primaria y secundaria, respectivamente. La primera debido a la ν(N—C=O) y la segunda por la δN—H y νC—N. Se observa, además, la banda amida III producto de múltiples contribuciones, principalmente por la νC—N, δN—H, νC—O y δ(O=C—N) (94); la banda de 1080 cm^{-1} puede deberse a las vibraciones C—O—C, sin embargo, también pude deberse a la νP=O del buffer de fosfatos en el que se encuentra disuelto el anticuerpo ya que se sabe que este modo vibracional produce una banda intensa (94,95). Finalmente, se observan 2 bandas: 2179 cm^{-1} y 2040 cm^{-1}, que pertenecen al compuesto azida de sodio presente en el buffer del anticuerpo y que se emplea para preservarlo. Ellas corresponden a la vibración ν_{as} N=N=N (96,97).

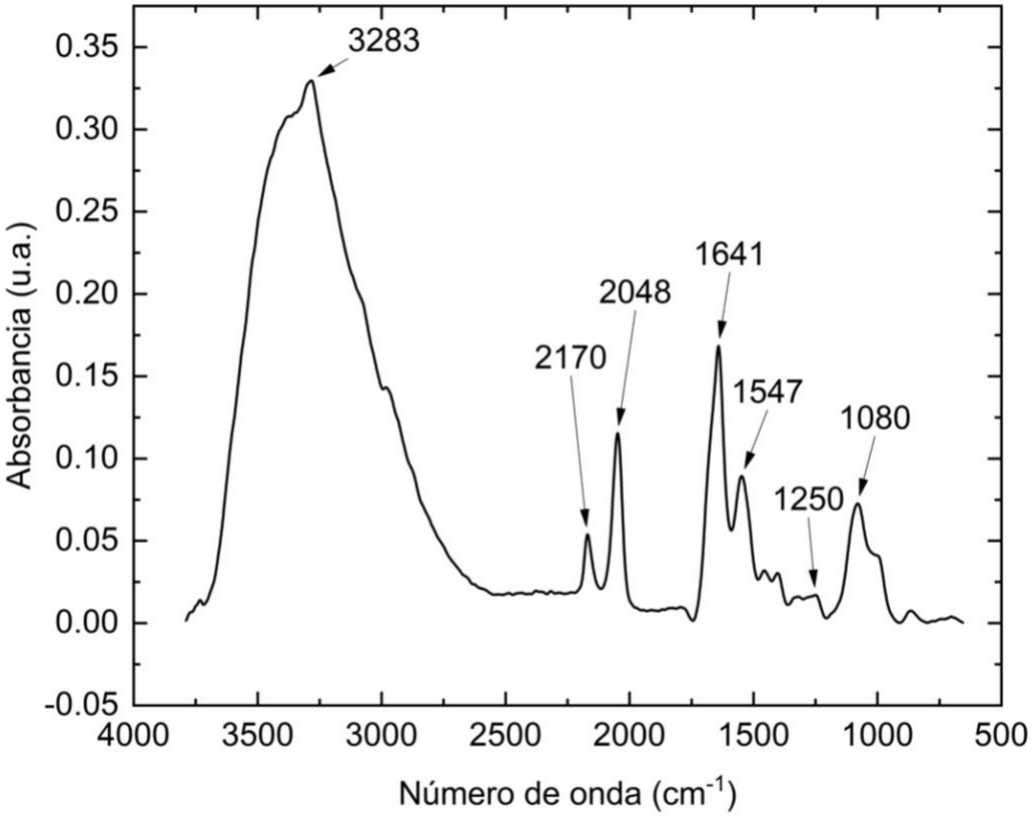


Figura 14. Espectro FT-IR del anticuerpo IgG anti-*Pseudomonas*.

La presencia de azida de sodio al 0.1% se reporta en la ficha técnica. Esto fue comprobado a través de la búsqueda del espectro correspondiente en la librería espectral *HR Aldrich FT-IR Collection Edition I* de la compañía Thermo Scientific. El azida de sodio también exhibe una banda débil en 1457 cm^{-1} debido a la νN=N que

pudiese traslaparse con una banda de la inmunoglobulina en la misma posición.

Los puentes disulfuro que unen a las cadenas pesadas con las ligeras de las IgG no se detectan en el espectro de infrarrojo debido a que las vibraciones νS—S son detectadas en ~530-500 cm^{-1} y el elemento de enfoque del cristal de ATR que es ZnSe tiene un rango espectral de 7800-550 cm^{-1}.

Ríos et al., 2016 (98) obtuvieron el espectro de un anticuerpo anti-*Salmonella*, donde destacan las bandas en 1649 y 1542, que pertenecen a las vibraciones de C═O (amida I) y N—H (amida II) respectivamente; menciona que bandas bajo la región de 1350 cm^{-1} pertenecen a vibraciones C—N, C—O y C—C—O del esqueleto de la proteína y los aminoácidos; además, destacan bandas en 1100 y 989 cm^{-1} asociadas al glicerol presente en la solución del anticuerpo. La banda cercana a 1550 cm^{-1} pertenece a las amidas.

En el espectro de la estreptavidina se observan bandas en 3296 cm^{-1} de la amida A, 2172 y 2045 cm^{-1} pertenecientes al azida de sodio (99). Las bandas en 1638 y 1533 cm^{-1} corresponden a las amidas I y II, respectivamente; finalmente encontramos bandas en 1076 y 984 cm^{-1} que representan vibraciones C—O y C═C.

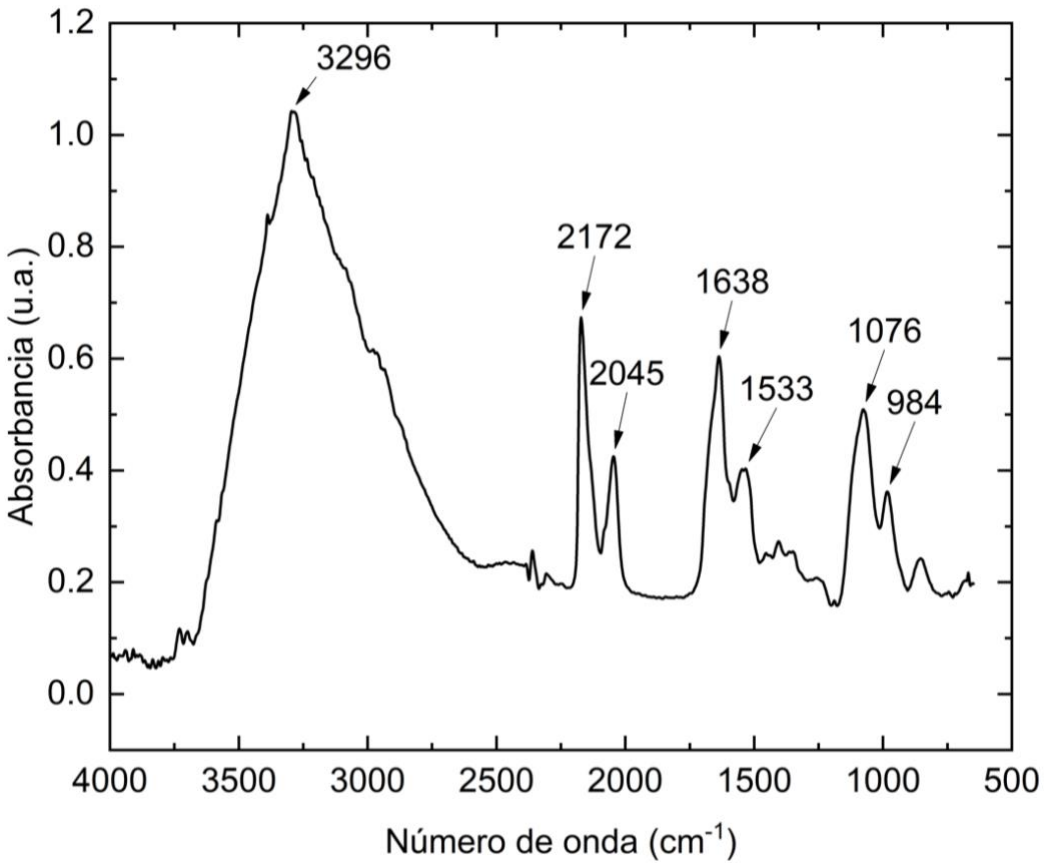


Figura 15. Espectro FT-IR de la estreptavidina (TRITC).

Krüger et al., 2018 (100) observaron el espectro de la estreptavidina donde destacan bandas en la región de 1632 cm^{-1} característica de la estructura secundaria en lámina β; el monómero de estreptavidina se compone de 8 hebras β antiparalelas, que se pliegan en un barril β.

En la figura 16 se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos de las distintas etapas del ensamblado, que son: soporte silanizado (SiO_2+3-APTMS) (A), soporte silanizado con el reticulante (SiO_2+3-APTMS+GA) (B), el paso anterior más la unión covalente de la estreptavidina (SiO_2+3-APTMS+GA+STV) (C), y el inmunosensor ensamblado con el anticuerpo inmovilizado(D).

En la figura 16A, soporte silanizado, se observan las bandas de 2936 y 2882 cm^{-1} que representan la vibraciones de υ_{as} (C—H) (CH_2) del metileno presentes en 3-APTMS, 1126 (υ_{as} Si—O—Si) cm^{-1}, 1042 (υ Si—O—C) cm^{-1} y 870 (υ Si—OH) cm^{-1} pertenecen al silicio empleado como soporte del inmunosensor.

En la figura 16B, del soporte silanizado con reticulante, se observan un amento en la

banda de 2941 y 2882 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones υ_{as} (C—H) (CH_2) de los metilenos del GA, 1636 cm^{-1} y 1537 cm^{-1} representan las vibraciones C═O del carbonilo libre y el enlace amida; 1096 (υ_{as} Si—O—Si) y 928 (υ Si—OH) cm^{-1} pertenecen al silicio.

Mientras tanto en las figuras 16C y 16D, soporte silanizado con reticulante más STV e inmunosensor respectivamente, la banda a 1665 cm^{-1} corresponden al estiramiento C═O principalmente de amidas I, 1560 cm^{-1} se asigna a la deformación N-H y el estiramiento C—N, mismas que se observan en los espectros de la figura 14 y 15. Analizando ambos espectros observamos que en cada etapa va aumentando la altura de las banda 2043 cm^{-1} (metilenos), 1663 cm^{-1} (amida I) y 1557 cm^{-1} (amida II) , lo que indica que hay un aumento en la unión de moléculas sobre el ensamblado.

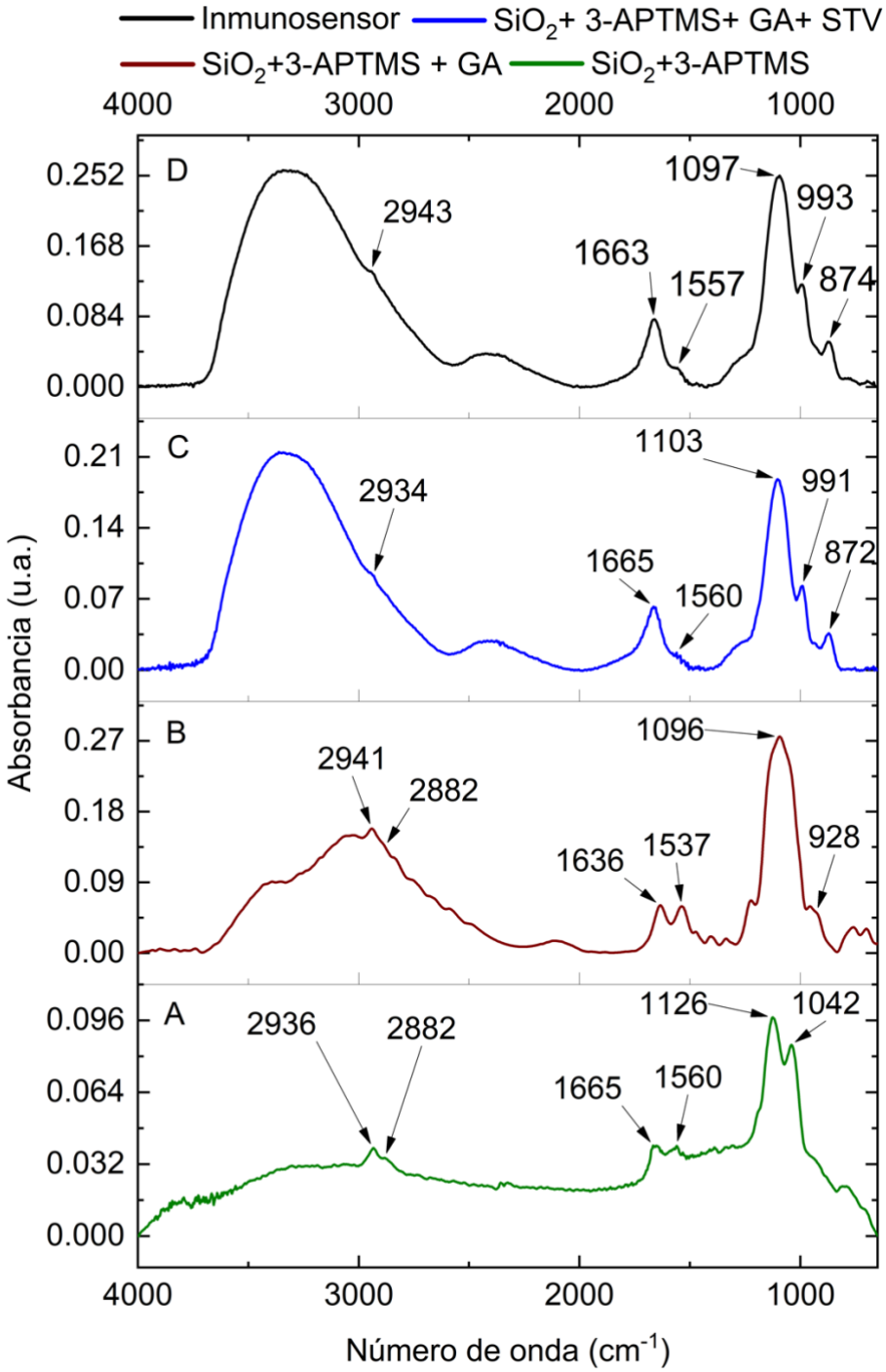


Figura 16. Espectros FT-IR de las distintas etapas del ensamblaje del inmunosensor.

Lapin et al., 2009 (101) reporta que en la silanización sobre SiO_2 se observan bandas en la región 2930 cm^{-1} que representa υ_{as} (CH_2), la región 1570-1590 cm^{-1} corresponde a la deformación de NH_2 y la zona de 900-1280 cm^{-1} representa las vibraciones υ(Si—O—Si) y υ (Si—O—C), bandas que aparecen en la figura 16A. La región de 2920 a 2874 corresponden a vibraciones υ(C—H) de los grupos —CH_2, y

$-CH_3$ (102), estas se observan desde la silanización (figura 16A) hasta el inmunosensor (figura 16D) presentando variación de posición en cada etapa. Las vibraciones υ(C—H) se observan en todos los espectros de la figura 16, puesto que en cada etapa se adhieren componentes que contienen cadenas hidrocarbonadas.

La banda en 1647 representa el estiramiento del grupo C═O de las amidas primarias. Caso L. en 2016 (75) desarrolló un biosensor enzimático donde caracterizó cada etapa del biosensor reportando que las bandas de 2931 cm^{-1} y 2876 cm^{-1} obtenidas en su trabajo corresponden a vibraciones simétricas del grupo CH_2 presentes en la silanización, mismas que aparecen cuando se ensambla con el GA observándose una mayor altura de las bandas. Las bandas en 1636 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} representan vibraciones C═O del carbonilo libre y de la amida; bandas que se aprecian con una ligera variación (recorrido de las bandas 1656 y 1557 cm^{-1}) en este trabajo, lo que permite establecer que el ensamblado del inmunosensor corresponde a lo planteado.

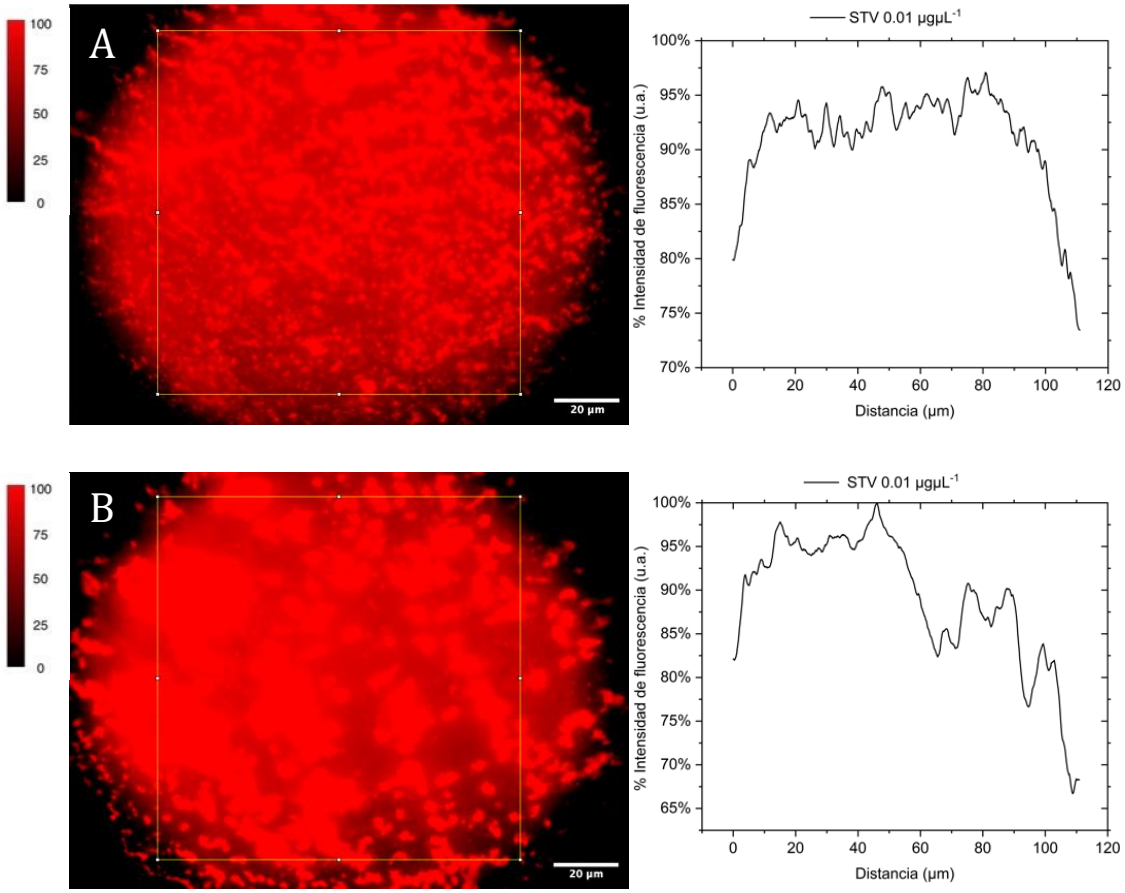
Con el objetivo de establecer la concentración óptima de STV para recubrir el soporte de silicio cristalino se hizo uso de la microscopía de fluorescencia y se empleó STV conjugada con un colorante fluorescente. La estreptavidina está conjugada con TRITC, fluoróforo que absorbe energía a una longitud de onda de 540-550 nm y emite fluorescencia entre 555-600 nm (103). La TRITC se utiliza principalmente en la microscopía de fluorescencia como etiqueta para determinar presencia o ausencia de componentes celulares (104–106) o bacterianos (103) mediante un ligando unido. Sin embargo, en este trabajo la TRITC como molécula marcadora para poder determinar la concentración óptima de STV sobre el soporte de SiO_2 cristalino.

En este caso, la fluorescencia es directamente proporcional con la cantidad de STV unida al soporte de silicio reticulado (SiO_2+3-APTMS+GA).

En la figura 17 se muestra la cobertura de la STV sobre el soporte de silicio reticulado. A concentraciones de 0.01 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ (figura 17A y B, izquierda) se observa una cobertura más uniforme y abundante de STV con respecto a los soportes en donde se utilizó una concentración de 0.001 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$, Figura (17C y D, izquierda).

Aunque en las figuras se muestra una zona del soporte, el examen de varios campos visuales fue realizado y se observaron similitudes con los aquí mostrados. Observamos un decaimiento en los extremos de los gráficos, esto se atribuye a la propia naturaleza del lente del microscopio de fluorescencia.

Los gráficos de la figura 17A, B, C y D (derecha), muestran los niveles de fluorescencia relativa respectiva. En ellos se corrobora lo anteriormente expuesto, ya que a concentraciones de STV de 0.01 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ (figura 17A y B derecha) presentan un porcentaje intensidad de fluorescencia mayor de 80% en la mayor parte de la superficie, mientras que en los soportes con concentración 0.001 $\mu g \mu L^{-1}$ observamos que los picos con mayor porcentaje de intensidad de fluorescencia presentan un ~35%.



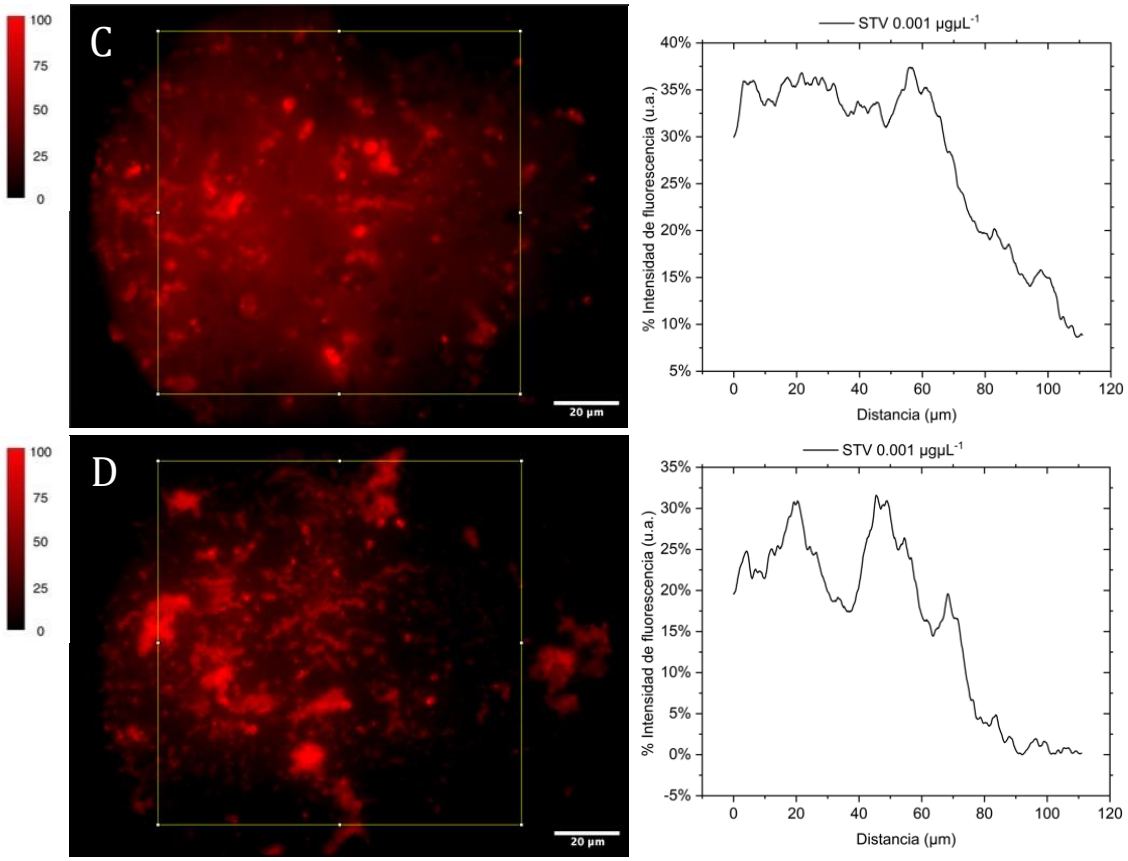


Figura 17. Identificación y cuantificación de STV sobre los soportes de silicio. En las figuras 17A y 17B se muestra la STV-TRITC unida al soporte de silicio reticulado con una concentración de 0.01 µg·µL^{-1}. La figura 17C y 17D representan la unión de STV-TRITC a una concentración de 0.001 µg·µL^{-1}. La barra del gradiente muestra la intensidad de la fluorescencia relativa. Se muestran los gráficos de las intensidades relativas calculadas a partir de las imágenes de la microscopia de fluorescencia.

En la figura 18, se agruparon los gráficos para observar comparativamente las diferencias entre ambas concentraciones, lo que permite realizar un análisis más claro, observamos una evidente diferencia de la fluoresencia relativa normalizada a ambas concentraciones. Se aprecia que la concentración 0.01 µg·µL^{-1} presenta una fluorescencia relativa 45% mayor que en la concentración de 0.001 µg·L^{-1} en una escala normalizada. Con esto queda claro que 0.01µg·µL^{-1} es la concentración óptima de STV que permite recubrir la superficie del soporte silanizado con mayor cobertura y homogeneidad, estas características proporcionan una mayor superficie con capacidad de unión con los anticuerpos biotinilados de la etapa final, lo que permitirá una mejor respuesta del inmunosensor.

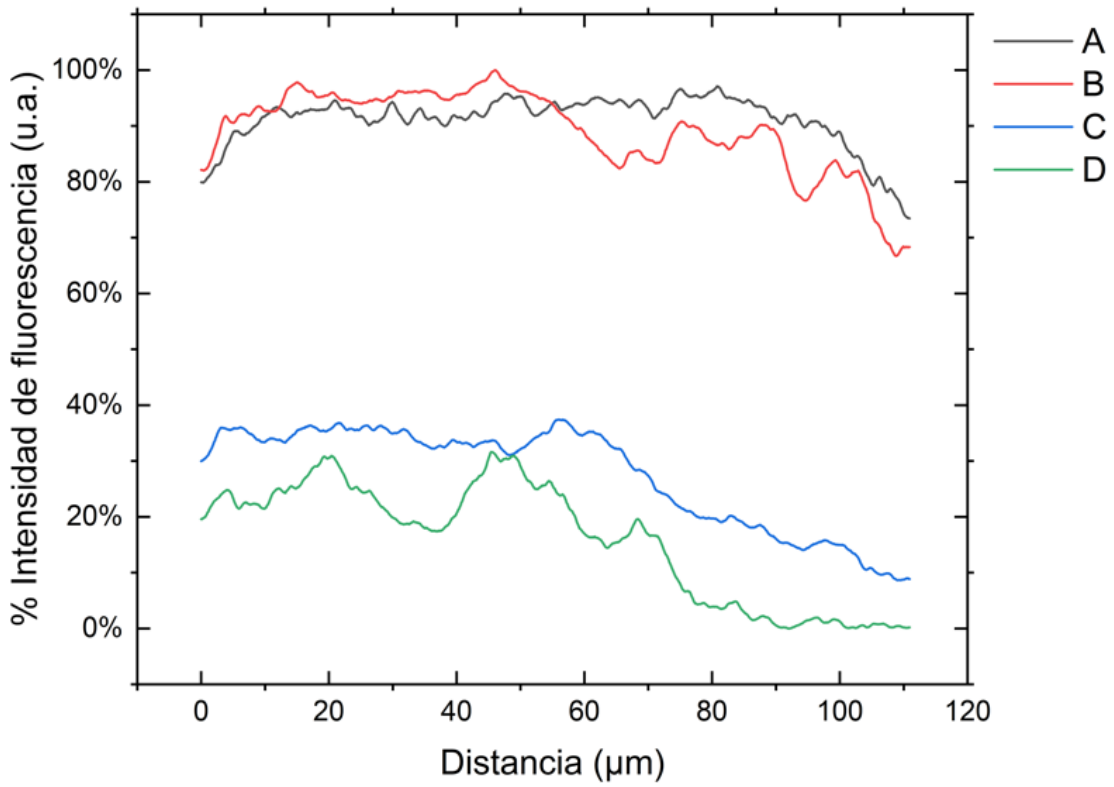


Figura 18. Comparación entre las fluorescencias normalizadas generadas entre concentraciones de STV 0.01 µgµL^{-1} y STV 0.001 µgµL^{-1}. A y B representan los gráficos de la figura 17A y 17B, los gráficos 17C y 17D se denotan con C y D respectivamente.

Con la concentración de STV establecida, se construyeron ensambles de SiO_2+3-APTMS+GA+STV y del inmunosensor, se empleó la microscopía SEM con la finalidad observar las proteínas depositadas en la superficie. La figura 19 muestra la superficie de los soportes con STV unida al silano mediante el glutaraldehído y la figura 20 muestra la superficie de los inmnosensores.

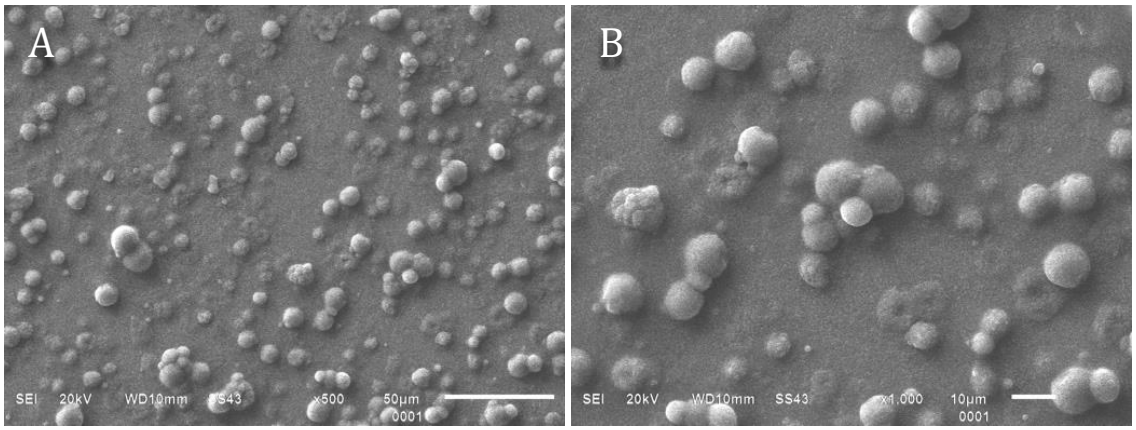


Figura 19. Micrografías SEM de los soportes SiO_2+3-APTMS+GA+STV. A) Micrografía con un aumento x500. B) Micrografía con un aumento x1000.

Las formas esféricas relacionadas a la proteína son probablemente un artefacto debido a que las muestras sufren un proceso de sublimación de oro en donde se aplica vacío al mismo tiempo, por lo tanto, las proteínas tenderían a desnaturalizarse y presentar una conformación como se observa en la figura 19. El enlace químico biotina-estreptavidina se puede disociar en una solución acuosa a temperaturas elevadas en el rango de 60-80 °C.

En las microscopías del inmunosensor (figura 20) se observa un aumento en la cantidad de microesferas en el soporte en comparación a la micrografía SEM de la figura 19; esto debido a que la etapa final de inmunosensor presenta 2 capas proteicas, una capa de STV y la capa final con el anticuerpo biotinilado.

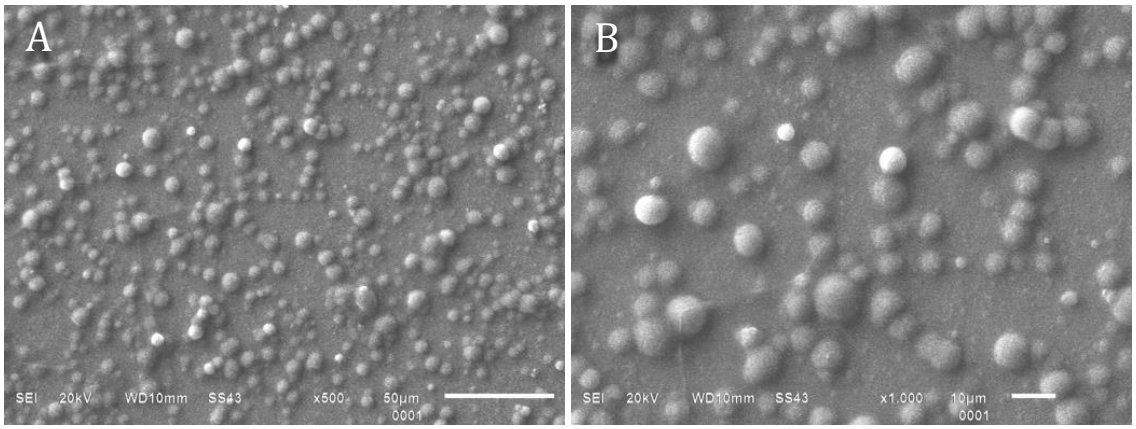


Figura 20. Micrografías SEM de los inmunosensores. A) Micrografía con un aumento x500. B) Micrografía con un aumento x1000.

Las microesferas han sido reportadas por otros autores, por ejemplo, Tran et al., 2021 evaluaron por SEM puntos cuánticos conjugadas con STV y el anticuerpo. Las micrografías presentaron formas circulares con un tamaño promedio de 14.7nm (± 3.7), en el caso de la STV-TRITC que es similar a lo obtenido en este trabajo. En la conjugación con el anticuerpo se mostraron estructuras similares a la STV presentando un mayor tamaño de 29.6 (± 11.8) nm(107).

Aunado a lo anterior, Farrokhonia et al., 2022 visualizaron por SEM el

nanobiosensor usando anticuerpos como elemento de biorreconocimiento. La micrografía mostró una distribución uniforme; en cuestión de formas, en este trabajo se presentan agrupaciones globulares blancas con bordes irregulares (108).

A partir de los resultados obtenidos mediante FT-IR, microscopía de fluorescencia y SEM se determinó que la construcción del inmunosensor se realizó exitosamente, además, permitió la estandarización de la metodología a emplear para las siguientes etapas del proyecto..

6.4. Inmunodetección de *P. aeruginosa* mediante FT-IR y SEM.

Una vez ensamblado el inmunosensor bajo las condiciones que se determinaron como óptimas, se llevó a cabo el análisis del bioreconocimiento de la bacteria por el inmunosensor. Inicialmente se obtuvo el espectro infrarrojo de la bacteria por ATR (método de reflexión total atenuada) tomando una colonia directamente de la placa de agar y depositándola sobre el cristal de ATR.

El espectro FT-IR de la bacteria (Figura 21A) presenta bandas en 3292 cm^{-1} que corresponden a vibraciones υN—H de las proteinas; también se asocian a υO—H de los polisacaridos y el agua (109). Las bandas de absorción en 2924 y 2853 cm^{-1} corresponden a vibraciones $\upsilon_{as}CH_2$ y $\upsilon_s(CH_2)(CH_3)$ de los ácidos grasos de la pared celular y otros componentes. La banda en 1649 cm^{-1} representa υC═O asociado a la Amida I, la banda de 1543 cm^{-1} pertenecen a la deformación N—H de la Amida II (110). Las bandas en 1454 y 1402 cm^{-1} surgen de las vibraciones de deformación de CH_2 y CH_3 y υ_sCOO— de las proteínas (99,101). En las regiones de 1238 a 1092 cm^{-1} aparecen las bandas asociadas a vibraciones υ_{as} y υ_s (P═O) de los ácidos nucleicos del ADN y ARN y de los fosfolípidos (100,101); sin embargo, también podrían asociarse a las redes del silano. El inmunosensor (figura 21B) presenta las mismas bandas discutidas en la figura 16. En la respuesta del inmunosensor (figura 21C) se observa las bandas 2938 y 2884 cm^{-1} que pertenecen a vibraciones de los ácidos grasos.

Bandas en 1651 y 1549 cm^{-1} correspondientes a la amida I y II. Un pico en la región de 1470 relacionado a la deformación de las proteínas de la bacteria. Vibraciones en 1105 pertenecientes al ensamblado del inmunosensor y vibración en 1053, 970 y 868 cm^{-1} asociados a los ácidos nucleicos (111).

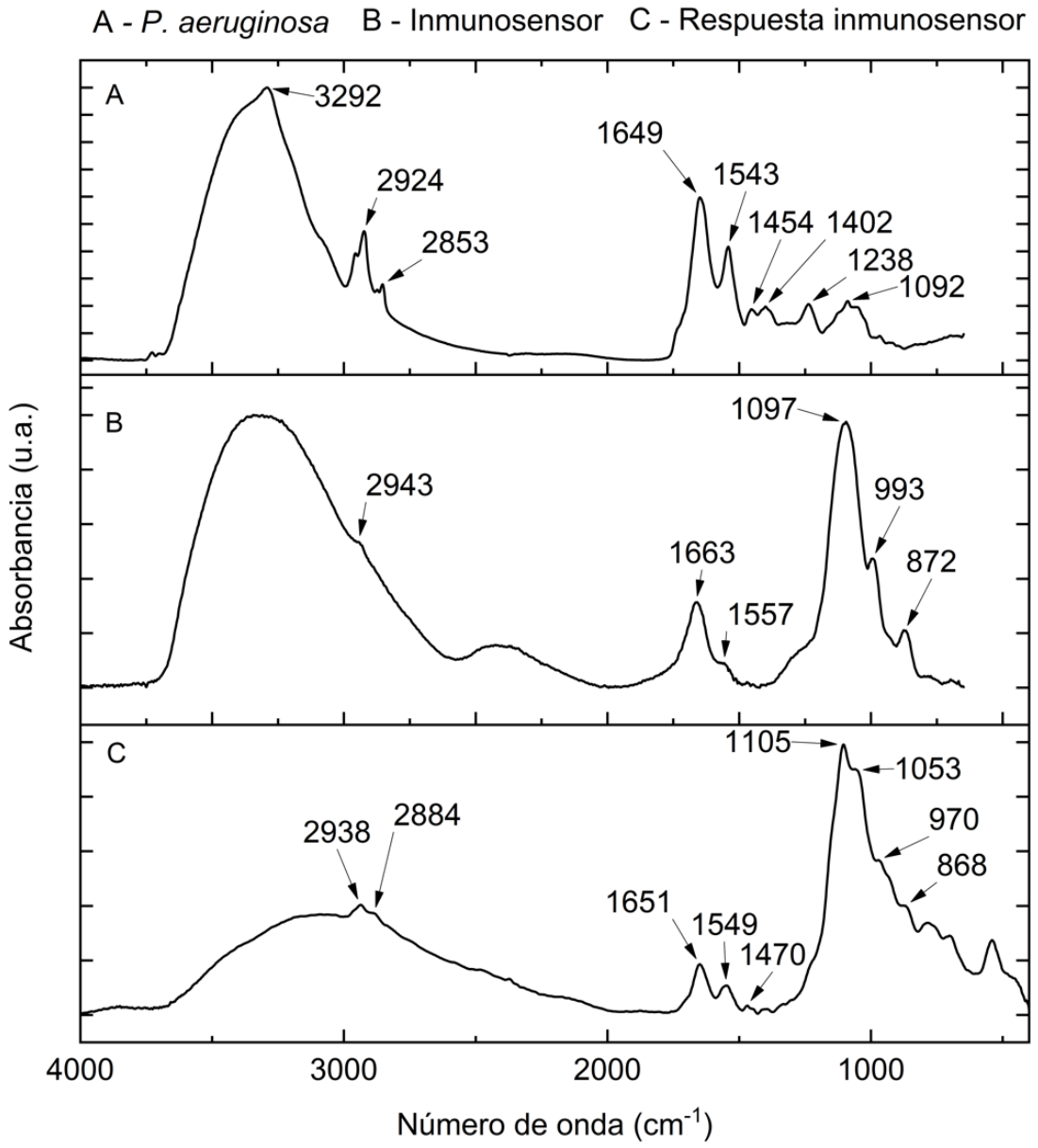


Figura 21. Espectros de FT-IR de la bacteria (A), inmunosensor (B) y del inmunosensor (C) detectando la bacteria a una concentración $10^{-1}cm^{-1}$.

Marques et al*.,* 2023 estudiaron los cambios bioquímicos de *P. aeruginosa* después de aplicar terapia fotodinámica con curcumina *in vivo* mediante FT-IR, en este trabajo presentan el perfil bioquímico de la bacteria (tabla 9)(111). Esta

información permite correlacionar las bandas espectrales en la respuesta del inmunosensor de la figura 21.

Tabla 9. Componentes estructurales de *P. aeruginosa* asociados a diferentes números de onda en un espectro obtenido por FT-IR.

Estructura	Numero de onda (cm^{-1})	Asignación
Estructura secundaria de proteínas	1638.6–1637.8	amida I (desordenada)
Estructura secundaria de proteínas	1679.6–1675.5	Amida I (β- lámina)
Ácidos nucleicos	1571–1588	δNH_2 o υ (C═N)
Ácidos nucleicos	1024–1027	υC—O. Ribosa
Proteínas	1402.3–1401.8	υ_s COO—
Ácidos nucleicos	1083–1085	υ_s PO2—
Lípidos	1456–1452	δas (CH)(CH2)
Lípidos	2883–2889	υ_s (CH)(CH3)
Ácidos nucleicos	1062–1066	υ_s PO2—
Lípidos	1382–1382	δ (CH)(CH3)
Lípidos	2923–2924	υ_{as} (CH)(CH2)
Proteínas	1278.9–1295.5	amida III
Lípidos	2853–2852	υ_s (CH)(CHs)
Ácidos nucleicos	967–969	C—C. C—O desoxirribosa
Lípidos	2959–2960	υ_{as} (CH)(CH3)
Ácidos nucleicos	1230–1232	υ_{as} PO2—
Carbohidrato	1157–1158	υ (C—O) glucosa, fructosa
Lípidos	2980–2982	υas (CH)(CH3)
Lípidos	1723–1719	(éster) Carbonilo C═O estiramiento en fosfolípidos, colesterol y triglicéridos
Proteínas	1542–1543	amida II
Ácidos nucleicos	1368–1377	υ (C—N) citosina, guanina
Ácidos nucleicos	988–990	C—C / C—O ribosa
Lípidos	1467–1467	δ (CH)(CH3) y δas (CH)(CH2)

Lípidos	2872–2872	υ_s (CH)(CHs)
Ácidos nucleicos	921–936	Hélice levógira de ADN (forma Z)
Lípidos	2893–2900	υ_s (CH)(CH3)
Ácidos nucleicos	1047–1058	υC-O. desoxirribosa
Proteínas	1439–1439.6	δ (CH)(CH3)
Proteínas	1514–1514.5	amida II
Carbohidratos	1111–1117	υ (C—O) disacáridos, sacarosa
Proteínas	1421.3–1421.3	δ (CH)(CH3)
Estructura secundaria de proteínas	1654.9–1656.2	amida I (α-hélice)

Estiramiento (υ), flexión (δ), asimétricos (as) y simétricos (s).

Adaptado de Marques et al., 2023 (111).

La SEM es un excelente método de detección y/o confirmación. Revela imágenes que permiten determinar presencia o ausencia del analito. A través de ella se corroboró visualmente el reconocimiento de la bacteria por el inmunosensor. Las figuras 22 y 23 muestran los resultados de las microscopías. Las micrografías mostraron presencia de bacterias cumpliendo con las características mencionadas en la introducción (bacteria con forma de bastón de aproximadamente 0.5-1um de diámetro y 1.5-5 mm de largo (1)). Con esto se logró confirmar la presencia de *P. aeruginos*a.

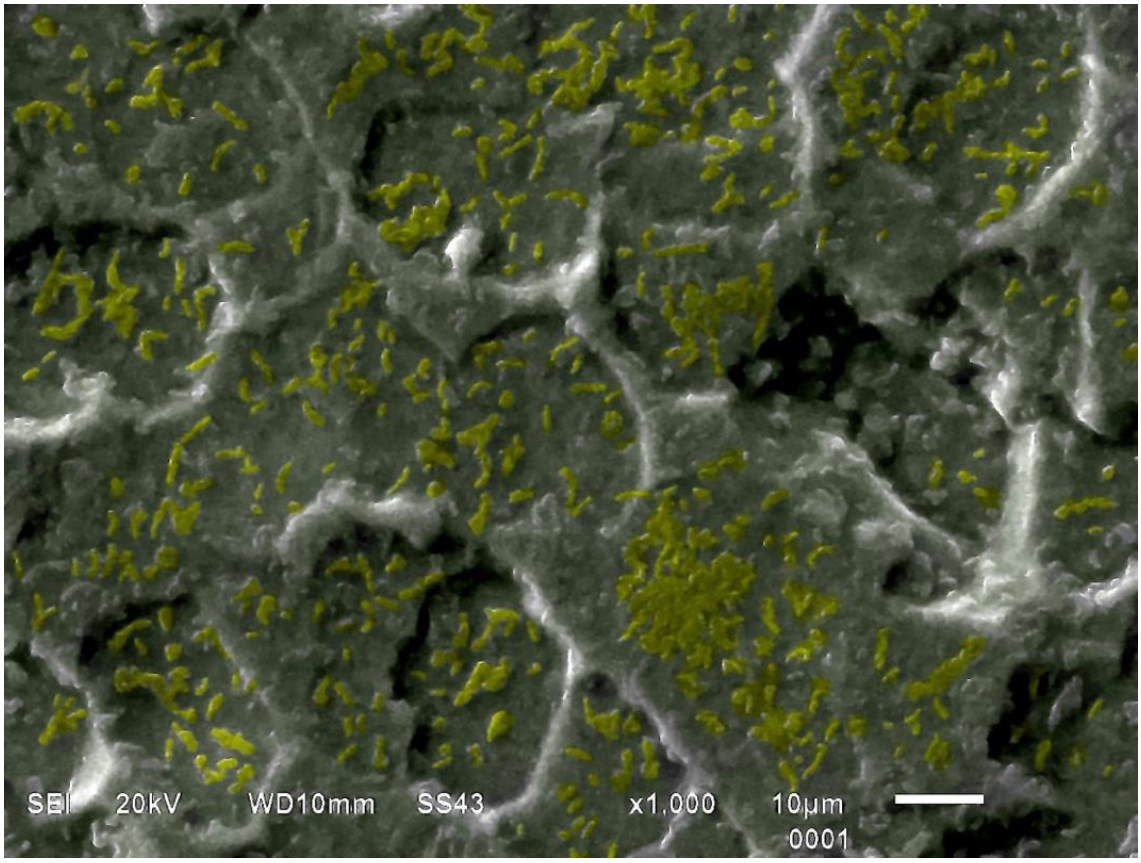


Figura 22. Micrografía SEM de *P. aeruginosa* detectada por el inmunosensor (x1000). La bacteria se ha resaltado en color amarillo para una rápida visualización.

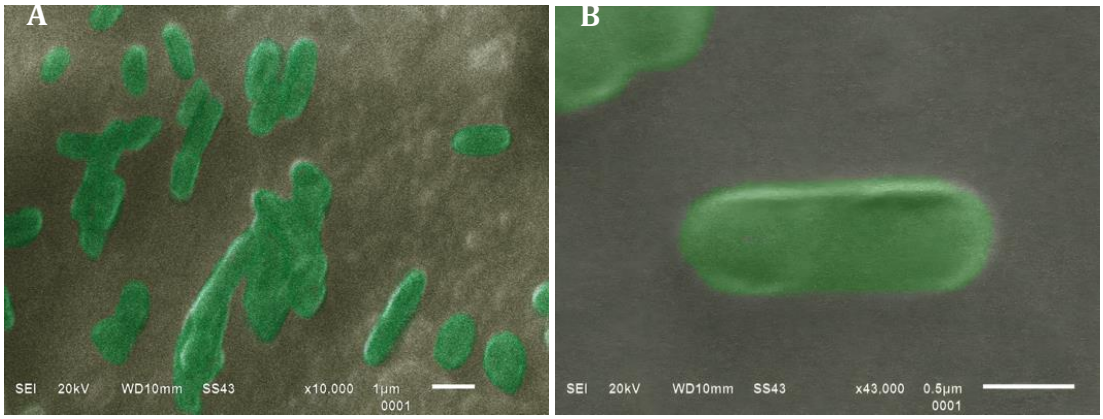


Figura 23. Micrografías SEM de la bacteria adherida al inmunosensor. A) Micrografía con un aumento x10,000. B) Micrografía con un aumento x43000. Las bacterias se resaltan con color verde para una mejor visualización.

La SEM además de poder identificar bacterias también permite evaluar cambios en la bacteria o de su biopelícula por efectos de agentes externos. Liu et al., 2020 emplearon SEM para evaluar el efecto bactericida del linalool, las micrografías

permitieron identificar que el linalool provocaba una alteración en la biopelícula y restos celulares (112). Stuermer et al., 2021 utilizaron SEM para evaluar la actividad de apósitos antimicrobianos para heridas causadas por *P. aeruginosa*; SEM reveló visualizaciones cualitativas de los cambios estructurales de la biopelícula (113). Olivera et al., 2020 identificaron y caracterizaron nuevos bacteriófagos contra *P. aeruginosa* multirresistente. Después del tratamiento con bacteriófagos, la SEM reveló una alteración de la biopelícula y restos celulares, además de identificar una reducción significativa de la biopelícula (114).

Después de corroborar el reconocimiento del inmunosensor por la bacteria, el siguiente paso fue conocer si la respuesta a distintas concentraciones de bacteria podía ser determinada FT-IR, por lo tanto, se realizaron diluciones de la bacteria para exponerlas al inmunosensor y se contabilizaron.

En la figura 24A se muestra la respuesta espectral del inmunosensor a distintas concentraciones de bacteria (10^{-1} a 10^{-7} UFC·mL^{-1}) por triplicado. Se observan bandas mencionadas anteriormente, 2934 cm^{-1} correspondiente a los metilenos, 1651 y 1553 cm^{-1} de las amidas I y II, 1465 cm^{-1} a la deformación de proteínas (banda asociada al reconocimiento de la bacteria por el inmunosensor) y 1074 cm^{-1} de los silicios. Se observó que la absorbancia de la banda de 1465 cm^{-1} que representa la flexión de C—H_2 y C—H_3 de las proteínas (100,101) se correlaciona con la concentración de bacterias en la detección. La intensidad disminuye al decrementar la concentración de la muestra (115).

En la figura 24B se muestra un acercamiento a la región comprendida entre 1650 a 1350 cm^{-1}, donde se identifica un cambio en la altura máxima de la banda en 1465 cm^{-1}, observándose en la dilución 10^{-1} UFC·mL^{-1} mayor altura y 10^{-7} UFC·mL^{-1} en lo más bajo, por lo que existe una correlación entre la altura de la banda y la concentración de la bacteria adherida al inmunosensor.

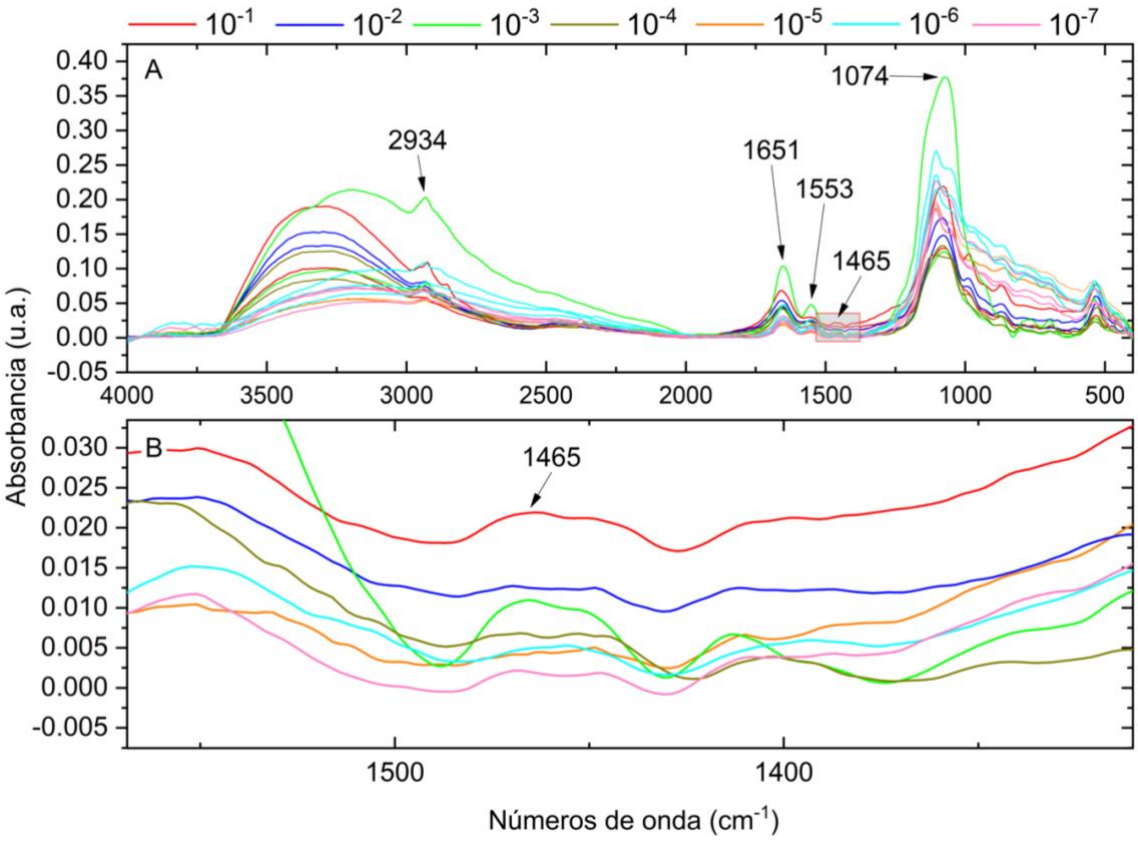


Figura 24. Análisis de espectros FT-IR de los inmunosensores + *P. aeruginosa* a distintas concentraciones de bacteria (10^{-1} a 10^{-7} UFC·mL^{-1}). A) Agrupación de espectros a distintas concentraciones; B) Acercamiento a la región entre 1650 a 1350 cm^{-1}.

La banda en 1465 cm^{-1} mostró una correlación positiva entre la altura del pico y la concentración de la bacteria adherida al inmunosensor. Se calcularon las alturas de las bandas correspondientes a las diferentes concentraciones de *P. aeruginosa* y se realizó una curva de calibración mediante regresión lineal, la cual se observa en la Figura 25. El intervalo de confianza nos permite estimar entre que valores se encuentran los valores reales con una probabilidad de error del 5% (116), en otras palabras, una confianza del 95 % de que el valor promedio de Y sea válido para un valor X. Se aprecia que un valor del gráfico tiende al límite del intervalo de confianza; los valores en los extremos son menos confiables.

El coeficiente de correlación (R^2) es una medida estadística de que tan bien se aproxima la línea de regresión a los datos reales, su función es predecir resultados o probar hipótesis (117). La R^2 del gráfico fue de 0.9219 que indica que el modelo es

válido.

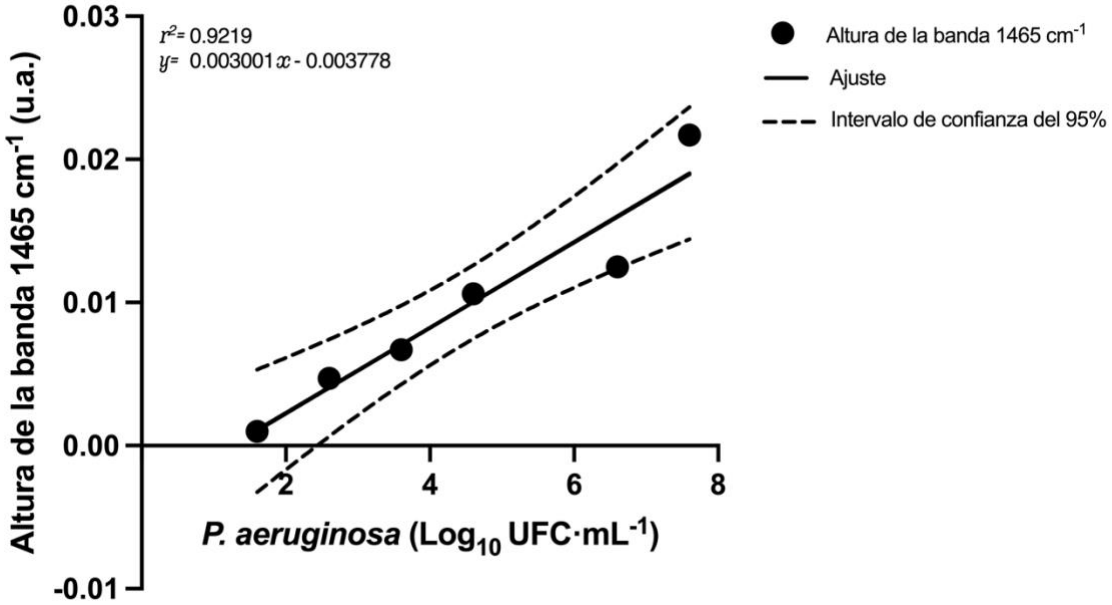


Figura 25. Curva de calibración de la cuantificación de *P. aeruginosa*.

A partir de los resultados de SEM y FT-IR se comprueba que el ensamblaje del inmunosensor se lleva a cabo de manera exitosa; y que la banda de 1465cm^{-1} tiene una respuesta lineal directa entre su altura y la concentración de *P. aeruginosa* a la que se expone el inmunosensor por lo que podría ser utilizada para la cuantificación.

Estos resultados indican que el dispositivo tiene la capacidad para detectar en una concentración de 200 UFC·mL^{-1} (~4 UFC en muestra) lo que presenta un alto grado de sensibilidad.

Aunque la sensibilidad del inmunosensor es importante, se han desarrollado biosensores contra *P. aeruginosa* que presentan una mejor sensibilidad; Das et al., 2019 (61) presenta un biosensor que detecta 60 UFC·mL^{-1}, Yue et al., 2017 (56) detectan 56 UFC·mL^{-1}, Sarabaegi et al., 2019 (60) presentan un biosensor con sensibilidad de 3 UFC·mL^{-1}, Zhang et al., 2019 (63) detectan 2 UFC·mL^{-1} y Hu et al., 2018 (59) son capaces de detectar 1 UFC·mL^{-1}, sin embargo, la sensibilidad.

Si bien el análisis por regresión lineal es un método válido, podría no ser el óptimo para las predicciones de espectros, pues podría existir cierta incertidumbre en las predicciones.

6.5 Ensayos de especificidad de los inmunosensores.

Con el fin de conocer la respuesta espectral de los inmunosensores ante posibles reconocimientos inespecíficos se probaron tres bacterias: *E. coli* (Gram negativa), *S. aureus* (Gram positiva) y *B. subtilis* (Gram positiva), los microorganismos se sensaron siguiendo las mismas condiciones empleadas con *P. aeruginosa*.

Los espectros obtenidos por FT-IR se muestras en la figura 26. No se observan cambios significativos en relación con el espectro del inmunosensor. *E. coli* (26B) muestra un patrón idéntico al del inmunosensor (26A), en el caso de las bacterias Gram positivas (26C y 26D) no se observan cambios significativos con respecto al espectro del inmunosensor a diferencia de un espectro de *B. subtilis*, la banda de color azul marino presenta una diferencia marcada con todas las demás, presentando una amplitud del pico entre 1200 y 600 cm^{-1}, sin embargo, esta región está principalmente constituida por componentes del propio inmunosensor, lo que implicaría una red más amplia de aminosilanos (24,75,94), por lo que la respuesta no estaría relacionada directamente con la detección de *B. subtilis*

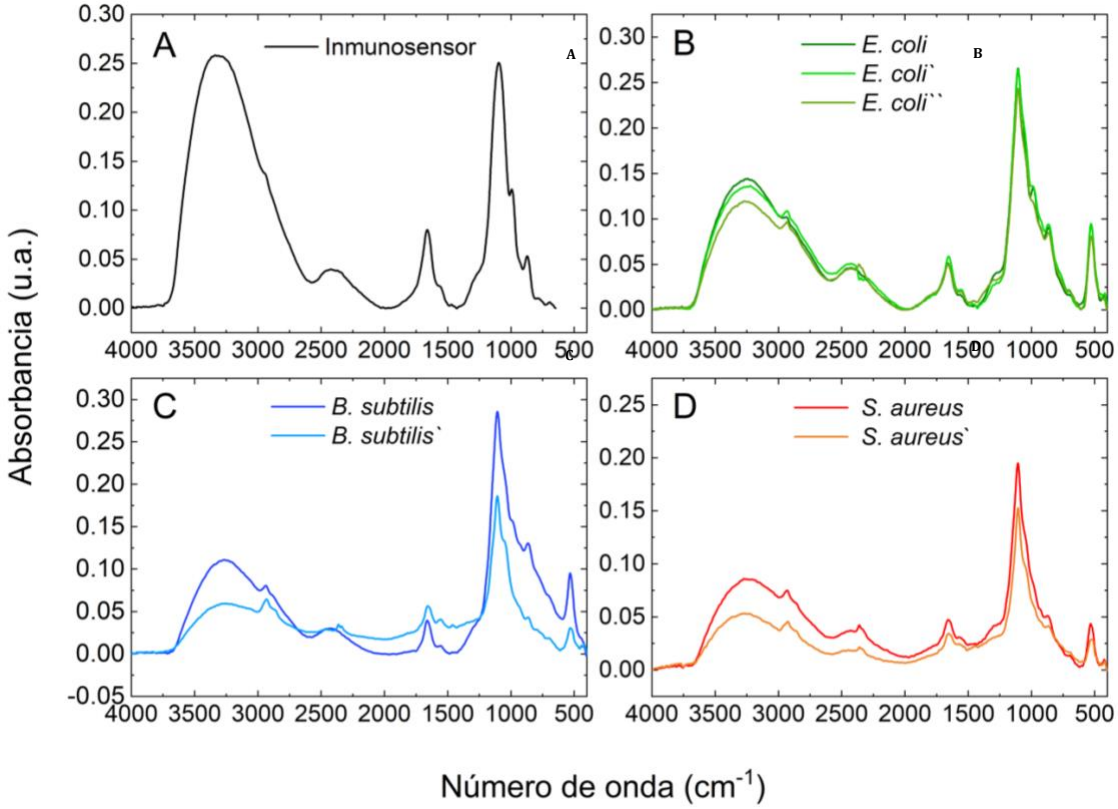


Figura 26. Espectros FT-IR de bacterias control. A) Espectro del inmunosensor; B) Espectros del inmunosensor con *E. coli.* C) Espectros del inmunosensor con *B. subtilis* y D) Espectros del inmunosensor con *S. aureus.*

En la figura 27 se graficaron los espectros de cada bacteria control junto con el inmunosensor, se destacan las bandas en 1659 y 1570 cm^{-1} correspondientes a las bandas Amida I y II, las bandas en 1107 cm^{-1} (υ_{as} Si-O-Si), 991 cm^{-1} (υ Si-O-C), 866 cm^{-1} (υ Si-OH) y 532 cm^{-1} (υ Si-O) pertenecen al silicio del inmunosensor. No se presentan cambios significativos en la altura de algún pico relevante o la aparición de una nueva banda que sea característica de cada bacteria. La banda 1570 cm^{-1} no presenta cambios significativos y la banda 1665 cm^{-1} no está presente en los inmunosensores con otras bacterias, mientras que en los resultados con *P. aeruginosa*, la región 1700 – 1400 cm^{-1} es fundamental para la identificación puesto que presenta mayor variación para la identificación de *P. aeruginosa.* Los resultados demuestran que los anticuerpos presentan especificidad sobre *P. aeruginosa.*

A pesar de lo anterior, no se puede descartar por completo uniones inespecíficas que, aunque de manera minoritaria pudiesen darse no entre el anticuerpo expuesto

y las bacterias, sino en zonas del inmunosensor en donde el recubrimiento del anticuerpo fuese escaso, como lo constituyen las zonas cercanas a las orillas del soporte del SiO_2 cristalino. Por ejemplo, si en algún caso, el glutaraldehído pudiese quedar expuesto, este es capaz de unir a una bacteria mediante una base de Schiff (enlace imina) con cualquier proteína que se encuentre en la superficie de la pared celular bacteriana de manera covalente e inespecífica (118,119).

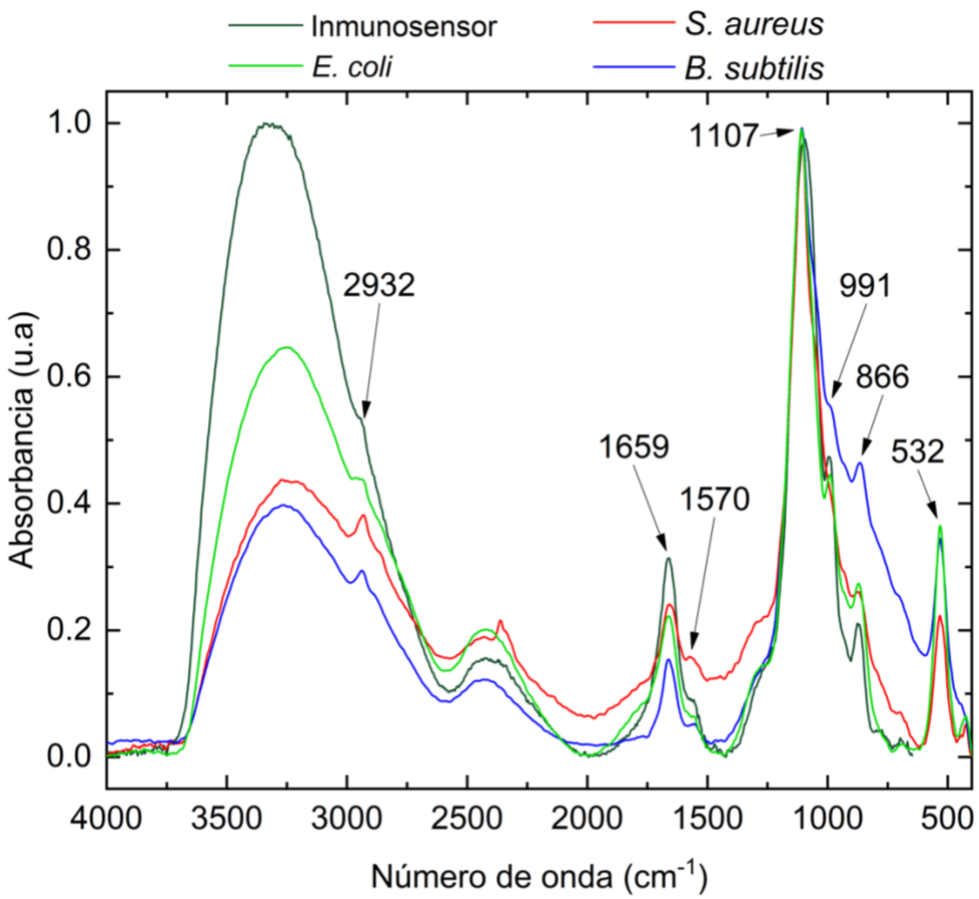


Figura 27. Espectros FT-IR que muestran la especificidad del inmunosensor. Negro - espectro del inmunosensor; verde – inmunosensor evaluado con *E. coli*; rojo – inmunosensor evaluado con *S. aureus* y azul – inmunosensor evaluado con *B. subtilis.*

6.6 Análisis predictivo de espectros mediante redes neuronales artificiales y clasificación por Naive Bayes.

Como ya se ha demostrado en secciones anteriores, la altura de la banda de 1465 cm^{-1} proporciona una respuesta lineal directa en la concentración de *P. aeruginosa* expuesta al inmunosensor. Sin embargo, existen más metodologías de análisis cuantitativo que puede utilizarse para el análisis espectral, las cuales incluyen: el análisis multivariado y la clasificación empleando diferentes algoritmos (120–122). Aunque todas ellas requieren de un gran número de espectros para lograr modelos predictivos sólidos, se decidió explorar su potencial para el análisis cuantitativo de los inmunosensores.

Los análisis subsecuentes fueron llevados a cabo empleando Quasar, un software multiplataforma basado en Python que cuenta con liberarías para bio-espectroscopía. La característica más distintiva del software consiste en que los análisis se realizan a través de flujos de trabajo (*workflows*). El workflow de quasar permite la conexión de los datos de entrada (espectros) con operadores que procesan, modelan o visualizan los datos y proporcionan información de forma casi inmediata(123).

El flujo de trabajo empleado para el análisis de los inmunosensores se muestra en la figura 28. La estrategia que se siguió consiste en realizar los mismos análisis a los mismos espectros normalizados y sin normalizar, esto para verificar si éste paso pudiese ser importante al momento de proporcionar mayor exactitud en el resultado o, en su defecto, introducir incertidumbre.

La evaluación de los promedios se hizo empleando 2 categorías: inmunosensor con *P. aeruginosa* e inmunosensor con bacterias control (*E. coli, S. aureus* y *B. subtilis)*, para esto, se delimitó la región de 1800 a 500 $cm^{-1.}$ La figura 29 muestra los promedios de los espectros sin normalizar. La figura 30 muestra el promedio de los espectros normalizados.

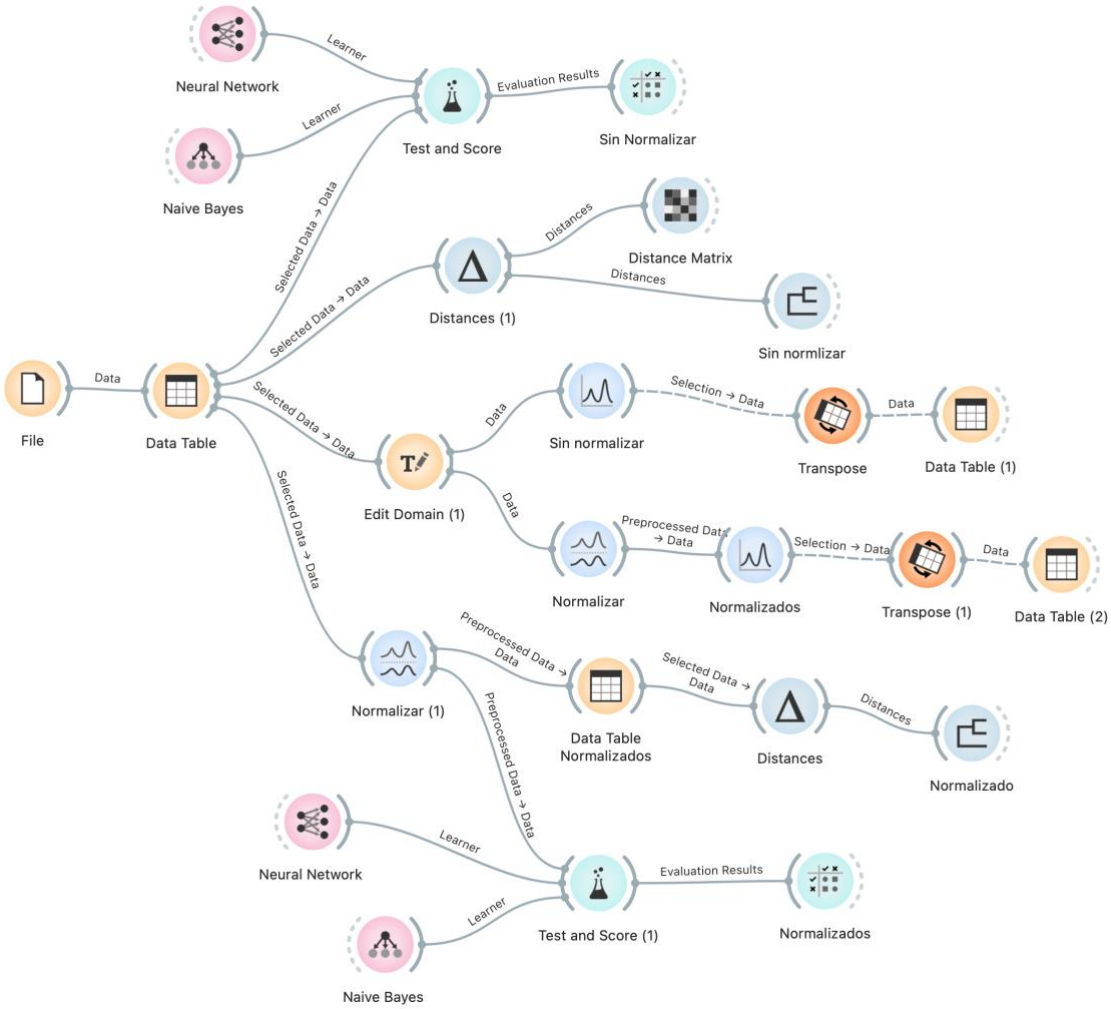


Figura 28. Workflow realizado en Quasar para el análisis de los espectros. Se introdujeron los espectros como datos de entrada; se utilizaron operadores para la normalización, visualización, clustering y clasificación en base a las características de cada espectro.

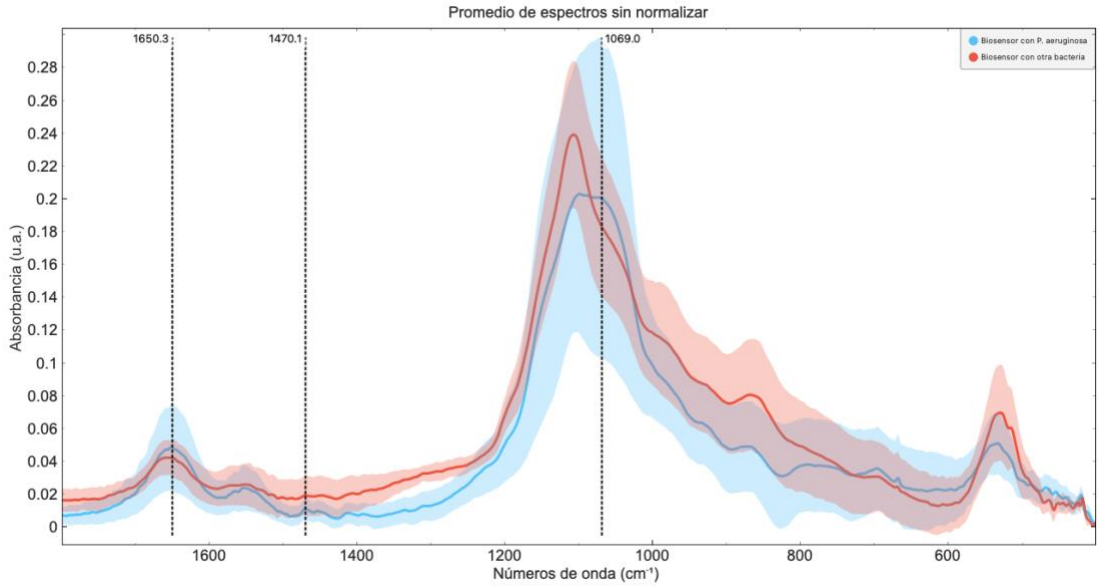


Figura 29. Promedios de espectros sin normalizar. Promedio de espectros de inmunosensores con *P. aeruginosa* (azul); promedios de espectros con otra bacteria (rojo).

La figura 29 muestra una mayor altura en la banda 1659 cm^{-1} de la amida I, una disminución en la banda 1470 cm^{-1} de los lípidos y un desplazamiento hacia 1069 cm^{-1} relacionada con ácidos nucleicos.

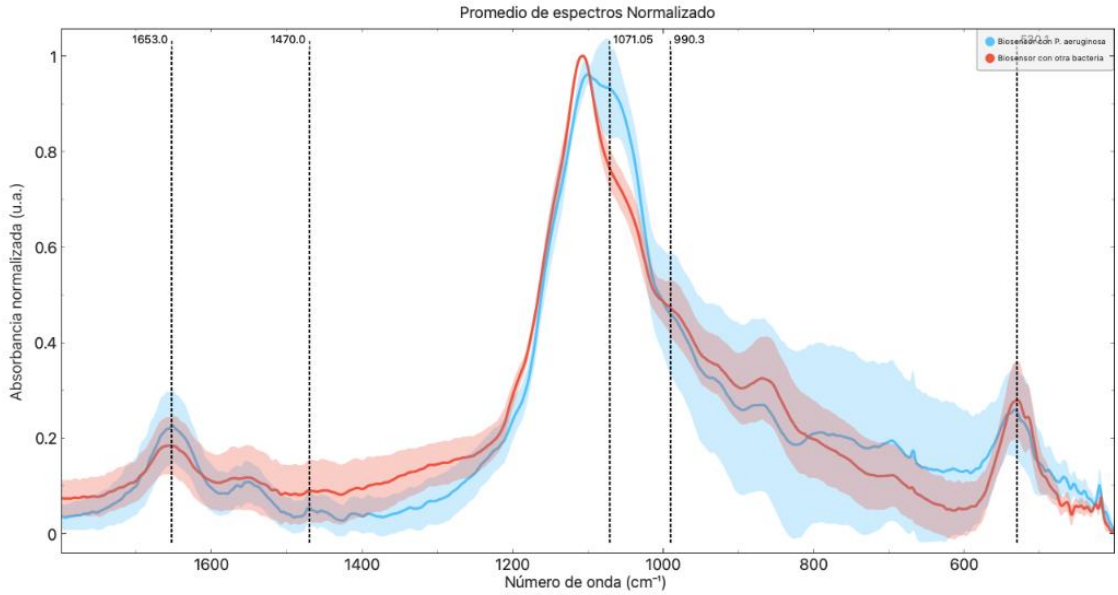


Figura 30. Promedios de espectros normalizados. Promedio de espectros de inmunosensores con *P. aeruginosa* (azul); promedios de espectros con otra bacteria (rojo).

En el caso de la figura 30 se observan cambios en las bandas 1653, 1470,1071 cm^{-1},

además, los espectros del inmunosensor con *P. aeruginosa* presenta una variación mayor en la región de 990 a 530 cm^{-1} (huella dactilar) con respecto al espectro de los inmunosensores con otra bacteria. Estos cambios permiten una identificación más precisa mediante FT-IR.

Los análisis basados en *test & score* consistieron en clasificar a los espectros de acuerdo con su concentración respectiva de *P. aeruginosa* empleando dos clasificadores: redes neuronales artificiales y Bayesiano ingenuo; además se realizó un análisis de agrupamiento (*clustering*). Los resultados se presentan en las tablas 10 y 12 (sin normalizar) y tablas 11 y 13 (normalizados).

Los espectros introducidos al flujo de trabajo representan los datos de entrada; las redes neuronales permiten la conexión entre los nodos que realizan el procesamiento de datos, esto permite obtener las matrices de las tablas 10 y 12 (124). Con esto se logró identificar la precisión de la red neuronal, predecir el tipo de espectro a partir de nuevos datos de entrada. Esto facilita la clasificación de cada espectro dentro de nuestro trabajo.

La tabla 10 muestra los resultados de predicción sin normalizar, observamos una agrupación del 100% en 10^{-1} UFC/mL, mientras que en las concentraciones 10^{-2} a 10^{-5} UFC/mL se obtiene una predicción acertada de máximo 66.70%. Cuando el inmunosensor evalúa las menores concentraciones no presenta un porcentaje de predicción. Las redes neuronales son capaces de distinguir en 100% los espectros de los inmunosensores con *E. coli*; esto podría determinarse por presentar unión inespecífica.

Tabla 10. Matriz de predicción basadas en redes neuronales sin normalizar. Solo se muestran valores ≠ 0%

		Predicha										
		10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**	**10^{-7}**	***B. subtilis***	***E. coli***	***S. aureus***	**Σ**
Real	**10^{-1}**	100.00 %					NA				50.00 %	**3**

10^{-2}		66.70%		33.30 %		NA					**3**
10^{-3}		33.30%	50.00%			NA					**3**
10^{-4}			25.00%	66.70 %		NA					**3**
10^{-5}					66.70 %	NA	50.00 %				**3**
10^{-6}						NA	50.00 %				**1**
10^{-7}			25.00%		33.30 %	NA					**2**
B. subtilis						NA		33.30 %		50.00 %	**3**
E. coli						NA		16.70 %	100.00%		**3**
S. aureus						NA		50.00 %			**3**
Σ	**2**	**3**	**4**	**3**	**3**	**0**	**2**	**6**	**2**	**2**	**27**

En la matriz de redes neuronales para la predicción de espectros normalizados (tabla 11) se muestra una única variación en la predicción de espectros a la concentración de 10^{-5} UFC/mL, con un aumento hasta del 75%. Permitiendo una clasificación más acertada que los espectros sin normalizar.

Tabla 11. Matriz de predicciones basadas en redes neuronales normalizadas. Solo se muestran valores ≠ 0%

		Predicha										
		10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**	**10^{-7}**	***B. subtilis***	***E. coli***	***S. aureus***	**Σ**
Real	**10^{-1}**	100.00 %							16.70%			**3**
	10^{-2}		66.70 %	25.00 %								**3**
	10^{-3}			50.00 %	33.30%							**3**
	10^{-4}		33.30 %		66.70%							**3**
	10^{-5}					75.00 %						**3**
	10^{-6}						NA	100.00 %				**1**
	10^{-7}			25.00 %		25.00 %		0.00%				**2**
	B. subtilis								33.30%		100.00 %	**3**
	E. coli									100.00 %		**3**
	S. aureus								50.00%		0.00%	**3**
	Σ	**2**	**3**	**4**	**3**	**4**	**0**	**1**	**6**	**3**	**1**	**27**

El aumento en la potencia informática ha permitido desarrollar modelos de redes neuronales artificiales basados en datos; esto ha llevado al aumento en el diagnóstico asistido por computadora que combinan algoritmos y/o métodos de reconocimiento de imágenes. Las redes neuronales requieren menos suposiciones previas y logran una alta precisión. Son adecuados para resolver problemas no lineales e inciertos (124). Las redes neuronales artificiales se conforman por nodos agrupados en capas interconectadas. La formación de la red consta de dos pasos diferentes; la propagación de la alimentación y la retropropagación. La red neuronal proporciona salidas basadas en las entradas. Las salidas de la red neuronal se comparan con las salidas reales y se calcula el error (125).

Teniendo en cuenta la complejidad molecular de los especímenes biológicos, se utilizan redes neuronales artificiales que combinan algoritmos estadísticos y matemáticos que genera evidencia quimio física a partir de datos espectrales(126).

Los clasificadores Bayesianos ingenuos están diseñados para hacer predicciones basadas en la presencia o ausencia de ciertas características dentro de una clase. Asume que la presencia o ausencia de una característica es independiente de la presencia o ausencia de cualquier otra característica (de allí el término 'ingenuo'). A pesar de su enfoque aparentemente simplista, los clasificadores Bayesianos ingenuos pueden funcionar sorprendentemente bien en escenarios complejos del mundo real donde se consideran múltiples variables independientes para la predicción u ocurrencia de eventos (127).

En este caso las matrices bayesianas nos permitieron una clasificación más acertada en comparación que las redes neuronales. La tabla 12 nos muestra la matriz bayesiana de los espectros sin normalizar, observamos que presentan una clasificación del 100% en concentraciones de 10^{-1} a 10^{-4} UFC·mL^{-1}, una predicción del 66.7 % en 10^{-5} UFC·mL^{-1}, sin embargo, sigue sin poder clasificar menores concentraciones. En cuestión del inmunosensor probado con bacterias distintas a *P. aeruginosa* se observa una clasificación del 100% para *B. subtilis* y *E. coli*, mientras que la clasificación de *S. aureus* está en 66.7%

Tabla 12. Matriz bayesiana sin normalizar. Solo se muestran valores ≠ 0%.

		Predicted										
		10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**	**10^{-7}**	***B. subtilis***	***E. coli***	***S. aureus***	**Σ**
Actual	**10^{-1}**	100.00 %					16.70%					**3**
	10^{-2}		100.00 %				16.70%					**3**
	10^{-3}			100.00 %			16.70%					**3**
	10^{-4}				100.00 %		16.70%					**3**
	10^{-5}					66.70 %		50.00%				**3**
	10^{-6}						0.00%	50.00%				**1**
	10^{-7}					33.30 %	16.70%	0.00%				**2**
	B. subtilis								100.00%		33.30%	**3**
	E. coli									100.00 %		**3**
	S. aureus						16.70%				66.70%	**3**
	Σ	**2**	**2**	**2**	**2**	**3**	**6**	**2**	**2**	**3**	**3**	**27**

La tabla 13 muestra los valores de la matriz bayesiana con espectros normalizados, observamos que la clasificación de 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-4} UFC·mL^{-1} presentan un valor del 100%, mientras que 10^{-3} y 10^{-5} UFC·mL^{-1} tienen valores de 66.7% y 60% respectivamente. Se observan 2 cambios significativos en la matriz normalizada comparando con la matriz sin normalizar, la capacidad de predicción de las concentraciones 10^{-3} y 10^{-5} disminuye; por lo tanto, la regresión bayesiana sin normalizar los espectros nos proporciona mejores valores de clasificación.

En la predicción de los inmunosensores con bacterias distintas a *P. aeruginosa* se observan valores similares para *B. subtilis* y *E. coli,* mientras que para *S. aureus* presenta una disminución hasta el 60%.

Tabla 13. Matriz de bayesiana de predicciones normalizada. Solo se muestran valores ≠ 0%.

		Predicho										
		10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**	**10^{-7}**	***B. subtilis***	***E. coli***	***S. aureus***	**Σ**
Actual	**10^{-1}**	100.00 %									20.00%	**3**
	10^{-2}		100.00%				16.70 %					**3**
	10^{-3}			66.70 %			16.70 %					**3**

10^{-4}				100.00%		16.70 %					**3**
10^{-5}					60.00%						**3**
10^{-6}			33.30 %			0.00%					**1**
10^{-7}					20.00%	16.70 %	NA				**2**
B. subtilis					20.00%			100.00 %		20.00%	**3**
E. coli						33.30 %			100.00 %		**3**
S. aureus										60.00%	**3**
∑	**2**	**2**	**3**	**2**	**5**	**6**	**0**	**1**	**1**	**5**	**27**

Los modelos de predicción están adquiriendo cada vez más importancia en la práctica clínica, como lo demuestra el creciente número de publicaciones que describen su desarrollo(128). Uno de sus principales objetivos es ayudar en la toma de decisiones clínicas combinando las características del paciente para determinar la probabilidad de un trastorno o problema en particular, como el diagnóstico y el pronóstico. En este caso se emplea como auxiliar en el diagnóstico acertado contra *P. aeruginosa*.

La clasificación basada en Naive Bayes tiene tres ventajas únicas sobre otros clasificadores. En primer lugar, su estructura está predefinida y, por tanto, no se necesita ningún aprendizaje estructurado. En segundo lugar, es muy eficiente y puede manejar una gran cantidad de conjuntos de datos, especialmente cuando las características no están fuertemente correlacionadas. Finalmente, sólo se requiere una pequeña cantidad de datos de entrenamiento para estimar los parámetros necesarios (129).

Se realizó finalmente un análisis de clustering basado en Spearman para la clasificación de espectros; esto basándose en ciertas características presentes en cada espectro. El análisis se hizo con los datos normalizados y sin normalizar, sin embargo, no presentaron diferencias significativas entre ambos casos.

En la figura 31 se muestra el árbol resultado del clustering. Se observa un agrupamiento independiente en los sensados de los controles negativos, logrando discriminar entre inmunosensor con *P. aeruginosa* y las bacterias control. Este

Análisis permite visualizar la clasificación de las distintas concentraciones 10^{-1} (UNO), 10^{-2} (DOS), 10^{-3} (TRES), 10^{-4} (CUATRO), 10^{-5} (CINCO), 10^{-6} (SEIS) y 10^{-7} (SIETE) de bacteria, fungiendo como un complemento clave para la identificación acertada.

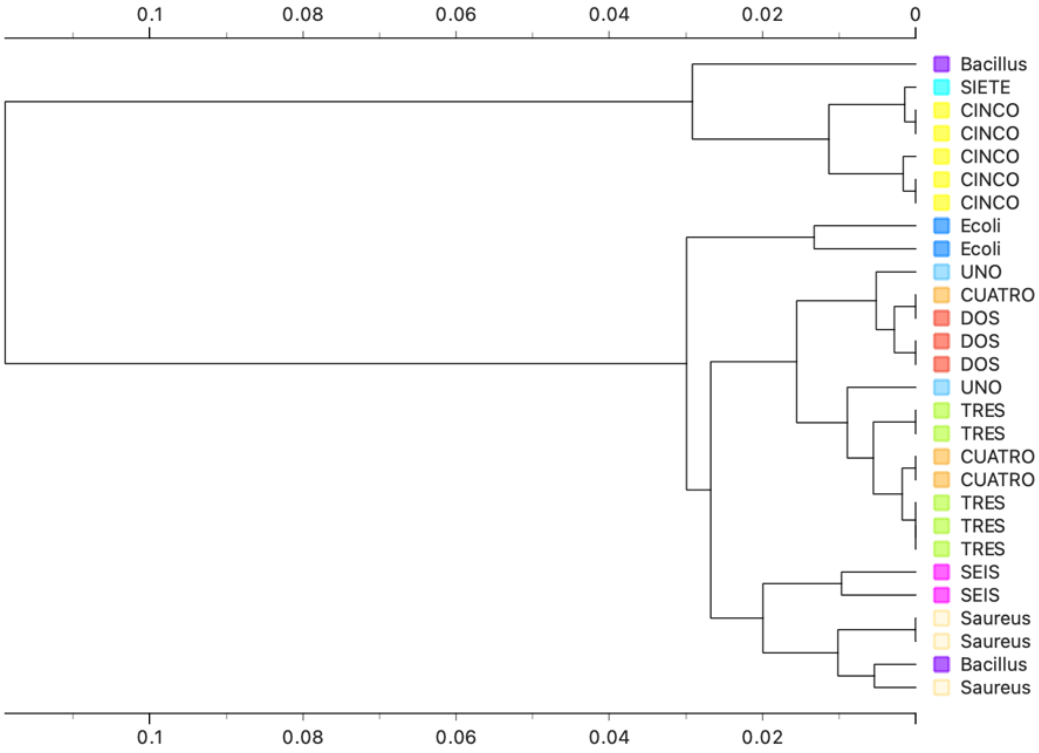


Figura 31. Análisis por clustering en Quasar. Cada categoría se muestra de distinto color, el análisis se realizó con el banco de espectros generados durante el proyecto de tesis.

El clúster de espectroscopía infrarrojo refleja la similitud fisicoquímica de los espectros en función de su similitud matemática(130). La correlación Spearman es esencialmente la reciprocidad entre funciones de distribución acumulativa para variables continuas, también conocida como correlación de grados (131).

La métrica de Spearman es apropiada para describir la tendencia general de todo el espectro; He K., 2021 (132) realizaron la agrupación de espectros infrarrojos de sustancias psicoactivas mediante medidas estadísticas Pearson y Spearman; la métrica Spearman presentó una mejor agrupación.

Dubrovkin J., 2024 (130) investigó la aplicación de la inteligencia artificial en métodos de espectroscopía, demostrando que el *clustering* de prones podría ser un método de comprensión para bases de datos espectrales.

Al evaluar los espectros mediante métodos no lineales podemos establecer lo siguiente: la visualización de los espectros normalizados permite hacer una mejor clasificación sobre la respuesta del inmunosensor tomando en cuenta 2 categorías: inmunosensor evaluado con *P. aeruginosa* e inmunosensor evaluado con otras bacterias, esto a través del desplazamiento y cambios en ciertas bandas como 1653 cm^{-1}, 1470 cm^{-1} y 1071 cm^{-1}.
En las matrices de predicción basada en redes neuronales, los espectros normalizados presentaron un mejor análisis consiguiendo valores mayores de predicción, caso contrario a las matrices de predicción bayesianas, donde los espectros sin normalizar mostraron mejores resultados, proporcionando una detección del 100% en los espectros a concentración 10^{-1} hasta 10^{-4} UFC/mL y un 66.7% en 10^{-5} UFC/mL, teniendo una mejor clasificación incluso que las redes neuronales con los espectros normalizados. Para ambos métodos, no se presentaron valores de predicción para las concentraciones más bajas (10^{-6} y 10^{-7} UFC/mL), por lo tanto, esto métodos presentan un mínimo de detección hasta 10^{-5} UFC/mL. Finalmente, el clustering permite hacer agrupaciones de los espectros, siendo un excelente complemento para la correcta identificación y cuantificación de *P. aeruginosa* con el inmunosensor.

El método lineal presenta una mayor sensibilidad al tener un mínimo de detección de 10^{-7} UFC/mL, sin embargo, estos datos pueden quedar en la incertidumbre o no ser del todo verdadero, estos resultados se sustentan de un solo método. Por otro lado, los análisis por métodos no lineales que son: visualización de espectros normalizados, predicción por redes neuronales (normalizados), clustering de espectros a distintas concentraciones y predicción mediante matriz bayesiana (mejores resultados), estos mostraron mejores resultados para discriminar respuesta del inmunosensor con las bacterias control, no obstante, a través de estos métodos la sensibilidad disminuye hasta 10^{-5} UFC/mL, pese a ello, el sistema es capaz de identificar con certeza la concentración presente de *P. aeruginosa.*

Conclusiones

7

En este trabajo de tesis se logró:

- Desarrollar un inmunosensor para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* empleando anticuerpos inmovilizados sobre SiO_2 cristalino, mediante el sistema estreptavidina-biotina.
- Identificar la producción de pioverdina y piocianina a través de medios King A y King B.
- Identificar a la cepa 38, mediante aproximación filogenética, correspondiente a *P. aeruginosa.*
- Evidenciar la resistencia a antibióticos de las cepas 38 (AM, CB, CF, CFX, Net, CL, STX y NF) y 39 (AM, CB, CF, CFX, NET, CL, CPF STX y NF), presentando una resistencia del 83.33% y 92.66% respectivamente a los antibióticos totales del disco.
- Caracterizar a *P. aeruginosa* mediante FT-IR.
- Estandarizar las condiciones para el ensamblado del inmunosensor.
- Detectar *P. aeruginosa* con el inmunosensor mediante la espectroscopia FT-IR y SEM.
- Construir una curva de calibración por métodos lineales que permite cuantificar a *P. aeruginosa* en el inmunosensor hasta una concentración de 10^{-7} UFC/mL.
- Lograr una clasificación hasta una concentración de 10^{-5} UFC/mL a través de métodos no lineales.
- Diseñar un inmunosensor con alta especificidad, sin embargo, no descartamos la posible adherencia inespecífica con otras bacterias por el uso de anticuerpos policlonales.

Bibliografía

8

1. Wilson MG, Pandey S. Pseudomonas aeruginosa. Universitas Hasanudin [Internet]. 2023 Aug 8 [cited 2023 Sep 18];1–18. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/
2. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R, et al. Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista chilena de infectología [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 Sep 18];36(2):180–9. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180&lng=es&nrm=iso&tlng=es
3. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A. Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. Postepy Hig Med Dosw [Internet]. 2017 Feb 14 [cited 2023 Sep 18];71:78–91. Available from: https://phmd.pl/icid/1231507
4. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Int J Mol Sci [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2024 Jan 22];21(22):1–25. Available from: /pmc/articles/PMC7698413/
5. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS. Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa Biofilm: A Review. Pathogens 2022, Vol 11, Page 300 [Internet]. 2022 Feb 27 [cited 2023 Sep 18];11(3):300. Available from: https://www.mdpi.com/2076-0817/11/3/300/htm
6. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol 21, Page 8671 [Internet]. 2020 Nov 17 [cited 2023 Sep 18];21(22):8671. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8671/htm
7. Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, et al. The environmental occurrence of Pseudomonas aeruginosa. APMIS [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Sep 26];128(3):220–31. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apm.13010
8. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. Drugs 2021 81:18 [Internet]. 2021 Nov 7 [cited 2023 Sep 18];81(18):2117–31. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-021-01635-6
9. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. Pseudomonas aeruginosa. Molecular Medical Microbiology. 2015 Jan 1;753–67.
10. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy 2022 7:1 [Internet]. 2022 Jun 25 [cited 2023 Sep 18];7(1):1–27. Available from: https://www.nature.com/articles/s41392-022-01056-1
11. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. 2017 [cited 2024 Mar 3]. Available from: https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-

bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed
12. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019 Jan 1;37(1):177–92.
13. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol [Internet]. 2018 [cited 2024 Jan 22];4(3):482. Available from: /pmc/articles/PMC6604941/
14. Bolivar-Vargas AF, Torres-Caycedo MI, Sánchez-Neira Y. Vista de Biofilms de Pseudomonas aeruginosa como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca [Internet]. 2021 [cited 2023 Sep 18];23:47–57. Available from: https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/1780/1542
15. Smith WD, Bardin E, Cameron L, Edmondson CL, Farrant K V., Martin I, et al. Current and future therapies for Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Sep 26];364(14):121. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnx121
16. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. Pseudomonas aeruginosa: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. Future Microbiol. 2015 Oct 1;10(10):1683–706.
17. Xie Y, Xie G, Yuan J, Zhang J, Yang Y, Yao Y, et al. A novel fluorescence biosensor based on double-stranded DNA branch migration-induced HCR and DNAzyme feedback circuit for sensitive detection of Pseudomonas aeruginosa (clean version). Anal Chim Acta. 2022 Nov 1;1232:340449.
18. Turner APF. Biosensors: sense and sensibility. Chem Soc Rev [Internet]. 2013 Mar 25 [cited 2023 Sep 26];42(8):3184–96. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/cs/c3cs35528d
19. Coulet PR. What is a biosensor? Bioprocess Technol [Internet]. 1991 Aug 28 [cited 2023 Sep 18];15:1–6. Available from: https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780367810849-1/biosensor-pierre-coulet
20. Khatami SH, Karami S, Siahkouhi HR, Taheri-Anganeh M, Fathi J, Aghazadeh Ghadim MB, et al. Aptamer-based biosensors for Pseudomonas aeruginosa detection. Mol Cell Probes. 2022 Dec 1;66:101865.
21. Castillo-Henríquez L, Brenes-Acuña M, Castro-Rojas A, Cordero-Salmerón R, Lopretti-Correa M, Vega-Baudrit JR. Biosensors for the Detection of Bacterial and Viral Clinical Pathogens. Sensors 2020, Vol 20, Page 6926 [Internet]. 2020 Dec 4 [cited 2023 Sep 18];20(23):6926. Available from: https://www.mdpi.com/1424-8220/20/23/6926/htm
22. Chen C, Wang J. Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. Analyst [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2023 Oct 3];145(5):1605–28. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/an/c9an01998g
23. Hermanson GT. Silane Coupling Agents. Bioconjugate Techniques. 2013 Jan 1;535–48.
24. Aissaoui N, Bergaoui L, Landoulsi J, Lambert JF, Boujday S. Silane layers on silicon surfaces: Mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption. Langmuir [Internet]. 2012 Jan 10 [cited 2024 Mar 17];28(1):656–65. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/la2036778
25. Bu T, Huang Q, Yan L, Zhang W, Dou L, Huang L, et al. Applicability of biological dye tracer in strip biosensor for ultrasensitive detection of pathogenic bacteria. Food Chem. 2019 Feb 15;274:816–21.

26. Aydin M, Aydin EB, Sezgintürk MK. Advances in immunosensor technology. Adv Clin Chem. 2021 Jan 1;102:1–62.
27. Karunakaran C, Pandiaraj M, Santharaman P. Immunosensors. Biosens Bioelectron. 2015 Jan 1;205–45.
28. Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. Essays Biochem [Internet]. 2016 Jun 6 [cited 2024 Jan 22];60(1):9. Available from: /pmc/articles/PMC4986469/
29. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Neurología. 2011 Jun 1;26(5):301–6.
30. Vashist SK, Lam E, Hrapovic S, Male KB, Luong JHT. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. Chem Rev [Internet]. 2014 Nov 12 [cited 2023 Oct 4];114(21):11083–130. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr5000943
31. Smith BC. Introduction to Infrared Spectroscopy. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 2011 Apr 13;15–32.
32. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. Appl Spectrosc Rev [Internet]. 2008 [cited 2023 Sep 20];43(2):134–79. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701829043
33. Nandiyanto ABD, Oktiani R, Ragadhita R. How to Read and Interpret FTIR Spectroscope of Organic Material. Indonesian Journal of Science and Technology [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2023 Sep 20];4(1):97–118. Available from: https://ejournal.upi.edu/index.php/ijost/article/view/15806
34. Maity JP, Kar S, Lin CM, Chen CY, Chang YF, Jean JS, et al. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013 Dec 1;116:478–84.
35. Kenne G, Merwe D van der. Classification of Toxic Cyanobacterial Blooms by Fourier-Transform Infrared Technology (FTIR). Adv Microbiol [Internet]. 2013 Oct 24 [cited 2023 Oct 11];2013(06):1–8. Available from: http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=37921
36. Zarnowiec P, Lechowicz L, Czerwonka G, Kaca W. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a Tool for the Identification and Differentiation of Pathogenic Bacteria. Curr Med Chem [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2024 Mar 11];22(14):1710–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760086/
37. Dziuba B, Babuchowski A, Nałecz D, Niklewicz M. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. Int Dairy J. 2007 Mar 1;17(3):183–9.
38. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2018 38:3 [Internet]. 2018 Nov 27 [cited 2024 Mar 11];38(3):427–48. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-018-3431-3
39. Chen Y, Liu J, Yang Z, Wilkinson JS, Zhou X. Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review. Biosens Bioelectron. 2019 Nov 1;144:111693.
40. Gunda NSK, Singh M, Norman L, Kaur K, Mitra SK. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. Appl Surf Sci. 2014 Jun 30;305:522–30.
41. Dixit CK, Vashist SK, MacCraith BD, O'Kennedy R. Multisubstrate-

compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. Nature Protocols 2011 6:4 [Internet]. 2011 Mar 10 [cited 2023 Oct 4];6(4):439–45. Available from: https://www.nature.com/articles/nprot.2011.304
42. Wang ZH, Jin G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. J Immunol Methods. 2004 Feb 15;285(2):237–43.
43. Udomsom S, Mankong U, Paengnakorn P, Theera-Umpon N. Novel rapid protein coating technique for silicon photonic biosensor to improve surface morphology and increase bioreceptor density. Coatings [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Oct 4];11(5):595. Available from: https://www.mdpi.com/2079-6412/11/5/595/htm
44. Ognjanović M, Stanković V, Knežević S, Antić B, Vranješ-Djurić S, Stanković DM. TiO2/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor. Microchemical Journal. 2020 Nov 1;158:105150.
45. Palimi MJ, Rostami M, Mahdavian M, Ramezanzadeh B. Surface modification of Cr2O3 nanoparticles with 3-amino propyl trimethoxy silane (APTMS). Part 1: Studying the mechanical properties of polyurethane/Cr2O3 nanocomposites. Prog Org Coat. 2014 Nov 1;77(11):1663–73.
46. Zhou M, Yang M, Zhou F. Paper based colorimetric biosensing platform utilizing cross-linked siloxane as probe. Biosens Bioelectron. 2014 May 15;55:39–43.
47. Lee JH, Kim JH, Choi K, Kim HG, Park JA, Cho SH, et al. Investigation of the mechanism of chromium removal in (3-aminopropyl)trimethoxysilane functionalized mesoporous silica. Scientific Reports 2018 8:1 [Internet]. 2018 Aug 13 [cited 2024 Feb 12];8(1):1–11. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-018-29679-x
48. Zhao Q, Wang Y, Zhang M, Wu D, Sun J, Yang X. A fluorescence turn-on biosensor utilizing silicon-containing nanoparticles: Ultra-sensitive sensing for α-glucosidase activity and screening for its potential inhibitors. Biosens Bioelectron. 2022 Oct 15;214:114504.
49. Bilgic A, Cimen A, Kursunlu AN, Karapınar HS, Guler E. Synthesis, characterization, and application of functionalized pillar[5]arene silica gel (Si-APTMS-pillar[5]arene) adsorbent for selectivity and effective removal of Cu(II) ion. J Mater Res [Internet]. 2022 Nov 14 [cited 2024 Feb 12];37(21):3587–98. Available from: https://link.springer.com/article/10.1557/s43578-022-00727-7
50. Starodub NF, Ogorodniichuk J, Lebedeva T, Shpylovyy P. Immune biosensors based on the SPR and TIRE: efficiency of their application for bacteria determination. https://doi.org/101117/122044648 [Internet]. 2013 Nov 18 [cited 2024 Feb 12];9032:211–4. Available from: https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9032/90320X/Immune-biosensors-based-on-the-SPR-and-TIRE--efficiency/10.1117/12.2044648.full
51. Xiao R, Rong Z, Long F, Liu Q. Portable evanescent wave fiber biosensor for highly sensitive detection of Shigella. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2014 Nov 11;132:1–5.
52. Suaifan GARY, Alhogail S, Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of Staphylococcus aureus. Biosens Bioelectron. 2017 Apr 15;90:230–7.
53. Narmani A, Kamali M, Amini B, Kooshki H, Amini A, Hasani L. Highly sensitive and accurate detection of Vibrio cholera O1 OmpW gene by fluorescence DNA biosensor based on gold and magnetic nanoparticles.

Process Biochemistry. 2018 Feb 1;65:46–54.
54. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH, Amini B. A fluorescence Nano-biosensors immobilization on Iron (MNPs) and gold (AuNPs) nanoparticles for detection of Shigella spp. Materials Science and Engineering: C. 2019 Dec 1;105:110113.
55. Kadadou D, Tizani L, Wadi VS, Banat F, Alsafar H, Yousef AF, et al. Recent advances in the biosensors application for the detection of bacteria and viruses in wastewater. J Environ Chem Eng. 2022 Feb 1;10(1):107070.
56. Yue H, He Y, Fan E, Wang L, Lu S, Fu Z. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of pseudomonas aeruginosa using phage as highly specific recognition agent. Biosens Bioelectron. 2017 Aug 15;94:429–32.
57. Wen KY, Cameron L, Chappell J, Jensen K, Bell DJ, Kelwick R, et al. A Cell-Free Biosensor for Detecting Quorum Sensing Molecules in P. aeruginosa-Infected Respiratory Samples. ACS Synth Biol [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2024 Feb 6];6(12):2293–301. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssynbio.7b00219
58. Cernat A, Tertis M, Gandouzi I, Bakhrouf A, Suciu M, Cristea C. Electrochemical sensor for the rapid detection of Pseudomonas aeruginosa siderophore based on a nanocomposite platform. Electrochem commun. 2018 Mar 1;88:5–9.
59. Hu J, Fu K, Bohn PW. Whole-Cell Pseudomonas aeruginosa Localized Surface Plasmon Resonance Aptasensor. Anal Chem [Internet]. 2018 Feb 6 [cited 2024 Feb 6];90(3):2326–32. Available from: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.7b04800
60. Sarabaegi M, Roushani M. A nano-sized chitosan particle based electrochemical aptasensor for sensitive detection of P. aeruginosa. Analytical Methods [Internet]. 2019 Nov 7 [cited 2024 Feb 6];11(43):5591–7. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ay/c9ay01509d
61. Das R, Dhiman A, Kapil A, Bansal V, Sharma TK. Aptamer-mediated colorimetric and electrochemical detection of Pseudomonas aeruginosa utilizing peroxidase-mimic activity of gold NanoZyme. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2019 Feb 20 [cited 2024 Feb 6];411(6):1229–38. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-1555-z
62. Alhogail S, Suaifan GARY, Bikker FJ, Kaman WE, Weber K, Cialla-May D, et al. Rapid Colorimetric Detection of Pseudomonas aeruginosa in Clinical Isolates Using a Magnetic Nanoparticle Biosensor. ACS Omega [Internet]. 2019 Dec 24 [cited 2024 Feb 6];4(26):21684–8. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.9b02080
63. Zhang X, Xie G, Gou D, Luo P, Yao Y, Chen H. A novel enzyme-free electrochemical biosensor for rapid detection of Pseudomonas aeruginosa based on high catalytic Cu-ZrMOF and conductive Super P. Biosens Bioelectron. 2019 Oct 1;142:111486.
64. Visaggio D, Pirolo M, Frangipani E, Lucidi M, Sorrentino R, Mitidieri E, et al. A Highly Sensitive Luminescent Biosensor for the Microvolumetric Detection of the Pseudomonas aeruginosa Siderophore Pyochelin. ACS Sens [Internet]. 2021 Sep 24 [cited 2024 Feb 6];6(9):3273–83. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssensors.1c01023
65. Martak D, Valot B, Sauget M, Cholley P, Thouverez M, Bertrand X, et al. Fourier-transform infra red spectroscopy can quickly type gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks. Front Microbiol. 2019 Jun 26;10(JUN):455902.
66. Maity JP, Kar S, Lin CM, Chen CY, Chang YF, Jean JS, et al. Identification and

discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013 Dec 1;116:478–84.
67. Bağcıoğlu M, Fricker M, Johler S, Ehling-Schulz M. Detection and identification of bacillus cereus, bacillus cytotoxicus, bacillus thuringiensis, bacillus mycoides and bacillus weihenstephanensis via machine learning based FTIR spectroscopy. Front Microbiol [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 11];10(APR):902. Available from: /pmc/articles/PMC6498184/
68. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. Essays Biochem [Internet]. 2016 Jun 6 [cited 2024 May 8];60(1):1. Available from: /pmc/articles/PMC4986445/
69. David Israel Ríos Vázquez. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE AGUA TERMAL DE CHIGNAHUAPAN, PUEBLA [Internet]. [Puebla]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019 [cited 2024 Feb 18]. Available from: https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/fd8c59ed-51db-4d4d-b75a-61039b71a9e8/content
70. BIO RAD. King A - MEDIO DE DIFERENCIACIÓN DE PSEUDOMONAS [Internet]. 2009 [cited 2024 Jan 29]. Available from: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/55274_08_2009_ES.pdf
71. BIO RAD. KING B - MEDIO DE DIFERENCIACIÓN DE PSEUDOMONAS [Internet]. 2009 [cited 2024 Jan 29]. Available from: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/55278_08_2009_ES.pdf
72. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. 2018 Jun 1;35(6):1547–9.
73. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics [Internet]. 2007 Nov [cited 2024 Feb 6];23(21):2947–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846036/
74. Gutierrez Abel. Investigación diagnóstica [Internet]. [cited 2024 May 8]. Available from: http://quimex.com.mx/wp-content/uploads/2021/01/Multibac-Multidiscos-Antibiogramas.pdf
75. Caso Vargas LR. Desarrollo de un método de determinación de aminas biógenas en tilapia por espectroscopias UV/Vis e infrarrojo [Internet]. Instituto Politécnico Nacional; 2016 [cited 2023 Oct 4]. Available from: http://tesis.ipn.mx/xmlui/handle/123456789/29524
76. Caso Vargas LR, Caballero Concha NA, Arcila Lozano LS, Delgado-Macuil R, Rubio-Rosas E, Luna González AD, et al. Characterization of diamine oxidase-based biosensors for biogenic amines detection assembled onto functionalized SiO_2 substrates using aliphatic and aromatic di-aldehydes as crosslinkers. CyTA - Journal of Food [Internet]. 2023 Dec 31 [cited 2024 Feb 6];21(1):570–9. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2023.2256820
77. Corregidor D, Tabraue R, Colchero L, Daza García R, Elices Calafat M, Guinea Tortuero GV, et al. Clasificación de los eventos de ruptura molecular entre estreptavidina y biotina medidos mediante microscopía de fuerza atómica de afinidad. Revista española de mecánica de la fractura, ISSN-e 2792-4246, Nº 4 (comunicaciones 5th Iberian Conference on Structural Integrity), 2022, págs 27-32 [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 28];(4):27–32. Available from:

https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8701278&info=resumen&idioma=ENG
78. Arcila-Lozano LS, Ríos-Corripio MA, García-Pérez BE, Jaramillo-Flores ME, González CA, Rocha-Gracia RC, et al. Aplicación de nanopartículas de oro en la elaboración de un inmunosensor para la detección de Staphylococcus aureus en alimentos. Anal Lett [Internet]. 2016 Dec 16 [cited 2024 Jan 28];50(7):1150–67. Available from: http://rdcb.cbg.ipn.mx/handle/20.500.12273/732
79. Demšar J, Erjavec A, Hočevar T, Milutinovič M, Možina M, Toplak M, et al. Orange: Data Mining Toolbox in Python . Journal of Machine Learning Research. 2013;14:2349–53.
80. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012 Jul;9(7):676–82.
81. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. BMC Bioinformatics. 2017 Nov 29;18(1).
82. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2014 Apr 9 [cited 2024 May 9];30(4):1159–68. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-013-1552-5
83. Abdelaziz AA, Kamer AMA, Al-Monofy KB, Al-Madboly LA. Pseudomonas aeruginosa's greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. Microb Cell Fact [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 May 9];22(1):1–14. Available from: https://link.springer.com/articles/10.1186/s12934-023-02122-1
84. Hall BG. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. Mol Biol Evol [Internet]. 2013 May 1 [cited 2024 Jan 25];30(5):1229–35. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst012
85. De Moraes Russo CA, Selvatti AP. Bootstrap and Rogue Identification Tests for Phylogenetic Analyses. Mol Biol Evol [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Jan 25];35(9):2327–33. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy118
86. Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, García-Valdés E. An rpoD-based PCR procedure for the identification of Pseudomonas species and for their detection in environmental samples. Mol Cell Probes. 2009 Jun 1;23(3–4):140–7.
87. Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. Environ Microbiol [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2024 Jan 25];12(6):1513–30. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x
88. Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in Pseudomonas. Front Microbiol. 2015 Mar 18;6(MAR):129093.
89. Maceda Mendoza JI. Determinación de resistencia a antibióticos en una colección de cepas de bacterias de Pseudomonas aeruginosa. [Puebla]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024.
90. Arias-Flores R, Rosado-Quiab U, Vargas-Valerio A, Grajales-Muñiz C. Microorganisms responsible of nosocomial infections in the Mexican Social Security Institute. Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Jan 29];54(1):20–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26820194/
91. Guerrero-Encinas I, González-González JN, Reyna-Murrieta ME, Bolado-

Martínez E, López-Mata MA, Morales-Figueroa GG, et al. Bacterial resistance status in a level 2 hospital in Northwest Mexico in 2016: Resistance status in Northwest Mexico. Biotecnia [Internet]. 2023 Sep 21 [cited 2024 Jan 29];25(3):93–104. Available from: https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/2046

92. Nájera-Bello JA, Villanueva-Pastrana N, Barlandas-Rendón NRE, Quintana-Ponce S, Cruz-Navarrete E, Maya-Rodríguez PA. Farmacorresistencia bacteriana de patógenos prioritarios aislados en Chilpancingo, Guerrero, México. Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 2021;68(4):181–7.
93. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2007 Sep 1;1767(9):1073–101.
94. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts [Internet]. 3rd ed. Journal of Raman Spectroscopy. John Wiley & Sons.; 2001 [cited 2024 Feb 28]. Available from: https://www.wiley.com/en-us/Infrared+and+Raman+Characteristic+Group+Frequencies%3A+Tables+and+Charts%2C+3rd+Edition-p-9780470093078
95. Jastrzbski W, Sitarz M, Rokita M, Bułat K. Infrared spectroscopy of different phosphates structures. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2011 Aug 15;79(4):722–7.
96. Di Bari C, Mano N, Shleev S, Pita M, L. De Lacey A. Halides inhibition of multicopper oxidases studied by FTIR spectroelectrochemistry using azide as an active infrared probe. Journal of Biological Inorganic Chemistry [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Feb 21];22(8):1179–86. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-017-1494-8
97. Abdul Ghaffar, Nawaz S, Munawar A, Zierkiewicz W, Michalczyk M, Helios K, et al. DFT Calculations and SEM–EDX Analysis of Copper(II)-Azide Complexes; [Cu(en)2(N3)2] and [Cu(Tmen)(N3)2]2 (Tmen = N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine). Russian Journal of Physical Chemistry B [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Feb 21];15(1):S42–51. Available from: https://link.springer.com/article/10.1134/S1990793121090074
98. Ríos-Corripio MA, Arcila-Lozano LS, Garcia-Perez BE, Jaramillo-Flores ME, Hernández-Pérez AD, Carlos-Martínez A, et al. Fluorescent Gold Nanoparticle-Based Bioconjugate for the Detection of Salmonella. Anal Lett. 2016 Aug 12;49(12):1862–73.
99. LibreTexts CHEMISTRY. Infrared Spectroscopy Absorption Table [Internet]. [cited 2024 Feb 28]. Available from: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
100. Krüger A, Bürkle A, Mangerich A, Hauser K. A combined approach of surface passivation and specific immobilization to study biomolecules by ATR-FTIR spectroscopy. Biomed Spectrosc Imaging. 2018 Jan 1;7(1–2):25–33.
101. Lapin NA, Chabal YJ. Infrared characterization of biotinylated silicon oxide surfaces, surface stability, and specific attachment of streptavidin. Journal of Physical Chemistry B [Internet]. 2009 Jun 25 [cited 2024 Feb 21];113(25):8776–83. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp809096m
102. Cusihuamán Noa S, Elena Talavera Núñez M, Arenas Chávez C, Pacheco Salazar DG, Vera Gonzales C. CARACTERIZACIÓN POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DEL O-CARBOXIMETILQUITOSANO OBTENIDO POR DERIVATIZACIÓN DEL QUITOSANO . Rev Soc Quím Perú. 2018;84(2).

103. Al-Awwal N, Masjedi M, El-Dweik M, Anderson SH, Ansari J. Nanoparticle immuno-fluorescent probes as a method for detection of viable E. coli O157:H7. J Microbiol Methods. 2022 Feb 1;193:106403.
104. Tang M, Teng P, Long Y, Wang X, Liang L, Shen D, et al. Hollow carbon dots labeled with FITC or TRITC for use in fluorescent cellular imaging. Microchimica Acta [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 Feb 27];185(4):1–6. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-018-2761-2
105. Francis RJ, Ferguson D, Kempster S, Hall J, Berry N, MacLellan-Gibson K. Blood identified and quantified in formalin fixed paraffin embedded lung sections using eosin fluorescence. Histochem Cell Biol [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Feb 27];158(4):383–8. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-022-02130-z
106. Shi Y, Hu Y, Jiang N, Yetisen AK. Fluorescence Sensing Technologies for Ophthalmic Diagnosis. ACS Sens [Internet]. 2022 Jun 24 [cited 2024 Feb 27];7(6):1615–33. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssensors.2c00313
107. Tran L, Park S. Highly sensitive detection of dengue biomarker using streptavidin-conjugated quantum dots. Scientific Reports 2021 11:1 [Internet]. 2021 Jul 26 [cited 2024 Feb 27];11(1):1–12. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-021-94172-x
108. Farrokhnia M, Amoabediny G, Ebrahimi M, Ganjali M, Arjmand M. Ultrasensitive early detection of insulin antibody employing novel electrochemical nano-biosensor based on controllable electro-fabrication process. Talanta. 2022 Feb 1;238:122947.
109. Lu X, Liu Q, Wu D, Al-Qadiri HM, Al-Alami NI, Kang DH, et al. Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of Escherichia coli O157:H7, Campylobacter jejuni and Pseudomonas aeruginosa under cold stress in low nutrient media. Food Microbiol. 2011 May 1;28(3):537–46.
110. Al-Qadiri HM, Al-Holy MA, Lin M, Alami NI, Cavinato AG, Rasco BA. Rapid detection and identification of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli as pure and mixed cultures in bottled drinking water using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. J Agric Food Chem [Internet]. 2006 Aug 9 [cited 2024 Mar 2];54(16):5749–54. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf0609734
111. Marques CMS, Pedroso JT, Bhattacharjee T, Pupin B, Pinto JG, Ferreira-Strixino J, et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) of Pseudomonas aeruginosa post photodynamic therapy with Curcumin in vitro. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2023 Jan 15;285:121916.
112. Liu X, Cai J, Chen H, Zhong Q, Hou Y, Chen W, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against Pseudomonas aeruginosa. Microb Pathog. 2020 Apr 1;141:103980.
113. Stuermer EK, Plattfaut I, Dietrich M, Brill F, Kampe A, Wiencke V, et al. In vitro Activity of Antimicrobial Wound Dressings on P. aeruginosa Wound Biofilm. Front Microbiol [Internet]. 2021 May 14 [cited 2024 Feb 27];12:664030. Available from: www.frontiersin.org
114. Oliveira VC, Bim FL, Monteiro RM, Macedo AP, Santos ES, Silva-Lovato CH, et al. Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Biofilm on Endotracheal Tubes. Front Microbiol [Internet]. 2020 Oct 6 [cited 2024 Feb 27];11:580779. Available from: www.frontiersin.org
115. Han Y, Han L, Yao Y, Li Y, Liu X. Analytical Methods Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration †. 2018;10.

116. Castañeda JA, Fabián Gil J. Una mirada a los intervalos de confianza en investigación. Rev Colomb Psiquiatr [Internet]. 2004 [cited 2024 Mar 18];33(2):193–201. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74502004000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
117. Zhang D. A Coefficient of Determination for Generalized Linear Models. Am Stat [Internet]. 2017 Oct 2 [cited 2024 Mar 18];71(4):310–6. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00031305.2016.1256839
118. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. Biotechniques [Internet]. 2004 Jun 6 [cited 2024 Mar 17];37(5):790–802. Available from: https://www.future-science.com/doi/10.2144/04375RV01
119. Hughes RC, Thurman PF. Cross-linking of bacterial cell walls with glutaraldehyde. Biochemical Journal [Internet]. 1970 [cited 2024 Mar 17];119(5):925. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1179494/
120. Wang L, Mizaikoff B. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2008 Jul 1 [cited 2024 Mar 17];391(5):1641–54. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-008-1989-9
121. Xu L, Xie J, Cai F, Wu J, Xu L;, Xie J;, et al. Spectral Classification Based on Deep Learning Algorithms. Electronics 2021, Vol 10, Page 1892 [Internet]. 2021 Aug 6 [cited 2024 Mar 17];10(16):1892. Available from: https://www.mdpi.com/2079-9292/10/16/1892/htm
122. Yun YH, Li HD, Deng BC, Cao DS. An overview of variable selection methods in multivariate analysis of near-infrared spectra. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019 Apr 1;113:102–15.
123. Toplak M, Read ST, Sandt C, Borondics F, Vaccari L, Byrne HJ, et al. Quasar: Easy Machine Learning for Biospectroscopy. Cells 2021, Vol 10, Page 2300 [Internet]. 2021 Sep 3 [cited 2024 Mar 17];10(9):2300. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2300/htm
124. Chen Y, Song L, Liu Y, Yang L, Li D. A Review of the Artificial Neural Network Models for Water Quality Prediction. Applied Sciences 2020, Vol 10, Page 5776 [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2024 Feb 28];10(17):5776. Available from: https://www.mdpi.com/2076-3417/10/17/5776/htm
125. Matel E, Vahdatikhaki F, Hosseinyalamdary S, Evers T, Voordijk H. An artificial neural network approach for cost estimation of engineering services. International Journal of Construction Management [Internet]. 2022 [cited 2024 Feb 28];22(7):1274–87. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15623599.2019.1692400
126. Tomas RC, Sayat AJ, Atienza AN, Danganan JL, Ramos MR, Fellizar A, et al. Detection of breast cancer by ATR-FTIR spectroscopy using artificial neural networks. PLoS One [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Feb 28];17(1):e0262489. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0262489
127. Pattekari SA, Parveen A. PREDICTION SYSTEM FOR HEART DISEASE USING NAIVE BAYES. International Journal of Advanced Computer and Mathematical Sciences [Internet]. 2012 [cited 2024 Mar 5];3(3):290–4.

Available from: http://bipublication.com
128. Langarizadeh M, Moghbeli F. Applying Naive Bayesian Networks to Disease Prediction: a Systematic Review. Acta Informatica Medica [Internet]. 2016 [cited 2024 Mar 5];24(5):364. Available from: /pmc/articles/PMC5203736/
129. Feng X, Li S, Yuan C, Zeng P, Sun Y. Prediction of Slope Stability using Naive Bayes Classifier. KSCE Journal of Civil Engineering [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2024 Mar 5];22(3):941–50. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s12205-018-1337-3
130. Dubrovkin J. Artificial Intelligence in Spectroscopy. Multi-stage clustering of IR absorption spectra of pure compounds. 2024 [cited 2024 Mar 13]; Available from: https://www.cambridgescholars.com/
131. Tu S, Li C, Shepherd BE. Between-and Within-Cluster Spearman Rank Correlations. 2024;
132. He K. Filter feature selection for unsupervised clustering of designer drugs using DFT simulated IR spectra data. ACS Omega [Internet]. 2021 Nov 30 [cited 2024 Mar 13];6(47):32151–65. Available from: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.1c04945

Colophon

This thesis was typeset with LaTeX 2ε. It uses the *Clean Thesis* style developed by Ricardo Langner. The design of the *Clean Thesis* style is inspired by user guide documents from Apple Inc.

Download the *Clean Thesis* style at `http://cleanthesis.der-ric.de/`.

Declaración

A mi familia.

Puebla, marzo, 2024

Fernando Iván Ramírez Lun