

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**NANOBIOSENSOR COLORIMÉTRICO
PARA LA DETECCIÓN DE
*Campylobacter fetus fetus***

Entregado como requisito para la obtención del título Ingeniera en Biotecnología

Milena Wajsblat – 178336

Carolina Silberstein – 158707

Tutor: Lorena Betancor

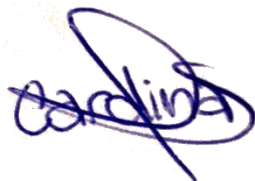
2016

Declaración de Autoría

Nosotras, Milena Wajsblat y Carolina Silberstein, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo final de carrera;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Carolina Silberstein



Milena Wajsblat

2 de Agosto de 2016

Agradecimientos

En una primera instancia, quisiéramos agradecerle a nuestra tutora Lorena Betancor por toda su ayuda y apoyo a lo largo de la realización de nuestra tesis.

Por otro lado, queremos agradecer a todo el equipo del laboratorio por apoyarnos y contribuir en el desarrollo del proyecto.

También les agradecemos a Zurgen por la confianza que nos tuvieron para el desarrollo de este trabajo y al Centro de Innovación en Ingenierías (CII) por financiar el proyecto.

Además, nos gustaría agradecer a nuestras familias (especialmente a Manolo) por su apoyo incondicional en esta etapa y a lo largo de toda la carrera.

Por último queremos agradecer a la Universidad ORT por dejarnos utilizar sus instalaciones en el Laboratorio de Biotecnología para poder llevar a cabo este trabajo.

Resumen

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una de las principales enfermedades reproductivas en bovinos y es causada por la bacteria *Campylobacter fetus*. La CGB tiene una gran implicancia en la eficiencia reproductiva bovina dado que causa en las hembras la muerte embrionaria temprana, infertilidad temporaria, repetición de celo y abortos esporádicos. Debido a su significancia socioeconómica, su detección es de gran importancia. Hoy en día existen distintos métodos de detección de *Campylobacter fetus*, como el cultivo bacteriano, la inmunofluorescencia y métodos moleculares. Sin embargo, dichas metodologías requieren tiempo y personal calificado para la realización e interpretación de los resultados.

En este trabajo se busca el desarrollo de un nanobiosensor colorimétrico a base de nanopartículas de oro, como una metodología sencilla, rápida y de bajo costo para la detección de *Campylobacter fetus fetus*. Para ello se puso a punto el crecimiento de la cepa, se relacionó en una curva de calibración la OD a 600 nm con las UFC/mL y se verificó la especificidad de los anticuerpos monoclonales comerciales anti-*Campylobacter fetus fetus* para ser utilizados en el desarrollo del biosensor. También se logró la síntesis y estabilización de las nanopartículas de oro a ser utilizadas, así como la funcionalización de las nanopartículas de oro y magnéticas con los anticuerpos monoclonales.

Se diseñaron dos tipos de nanobiosensores colorimétricos para la detección de *Campylobacter fetus fetus* y se realizaron pruebas de concepto para los mismos, obteniendo resultados prometedores. El nanobiosensor basado en nanopartículas magnéticas y de oro aún no ha sido estudiado con respecto al rango de linealidad y los límites de sensibilidad. Para el nanobiosensor de desagregación de las nanopartículas de oro se logró el estudio del límite de sensibilidad y del rango de linealidad, obteniendo un rango lineal de 10^6 a 10^9 UFC/mL y la sensibilidad de hasta 10^2 UFC/mL.

Palabras clave

Campylobacter fetus fetus; nanotecnología; nanobiosensor; nanopartículas de oro; nanopartículas magnéticas; detección; campilobacteriosis genital bovina.

Abreviaciones

Ac: Anticuerpo

AFM: microscopía de fuerza atómica

BSA: Albumina de suero bovino

BCIP/NBT: 5-Bromo- 4-cloro- 3-indolil fosfato/Nitroazul de tetrazolio

CGB: Campilobacteriosis genital bovina

CH₃-PEG- NH₂ : Polietilenglicol aminado

DLS: dispersión de luz dinámica

EDA: etilendiamina

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'- etil-carbodiimida hidroclicoridrica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FTIR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

g: Gramos

IgG: Inmunoglobulina G

HRP: Horseradish peroxidase

KDa: Kilodalton

L: Litro

M: Molar

mM: Milimolar

MES: 2- (N- morfolino) acido etanosulfónico

mg: Miligramos

μL: Microlitros

mL: Mililitros

NHS: N-Hidroxisuccinimida

nm: Nanometros

nmol: Nanomoles

Np: Nanopartícula

NpAu: Nanopartícula de oro

NpMg: Nanopartícula magnética

OD: Densidad optica

PBS: Buffer fosfato salino

PEG: Polietilenglicol

pmol: Picomol

pNPP: p-Nitrofenil fosfato

RPM: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: microscopía electrónica de barrido

TAE: Tris-acetato- EDTA

TEM: microscopía electrónica de transmisión

Temed: Tetrametiletilendiamina

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

TSA: Agar triptona de soja

UFC: Unidades formadoras de colonia

UV: Ultra violeta

V: Voltio

Vis: Visible

XPS: espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

XRD: difracción de rayos X en polvo

Índice

1. Introducción.....	11
1.1 <i>Campylobacter</i>	11
1.2 Biosensores.....	13
1.3 Procedimiento y parámetros para desarrollar un biosensor.....	16
1.4 Nanotecnología y biosensado.....	19
1.5 Nanopartículas de oro en biosensado.....	21
1.6 Nanopartículas magnéticas y biosensado.....	25
1.7 Desafíos en la biodetección.....	26
2. Objetivos.....	27
3. Metodología.....	29
3.1 Materiales.....	29
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Regeneración de la cepa <i>Campylobacter fetus fetus</i>	29
3.2.2 Conservación de la cepa.....	29
3.2.3 Crecimiento de <i>Campylobacter fetus fetus</i> en medio de cultivo sólido	30
3.2.4 Estandarización del crecimiento en medio de cultivo líquido de <i>Campylobacter fetus fetus</i>	30
3.2.5 Visualización de la cepa <i>Campylobacter fetus fetus</i> por tinción con cristal violeta	30
3.2.6 Identificación bioquímica de la cepa de <i>Campylobacter fetus fetus</i> por la prueba catalasa.....	30

3.2.7	Identificación bioquímica de la cepa <i>Campylobacter fetus fetus</i> por la prueba oxidasa.....	30
3.2.8	Preparación de proteínas del lisado celular para SDS-PAGE y Western Blot.....	31
3.2.9	Visualización del lisado bacteriano por SDS-PAGE.....	31
3.2.10	Tinción de geles con solución nitrato de plata.....	31
3.2.11	Western Blot de anticuerpos monoclonales comerciales.....	32
3.2.12	ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales comerciales.....	32
3.2.13	Curva relacionando OD a 600 nm con UFC/ml.....	32
3.2.14	Nanopartículas de oro	33
3.2.14.1	Síntesis de nanopartículas de oro.....	33
3.2.14.2	Estabilización con PEG.....	33
3.2.14.3	Funcionalización con anticuerpos.....	33
3.2.15	Electroforesis en gel de agarosa de nanopartículas de oro.....	34
3.2.16	Funcionalización de nanopartículas magnéticas.....	34
3.2.17	Electroforesis SDS-PAGE para verificación de unión de anticuerpo a las nanopartículas.....	35
3.2.18	Ensayo de detección de <i>Campylobacter fetus fetus</i> utilizando un sistema con nanopartículas magnéticas y de oro.....	35
3.2.19	Ensayo de detección de <i>Campylobacter fetus fetus</i> utilizando un sistema con nanopartículas de oro agregadas.....	36
4.	Resultados y discusión.....	37
4.1	Crecimiento de la cepa <i>Campylobacter fetus fetus</i>	37
4.2	Estandarización del crecimiento de <i>Campylobacter fetus fetus</i>	39

4.3 Síntesis, estabilización y funcionalización de nanopartículas de oro.....	41
4.4 Diseños propuestos de nanobiosensor.....	44
4.5 Electroforesis SDS-PAGE de lisado de <i>Campylobacter fetus fetus</i>	45
4.6 Reconocimiento de proteínas de la bacteria por anticuerpos monoclonales comerciales.....	46
4.7 Funcionalización de nanopartículas magnéticas y de oro con anticuerpo monoclonal.....	48
4.8 Ensayo de nanobiosensor basado en nanopartículas magnéticas y de oro.....	49
4.9 Ensayo de nanobiosensor basado en nanopartículas de oro agregadas.....	53
4.10 Perspectivas a futuro.....	58
5. Análisis económico.....	60
6. Conclusiones.....	66
7. Referencias bibliográficas.....	67
Anexo 1.....	70

1. Introducción

1.1 Campylobacter

Campylobacter es un género de bacterias muy diversas a un nivel taxonómico así como patológico(1). El género tiene una gran importancia por su impacto económico y clínico, ya que están involucrados en un amplio rango de enfermedades en humanos y animales(1).

Una de las principales infecciones reproductivas infecciosas en bovinos, es la campilobacteriosis genital bovina (CGB) (2). La misma es una enfermedad de transmisión sexual causada por la especie *Campylobacter fetus* (1,2).

La campilobacteriosis genital bovina tiene una gran implicancia en la eficiencia reproductiva, debido a que en las hembras el patógeno causa la muerte embrionaria temprana, infertilidad temporaria durante seis meses, repetición de celo y abortos esporádicos entre el mes 5 y 6 de la gestación (2).

El toro constituye el reservorio natural de la bacteria dado que es un portador asintomático. La misma se localiza en las criptas de la mucosa prepucial y en la uretra distal (2).

La CGB es una enfermedad de declaración obligatoria a la organización mundial de sanidad animal (OIE) debido a su significancia socio-económica e implicancias en la salud pública, particularmente con respecto al comercio internacional de animales y sus productos derivados (3).

La importancia de la CGB en Uruguay, es debida a que los procreos son considerados bajos (del rango de 50-75%) (4). El índice de procreo bajo no está relacionado únicamente con las enfermedades que afectan a la reproducción, sino que también pueden deberse a aspectos nutricionales y de manejo. Sin embargo, dichas enfermedades afectan la reproducción y están presentes en los rodeos de cría de Uruguay (4). Según el último estudio epidemiológico realizado en el país, en el 2005 por la dirección de laboratorios veterinarios (DILAVE) y el instituto nacional de investigación agropecuaria (INIA), CGB está presente en un 37% de los establecimientos evaluados y en un 28% de los toros muestreados (4, 5). En el 2014, la CGB fue mencionada como la principal enfermedad causante de problemas de fertilidad en Uruguay en el XII Taller de "Evaluación de diagnósticos de preñez del ganado bovino" realizado en INIA (4).

Dado que la CGB es una enfermedad que está presente en los rodeos de cría de Uruguay, es de suma importancia tomar las medidas necesarias para conocer su situación en los establecimientos (4). Siendo los toros los portadores asintomáticos, es esencial planificar con tiempo su revisión en los

periodos de reposo sexual, de manera de permitir un tiempo suficiente para realizar medidas preventivas o de control (4).

Las bacterias comprendidas dentro del género *Campylobacter* son gram negativas, con forma de espiral o comas y móviles (1, 2) (Figura 1). Los cultivos son catalasa y oxidasa positivos, y gelatina e indol negativos (2).

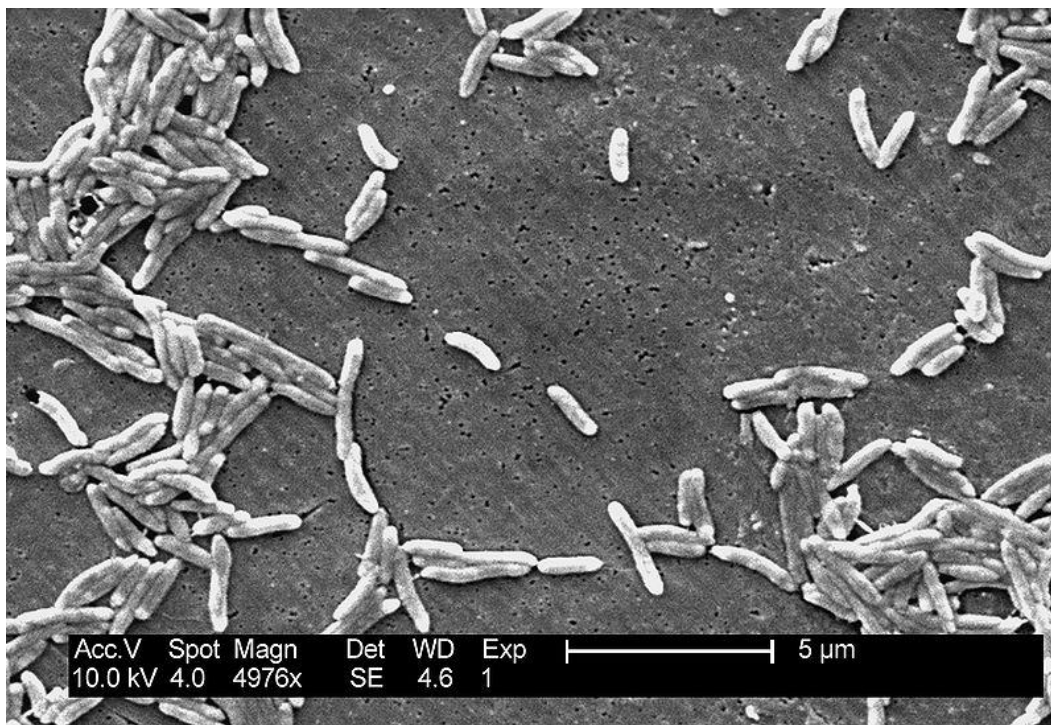


Figura 1: Microscopia electrónica de la bacteria *Campylobacter fetus* obtenida del Centers for Disease Control and Prevention's.

La especie *Campylobacter fetus* es dividida en dos subespecies, ambas microaerófilas, las cuales están altamente relacionadas a nivel genómico (6). Dichas subespecies son *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis*, siendo la primera de ellas menos exigente en el cultivo (2).

Hoy en día existen distintos métodos de detección de *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis*. Una de ellas es el cultivo bacteriológico, el mismo puede ser realizado a partir de muestras del mucus cervicovaginal o del fluido preputial (2). En el caso del fluido preputial, las muestras se siembran a partir del medio de transporte (por ejemplo el medio Cary Blair) en placas de agar Skirrow y son incubadas a 37°C en atmosfera microaerofílica y son observados durante 7 días (2). Una vez crecidos, se identifica la especie mediante la morfología de las colonias y se observa en un microscopio de contraste de fase para ver la morfología bacteriana y el movimiento característico de *Campylobacter* (2). Una vez que se confirma que la morfología de las bacterias y las colonias

corresponde a la especie *Campylobacter fetus* se procede a realizar las pruebas bioquímicas (2). Este es un método que requiere de mucho tiempo hasta la obtención de un resultado, lo cual es una gran desventaja.

Existen además, métodos moleculares de diagnóstico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final, PCR multiplex o PCR en tiempo real. Un ejemplo es la PCR multiplex utiliza 2 sets de primers lo que permite además de la identificación de la especie, la discriminación entre las dos subespecies (7). Este método requiere de la extracción del ADN pero no es necesario ningún paso de pre-enriquecimiento. El límite inferior de detección del mismo es de 10^3 UFC/mL (7).

La inmunofluorescencia directa (IFD) es otra metodología utilizada para la identificación de *Campylobacter fetus*. La misma se realiza con muestras de lavados prepuciales, utilizando anticuerpos marcados con un fluoróforo para identificar si se encuentra la bacteria en la muestra (8). Los límites inferiores de detección por IFD pueden llegar a ser de 10^2 UFC/mL si el lavado prepucial es centrifugado para concentrar la muestra (8).

Todas estas metodologías requieren tiempo y personal calificado para la realización de los ensayos, así como para la interpretación de resultados.

1.2 Biosensores

La IUPAC define a un biosensor como un dispositivo capaz de proveer información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está asociado a un elemento de transducción (9). Los biosensores detectan compuestos químicos o biológicos con la ayuda de un elemento de reconocimiento biológico que genera un cambio en las propiedades cuando se une al compuesto (10). El cambio en las propiedades es convertido a una señal detectable (10).

El rendimiento del biosensor puede evaluarse según distintos aspectos, de los cuales la sensibilidad, selectividad y rango dinámico son factores muy importantes que se deben considerar (11, 12). Es necesario que el biosensor tenga una alta sensibilidad para generar altas señales con poco ruido. La alta selectividad permite que capture moléculas específicas del biosensor (11, 12). También debe ser reproducible, de un largo tiempo de vida, miniaturizable, económico y muchas veces se requiere que sea robusto (11, 12).

Un biosensor consiste en tres elementos básicos, un sistema de reconocimiento biológico, para la unión específica y selectiva con el analito blanco, un transductor, para convertir la unión a una señal, y un sistema de procesamiento de la señal (Figura 2) (13, 14).

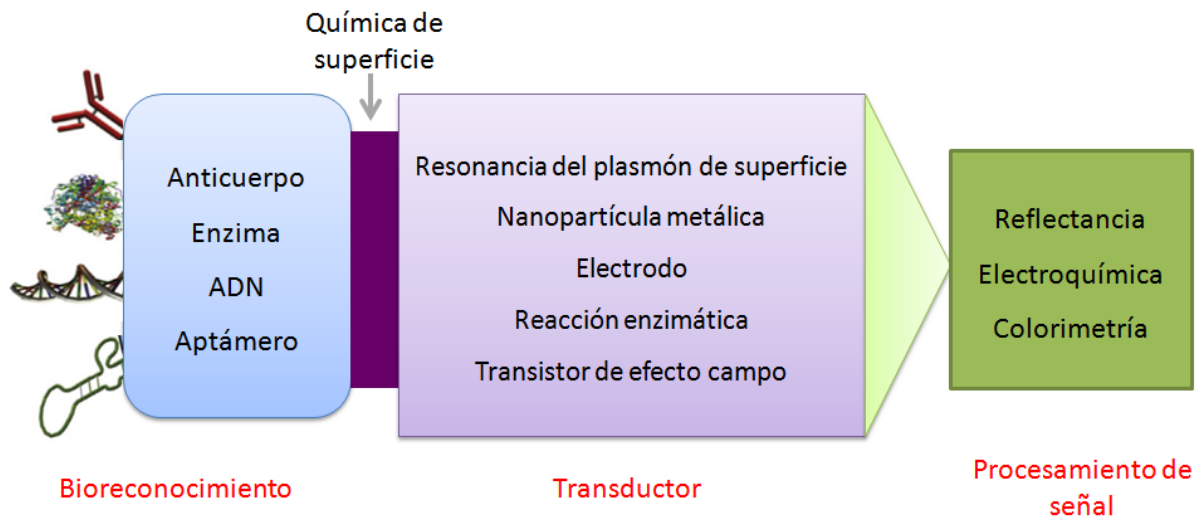


Figura 2: Esquema de los componentes de un biosensor (14).

Los elementos de reconocimiento biológico o bioreceptores, son la clave para la especificidad y selectividad del biosensor, es el elemento responsable de detectar el analito blanco en el sistema del biosensor (13). Las formas más comunes de bioreceptor utilizados son basados en interacciones entre antígeno y anticuerpo, interacciones entre ácidos nucleicos, interacciones enzimáticas, interacciones celulares e interacciones utilizando materiales biomiméticos (13) (Figura 3).

Los anticuerpos son los bioreceptores más comunes utilizados para las aplicaciones de biosensado debido a que son técnicas analíticas altamente específicas, proveen límites de detección extremadamente bajos y pueden utilizarse para una amplia variedad de sustancias (9, 13). Los mismos son producidos por el sistema inmune y son capaces de reconocer un antígeno específico uniéndose de manera no covalente (9). Los anticuerpos utilizados en los biosensores pueden ser de dos tipos, monoclonales o policlonales. Los anticuerpos policlonales son altamente sensibles pero son menos específicos ya que reconocen diferentes epítopes del analito y puede haber reactividad cruzada. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales, son todos idénticos ya que son producidos a partir de una sola célula inmune y se unen todos al mismo epítope, por lo cual tienen alta especificidad.

El transductor es el componente del biosensor que convierte el evento del reconocimiento en una señal detectable (9, 13). Los transductores pueden utilizar varios mecanismos, los básicos son electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos (Figura 3).

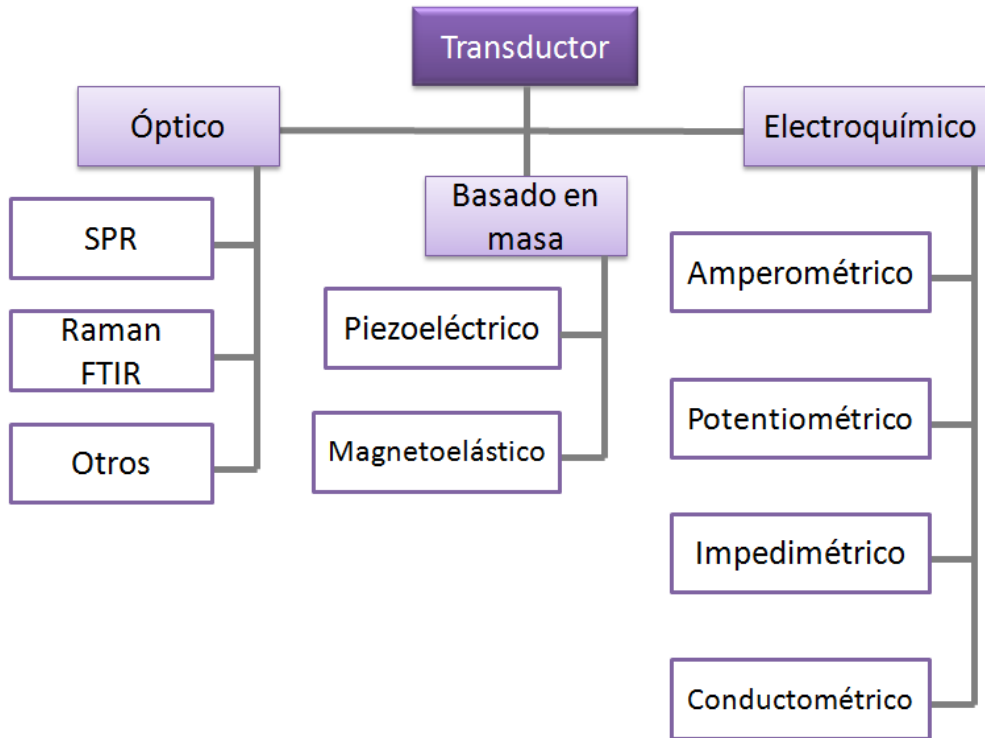


Figura 3: Clasificación de los biosensores según sus transductores (13).

Los biosensores electroquímicos están basados en cambios de las propiedades eléctricas cuando está presente el analito en la muestra (11). Adentro de este tipo de biosensor es posible clasificar a los mismos dependiendo de la señal eléctrica amplificada entre amperométrico, impedimétrico, potenciométrico y conductométrico (11).

Los biosensores piezoeléctricos están basados en la variación de la frecuencia de la resonancia (11). Esta frecuencia de resonancia cambia debido al incremento de la masa generado por el reconocimiento del antígeno (11).

En los biosensores ópticos, el proceso de transducción induce un cambio medible en la fase, amplitud, polarización o frecuencia de la luz incidente en respuesta a un cambio físico o químico que ocurre por el proceso de reconocimiento del analito (13). Las ventajas de dichos biosensores incluyen a la selectividad, especificidad, aislamiento de la interferencia que pueden ocurrir en la detección electroquímica, rapidez, entre otros (9, 13).

Los formatos de transducción óptica más comúnmente utilizados son la fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia del plasmón de superficie y espectroscopia de superficie mejorada de Raman (9). Los biosensores basados en la resonancia del plasmón de superficie son biosensores ópticos que no requieren de marcaje (13). Cuando el biosensor basado en resonancia del plasmón de superficie es expuesto a cambios, varía el índice de refracción, el cual es utilizado para medir la reacción (13). Dichos biosensores son altamente sensibles, permiten una detección a tiempo real, tienen poca interferencia, no se requiere pretratamiento de la muestra, es rápido, permite análisis de alto rendimiento y utiliza poca cantidad de reactivo y muestra (13).

Los biosensores juegan un rol analítico significativo en medicina, agricultura, seguridad alimentaria, bioprocesamiento y monitoreo ambiental e industrial (13).

Para el monitoreo ambiental existen, por ejemplo, los biosensores con bacterias como bioreceptor, los mismos detectan contaminantes, toxicidad, monitoreo de bacterias genéticamente modificadas liberadas al ambiente, entre otros (9). Los mismos pueden tener por ejemplo genes reporteros que se inducen por cierto contaminante (9).

También se utilizan biosensores para los alimentos, para monitorear los parámetros nutricionales, por ejemplo el azúcar, aditivos, contaminantes, contaminación microbiológica, asesoramiento de tiempo de almacenamiento y factores como el olor (9).

Los biosensores utilizados para la biodefensa son necesarios para patógenos y toxinas que pueden ser utilizados por enemigos militares o por motivos terroristas, por ejemplo biosensores para ántrax (9).

En la medicina, los biosensores son utilizados principalmente para diagnóstico, también se utilizan para detección de patógenos como *Vibrio cholerae* (10).

1.3 Procedimiento y parámetros para desarrollar un biosensor

El desarrollo de biosensores es un campo multidisciplinario que incluye la bioquímica y biotecnología para proveer los agentes de reconocimiento y las técnicas de inmovilización, pero también incorpora dispositivos microelectrónicos, ópticos y acústicos y técnicas avanzadas para el procesamiento de señales (15).

Uno de los aspectos más importantes que se debe tener en cuenta en el proceso para el desarrollo de un biosensor, es la inmovilización de las biomoléculas en el mismo (15, 16). Como ya fue mencionado anteriormente, un biosensor requiere de un elemento de reconocimiento unido a la superficie del transductor de señal (15). La inmovilización permite la estabilización de los

componentes biológicos, además, es necesaria para cumplir con los requerimientos de la transducción de señal (15).

Una inmovilización ideal debe garantizar la estabilidad de las biomoléculas en la superficie, manteniendo sus propiedades bioquímicas y catalíticas (si las tiene) y permitiendo el acceso de los analitos blanco a la biomolécula (16). Es esencial el procedimiento de inmovilización de la biomolécula para asegurar el funcionamiento del biosensor (16).

Los biosensores ofrecen dispositivos de diagnóstico pequeños, selectivos y portátiles para sustancias biológicas clave (17). Las propiedades óptimas para los biosensores se describen en la Tabla 1 a continuación (17).

Tabla 1: Características de los biosensores (17)

Características	Requisito	Ejemplos/comentarios
Selectividad	Idealmente específica.	Electrodos selectivos de iones: rango de 10^{-1} a 10^{-9} o mejor para iones competidores. Enzimas son selectivas para clases de compuestos químicos. Anticuerpos son generalmente muy selectivos. Adsorción no selectiva de materiales orgánicos sobre superficies recubiertas con proteína es un problema común.
Sensibilidad	Curva de respuesta de concentración lineal, detección del cambio de concentración de menos del 1%.	Sistema potenciométrico limitado en la linealidad en respuesta gobernada por la ecuación de Nernst y la fuerza iónica. Sistemas piezoeléctricos limitados por las ecuaciones del movimiento y la transferencia de energía al medio ambiente local. Sistema óptico limitado por las reglas de espesor y concentración de la ley de Beer.
Límite de detección	Mejor que nanomolar para la mayoría de los analitos bioquímicos de interés.	Potenciométrica en general μM . Sistemas piezoeléctricos, amperométricos y de fluorescencia pueden trabajar de forma reproducible en este nivel.
Reversibilidad	Recuperación de la respuesta analítica completa en cuestión de segundos de ciclo de limpieza.	Generalmente determinado por la química; menor concentración de analito por lo general conduce a los tiempos más largos de reversión. Reversibilidad general: enzima > receptor molecular > anticuerpos.
Tiempo de respuesta	99% de máxima señal desarrollada dentro de unos pocos segundos.	Relacionada con la concentración de analito y velocidades de difusión; generalmente de 1 a 30 minutos para baja concentración de analito.
Tamaño	Sistemas de flujo laminar miniaturizados generalmente proporcionan una mejora de los tiempos de respuesta y la reversibilidad.	Dispositivos piezoeléctricos tienen un área superficial de cm^2 . Fibras ópticas aproximadamente 0,5 mm de diámetro y longitud de cm. Transistores de efecto de campo pocos mm^2 .
Robustez	Insensible al choque físico o eléctrico de menor importancia.	Sistemas de estado sólido y la unión covalente química son preferidos.
Confiabilidad	Sistema de calibrado en un mínimo o ningún desplazamiento, tiempo de vida de meses.	Posibles ventajas para los sistemas de fibra óptica los cuales pueden ser la auto-calibración; todos los sistemas pueden ser parcialmente controlados mediante el uso de diferencia de señales de doble canal.
Costo	Bajo costo para su uso generalizado desechable o continuo.	Posibles ventajas de las tecnologías litográficas utilizando dispositivos semiconductores o piezoeléctricos.
Recuperación de la señal	Señal que es fiable, de fácil transmisión, y libre de interferencias.	Posibles ventajas para dispositivos de fibra óptica que son también útiles para redes de sensores distribuidos de manera remota.

1.4 Nanotecnología y biosensado

La nanotecnología es la ciencia que involucra el diseño, caracterización y manipulación de materiales a nivel de átomos o moléculas a una escala entre 1 y 100 nm (18). Los materiales nanométricos tienen propiedades distintas a los materiales a granel, difieren en las propiedades ópticas y electrónicas, además de que presentan una mayor relación superficie-volumen (18). Los componentes internos de las células biológicas son de la misma escala que aquellos estudiados por la nanotecnología (19) (Figura 4).

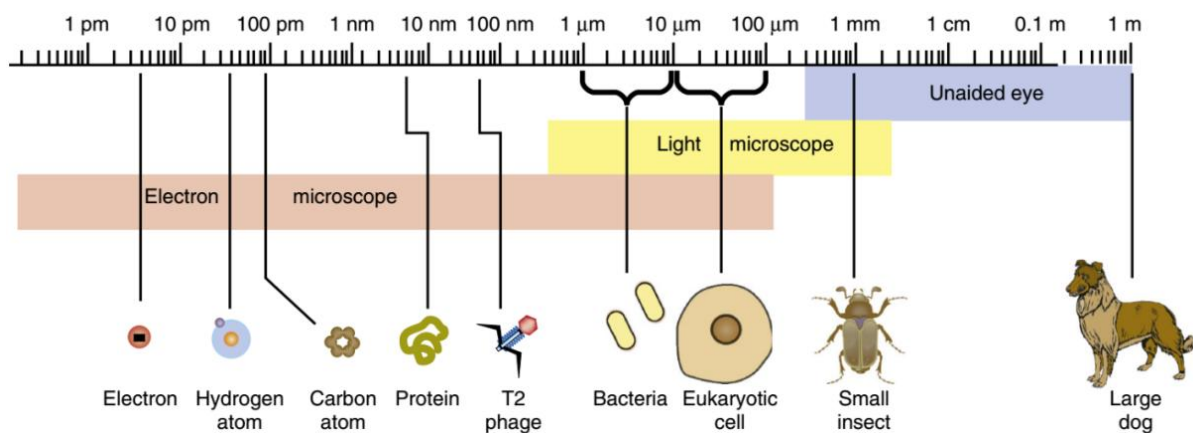


Figura 4: Escala comparativa del tamaño de los nanomateriales y otras moléculas y organismos vivos (19).

Existen distintos tipos de nanomateriales, los mismos pueden ser orgánicos o inorgánicos, pueden ser de distintas formas, como nanopartículas esféricas, nanocristales, nanorods, nanoestructuras de carbón, entre otras (9). Cada uno de estos nanomateriales puede tener distintas características y propiedades (Tabla 2).

Tabla 2: Ejemplos de nanomateriales y sus propiedades(18)

Nanomaterial	Diámetro típico	Descripción	Propiedades útiles	Imagen
Quantum dots	2-10 nm	QD son nanopartículas fluorescentes semiconductoras, consisten de un core de material semiconductor (generalmente cadmio mezclado con selenio o telurio) y una cubierta semiconductoras (normalmente sulfuro de zinc).	Su fotoestabilidad y espectro de emisión son utilizados en ensayos en una gran cantidad de modos, incluyendo emisión de fluorescencia, quenching de fluorescencia, o como dadores de energía.	
Nanopartículas magnéticas	1-100 nm	Formado con elementos magnéticos como hierro, nickel y cobalto y pueden ser manipulados usando campos magnéticos.	Utilizados para concentrar partículas en ensayos; tienen excelente conductividad.	
Nanotubos de carbono	0,4-100 nm	Alótropo de carbono consistiendo de hojas de grafeno enrolladas en cilindros.	Exhiben fotoluminiscencia; excelentes propiedades eléctricas; semiconductores.	
Nanopartículas de oro	5-110 nm	Hechas de oro, pueden ser en forma de esfera, cubos, hexágonos, entre otros.	Habilidad de dispersar la luz resonante; altamente estables químicamente; cambian de color con la agregación; excelente conductividad.	

Las nanopartículas y nanomateriales deben ser caracterizados luego de su síntesis para ser utilizados, esto se debe a que la caracterización es importante para entender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las nanopartículas (20). La caracterización de las mismas puede ser realizada utilizando una variedad de diferentes técnicas, tales como la microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM, SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS), la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), difracción de rayos X en polvo (XRD), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía UV-Vis(20).

Las técnicas mencionadas anteriormente pueden ser usadas para la determinación de diferentes parámetros, como por ejemplo el tamaño, la forma, la cristalinidad, dimensiones fractales, tamaño de poro y área superficial (20). Además permiten también determinar, la orientación, la intercalación y la dispersión de las nanopartículas y nanotubos en materiales nanocompuestos (20).

El tamaño y la morfología de las partículas pueden ser determinados por las técnicas de TEM, SEM y AFM, donde la AFM presenta una ventaja frente a la microscopía tradicional, ya que la AFM mide imágenes tridimensionales de manera que la altura y el volumen de las nanopartículas pueden ser calculadas (20).

La dispersión de luz dinámica es utilizada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas (20). Además, la difracción de rayos X se utiliza para la determinación de la cristalinidad, mientras que la espectroscopía UV-Vis se utiliza para confirmar la formación de la muestra observando al plasmón de superficie de aquellas nanopartículas que lo presenten (20).

Los materiales a nano escala tienen un amplio rango de aplicaciones, entre ellos se encuentran las aplicaciones en los procesos industriales, en productos de consumo y médicas (11). Estas aplicaciones están basadas en las características químicas y físicas que tienen los materiales a esta escala. Una de las grandes ventajas de los nanomateriales, como ya mencionado anteriormente, es su gran relación superficie-volumen. Esto permite que sean de suma utilidad en aplicaciones médicas, como pueden ser la terapia y el diagnóstico (11). La utilidad que les provee la gran relación superficie-volumen para las aplicaciones médicas se debe a la capacidad de inmovilizar una mayor cantidad de moléculas en el mismo volumen.

Otra aplicación que se le puede dar a la nanotecnología en el diagnóstico es el biosensado (11). Hoy en día existe mucha investigación enfocada en integrar la nanotecnología a los biosensores mediante el uso de nanoestructuras como las nanopartículas (11). Dentro de las nanopartículas más usadas para el desarrollo de nanobiosensores se encuentran las nanopartículas de oro, plata y magnéticas (11). Estas nanopartículas le dan propiedades fisicoquímicas únicas al biosensor, como por ejemplo, la resonancia de plasmón de superficie, o cambio colorimétrico, entre otros (11).

1.5 Nanopartículas de oro en biosensado.

Las nanopartículas de oro son preparadas fácilmente y han sido utilizadas durante cientos de años debido a su color intenso que varía dependiendo del tamaño de la partícula (11). Mientras que las nanopartículas de oro comparten las mismas cualidades para la aplicación biológica que el resto de las nanopartículas, estas tienen características que les dan ventaja, sus propiedades ópticas, su biocompatibilidad y la facilidad con la que es posible la modificación de su superficie con moléculas tioladas (11).

Las nanopartículas de oro pequeñas (10-50nm de diámetro) en agua o vidrio aparecen con un color rojo oscuro (21). El origen físico de este fenómeno está asociado con la oscilación coherente de electrones de la superficie de las nanopartículas de oro inducidas por el campo electromagnético incidente (21). Cuando la luz visible brilla en las AuNPs, la luz de una longitud de onda resonante es absorbida por las AuNPs e induce la oscilación colectiva de electrones de superficie llamada plasmón de superficie (11, 21, 22). AuNPs pequeñas, como por ejemplo de 13 nm de diámetro, absorben la luz verde, que corresponde a una fuerte banda de absorción (banda de plasmón de superficie) a

aproximadamente 520 nm en el espectro de luz visible; por lo tanto las soluciones de AuNPs aparecen de color rojo (21).

La resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de oro se encuentra en la parte del espectro visible (11, 22). La posición dentro del espectro de la banda del plasmón de superficie está determinada por una combinación de características de la nanopartícula, como la composición, el tamaño y la forma (11, 21, 22). También depende de la agregación de las nanopartículas, cuando las nanopartículas se encuentran en un estado agregado, absorben como una única nanopartícula grande (21).

El biosensado con las nanopartículas de oro, típicamente utiliza las propiedades ópticas de las mismas (11, 21, 22). La resonancia del plasmón de superficie es una propiedad que puede ser utilizada para el sensado (11, 21, 22, 23). Esto es debido a que cualquier cambio en las nanopartículas, como la modificación de la superficie, agregación, el índice de refracción del medio, entre otras, causa el cambio colorimétrico (21, 23). En el caso de la agregación, las nanopartículas absorben a longitudes de onda mayores, lo mismo ocurre con nanopartículas de oro de mayor tamaño.

Existe una gran diversidad de métodos mediante los cuales es posible obtener las nanopartículas de oro, tanto con aproximaciones *bottom-up* como *top-down* (11). Los métodos *bottom-up* han sido probados ser más eficientes para obtener nanopartículas de tamaño y forma controlada (11). La síntesis de nanopartículas de oro puede realizarse mediante métodos electroquímicos o mediante reducción química (11).

La síntesis química de las nanopartículas de oro, normalmente incluye una reducción de sales metálicas con un agente reductor (24). Para controlar el crecimiento de las nanopartículas y prevenir la agregación, se usan agentes estabilizantes que pueden ayudar en la estabilidad coloidal por repulsión electrostática o estérica (11).

Un método simple para la síntesis de las nanopartículas de oro es el método Turkevich (25), donde se obtienen una solución de nanopartículas de oro de alrededor de 20 nm, mediante el uso de citrato de sodio tanto como reductor como estabilizador (11, 22). También existen otros métodos, la reducción con borohidruro permite la síntesis de nanopartículas de oro más pequeñas, la misma es aplicada luego que una solución de iones oro sea transferida a fase orgánica (24). También existen métodos de microemulsión, donde se reduce la sal de oro en el *core* acuoso de micelas, y el método de semilla, donde se preparan nanopartículas de oro semilla sobre las cuales se agrega más capas de oro en presencia de un agente reductor débil (24).

Existen además, métodos para sintetizar nanopartículas de oro con formas distintas a la esférica. Uno de los métodos que se utiliza para esto, es el método de semilla, el cual se utiliza para generar nanopartículas en forma de nanotubos y nanoprismas (11). Primero se sintetizan nanopartículas mediante un proceso de reducción de la sal de oro en presencia de agentes estabilizantes, y luego las semillas son crecidas usando una solución de crecimiento con surfactantes y un agente reductor débil (11). En este paso se puede controlar el tamaño de las nanopartículas mediante el ajuste de la cantidad de solución de crecimiento, además se pueden agregar agentes externos como moléculas o iones que afectan la dirección de crecimiento de las nanopartículas para generar distintas formas (11). Otro método es la descomposición térmica, donde el metal precursor es disuelto en una solución poliol (11). El poliol actúa como agente reductor del metal y a temperaturas altas se oxida a varias especies de aldehídos y cetonas (11). También existe la síntesis mediada por un molde, donde la nanopartícula se genera dentro o alrededor del molde y genera una forma complementaria a la del mismo (11). La reacción de reemplazamiento Galvánica es un método donde los iones metales se reducen espontáneamente en partículas y films metálicos en ausencia de un campo eléctrico (11).

La estabilidad coloidal de las nanopartículas es de gran importancia para evitar la agregación de las mismas (11, 21). Una forma de estabilizar a las nanopartículas y evitar su agregación es mediante la adhesión de moléculas a su superficie, las cuales pueden evitar la agregación mediante estabilización iónica (citrato), o por impedimento estérico (PEG) (11, 21).

Las nanopartículas de oro, así como otras nanopartículas metálicas, tienen diversas aplicaciones (Figura 5) (21, 23, 24). Las nanopartículas de oro se aplican en métodos analíticos y en el biosensado de una amplia variedad de analitos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos, moléculas pequeñas, iones metálicos y células enteras (21, 24).

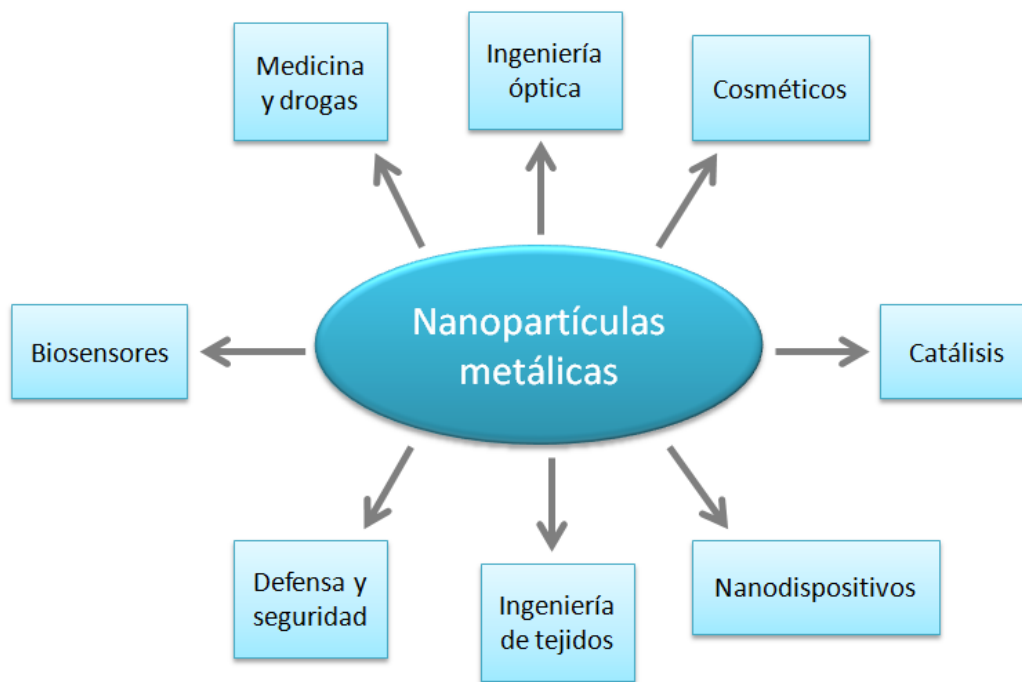


Figura 5: Aplicaciones de nanopartículas metálicas (24).

Como fue explicado anteriormente, un biosensor necesita un bioreceptor, es decir, una molécula capaz de reconocer de manera específica el analito de interés (24). Las biomoléculas, incluyendo a las proteínas, pueden ser conjugadas a las nanopartículas mediante dos aproximaciones, la unión covalente directa de la misma a la superficie de la partícula y las interacciones no covalentes entre ellas (24). La conjugación covalente entre nanopartículas y proteínas provee conjugados más estables, lo cual es importante en los medios complejos de las muestras a analizar (24).

Una aproximación utilizada para la conjugación covalente de nanopartículas a biomoléculas es la química de la carbodiimida (24). En dicha técnica, la carbodiimida activa los grupos carboxilo y facilita su reacción con los grupos amino presentes en las proteínas (24). Una carbodiimida comúnmente utilizada es la N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida hidroclicídrica (EDC), la cual tiene una mayor eficiencia cuando está en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) para la formación del enlace ya que reacciona con los grupos carboxilo formando un éster activo intermedio (Figura 6) (24).

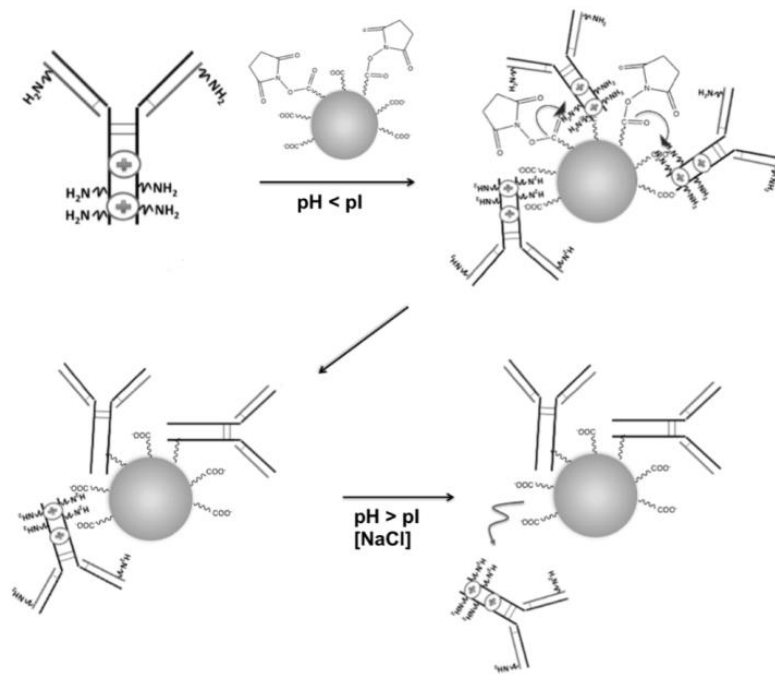


Figura 6: Esquema de inmovilización covalente de anticuerpos en nanopartículas mediante método de EDC NHS (26).

1.6 Nanopartículas magnéticas y biosensado

Los materiales magnéticos han sido utilizados en varias formas en la tecnología, ya sea en motores, generadores, sensores, entre otros (27). Los mismos pueden ser basados en metales tales como el hierro, nickel, cobalto u oxido de metales (27). Es de gran interés la miniaturización de estos materiales, como por ejemplo en nanopartículas magnéticas (27). Las mismas, tienen propiedades diferentes a los mismos materiales a granel (27). En la mayoría de los casos, las nanopartículas magnéticas pequeñas presentan propiedades supermagnéticas a temperatura ambiente, significando que son susceptibles a un campo magnético externo, pero no son magnéticas cuando no hay un campo magnético externo presente (27).

Los nanomateriales magnéticos son de gran utilidad para el biosensado debido a sus propiedades supramagnéticas (28). Es por dichas propiedades que pueden ser utilizados en una variedad de instrumentos y formatos para el biosensado (11). Los biosensores magnéticos están en constante desarrollo y en camino a ser establecidos como competencia en los métodos de detección biológica (11).

La principal desventaja de los biosensores, en especial de los colorimétricos, es la necesidad de eliminar el ruido de fondo presente en las muestras biológicas, las cuales en general tienen una gran cantidad de analitos (18). Por lo tanto, es necesario un paso de enriquecimiento o de pre

concentración de la misma para luego lograr la detección del analito blanco¹⁸. Las nanopartículas magnéticas pueden ser conjugadas a elementos de bioreconocimiento, como por ejemplo anticuerpos, para ser aplicadas en la separación magnética del analito blanco de una matriz compleja (18).

1.7 Desafíos en la biodetección

Los biosensores son una herramienta fundamental en el entendimiento de sistemas vivos, y además son de gran utilidad en un gran rango de aplicaciones, entre ellas se destacan las aplicaciones de diagnóstico.

Para el desarrollo de los biosensores, se busca que los mismos logren cumplir con ciertas características. Las mismas les dan una ventaja a los biosensores frente a otros métodos de detección. Estas características incluyen que sean de uso *in situ*, rapidez, mejorar la logística del transporte de la muestra, bajo ruido para poder aplicarlos a muestras complejas y bajo costo.

Este trabajo apunta al desarrollo de una metodología más sencilla para la detección de una bacteria de impacto agrícola ganadero tal como *Campylobacter fetus fetus*.

2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una nueva metodología nanotecnológica para la detección de *Campylobacter fetus fetus*.

Anteriormente, hemos destacado la importancia de la detección de *Campylobacter fetus fetus*, tanto para el área de la salud pública, como por su impacto económico, especialmente en Uruguay donde es una enfermedad de gran importancia.

Por otro lado, hemos mencionado que los biosensores son una alternativa atractiva para la detección de analitos, como lo pueden ser las bacterias. Esto se debe a las características de los mismos, que incluyen la alta sensibilidad y especificidad, el tiempo de vida largo que tienen, bajos costos de producción, análisis rápidos y en tiempo real, miniaturizables, capacidad multi-análisis, entre otras.

A su vez, también la utilización de nanomateriales en el biosensado presenta ventajas, las mismas se deben a que los materiales a esta escala tienen propiedades únicas, diferentes a cuando se encuentran a granel. Por otro lado, también a esta escala, la relación superficie-volumen es mayor, teniendo mayor cantidad de superficie para la inmovilización de las moléculas biológicas de reconocimiento. Además, una gran ventaja de los nanomateriales, es que se encuentran a la misma escala que las macromoléculas.

Tomando en cuenta todas las ventajas de los biosensores utilizando nanomateriales, se propuso en este trabajo investigar dos diseños de nanobiosensor para la detección de *Campylobacter fetus fetus*. Uno de los diseños involucrando a las nanopartículas de oro en agregación y el otro utilizando tanto nanopartículas magnéticas como nanopartículas de oro. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Generar material de referencia (cepa de *C. fetus fetus*).
- Caracterizar la herramienta de detección (anticuerpos anti *C. fetus fetus*).
- Sintetizar, estabilizar y caracterizar nanopartículas de oro.
- Funcionalizar nanopartículas de oro y magnéticas con anticuerpos anti *C. fetus fetus*.
- Evaluar la funcionalización de las nanopartículas.
- Diseñar metodologías nanotecnológicas para la detección de *Campylobacter fetus fetus*.

- Desarrollar un biosensor.
- Caracterizar el biosensor.

3. Metodología

3.1 Materiales:

Las bacterias *Campylobacter fetus fetus* (ATCC® 25936™) fueron adquiridas de ATCC. Los anticuerpos primarios utilizados Anti-Campylobacter Fetus antibody clone 1053/350 ABIN471967 y Anti-Campylobacter Fetus antibody clone 123/117 ABIN471966 fueron obtenidos de Antibodies online. Anticuerpo secundario Anti-mouse IgG A2429, ácido poli(etilen glicol) 2-mercaptoetil eter acético (PEG), etilendiamina (EDA), el Nitrofenil fosfato (pNPP) y la solución de revelado BCIP/NBT solution premixed de Sigma Aldrich. Marcador de peso molecular See Blue Plus 2 Prestained y el kit iBlot Gel Transfer Stocks Nitrocelulose Regular de Novex by life technologies. Filtro concentrador de proteínas GE 3,000MWCO 2mL de GE Healthcare. Albumina de suero bovino (BSA) de gibco by Life Technologies y CH₃-PEG-NH₂ de Rapp Polymere.

Los demás materiales que se utilizaron fueron de grado analítico.

Los reactivos utilizados en la metodología del trabajo están nombrados a lo largo del ítem 3.2 Métodos. La composición de los medios de cultivo y de las soluciones utilizadas se encuentra detallada en el Anexo 1.

3.2 Métodos:

3.2.1 Regeneración de la cepa *Campylobacter fetus fetus*:

Se adquirió la cepa *Campylobacter fetus fetus* (ATCC® 25936™) en estado liofilizado. Para la propagación de la misma, se resuspendió el liofilizado en 1 mL de medio tioglicolato. Luego se inoculó con 0,5 mL de la suspensión en 10 mL de tioglicolato y se incubó a 37°C durante 3 días. Después se estrió, a partir de este cultivo, en una placa de TSA sangre y a partir de una colonia aislada se creció en 50 mL de medio Brucella broth ph 7,0 en condiciones microaerófilas y a 37°C. Una vez crecido el cultivo se conservó la cepa como descrito en metodología 3.2.2.

3.2.2 Conservación de la cepa:

La cepa crecida en cultivo líquido Brucella broth, luego fue centrifugada a 4000 g durante 10 minutos y resuspendida en 1 mL de medio Brucella broth 30% glicerol y almacenada a -80°C.

3.2.3 Crecimiento de *Campylobacter fetus fetus* en medio de cultivo solido:

Se realizó un estriado a partir de un cultivo líquido de la bacteria en medio Brucella broth. El estriado se realizó en una placa de TSA sangre y fue incubado a 37°C en una cámara de anaerobiosis utilizando una vela para crear un ambiente microaerófilico.

3.2.4 Estandarización del crecimiento en medio de cultivo líquido de *Campylobacter fetus fetus*:

Se creció *Campylobacter fetus fetus* en 50 mL de medio Brucella broth pH 7,0 a partir de una colonia aislada en TSA sangre o del raspado de la cepa conservada a - 80°C en Brucella broth 30% glicerol. El mismo se incubó 24 horas en un shaker a 37°C a 100 rpm dentro de una cámara de anaerobiosis utilizando una vela para crear un ambiente microaerófilico. Se midió la OD a 600 nm y se diluyó a una OD de 0,7 para inocular un nuevo matraz, con 50 mL de medio Brucella broth, con 500 µL de cultivo repitiendo la incubación para el crecimiento del mismo.

3.2.5 Visualización de la cepa *Campylobacter fetus fetus* por tinción con cristal violeta:

Para la visualización por microscopía de la cepa, se tiñó la cepa con el colorante cristal violeta. Para ello, se extendió la muestra de cultivo líquido en un porta objetos de cristal y se dejó secar al aire.

En seguida, se fijó la muestra por calor (flameando tres veces en el mechero) y se añadió el colorante cristal violeta. Se dejó 1 minuto el colorante sobre la muestra y se lavó la misma con agua destilada.

3.2.6 Identificación bioquímica de la cepa de *Campylobacter fetus fetus* por la prueba catalasa:

Se colocó una gota de peróxido de hidrogeno 30% sobre un porta objetos y se depositó la muestra del cultivo bacteriano sobre el reactivo.

El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno se tomó como catalasa positiva.

3.2.7 Identificación bioquímica de la cepa de *Campylobacter fetus fetus* por la prueba oxidasa:

Se colocó un papel de filtro sobre una placa de petri y se añadió una gota del reactivo de oxidasa. A continuación, se depositó con un palillo de madera la muestra del cultivo bacteriano sobre el reactivo.

La reacción positiva se observa con la aparición de un color azul-violeta intenso.

3.2.8 Preparación de proteínas del lisado celular para SDS-PAGE y Western Blot:

Se tomaron 10 mL de cultivo de *C. fetus fetus*, y se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos. Se resuspendieron en 20 ml de PBS y se repitió el lavado 2 veces, resuspendiendo el último pellet en 1 mL de PBS. Luego se hirvió la suspensión durante 15 minutos en un baño de agua para lograr la lisis de las bacterias. Una vez lisadas las bacterias, se centrifugó el lisado a 17000 g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se concentró con un filtro concentrador de proteínas, con un corte de membrana de 3 KDa, centrifugando a 4000 g a 4°C hasta recuperar 200 µL. De esta manera se concentró el lisado 50 veces.

3.2.9 Visualización del lisado bacteriano por SDS-PAGE:

De manera de visualizar las proteínas del lisado celular se realizó una electroforesis del mismo en un gel de poliacrilamida al 10% cargando 25 µL de cepa lisada con buffer de carga reductor y 7 µL de marcador de peso molecular. Se corrió la electroforesis con un voltaje de 120 V y se dejó el amperaje libre. Se reveló por tinción con plata.

3.2.10 Tinción de geles con solución de nitrato de plata:

El revelado del gel de poliacrilamida, para la visualización del perfil proteico del lisado celular, fue realizado por tinción con plata. Todos los pasos de la tinción se realizaron en agitación y a temperatura ambiente y se encuentran detallados a continuación.

Luego de concluída la electroforesis, se sumergió el gel en suficiente volumen de solución de fijación, de manera que el mismo quede cubierto, y se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se descartó la solución de fijación y se sumergió el gel en un volumen similar de solución de lavado durante 15 minutos. Este paso fue realizado dos veces.

En seguida se hicieron tres lavados con agua milliQ durante 5 minutos y una vez finalizado, se incubó el gel en solución de tiosulfato durante un minuto. Se realizaron tres lavados con agua miliQ durante 30 segundos y se incubó el gel durante 20 minutos con solución de nitrato de plata. Se enjuagó el gel dos veces con agua milliQ y se sumergió el gel en suficiente volumen de solución reveladora. Se agitó suavemente hasta que se visualizaron las diferentes bandas, y se detuvo la reacción inmediatamente colocado el gel en la solución de detención.

3.2.11 Western Blot de anticuerpos monoclonales comerciales:

Para la realización del Western Blot se realizó previamente una electroforesis SDS-PAGE. Luego las proteínas del gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con el kit del iBlot siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego se bloqueó la membrana con PBS Tween 0,05% leche 5% a 4 °C overnight. Después se lavó la membrana tres veces con PBS Tween 0,05% durante 10 minutos a 70 rpm. Se incubó la misma durante 1 hora con 0,5 µg/mL de anticuerpo primario anti *Campylobacter fetus fetus* a 37 °C a 70 rpm, nuevamente se lavó la membrana tres veces con PBS Tween 0,05% durante 10 minutos a 70 rpm. Una vez finalizados los lavados, se incubó 1 hora con una dilución 1/1500 de anticuerpo secundario anti-mouse como recomienda el fabricante a 37 °C a 70 rpm y se repitieron los lavados. Se reveló el Western blot con BCIP/NBT solution, premixed.

3.2.12 ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales comerciales:

Se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 100 µL anticuerpo primario a 0,5 µg/mL en buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 se incubó overnight a 4°C. Se lavó cuatro veces con PBS Tween 0,05% y se bloqueó cubriendo el pocillo completamente con PBS Tween 0,05% leche 5% durante 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente cuatro veces con PBS Tween 0,05% y se agregaron 100 µL de *C. fetus fetus* a distintas OD a 600 nm y se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación. Se lavó nuevamente y se agregaron 100 µL de anticuerpo primario a 2 µg/mL en PBS Tween 0,05% y se incubó 1 hora a 37°C. Se volvió a lavar cuatro veces en PBS Tween 0,05% y se agregaron 100 µL de anticuerpo secundario anti mouse diluido en PBS Tween 0,05% incubando 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se reveló con pNPP en buffer Tris-HCl pH9,5 y se midió la absorbancia a 405 nm.

3.2.13 Curva relacionando OD a 600 nm con UFC/mL:

De manera de obtener una curva que relacione OD a 600 nm y UFC/mL, se creció un cultivo de *C. fetus fetus* en medio Brucella broth. Luego se plaquearon duplicados de distintas diluciones del cultivo que se encontraban dentro del rango lineal del equipo de las OD a 600 nm en placas de TSA sangre. Se realizaron tres diluciones de cada una de las mismas de manera de obtener una placa contable (entre 25 y 250 colonias) y a partir de esta placa poder deducir las UFC/mL correspondientes para dicha dilución. Una vez obtenidas las UFC/mL para las diluciones, se graficó la curva de UFC/mL en función de las OD a 600 nm.

3.2.14 Nanopartículas de oro:

3.2.14.1 Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis se realizó según el método de Turkevich (25). Se lavó un matraz de 500 mL con agua regia y se enjuagó con agua milliQ, luego se secó en la estufa y se envolvió con aluminio. Una vez que se secó, se añadieron 80 mg de sal citrato de oro en 195 mL de agua milliQ. Se calentó la disolución hasta su ebullición agitando con imán. Cuando se llegó a la ebullición se añadió 239,9 mg de citrato de sodio tribásico dihidratado disueltos en 5 mL de agua milliQ y se calentó durante 30 minutos. Luego de los 30 minutos de ebullición se dejó enfriando a temperatura ambiente.

Durante la síntesis se trabajó con un sistema de reflujo para evitar pérdida de volumen por la evaporización.

De manera de caracterizar y determinar la concentración de las nanopartículas de oro sintetizadas se midió el espectro UV-visible (entre 400 y 600 nm).

3.2.14.2 Estabilización con PEG

Se mezclaron 0,5 nmol de las nanopartículas de oro sintetizadas, 125 μ L de SDS 10%, 120 μ L de PEG 10 mg/mL, 625 μ L de NaOH 2 M y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua milliQ.

Esta mezcla se dejó en agitación overnight a temperatura ambiente. Luego, se lavó tres veces con agua milliQ por centrifugación a 12700 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalizado el último paso de centrifugación, se resuspendió el pellet de nanopartículas en 5 mL de buffer MES 10 mM, pH 5,0.

De manera de caracterizar las nanopartículas de oro estabilizadas con PEG y calcular la concentración de las mismas, se midió el espectro UV-Visible (entre 400 y 600 nm).

3.2.14.3 Funcionalización con anticuerpos

Para la funcionalización y agregación de las nanopartículas de oro estabilizadas con PEG, primero se prepara la solución activadora. La solución activadora se realizó mezclando 20 μ L de solución EDC 10 mg/mL en MES 10 mM pH 5,0 y 30,5 μ L de sulfo-NHS 10 mg/mL en MES 10 mM pH 5,0 y se dejó en agitación 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego se agregó a la solución activadora 20 pmol de nanopartículas de oro estabilizadas con PEG, llevando a un volumen final de 500 μ L con buffer MES 10 mM pH 5,0 y se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C en agitación. Una vez finalizada la incubación, se eliminó el exceso de solución

activadora por centrifugación, utilizando tubos Amicon con corte de 100 kDa, 10 minutos a 11000 rpm. Después de la centrifugación, se lavó el pellet con buffer MES 10 mM pH 5,0 y se vuelve a centrifugar durante 30 minutos a 13400 rpm a 4°C.

Se resuspendió el pellet con la cantidad de anticuerpo requerida y llevando a un volumen final de 500 μ L o 200 μ L (utilizando 500 μ L para nanopartículas de oro sin agregar y 200 μ L para obtener nanopartículas de oro agregadas) con buffer MES 10 mM pH 5,0. Se incubó la solución durante 45 minutos a 37°C en agitación. Luego de la incubación se centrifugó a 13400 rpm durante 30 minutos a 4°C.

El pellet se resuspendió en 500 o 200 μ L (utilizando 500 μ L para nanopartículas de oro sin agregar y 200 μ L para obtener nanopartículas de oro agregadas) de buffer de desorción (fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 con 500 mM de NaCl). Se incubó durante 30 minutos a 37°C en agitación. Se centrifugó luego de la incubación a 13400 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Finalmente, se resuspendió el pellet en 500 μ L de buffer de bloqueo (Bicarbonato de sodio 10 mM pH 8,0 con 50 mM de PEG aminado o 50 mM de EDA). Se incubó overnight en agitación a 4°C. Después de la incubación se centrifugó durante 30 minutos a 13400 rpm a 4°C. El pellet fue resuspendido en 500 μ L de buffer MES 10 mM pH 5,0 y las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo son caracterizadas por la medida del espectro UV-visible (entre 400 y 600 nm).

3.2.15 Electroforesis en gel de Agarosa de nanopartículas de oro:

Con el objetivo de verificar la correcta funcionalización de las nanopartículas de oro con el anticuerpo, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa 1%.

En la misma se cargaron 20 μ L de nanopartículas de oro con buffer de carga, 20 μ L de nanopartículas de oro estabilizadas con PEG con buffer de carga y 20 μ L de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos con buffer de carga.

Se corrió la electroforesis con un voltaje de 100V durante 1 hora.

3.2.16 Funcionalización de nanopartículas magnéticas:

Las nanopartículas magnéticas fueron adquiridas comercialmente ya sintetizadas.

Para la funcionalización de las nanopartículas magnéticas, se realizó primero una etapa de lavado de las mismas para eliminar restos de detergentes que vienen en la solución comercial. Se lavaron 5 mg de nanopartículas magnéticas 3 veces con 125 μ L de MES 10 mM pH 5,5.

Luego se activaron las nanopartículas magnéticas lavadas en 125 μL de solución 50 mM EDC y 75 mM NHS en buffer MES 10 mM pH 5,0 durante 30 minutos a 37°C en agitación. Luego se lavó con el mismo buffer MES durante 5 minutos dos veces.

Para la unión del anticuerpo, se adaptó la técnica de la Tesis de doctorado de Ester Polo, Zaragoza (26). Se agregaron 20 μL de las nanopartículas magnéticas activadas, 20 μL de anticuerpo y 160 μL de buffer MES 10 mM pH 5, incubando la solución durante 60 minutos a 37°C en agitación.

El anticuerpo no unido fue separado de la mezcla utilizando un imán, luego se lavó con buffer MES 10 mM pH 5,0 durante 5 minutos.

Luego se incubaron las nanopartículas funcionalizadas en 200 μL de buffer de desorción (fosfato de sodio 10 mM pH 8 con 300 mM de NaCl) durante 15 minutos a 37°C en agitación. Luego se separó el sobrenadante de las nanopartículas magnéticas con un imán. Se agregó 200 μL de BSA al 2% para bloquear la superficie de las nanopartículas y se incubó a 4°C overnight en agitación.

Luego se separó la solución de bloqueo de las nanopartículas magnéticas mediante un imán y se lavó una vez con buffer MES 10 mM pH 6,0 y se resuspendió en 200 μL este mismo buffer.

3.2.17 Electroforesis SDS-PAGE para verificación de unión de anticuerpo a las nanopartículas:

Con el objetivo de verificar la correcta funcionalización de las nanopartículas, tanto magnéticas como de oro, con anticuerpos, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 10%. En la misma se cargaron 7 μL de marcador de peso molecular, 25 μL de solución de anticuerpo aplicada con buffer de carga reductor, 25 μL del sobrenadante luego de la incubación con anticuerpos de las nanopartículas magnéticas y de oro (anticuerpos que no se unieron) con buffer de carga reductor y 25 μL de sobrenadante luego de la desorción de los anticuerpo de las nanopartículas magnéticas y de oro (anticuerpos que se unieron iónicamente pero no covalentemente) con buffer de carga reductor. Se corrió la electroforesis con un voltaje de 120 V y amperaje libre. Se reveló por tinción con plata.

3.2.18 Ensayo de detección de *Campylobacter fetus fetus* utilizando un sistema con nanopartículas magnéticas y de oro:

Con el objetivo de detectar *Campylobacter fetus fetus* en una muestra problema, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente 5 μL de nanopartícula magnética funcionalizada con anticuerpo con 250 μL de la muestra a analizar. Luego de la incubación se realizaron tres lavados con 250 μL de buffer MES 10 mM pH 5, sometiendo a la muestra al imán para la separación del sobrenadante. Una vez concluidos los lavados, se incubó, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, el

pellet con 250 μ L de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo a una absorbancia de 0,3 en el pico máximo. Luego se colocó la muestra en el imán y se midió en el espectrofotómetro la absorbancia en el pico máximo del sobrenadante, de manera de comparar la absorbancia de las nanopartículas de oro aplicadas y el sobrenadante luego de la incubación. Se utilizó como control negativo 250 μ L de buffer MES 10 mM pH5 en lugar de la muestra con bacterias.

3.2.19 Ensayo de detección de *Campylobacter fetus fetus* utilizando un sistema con nanopartículas de oro agregadas:

Con el objetivo de detectar *Campylobacter fetus fetus* en una muestra, se incubaron 100 μ L de la solución de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo, con una absorbancia de 0,3 en el pico máximo, con 40 μ L de una dilución de bacteria en buffer MES 10 mM pH 5. Los ensayos se incubaron durante 90 minutos a 37°C en agitación. Luego de la incubación se midió el espectro UV-Visible. Se utilizó como control negativo 100 μ L de buffer MES 10 mM pH 5.

4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento de la cepa *Campylobacter fetus fetus*:

El desarrollo de un biosensor, necesita de un estándar para calibrar, optimizar y determinar parámetros de sensibilidad, linealidad y rango dinámico. Dicho estándar de la cepa, se necesita para poder hacer los ensayos y poner a punto los nanobiosensores antes de ser probados con muestras de campo.

Para ello, se adquirió la cepa *Campylobacter fetus fetus* de ATCC. Para la propagación de la misma a partir del liofilizado, se resuspendió el mismo en 1 mL de medio tioglicolato. Luego se inocularon 10 mL de tioglicolato con 0,5 mL de la suspensión del liofilizado, incubando el cultivo a 37°C durante 3 días. Después se inoculó, a partir de este cultivo, en 50 mL de medio Brucella broth, el medio recomendado por ATCC, pH 7,0 en condiciones microaerofílicas en agitación y a 37°C.

Una vez que se logró el crecimiento en Brucella broth, se realizó un estriado en una placa de TSA sangre incubando en condiciones microaerofílicas a 37 °C, (Figura 7) y se comenzó un cultivo líquido Brucella broth a partir de una colonia aislada.

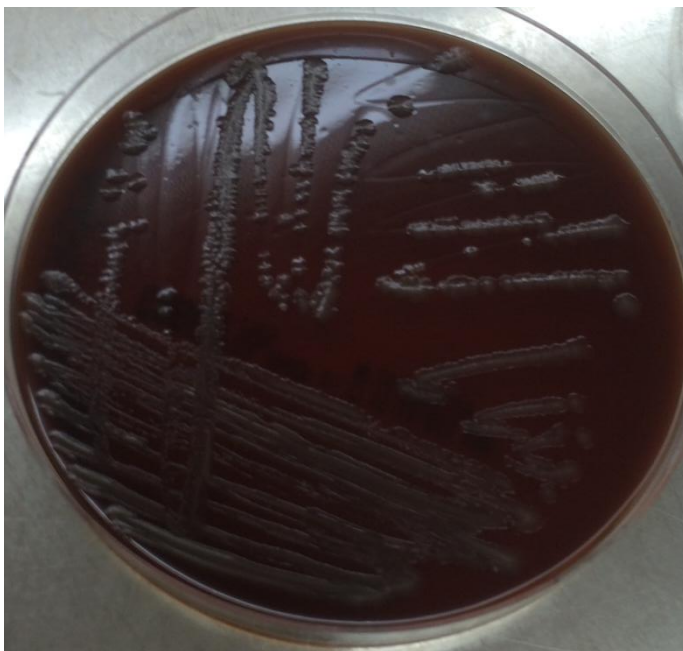


Figura 7: Estriado de *Campylobacter fetus fetus* en una placa de TSA sangre.

En la Figura 7 se observa el estriado, donde se puede ver que las colonias tienen la morfología esperada, translúcidas, pequeñas, circulares, brillantes, chatas y grises.

Por otro lado se realizó una tinción con cristal violeta (Figura 8) donde se comprobó que las células son espiroquetas y que presentan una morfología alargada (2). Las células se encuentran agrupadas en pares o solas (2).

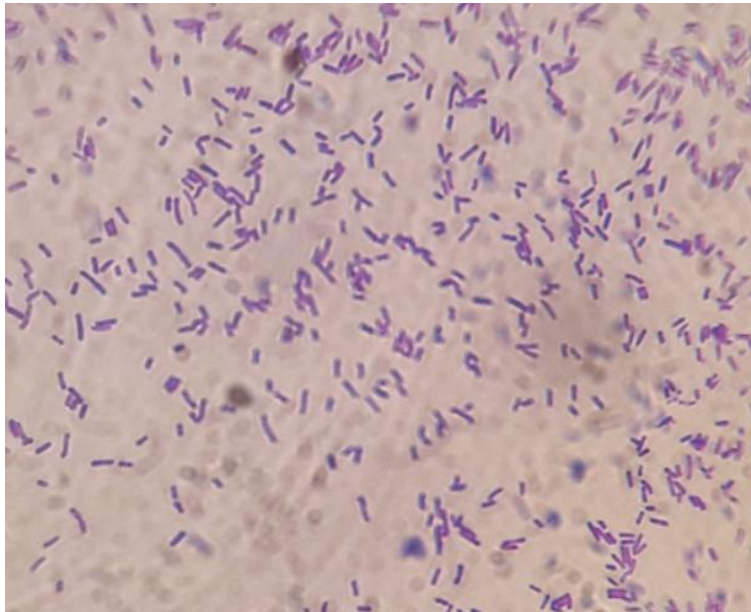


Figura 8: Tinción con cristal violeta de *Campylobacter fetus fetus*.

Con el objetivo de confirmar la identidad de la bacteria, se realizaron pruebas bioquímicas además de la observación de la morfología ya mencionada utilizando como control negativo de la oxidasa a *Escherichia coli* y como control negativo de la catalasa a *Streptococcus*. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron la prueba de la catalasa y la oxidasa (Figura 9). En la bibliografía, se reporta como característica de *Campylobacter fetus fetus* las pruebas de catalasa y oxidasa positivas (2).

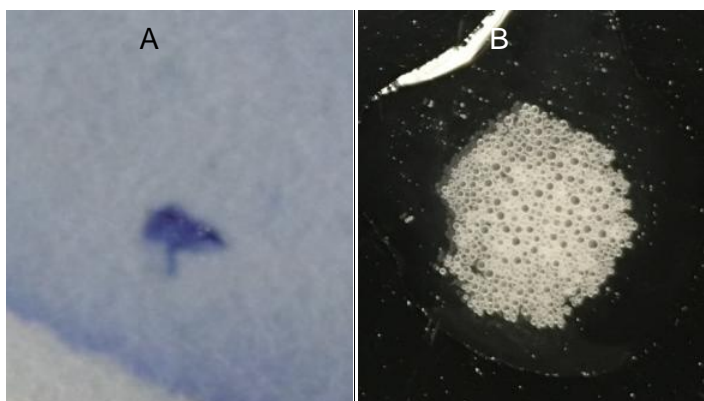


Figura 9: Pruebas bioquímicas de *Campylobacter fetus fetus*, (A) prueba de la oxidasa, (B) prueba de la catalasa utilizando peróxido de hidrógeno 30% como reactivo.

Se puede observar en la Figura 9 A y B que las pruebas bioquímicas son ambas positivas. En la Figura 9A se ve el color azul indicador de que es una especie oxidasa positivo y en la Figura 9B se ven burbujas de peróxido de hidrogeno indicando que es catalasa positiva. Estos resultados se corresponden con las características de *Campylobacter fetus fetus* (2).

4.2 Estandarización del crecimiento de *Campylobacter fetus fetus*:

Para el desarrollo de un biosensor para la bacteria de estudio es esencial contar con una correlación entre la OD 600 nm durante el crecimiento y la cantidad de bacterias. Esta necesidad surge de contar con muestras de concentración conocida de bacterias para determinar el rango dinámico del biosensor y el límite de sensibilidad.

Para esto, se realizó una curva de calibración relacionando unidades formadoras de colonias por mililitro con la OD a 600 nm. Para ello, se creció un cultivo de *C. fetus fetus* a 37°C y en agitación en un ambiente microaerofílico siguiendo los pasos de la metodología del punto 2.2.4. Una vez crecidas las bacterias, se midieron las OD a 600 nm de diluciones del cultivo, se tomaron aquellas diluciones presentaban una relación lineal entre OD a 600 nm y el factor de dilución en el rango lineal del espectrofotómetro. De cada una de las diluciones se volvieron a hacer tres diluciones, las cuales se plaquearon por duplicado, de manera de obtener una placa contable a partir de la cual obtener las UFC/mL. (Figura 10.A).

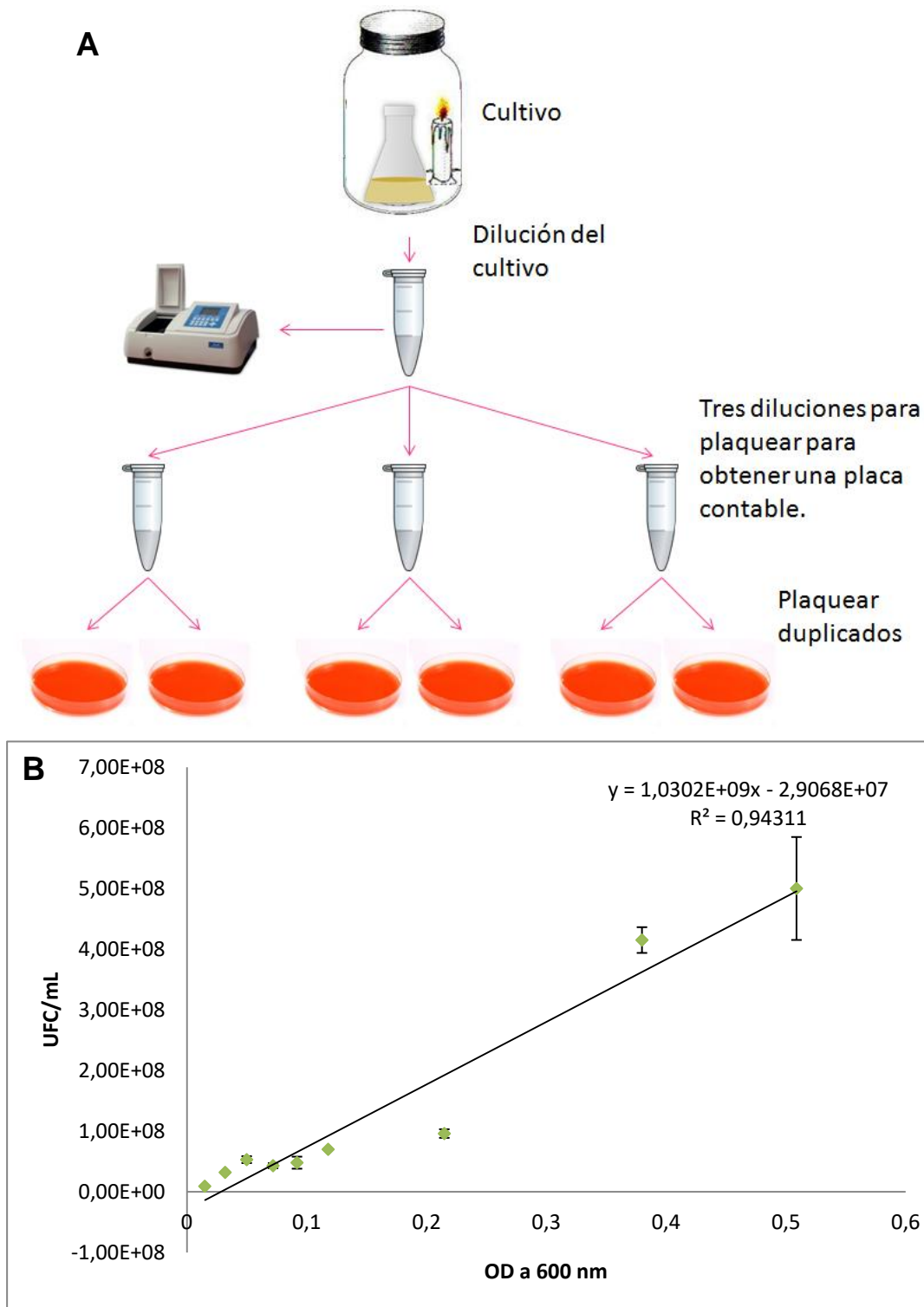


Figura 10: (A) Esquema de metodología para la obtención de una curva de calibración entre concentración de bacterias y OD a 600 nm (B) Curva de calibración entre OD600nm y UFC/mL de *Campylobacter fetus fetus*.

A partir de la curva en la Figura 10.B se puede determinar las UFC/mL de los cultivos con estas condiciones de crecimiento midiendo la OD_{600nm}. Esta curva de calibración es de gran importancia

para los ensayos, ya que es necesario conocer la concentración de bacterias utilizadas para poder determinar los rangos de detección del nanobiosensor.

Como se puede observar en la Figura 10.B, el rango lineal de la curva de se encuentra entre las OD a 600 nm de 0 a 0,5, con un R^2 de 0,94. Este R^2 se puede deber a que es un experimento biológico donde la variabilidad es significativa debido a la manipulación, además de que se debió trabajar con muestras muy diluidas las cuales presentan mayor error. Esta también es la razón por la cual en los puntos con OD a 600 nm mas altas se encuentra un error mayor que en concentraciones menores, la mayor dilución de la muestra para poder lograr obtener una placa contable se ve reflejada en el error más alto de estos puntos. Este ensayo fue repetido más de tres veces, siempre presentando errores significativos.

A pesar del error de la curva, se considera que la misma puede ser utilizada para relacionar la OD a 600 nm con las UFC/mL en los ensayos futuros. Esto es debido a que no es necesario contar con un valor exacto de la concentración bacteriana, además de que los errores se presentan dentro de un mismo orden de magnitud.

4.3 Síntesis, estabilización y funcionalización de nanopartículas de oro:

Como fue descrito anteriormente, las nanopartículas de oro fueron sintetizadas por el método de Turkevich. Una vez sintetizadas, fueron estabilizadas con PEG para evitar la agregación de las mismas. Luego se las funcionalizó con anticuerpos unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas. Es de suma importancia caracterizar las nanopartículas en cada una de las etapas para comprobar que se lograron sintetizar, estabilizar y funcionalizar y que por lo tanto se está cumpliendo los pasos de preparación de las nanopartículas de oro. Es por esto que se realizaron medidas del espectro UV-Visible entre 400 y 600 nm, también se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar el retraso de las nanopartículas de oro en sus distintas etapas de preparación.

La resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de oro se encuentra en el espectro visible y depende de características de las nanopartículas. La banda del plasmón de superficie cambia según el tamaño y según cambios realizados a la superficie de la nanopartícula.

El cambio en la banda del plasmón de superficie por las modificaciones realizadas a la superficie de las nanopartículas, es la propiedad que se utiliza para la caracterización de las nanopartículas. Se puede ver y corroborar los cambios en el plasmón de superficie en las etapas de síntesis, estabilización y funcionalización de las mismas mediante la medida del espectro UV-visible (Figura 11).

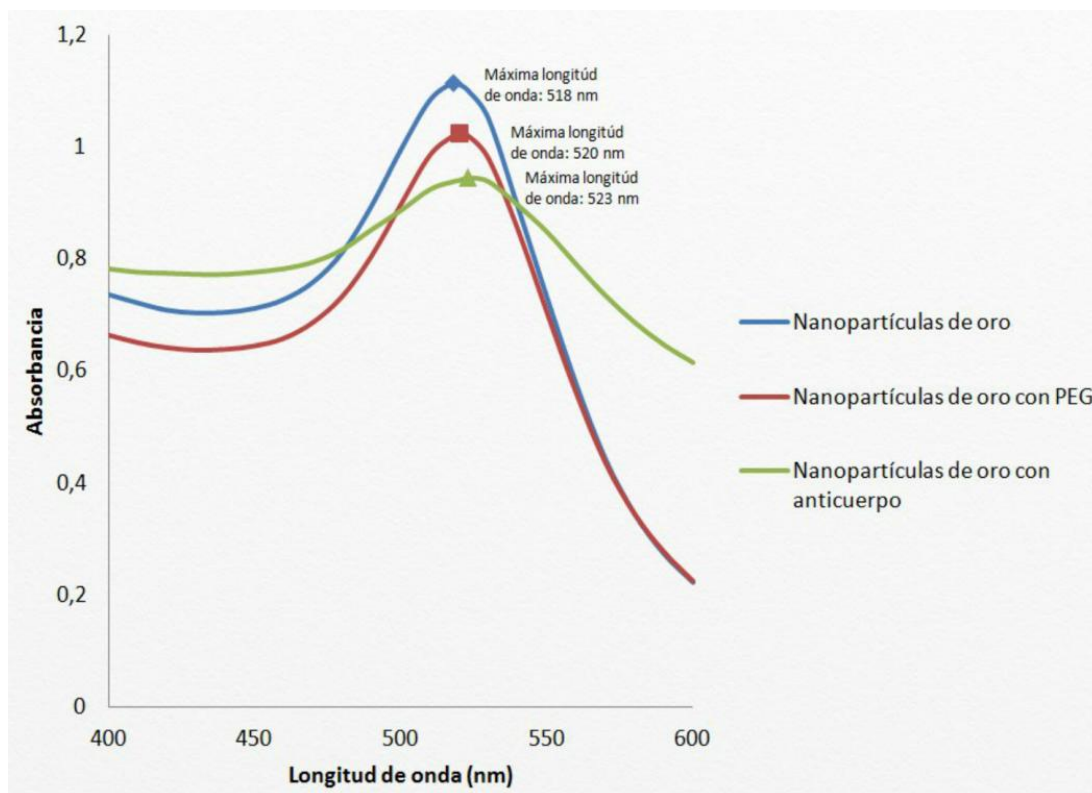


Figura 11: Caracterización de nanopartículas de oro en la síntesis, estabilización y funcionalización mediante espectroscopía UV-visible.

Como se puede observar en la Figura 11, las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich presentan un pico máximo de absorbancia a una longitud de onda de 518 nm lo cual se corresponde a nanopartículas de un tamaño de alrededor de 14 nm. Una vez que se estabiliza la superficie de las nanopartículas de oro con PEG, las mismas pasan a tener un pico máximo de absorbancia a una longitud de onda de 520 nm, indicando que la superficie fue modificada y por lo tanto el plasmón de superficie cambió. Lo mismo ocurrió cuando las nanopartículas estabilizadas con PEG fueron funcionalizadas con anticuerpo, la banda del plasmón de superficie incrementó de los 520 nm a los 523 nm. Para cada uno de los espectros UV-Visible se realizaron tres ensayos independientes. Este resultado es un indicador de que se logró cumplir con las distintas etapas de preparación de las nanopartículas de oro para ser utilizadas en el nanobiosensor.

Para corroborar que se logró cumplir con las etapas de estabilización y funcionalización de las nanopartículas de oro, se realizó una electroforesis de retraso en gel de agarosa de las nanopartículas luego de su síntesis, estabilización y de su funcionalización (Figura 12), no es necesaria la tinción del gel debido a que las nanopartículas de oro presentan color rojo.

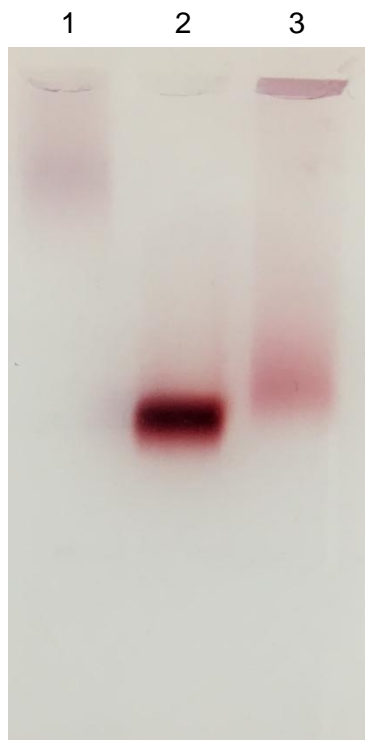


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa 1% de las nanopartículas de oro en sus etapas de preparación. Carril 1: síntesis, carril 2: estabilización con PEG, carril 3: funcionalización con anticuerpos.

En las etapas de estabilización con PEG y funcionalización con anticuerpos el tamaño de la nanopartícula aumenta ya que se le agregan moléculas a la superficie. Este aumento de tamaño se ve reflejado en el retraso de las nanopartículas en la electroforesis en gel de agarosa (Figura 12). Se puede ver la diferencia de tamaño entre las nanopartículas estabilizadas con PEG y las funcionalizadas con anticuerpo ya que las funcionalizadas con anticuerpo se retrasan en el gel por su mayor tamaño. Por otro lado las nanopartículas de oro del carril 1, se encuentran estabilizadas con citrato, el mismo se une mediante puentes de hidrogeno a las nanopartículas de oro, las cuales son interacciones débiles y se rompen con el agregado del buffer de carga. Es por esto que el citrato se ve desplazado cuando se agrega el buffer de carga y las nanopartículas de oro agregan, viéndose retrasadas en el carril con respecto a las nanopartículas estabilizadas con PEG y las nanopartículas funcionalizadas.

La solución de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich (Figura 13) logró mantenerse estable durante un tiempo mayor a 8 meses manteniendo el máximo de absorbancia en la misma longitud de onda con el mismo valor de absorbancia. A su vez, la solución de nanopartículas de oro estabilizadas con PEG, se mantuvieron estables por 6 meses.

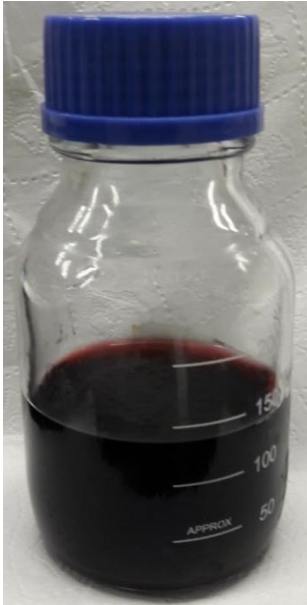


Figura 13: Suspensión coloidal de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.

Como se puede ver en la Figura 13, la solución coloidal de nanopartículas de oro presenta un color rojo, como es esperado para nanopartículas de alrededor de 14 nm.

4.4 Diseños propuestos de nanobiosensor

Para la detección de *Campylobacter fetus fetus* se propusieron dos diseños de nanobiosensores. Uno de ellos basado en nanopartículas magnéticas y de oro funcionalizadas con anticuerpo y otro basado en un ensayo de desagregación de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo.

El primero incluye en una primera instancia de concentración de las bacterias mediante el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpo. Seguida por una etapa de incubación con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo. Luego por separación con imán, si hay bacteria se atrapa en el imán las nanopartículas magnéticas las cuales se encuentran unidas a las bacterias, y las bacterias también son unidas a las nanopartículas de oro. Por lo que si hay presente bacteria, baja la concentración de nanopartículas de oro en solución. Se mide el espectro UV-visible de una solución de nanopartículas de oro funcionalizadas antes y después de ser incubadas con las bacterias y nanopartículas magnéticas de manera de observar un cambio de absorbancia en el pico máximo.

En el ensayo de desagregación se encuentran las nanopartículas agregadas las cuales tienen una banda de plasmón de superficie correspondiente a nanopartículas de mayor tamaño. Cuando se incuban con la bacteria, los anticuerpos reconocen a las mismas y se comienza la desagregación, cambiando la banda del plasmón de superficie.

En ambos ensayos se requiere de la utilización de anticuerpos por lo que en una primera instancia se estudió su especificidad y el reconocimiento de la bacteria por los mismos.

4.5 Electroforesis SDS-PAGE de lisado de *Campylobacter fetus fetus*:

Como ya mencionamos, uno de los elementos fundamentales a considerar en el desarrollo de un biosensor es la molécula de reconocimiento y el tipo de interacción con el antígeno.

Para conocer más acerca de los anticuerpos comerciales con los que contamos se realizó un Western Blot con un lisado de *Campylobacter fetus fetus*. El primer paso para ello fue realizar el lisado de la bacteria, el cual se obtuvo hirviendo un cultivo líquido de la misma y luego concentrando las proteínas.

Con el objetivo de observar el perfil proteico de la bacteria *Campylobacter fetus fetus*, se creció la misma, para luego a partir del lisado, obtener las proteínas para analizar por SDS-PAGE. Luego de la corrida se tiñó el gel por tinción con plata y el mismo se puede observar en la Figura 14.

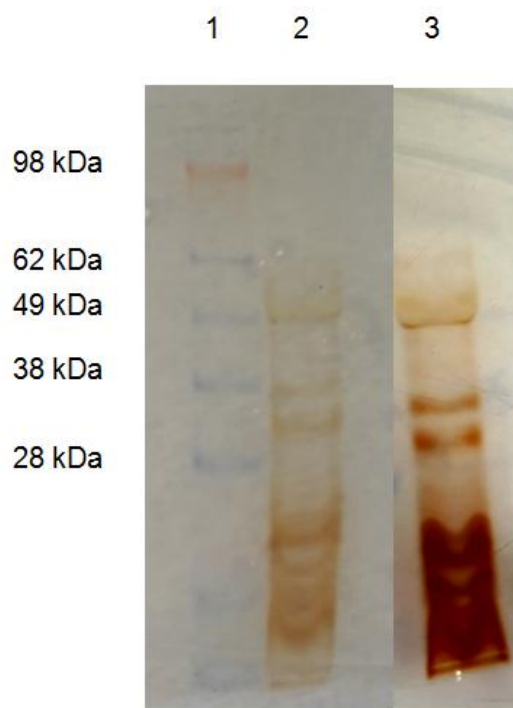


Figura 14: SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 10%, Carril 1: Marcador de peso molecular (See Blue Plus2 Prestained standard), Carril 2: Muestra de lisado de *Campylobacter fetus fetus*, tinción de 5 minutos, Carril 3: Muestra de lisado de *Campylobacter fetus fetus*, tinción de 20 minutos.

En la Figura 14 se logró la visualización de la electroforesis del lisado proteico de *C. fetus fetus* y por lo tanto es posible la realización de un Western Blot para determinar si hay reconocimiento de las proteínas bacterianas por los anticuerpos, y el peso molecular de las proteínas reconocidas.

4.6 Reconocimiento de proteínas de la bacteria por anticuerpos monoclonales comerciales:

El Western Blot fue realizado a partir de la transferencia de un SDS-PAGE del lisado bacteriano a una membrana de nitrocelulosa. A continuación se visualiza el resultado (Figura 15).

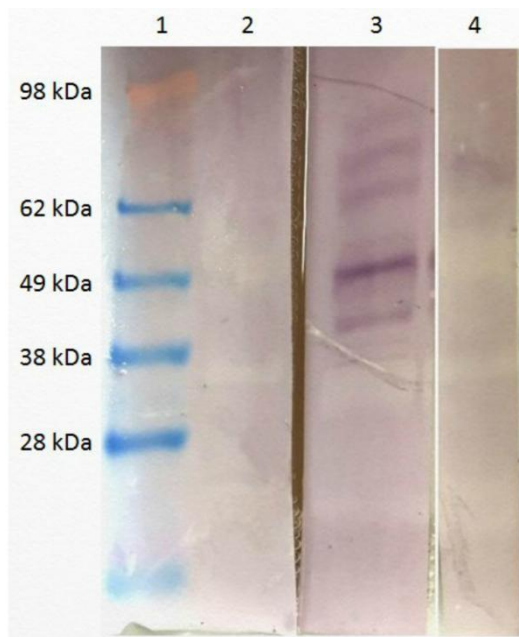


Figura 15: Western Blot a partir de SDS-PAGE, Carril 1: Marcador de peso molecular (See Blue Plus2 Prestained standard), Carril 2: Control negativo con el lisado bacteriano y sin anticuerpo primario, Carril 3: Incubación con anticuerpo primario 66, Carril 4: Incubación con anticuerpo primario 67.

En la Figura 15 se puede observar que ambos anticuerpos reconocen proteínas de *C. fetus fetus*, se ven varias bandas de reconocimiento con el anticuerpo 66 y una con el anticuerpo 67, indicando que los anticuerpos reconocen epítopes de la bacteria. En el carril 2 se observa que no hay reconocimiento de ninguna proteína en el control negativo, es decir no hay reconocimiento de proteínas del lisado por el anticuerpo secundario únicamente, haciendo válido el ensayo.

Es necesario para los diseños de biosensor propuestos, que se logren reconocer epítopes repetidos en la bacteria o que cada uno de los anticuerpos reconozca un epítope distinto de la bacteria. La presencia de epítopes repetidos en la célula o el reconocimiento de epítopes distintos, podría permitir la unión de más de un anticuerpo a la célula a la misma vez. Se realizaron varios diseños de ELISA utilizando el anticuerpo primario 66 y 67 de manera de determinar si los anticuerpos son

capaces de reconocer epítopes distintos de la bacteria o epítopes repetidos. Se muestra únicamente el diseño con el cual se obtuvieron los mejores resultados a continuación, el cual es el que utiliza al anticuerpo 66 tanto como anticuerpo de captura y como anticuerpo primario (Figura 16).

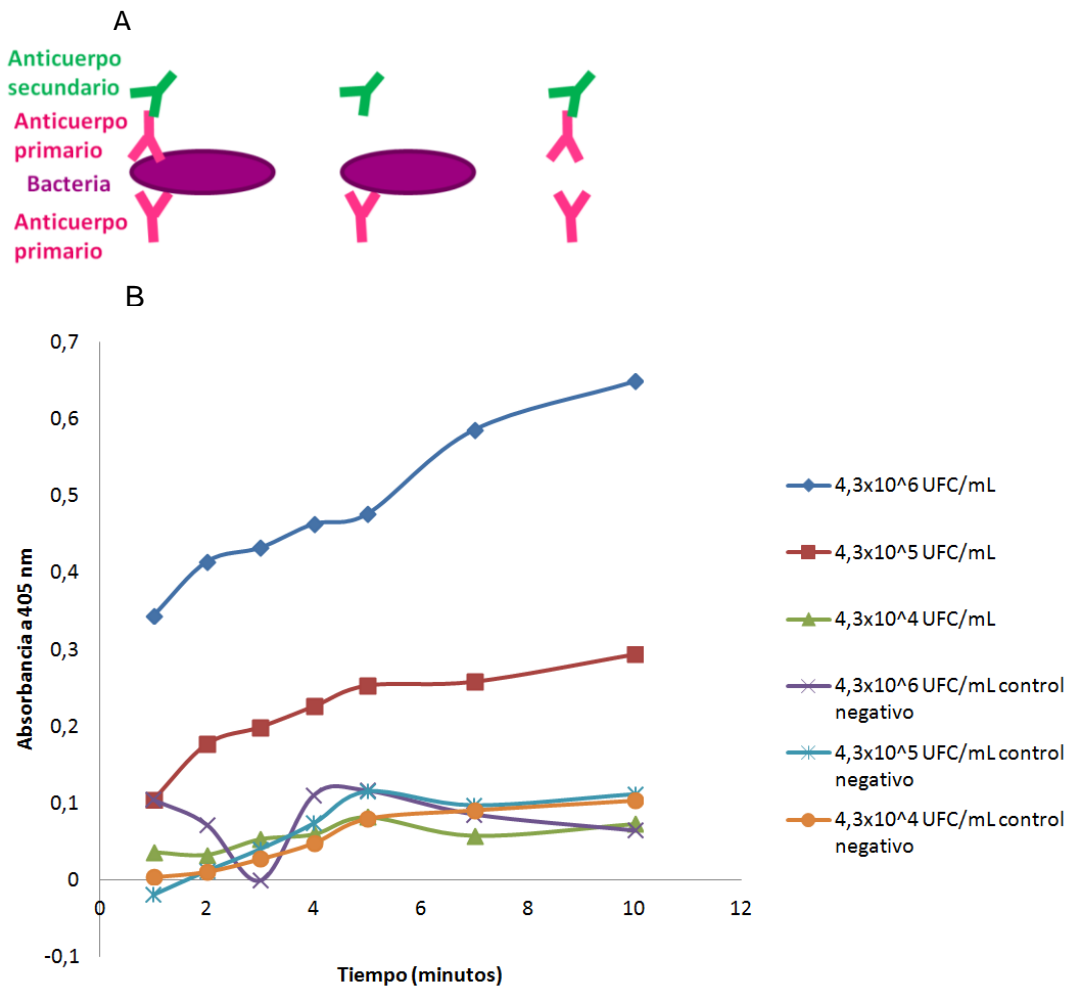


Figura 16: (A) Esquema de ensayo de ELISA, (B) Resultados del ensayo de ELISA.

Como se puede ver en la Figura 16.A, el ensayo de ELISA realizado consiste en un anticuerpo primario inmovilizado en la placa el cual es incubado con la bacteria y luego con el mismo anticuerpo primario, finalizando con la incubación del anticuerpo secundario. Los controles negativos consisten en un ensayo con anticuerpo inmovilizado en la placa, luego se incuba la misma con la bacteria, pero la incubación con anticuerpo primario se realiza solamente con PBS y luego se incuba con el anticuerpo secundario. Este diseño utiliza dos anticuerpos monoclonales iguales que deben reconocer epítopes en una misma bacteria para generar señal. Con este diseño se logró obtener señal en el caso del anticuerpo primario 66 (Figura 16B), indicando que el mismo reconoce epítopes repetidos en la bacteria. Este resultado es prometedor para adaptar al biosensor a ser utilizado. Tomando en cuenta este resultado, se selecciona al anticuerpo 66 para los futuros ensayos con nanopartículas.

4.7 Funcionalización de nanopartículas magnéticas y de oro con anticuerpo monoclonal:

Como fue mencionado en materiales y métodos, la funcionalización tanto de las nanopartículas magnéticas como la de las nanopartículas de oro se realizó mediante la misma técnica. La misma consiste en activar a los grupos carboxilo de las nanopartículas utilizando EDC y NHS. Se agregaron a los anticuerpos a un pH menor a su punto isoeléctrico, de manera que los mismos tengan una carga positiva y se unan mediante interacciones iónicas a las nanopartículas en una primera etapa. Luego se forma el enlace covalente entre los grupos carboxilo activados de las nanopartículas y los grupos amino de los anticuerpos. Después se agregó un buffer con sal para que los anticuerpos unidos no covalentemente se logren separar de las nanopartículas y queden solamente unidos aquellos que lograron formar enlaces covalentes (Figura 6).

Las etapas de unión del anticuerpo se pueden ver tomando los sobrenadantes de los pasos de funcionalización y comparando con el anticuerpo aplicado. Para ello se realiza una electroforesis SDS-PAGE, comprobando con los mismos que el anticuerpo fue unido a las nanopartículas (Figura 17).

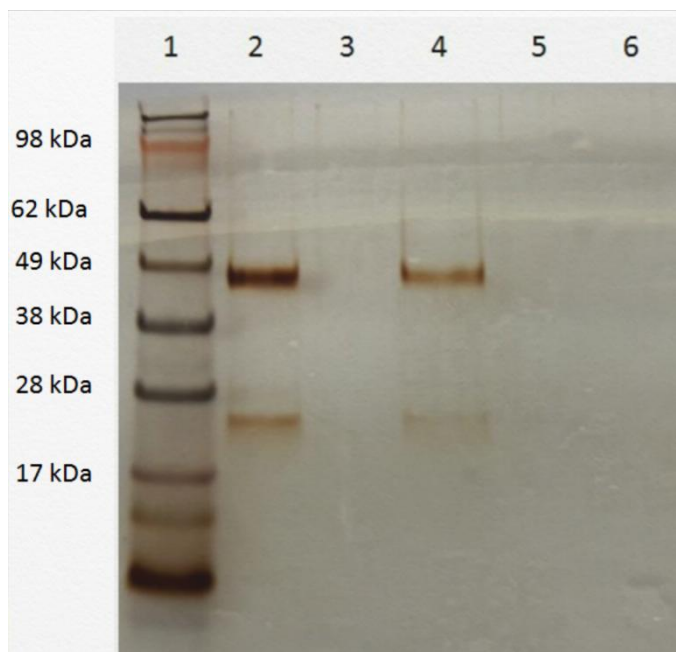


Figura 17: Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 10%, Carril 1: 7 μ L de Marcador de peso molecular (See Blue Plus2 Prestained standard), Carril 2: anticuerpo primario 66 aplicado para funcionalización, Carril 3: anticuerpo no unido a nanopartículas magnéticas durante funcionalización, Carril 4: anticuerpo unido no covalentemente a nanopartículas magnéticas durante funcionalización Carril 5: anticuerpo no unido a nanopartículas de oro durante funcionalización, Carril 6: anticuerpo unido no covalentemente a nanopartículas de oro durante funcionalización.

Como se puede ver en la Figura 17, se logró la funcionalización de las nanopartículas con los anticuerpos. Se puede ver que en el caso de las nanopartículas magnéticas no quedaron anticuerpos sin unir. Sin embargo, luego del agregado de sal para separar los anticuerpos unidos no covalentemente, se observa una banda correspondiente a los mismos. Esta banda no es tan intensa como la de los anticuerpos aplicados, por lo que se infiere la unión de los anticuerpos a las nanopartículas. Por otro lado, en las nanopartículas de oro, no se visualizan bandas correspondientes a los anticuerpos que no se unen ni a los que se unen de forma no covalente. No se observa una banda correspondiente al anticuerpo en el primer sobrenadante de las nanopartículas de oro, lo que sugiere que se unieron todos los anticuerpos ya sea de manera covalente o no. Tampoco se encuentra anticuerpo en el segundo sobrenadante el cual se obtiene incubando las nanopartículas con una solución con sal para que se separen los anticuerpos unidos de manera no covalente. Esto podría significar que todos los anticuerpos aplicados se unen de manera covalente. De todas maneras un paso a futuro sería medir las concentraciones de proteínas en cada una de las etapas, de manera de confirmar el resultado, además de calcular exactamente cuánto fue el anticuerpo unido a las nanopartículas

Estos resultados son indicadores de que se logró la adaptación del método de unión del anticuerpo de HRP a nanopartículas magnéticas de bibliografía (26) a nuestro anticuerpo tanto para las nanopartículas magnéticas como para las de oro. Aun no había sido reportada la unión de este anticuerpo a nanopartículas, y este paso es clave para el desarrollo del biosensor.

4.8 Ensayo de nanobiosensor basado en nanopartículas magnéticas y de oro:

Para la detección de *Campylobacter fetus fetus* se propuso un diseño de nanobiosensor basado en nanopartículas magnéticas y de oro funcionalizadas con anticuerpo.

El mismo consistió en una primera instancia de concentración de las bacterias mediante el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpo. Luego de esta etapa, se mide el espectro UV-visible de una solución de nanopartículas de oro funcionalizadas la cual es agregada en el ensayo y luego se incuba esta solución, en la cual si se encuentran bacterias unidas a las nanopartículas magnéticas, las nanopartículas de oro también se unen.

Después de esta etapa, se utiliza un imán para la separación del complejo unido a las nanopartículas magnéticas y se verifica el sobrenadante mediante la medida del espectro UV-visible (Figura 18).

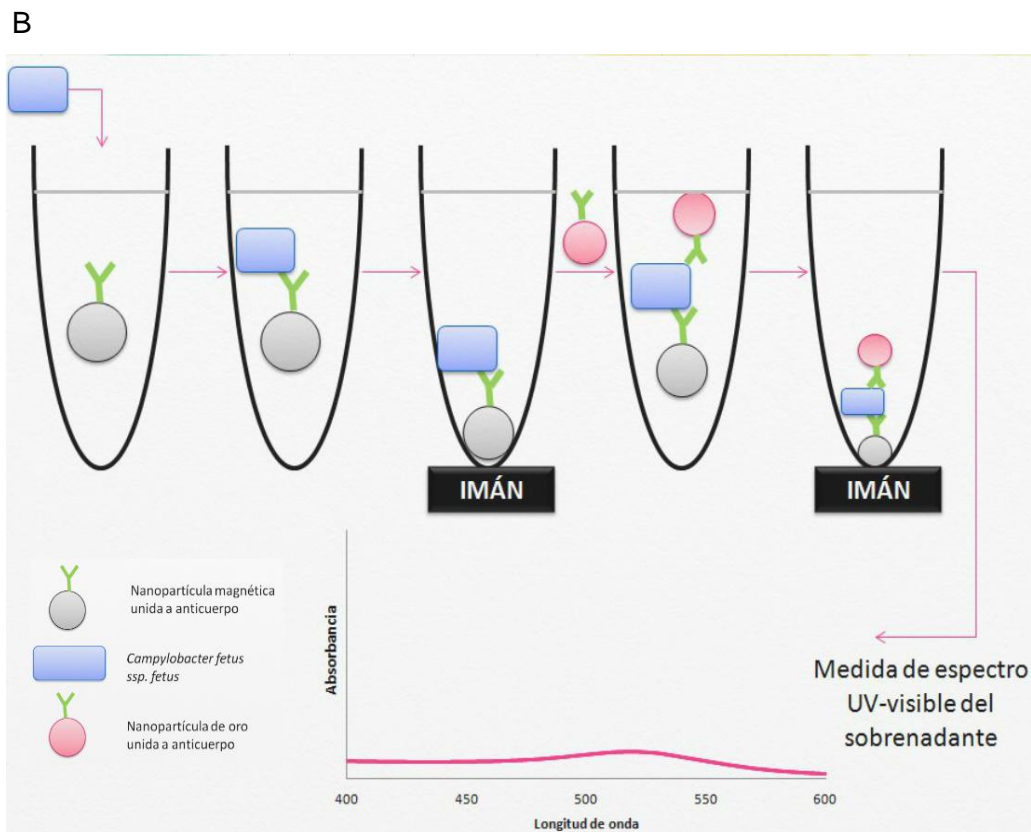
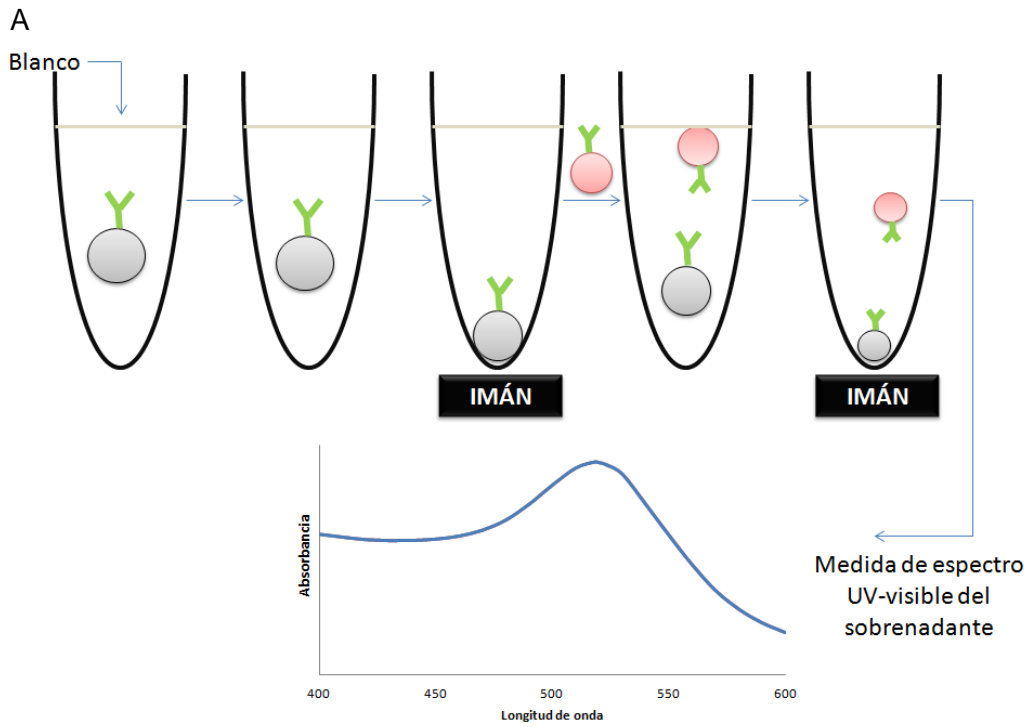


Figura 18: Esquema general del diseño de nanobiosensor para la detección de *Campylobacter fetus fetus* basado en nanopartículas de oro y magnéticas. (A) En ausencia de bacteria, (B) en presencia de bacteria.

Como se puede ver en la Figura 18, si hay presencia de bacteria en la muestra, entonces las nanopartículas de oro están unidas en el complejo y por lo tanto, el sobrenadante presenta una absorbancia menor en el pico máximo de absorbancia (Figura 18B). Si la bacteria no está presente en la muestra, entonces las nanopartículas de oro no se unen al complejo y no se debería ver un cambio significativo en la absorbancia (Figura 18A).

Es de extrema importancia la optimización de la relación entre nanopartículas y anticuerpos inmovilizados en las mismas. Esto se debe a que va a depender de esto la unión de las nanopartículas de oro al analito, y por lo tanto va a verse reflejado en los resultados de los ensayos. Es decir, es conveniente que la superficie de las nanopartículas se encuentre cubierta de anticuerpos para el mejor atrapamiento, pero no es necesario funcionalizar con un exceso de anticuerpos ya que esto significa un costo innecesario.

Se realizó un primer ensayo donde se buscó optimizar la relación nanopartícula de oro:anticuerpo, utilizando relaciones 1:1 y 1:2. Los resultados se observan en la Figura 19.

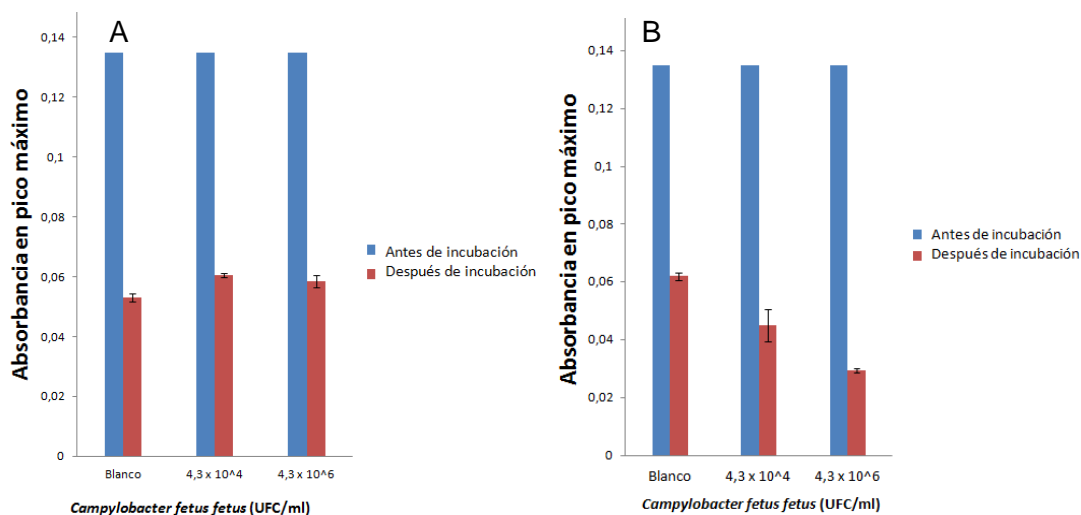


Figura 19: Resultados del ensayo del nanobiosensor con nanopartículas magnéticas y de oro mediante medidas de la absorbancia en el plasmón de superficie de las nanopartículas de oro. (A) Relación NpAu:Ac de 1:1, (B) Relación NpAu:Ac de 1:2.

Respecto a la relación NpAu:Ac 1:1, observada en la Figura 19, no se logró diferenciar el blanco de la muestra con bacterias, y por lo tanto esta relación no podría ser utilizada para el nanobiosensor. En cambio, la relación NpAu:Ac 1:2, se observó una bajada en la absorbancia que parecería ser proporcional a la cantidad de bacterias presente en la muestra, por lo cual se continuaron los ensayos con esta relación.

La disminución de la absorbancia observada en el sobrenadante del blanco podría deberse a la unión inespecífica de las nanopartículas de oro a la pared del eppendorf donde se realizó el ensayo. Dicha unión puede ser causada porque la superficie de las nanopartículas no se encontraba lo suficientemente bloqueada con el PEG aminado, por lo cual se probó el bloqueo con EDA, de todas maneras no se logró remediar esta bajada de absorbancia (resultados no mostrados). Más allá de esto, el EDA tiene un precio significativamente menor al PEG aminado, por lo que podría ser una ventaja lograr el bloqueo con dicha molécula.

La repetición de los experimentos de la relación 1:2 de NpAu:Ac se realizó, pero no se lograron resultados prometedores (resultados no mostrados). Por lo tanto, se realizó un ensayo en el cual se aumentó la concentración inicial de nanopartículas de oro y se abarcó un rango mayor de concentraciones de *C. fetus fetus*, así como un control negativo con *E. coli*. Dicho experimento arrojó los resultados que se muestran en la Figura 20. Es evidente que no se observan diferencias entre las distintas concentraciones testeadas de *Campylobacter fetus fetus*.

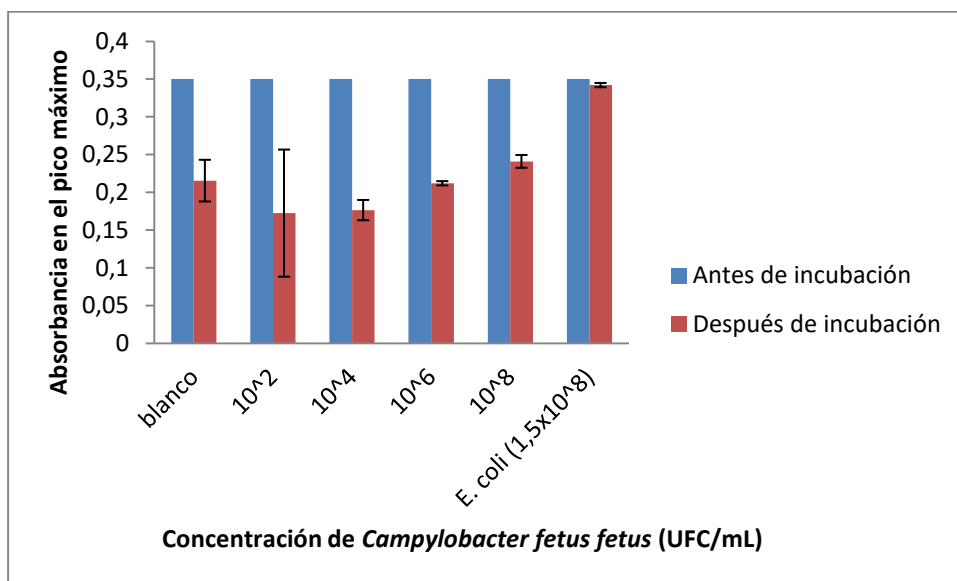


Figura 20: Resultados del ensayo del nanobiosensor con nanopartículas magnéticas y de oro mediante medidas de la absorbancia en el plasmón de superficie de las nanopartículas de oro.

Con el fin de verificar el potencial del diseño propuesto de nanobiosensor, se realizó un ensayo en el cual se utilizaron nanopartículas de oro con una relación de nanopartícula de oro:anticuerpo de 1:6, la cual es una relación extremadamente alta (Figura 21).

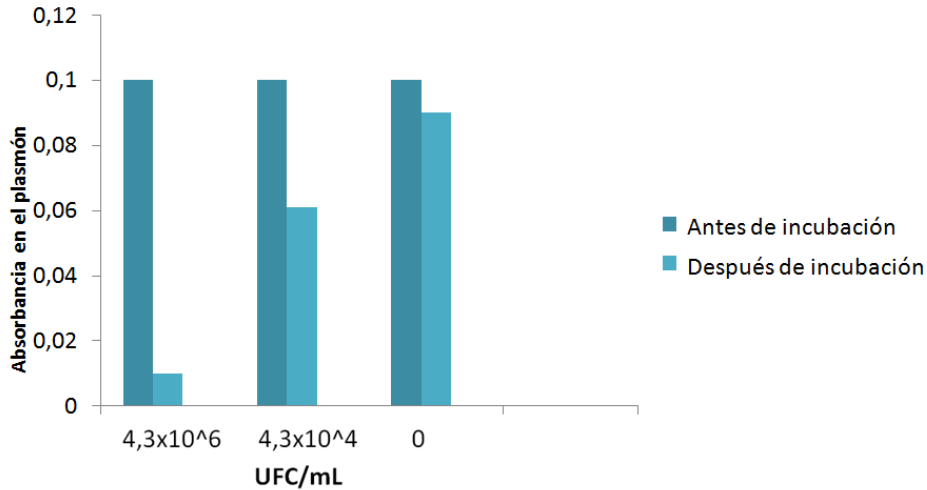


Figura 21: Resultados del ensayo del nanobiosensor con nanopartículas magnéticas y de oro (Relación 1:6 de NpAu:Ac) mediante medidas de la absorbancia en el plasmón de superficie de las nanopartículas de oro.

Como se puede observar en la Figura 21, los resultados obtenidos son prometedores, ya que se logra tener una diferencia entre las absorbancias del sobrenadante del blanco con respecto a las distintas concentraciones de bacterias. También se observa una diferencia en las absorbancias del sobrenadante entre las dos concentraciones de bacterias agregadas, siendo estos resultados indicadores de un posible biosensor cuantitativo.

La cantidad de anticuerpo utilizada para el ensayo de la Figura 21, es una cantidad muy alta que significaría en un costo muy elevado para el desarrollo del nanobiosensor. En esta instancia se decidió seguir con el siguiente nanobiosensor propuesto, quedando la optimización de este diseño como una perspectiva a futuro.

4.9 Ensayo de nanobiosensor basado en nanopartículas de oro agregadas:

Como ya fue mencionado anteriormente, una propiedad de gran interés e importancia de las nanopartículas de oro es el plasmón de superficie, el cual se modifica según el tamaño de las mismas, siendo por lo tanto una característica a ser explotada en este diseño de nanobiosensor con el objetivo de detectar a la bacteria de interés. Las nanopartículas de oro agregadas, debido a la poca distancia entre sí, presentan una banda de plasmón de superficie correspondiente a una nanopartícula de mayor diámetro.

En este diseño, se espera que al unirse las nanopartículas a la bacteria, las mismas se separen del agregado y por lo tanto que vuelvan a presentar la banda de plasmón de superficie correspondiente al diámetro de una única nanopartícula (Figura 22).

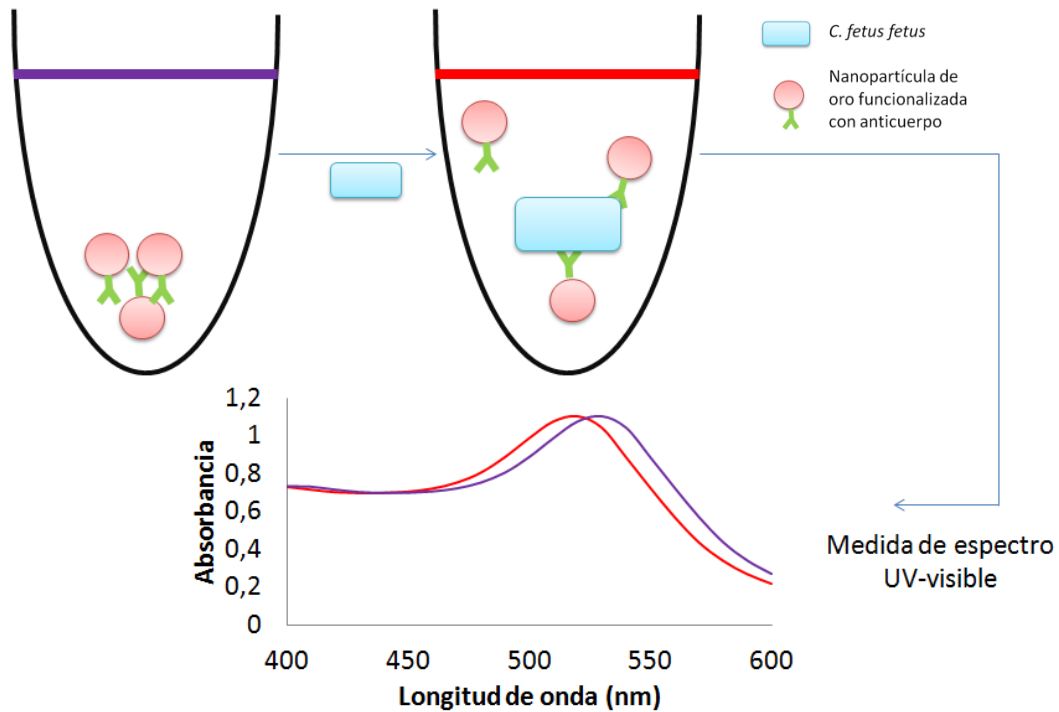


Figura 22: Esquema general del diseño de nanobiosensor para la detección de *Campylobacter fetus fetus* basado en nanopartículas de oro agregadas.

Para este diseño, se probó realizar el ensayo con varias concentraciones de bacterias y con incubaciones de tiempos de 30 minutos a 2 horas y media ya que el factor del tiempo es un factor a optimizar en el biosensor (Figura 23). Se determinó que el tiempo de incubación óptimo para lograr ver diferencias en las longitudes de onda donde la absorbancia es máxima fue de 90 minutos. En la Figura 24 se observa el resultado del ensayo probando concentraciones de bacterias de 10^6 ufc/mL a 10^9 ufc/mL.

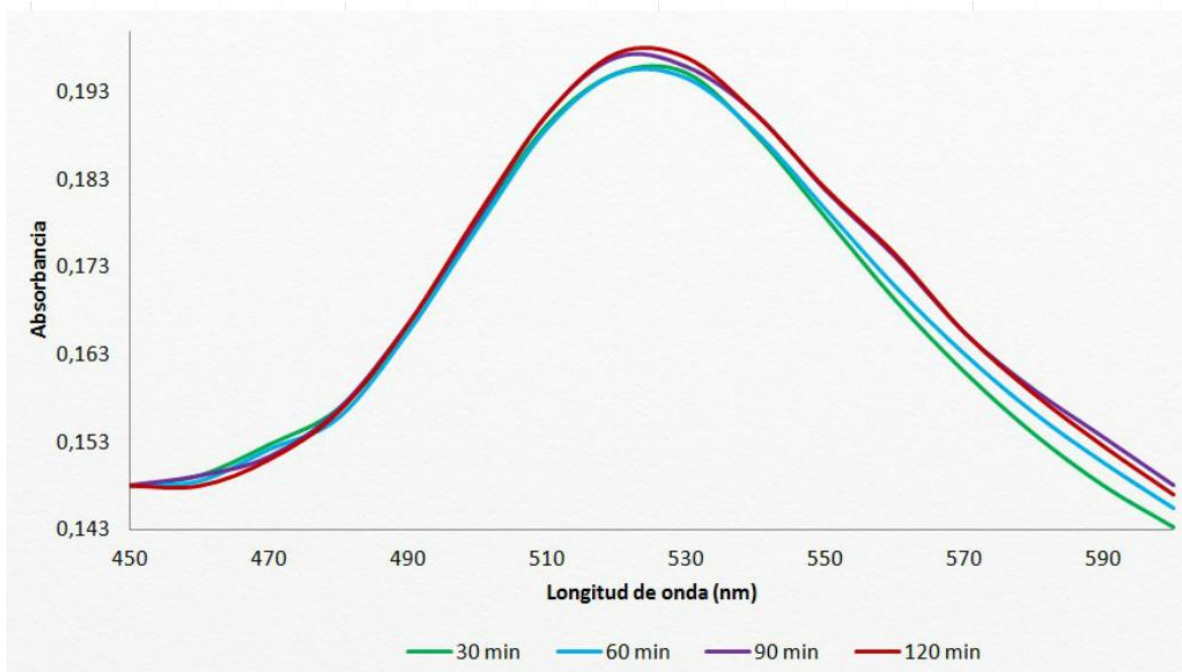


Figura 23: Medida del espectro UV-visible de las nanopartículas de oro luego del ensayo con el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro agregadas incubando con 10^6 UFC/mL a distintos tiempos.

Como ya habíamos mencionado anteriormente, es de suma importancia optimizar los parámetros del biosensor. Un parámetro importante a optimizar es el tiempo de incubación, por lo cual esto se midió el corrimiento del plasmón de superficie con distintos tiempos de incubación para determinar el tiempo óptimo (Figura 23). Se observa en la Figura 23 que el corrimiento del plasmón de superficie ocurre únicamente luego de pasados los 90 minutos de incubación con las bacterias, luego manteniéndose constante, lo cual indica que este es el tiempo óptimo para el ensayo de nanopartículas de oro agregadas.

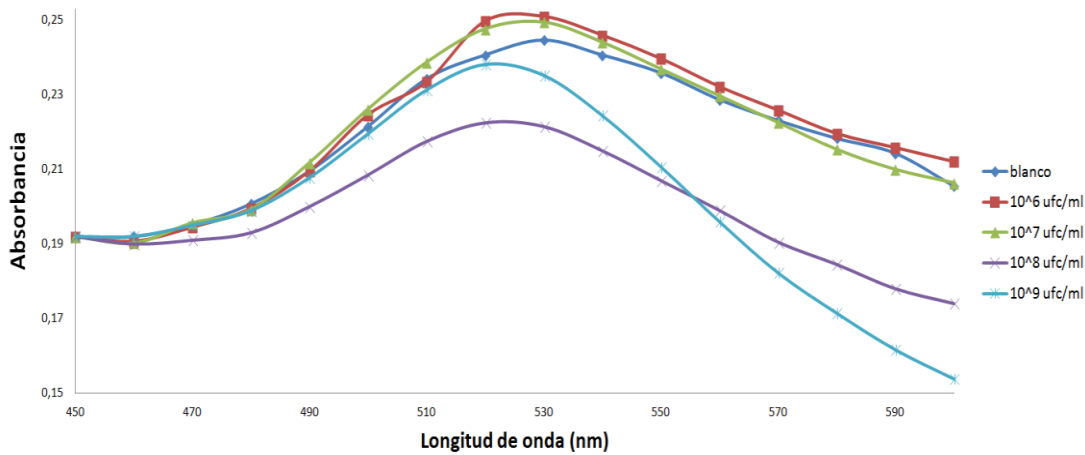


Figura 24: Medida del espectro UV-visible de las nanopartículas luego del ensayo con el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro agregadas.

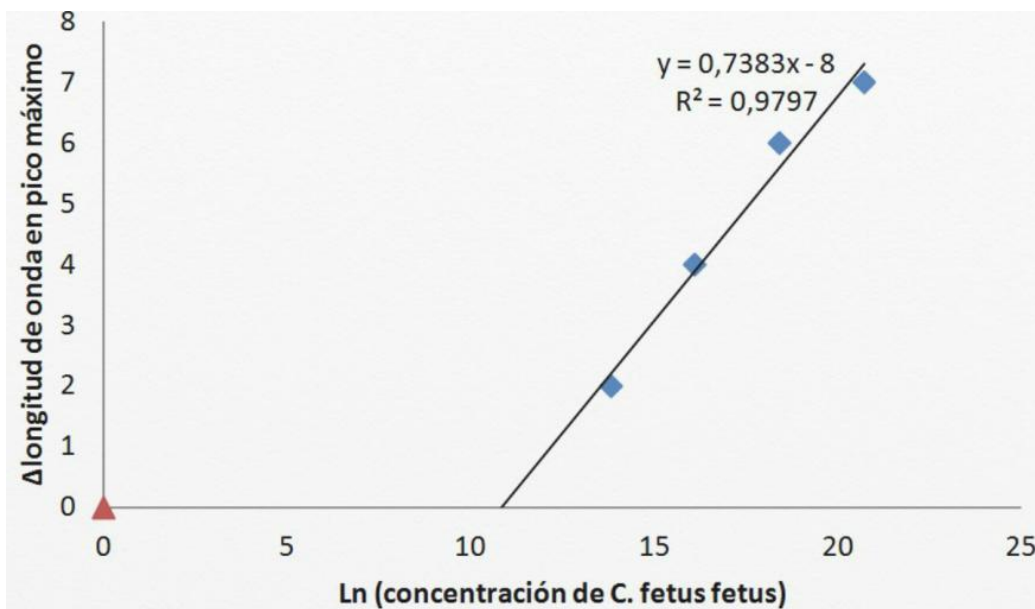


Figura 25: Relación entre la disminución de la longitud de onda en el pico máximo de absorbancia y el logaritmo de la concentración de *C. fetus fetus* en la muestra.

Se puede observar, en la Figura 24, como el pico máximo del plasmón de superficie de las nanopartículas de oro se mueve hacia longitudes de onda menores cuando se incuban las nanopartículas de oro agregadas con mayor concentración de bacterias. Esto se corresponde con la hipótesis realizada anteriormente, donde se proponía que las nanopartículas del agregado, una vez que reconocen la bacteria se separan y vuelven a presentar el plasmón de superficie de nanopartículas dispersas. Es decir, las nanopartículas sueltas tienen un máximo de absorbancia a longitudes de onda menores que las agregadas, y por lo tanto al verse el corrimiento del plasmón a

longitudes menores de onda, podemos ver que se está adoptando el plasmón de superficie de nanopartículas dispersas.

En la Figura 25 se puede ver que hay una relación logarítmica entre la longitud de onda en el pico máximo y la concentración de bacterias en la muestra. Este resultado es prometedor ya que se observó la caída de la longitud de onda en el pico máximo de absorbancia con respecto al blanco. Además, se logró tener una relación entre la caída de dicha longitud de onda y la concentración de bacterias, indicando que podría ser utilizado como un nanobiosensor cuantitativo.

Se repitió el ensayo agregando concentraciones de bacteria menores, de 10^2 y 10^4 UFC/mL (Figura 26). Las concentraciones menores de bacteria agregaron con el fin de estudiar la sensibilidad y rango dinámico del método de detección. Esto permite verificar si dicho método es capaz de detectar concentraciones menores de bacteria, sabiendo que las muestras biológicas donde se encuentra el analito de interés pueden llegar a tener bacterias a dichas concentraciones.

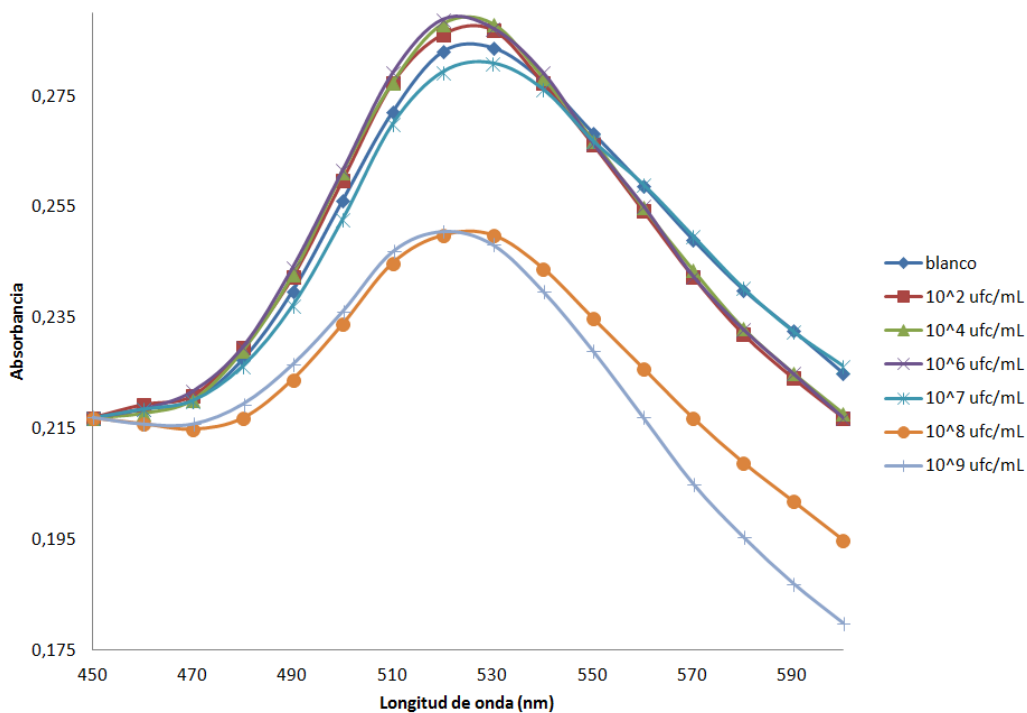


Figura 26: Medida de el espectro UV-visible de las nanopartículas luego del ensayo con el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro agregadas.

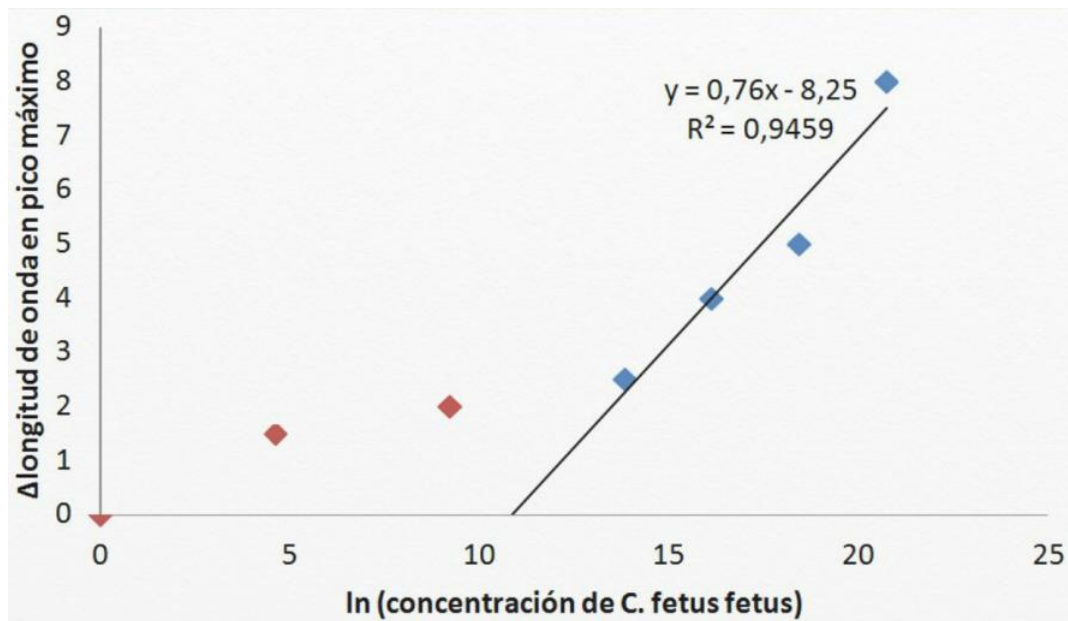


Figura 27: Relación entre la disminución de la longitud de onda en el pico máximo de absorbancia y el logaritmo de la concentración de *C. fetus fetus* en la muestra.

Los resultados obtenidos en la Figura 26 y 27 se corresponden con los observados en el ensayo anterior. La Figura 27 confirma la relación logarítmica entre la disminución de la longitud de onda y la concentración de bacterias que se observó en la Figura 25, confirmando que el ensayo podría ser un ensayo cuantitativo en el rango de 10^6 a 10^9 UFC/mL, siendo el mismo el rango dinámico del ensayo. Sin embargo, la relación encontrada no incluyó a las concentraciones menores de bacteria que fueron probadas. De todas maneras se logró la detección de dichas concentraciones, ya que también presentaban una diferencia en la longitud de onda del pico máximo con respecto al blanco.

4.10 Perspectivas a futuro:

Los nanobiosensores propuestos en este trabajo han mostrado resultados prometedores en los ensayos, especialmente el nanobiosensor con nanopartículas de oro agregadas. Sin embargo, aún falta la optimización y estudio de varios parámetros. Como fue mencionado anteriormente, las propiedades a optimizar de los biosensores incluyen la selectividad, sensibilidad, el límite de detección, robustez, entre otros. Algunos de los mismos ya fueron optimizados, como por ejemplo el tiempo de detección y la selectividad. También se propone que a futuro se estudien las relaciones entre los reactivos, de manera de que la respuesta pueda ser detectada a simple vista y que por lo tanto pueda ser un biosensor para uso *in situ*.

Por otro lado, sería deseable realizar ensayos con muestras biológicas de manera de verificar el efecto matriz en el biosensor, así como con la cepa *Campylobacter fetus venerealis* la cual va a

determinar si el biosensor es específico de especie o subespecie. Con respecto a *Campylobacter fetus venerealis* ya se han comenzado los estudios de crecimiento de la cepa en distintos medios de cultivo.

Además, se están realizando estudios para la producción de anticuerpos policlonales de manera de abaratar los costos del biosensor.

5. Análisis económico

Se obtuvieron resultados muy prometedores en el trabajo, correspondientes a los primeros pasos para el desarrollo del nanobiosensor para la detección de *C. fetus fetus*. Todavía existen etapas para la validación de los métodos de detección que se probaron en este estudio. Sin embargo, con los ensayos realizados en este estudio es posible calcular la cantidad de reactivo necesaria para una reacción de detección de *C. fetus fetus* de cada uno de los diseños propuestos. Por lo tanto, es posible calcular el costo en relación a los reactivos necesarios por reacción.

Lo primero que se hizo para comenzar con el cálculo del costo por reacción fue obtener los precios de los reactivos y la cantidad de reactivo que traen en el envase (Tabla 3).

Tabla 3: Reactivos utilizados para los ensayos de detección de *C. fetus fetus*

Reactivos	Proveedor	Cantidad	Precio (Dólares)
Nanopartículas magnéticas (fluidMAG-PAA)	Chemicell	25 mg-mL	44,92
EDC	Sigma-Aldrich	5 g	166
NHS	Fluka	25 g	84,15
MES	Merck	25 g	58
Anticuerpo 66	Antibodies online	200 µg	998
Anticuerpo 67	Antibodies online	200 µg	998
Fosfato de sodio	Carlo Erba reagents	1 kg	78
NaCl	Dorwil química analítica	1 kg	11,36
BSA	gibco by Life Technologies	25 g	171
sal citrato de oro		5 g	400
sal citrato de sodio tribásico	Merck	1 kg	65
NaOH	Dorwil química analítica	1 kg	26,97
PEG	Aldrich	500 mg	1150
SDS	J.T. Baker	500 g	132
EDA	Sigma	250 mL	139
Bicarbonato de sodio	Macllinckrodt chemicals	1 kg	21,96

Con los datos de la Tabla 3, es posible calcular el costo de la reacción tomando en cuenta el precio del reactivo y la cantidad utilizada en los ensayos.

En las tablas a continuación (Tablas 4 y 5) se encuentran los precios correspondientes a las cantidades que se utilizaron de reactivo para la funcionalización de las nanopartículas magnéticas.

Tabla 4: Precio de la activación de las nanopartículas magnéticas

Reactivo	Precio (dólares)
5 mg NpMg	8,984
375 μ L MES 10 mM	0,00185625
10 mg EDC	0,332
15 mg NHS	0,05049
250 μ L MES 10 mM	0,0012375
Total	9,36958375

En la Tabla 4 se calcula el precio para la activación de las nanopartículas magnéticas, sin embargo la cantidad de nanopartículas magnéticas activadas que resulta de esta reacción es de 125 μ L de los cuales se utilizan únicamente 20 μ L para la funcionalización.

Tabla 5: Precio de la funcionalización de las nanopartículas magnéticas

Reactivo	Precio (dólares)
20 μ L de nanopartículas activadas	1,4991334
6,8 μ L de anticuerpo	34,00204
175 μ L MES 10 mM	0,00086625
200 μ L MES 10 mM	0,00099
200 μ L fosfato de sodio 10 mM	0,000032
200 μ L NaCl 300 mM	0,00004
200 μ L 2% BSA	0,02736
Total	26,52842165

De la funcionalización de nanopartículas magnéticas (Tabla 5), se obtienen 200 μ L, sin embargo, para la reacción de detección de *C. fetus fetus* se utilizan únicamente 5 μ L. El precio de las nanopartículas magnéticas en el nanobiosensor sería de 0,888 dólares.

Por otro lado, se necesita el cálculo del costo de las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo, ya que las mismas son utilizadas para ambos de los diseños propuestos en este trabajo. Los cálculos del costo de las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo se encuentran a continuación.

Tabla 6: Precio de la síntesis de nanopartículas de oro

Reactivo	Precio (dólares)
80 mg sal oro	6,55832
239,9 mg sal citrato	0,015593513
Total	6,573913513

En la síntesis de las nanopartículas de oro (Tabla 6) se obtiene un total de 200 mL, sin embargo para la estabilización de las mismas con PEG se utiliza únicamente alrededor de 48 mL.

Tabla 7: Precio de la estabilización de nanopartículas de oro con PEG

Reactivo	Precio (dólares)
Nanopartículas de oro	1,577739243
125 µL SDS 10%	0,033
120 µL PEG	2,759779218
625 µL NaOH 2 M	0,0014125
5 mL MES 10 mM	0,02475
total	4,396680961

De la estabilización de las nanopartículas de oro con PEG (Tabla 7) se obtiene un volumen de 5 mL, de los cuales se utilizan alrededor de 239,5 µL para la funcionalización de las mismas con anticuerpo.

Tabla 8: Precio de la funcionalización de nanopartículas de oro con anticuerpos

Reactivo	Precio (dólares)
Nanopartículas estabilizadas	0,210601018
20 µL EDC 10 mg/mL	0,00664
30,5 µL NHS 10 mg/mL	0,00102663
260 µL MES 10 mM	0,001289475
500 µL MES 10 mM	0,002475
5 µL Anticuerpo	25
195 µL MES 10 mM	0,00096525
200 µL Fosfato de sodio 10 mM	0,000032
200 µL NaCl 500 mM	0,000066666
500 µL EDA 50 mM	0,00093
500 µL Bicarbonato de sodio 10 mM	0,000009225
500 µL MES	0,002475

En la Tabla 8 tenemos el precio total de 500 µL de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo. Las cantidades utilizadas en los dos diseños propuestos de nanobiosensor son distintas y por lo tanto el precio también. Para el nanobiosensor que utiliza el sistema con nanopartículas de oro y magnéticas, el precio de las nanopartículas de oro funcionalizadas es de 0,26 dólares, resultando en un total de 1,15 (35 pesos uruguayos) dólares por reacción cuando incluimos el precio de las magnéticas. Por otro lado, el nanobiosensor que utiliza las nanopartículas de oro únicamente tiene un costo de 0,207 dólares (6,3 pesos uruguayos).

Como ya mencionado anteriormente, los otros métodos de detección que existen en Uruguay son la PCR y la inmunofluorescencia directa, las mismas tienen un precio de alrededor de 730-890 y 550-660 pesos respectivamente, pudiendo los nanobiosensores tener un precio competitivo en el mercado.

También se tienen que considerar otros costos relacionados con cada uno de los métodos de detección de *Campylobacter fetus*. En el caso de la inmunofluorescencia, se requiere de un microscopio de fluorescencia, el cual es de un costo elevado, lo cual requiere de una gran inversión. Por otro lado, para la PCR es necesario una centrifuga, así como un termociclador. Mientras que para el biosensor propuesto, se requiere únicamente un espectrofotómetro el cual es considerablemente accesible en comparación con los equipos requeridos en los otros métodos de detección.

Podemos concluir que ambos diseños propuestos de nanobiosensor tiene una gran ventaja frente a los otros métodos que existen en Uruguay con respecto al costo de los mismos. Dentro de los dos diseños, el biosensor que utiliza las nanopartículas de oro agregadas tiene una ventaja frente al que involucra también nanopartículas magnéticas. Esta ventaja se debe a que el costo es menor y además no requiere de un imán capaz de unir a las nanopartículas magnéticas para hacer posible el ensayo. De todas maneras, se debería evaluar ambos biosensores con la muestra biológica, así como con controles negativos para ver la validar el método.

A continuación se presenta el análisis económico comparativo entre los métodos de detección de *Campylobacter fetus subespecie fetus*.

Tabla 9: Comparación económica de los distintos métodos de detección de *Campylobacter fetus fetus*

Método de detección	Inversión inicial	Mantenimiento de equipos	Recursos humanos	Costo por unidad	Precio por reacción
Inmunofluorescencia	Microscopio de fluorescencia	>	=	-	18-21,5 dólares
	Heladera				
PCR	Heladera	=	=	-	24-29 dólares
	Termociclador				
	Centrífuga				
Nanobiosensor (NpMg y NpAu)	Heladera	=	<	1,18 dólares	Proponemos: 15 dólares
	Espectrofotómetro				
	Centrífuga				
Nanobiosensor (NpAu agregadas)	Heladera	=	<	0,207 dólares	Proponemos: 14 dólares
	Espectrofotómetro				
	Centrífuga				

Con el fin de estudiar la viabilidad de los métodos de detección propuestos en el mercado, se realizó una tabla comparativa entre los distintos métodos de detección disponibles (Tabla 9). Como fue mencionado anteriormente, la inversión inicial de los nanobiosensores propuestos, es menor a la del método de inmunofluorescencia teniendo en cuenta los equipos necesarios. Por otro lado, los

recursos humanos de los métodos de detección basados en nanobiosensores son menores que los demás debido a que no se requiere de personal altamente calificado debido a la menor manipulación necesaria. Además, al haber estudiado el costo de las reacciones de los nanobiosensores propuestos, se puede observar que con un precio competitivo en el mercado aún se obtiene un margen de ganancia significativo, siendo estos métodos viables económicamente.

6. Conclusiones

Se optimizó el crecimiento de la cepa *Campylobacter fetus fetus*, obteniéndose además una curva de calibración que relaciona la OD_{600 nm} y las UFC/mL.

Se verificó la especificidad de los anticuerpos monoclonales comerciales anti-*Campylobacter fetus fetus* y además se determinó que el anticuerpo 66 reconoce epítopes repetidos de la bacteria.

Se sintetizaron y estabilizaron nanopartículas de oro que fueron caracterizadas exitosamente. Se logró determinar la estabilidad de las mismas en el tiempo.

Se logró la funcionalización de las nanopartículas magnéticas y de oro con los anticuerpos monoclonales comerciales, adaptando protocolos generales de inmovilización de anticuerpos a nanopartículas magnéticas, para los anticuerpos anti- *Campylobacter fetus fetus*.

Se diseñaron dos tipos de nanobiosensores colorimétricos para la detección de *Campylobacter fetus fetus* y se realizaron pruebas de concepto para los mismos, obteniéndose resultados prometedores.

Para el nanobiosensor de desagregación de las nanopartículas de oro se logró el estudio del límite de sensibilidad y del rango de linealidad, obteniendo un rango lineal de 10⁶ a 10⁹ UFC/mL y la sensibilidad de hasta 10² UFC/mL.

Se evaluó y determinó que de desarrollarse estos nanobiosensores, tendría un valor competitivo en el mercado de detección de *Campylobacter fetus*.

7. Referencias

1. Ali A, et al. *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene*. 2012; 508(2): 145-156.
2. Marcellino RB, Morsella CG, Cano D, Paolicchi FA. Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*. 2015; 47(3): 183-189.
3. Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007; 13(10): 993-1000.
4. Campylobacteriosis genital bovina: importancia del monitoreo previo al entore. *Revista INIA*. 2014; 38: 16-20.
5. Leániz G. Campylobacteriosis Genital Bobina. *Lechuza Roja*. 2013; 27: 10-11.
6. Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Veterinary Microbiology*. 2004; 103(1-2):77-84.
7. Iraola G, Hernández M, Calleros L, Paolicchi F, Silveyra S, Velilla A, Carretto L, Rodríguez E, Pérez R. Applications of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Veterinary Science*. 2012; 13(4): 371-376.
8. Figueiredo JF, Pellegrin AO, Fóscolo CD, Machado RP, Miranda KL, Lage AP. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2002; 44(3-4): 118-123.
9. Griffin GD, Stratis-Cullum DN. Biosensors. En: Moselio Schaechter M. *Encyclopedia of Microbiology Studies*. 3ra ed. Oxford: Elsevier; 2009. p. 88-103.
10. Nayak M, Kotian A, Marathe S, Chakravorty D. Detection of microorganisms using biosensors – a smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009; 25(4): 661-667.

11. De la Fuente JM, Grazu V. Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. Zaragoza: Elsevier; 2012.
12. Giljohann DA, Mirkin CA. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*. 2009; 462(7272): 461-464.
13. Karunakaran C, Rajkumar R. Chapter 1: Introduction to biosensors. En: Karunakaran C, Bhargava K, Benjamin R. *Biosensors and Bioelectronics*. 1ra ed. Amsterdam: Elsevier; 2015. p. 1-68.
14. Kayamura A, Miyata T. Biosensors. En: Ebara M. *Biomaterials Nanoarchitectonics*. 1ra edición, Tsukuba: Elsevier; 2016. p. 157-176.
15. Evtugyn G. *Biosensor: Essentials*. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer Science & Business Media; 2014.
16. Preedy VR, Patel VB. *Biosensors and environmental health*. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press; 2012.
17. Roe JN. Biosensor development. *Pharmaceutical Research*. 1992; 9(7): 835-844.
18. Gilmartin N, O'Kennedy R. Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012; 50(2): 87-95.
19. Clark DP, Pazdernik NJ. Chapter 7 – Nanobiotechnology. En: Elsevier. *Biotechnology*. 2da ed. Boston: Elsevier; 2015. p. 219-248.
20. El-Noura KMMA, Eftaihab A, Al-Warthanb A, Ammarb RAA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*. 2010; 3(3): 135-140.
21. Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*. 2008; 9(15): 2363-2371.
22. Oliveira E, Núñez C, Santos HM, Fernández-Lodeiro J, Capelo JL, Lodeiro C. Revisiting the use of gold and silver functionalized nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015; 212: 297-328.
23. Alizadeh A, Khodaei MM, Hamidi Z, Bin Shamsuddin M. Naked-eye colorimetric detection of Cu²⁺ and Ag⁺ ions based on close-packed aggregation of pyridines-functionalized gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014; 190: 782-791.

24. Tiwari A, Turner APF. Biosensors nanotechnology. Linköping: Wiley; 2014
25. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951; (11): 55-75.
26. Parolo C, De la Escosura-Muñiz A, Polo E, Grazu V, De la Fuente JM, Merkoçi A. Design, preparation and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold nanoparticle conjugate as immunosensing label. *Applied Materials and Interfaces*. 2013; 5(21): 10753-10759.
27. Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutiérrez L, Morales MP, Böhm IB, Haverhagen JT, Prosperi D, Parak WJ. Biological applications of magnetic nanoparticles. *The Royal Society of Chemistry*. 2012; 41(11): 4306-4334.
28. Gazeau F, Lévy M, Wilhelm C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy. *Nanomedicine*. 2008; 3(6): 831-844.

Anexo 1

Preparación de soluciones.

Medio Tioglicolato

Para la preparación de 1 L se utilizó el medio Tioglicolato de Oxoid:

- 29,75 g de Tioglicolato
- pH 7,1

Suspender en 1 L de agua destilada, llevar a ebullición hasta disolución completa y autoclavar.

TSA sangre

Para la preparación de 1 L se utilizó el medio TSA de Mast:

- 37 g de TSA
- pH 7,3

Suspender en 1 L de agua destilada y autoclavar. Fundir el medio y adicionar 5% de sangre ovina.

Brucella Broth

Para la preparación de 1L:

- 10 g de Triptona
- 10 g de Peptona
- 1 g de D-Glucosa
- 2 g de Extracto de levadura
- 5 g de NaCl
- 0,1 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- pH 7

Se adiciona 1 L de agua destilada y se autoclava.

Buffer TAE

Para la preparación de 1 L 50X:

- 242 g de Tris
- 18,6 g de EDTA

Agregar 500 mL de agua destilada y 57,1 mL de ácido acético glacial. Llevar a 1L de volumen total con agua destilada.

Buffer MES

- 10 mM
- pH 5,0 o pH 6,0

Buffer PBS

Para la preparación de 1L 10X:

- 80 g de NaCl
- 2 g de KCl
- 14,4 g de Na_2HPO_4
- 2,4 g de KH_2PO_4
- pH 7,4

Suspender en 1 L de agua destilada.

Gel de poliacrilamida

Para la preparación de dos geles de poliacrilamida al 10% se deben seguir los siguientes pasos:

Para la preparación de una solución de acrilamida al 30% se pesan 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida, y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Para la preparación de una solución de APS al 10 % se pesan 50 mg de APS y se agregan 500 μL de agua destilada.

Gel separador (15mL):

- 5,9 mL de agua destilada
- 5 mL de acrilamida al 30%

- 3,8 mL de buffer Tris 1,5M pH 8,8
- 0,15 mL de SDS al 10%
- 0,15 mL de persulfato de amonio al 10%
- 0,006 mL de TEMED

Gel concentrador (5mL):

- 3,4 mL de agua destilada
- 0,83 mL de acrilamida al 30%
- 0,63 mL de buffer Tris 1M pH 6,8
- 0,05 mL de SDS al 10%
- 0,05 mL de persulfato de amonio al 10%
- 0,005 mL de TEMED

Agua regia

Para la preparación del agua regia se utiliza ácido nítrico y ácido clorhídrico en una proporción (3:1)

Gel de agarosa

Para la preparación de un gel de agarosa al 1%:

- 0,3 g de Agarosa
- 30 mL de buffer TAE

El buffer de carga utilizado para los geles de agarosa fue EZ- Vision de Amresco.

Soluciones para la tinción de geles con solución de nitrato de plata

Solución de fijación: 35 ml etanol, 7 mL ácido acético glacial y 18 mL agua milliQ.

Solución de lavado: 7 mL de solución de fijación, 53 mL agua milliQ.

Solución de tiosulfato: 12 mg de tiosulfato de sodio, 60 mL agua milliQ.

Solución de nitrato de plata: 0,12 g de nitrato de plata, 45 µl de formaldehído 37% y 60 mL agua milliQ.

Solución reveladora: 3,6 g de carbonato de sodio, 1,2 mL de solución de tiosulfato, 30 µl de formaldehído 37% y 58,8 mL de agua milliQ.

Solución de detención: 3 mL de ácido acético glacial y 57 mL de agua milliQ.