A high-magnification scanning electron micrograph (SEM) showing a dense array of spherical gold nanoparticles. The particles are interconnected, forming a porous, interconnected network. The color is a bright yellow-gold, characteristic of gold at the nanoscale. The background is dark, making the particles stand out.

# BIOSENSORES A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

M.A. Ríos-Corripio, L.S. Arcila-Lozano y M. Rojas-López\*  
Instituto Politécnico Nacional. CIBA-Tlaxcala. Tepetitla, Tlax. 90700, México.  
\*e-mail: marlonrl@yahoo.com.mx

## Resumen

En la actualidad el uso de biosensores para el diagnóstico de enfermedades infecciosas ha llamado considerablemente la atención debido a la viabilidad que ofrecen por las cualidades de algunos de ellos como son el tiempo de respuesta, la especificidad y sensibilidad, así como su bajo costo. En particular los biosensores elaborados a partir de nanopartículas de oro podrían ofrecer estas ventajas, para la detección de una gran cantidad de analitos. En este trabajo se propone una metodología para la detección rápida de microorganismos patógenos en agua y alimentos utilizando un bioconjugado fluorescente elaborado a partir de nanopartículas de oro. Se probó su eficacia para la detección de las bacterias *Salmonella* spp. y *S. aureus* en muestras de agua y leche contaminada. La metodología propuesta podría representar una alternativa viable de aplicación en el campo del diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas.

**Palabras clave:** Biosensores, nanopartículas, patógenos, *Salmonella*, *S. aureus*

## Abstract

Nowadays the use of biosensors for diagnosis of infectious diseases has attracted considerably the attention due their feasibility and also by the qualities of some of them, such as the time of response, specificity, sensibility, as well as the low cost. Particularly biosensors made from gold nanoparticles could offer these advantages, for the detection of a large number of analytes. In this work, it is proposed a methodology for the rapid detection of pathogens in food and water using a fluorescent bioconjugate obtained from gold nanoparticles. The effectiveness of the bioconjugate for the detection of bacteria *Salmonella* spp. and *S. aureus* in contaminated samples of water and milk was proved. The proposed methodology could represent a viable alternative for application in the field of rapid diagnosis of infectious diseases.

**Keywords:** Biosensors, nanoparticles, pathogens, *Salmonella*, *S. aureus*

## Introducción

Actualmente una de las problemáticas que ponen en riesgo la salud del humano es sin duda es la contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos, los cuales llegan al organismo a través de alimentos preparados, conservados o almacenados en condiciones de higiene cuestionables. La presencia de microorganismos patógenos en el organismo produce síntomas que pueden ser desde leves como los dolores estomacales y diarreas, hasta los severos como la deshidratación, úlceras estomacales, e incluso la muerte. Entre las infecciones por alimentos más comunes se encuentran las que son causadas por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. Otro tipo de bacterias tales como, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, las enterohemorrágicas *Escherichia coli* O103:H25, O26, O111, O115, O128, O145, así como las recientemente aisladas *Staphylococcus aureus* O104:H4 resistente a antibióticos, además de virus and protozoarios los cuales son transmitidos a través del consumo de alimentos [1].

Uno de los principales desafíos que surgen en esta problemática es sin duda la identificación del tipo de microorganismo patógeno. El método microbiológico estándar para la detección de patógenos en alimentos es el conteo de colonias en placa de agar, procedimiento que requiere varios días para la determinación de la presencia del microorganismo en la muestra. Desafortunadamente, los resultados de estas pruebas comúnmente son difíciles de interpretar y no están disponibles en los tiempos deseados. Por otra parte, los métodos moleculares, los cuales están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés PCR tiempo real) son los que han mostrado tener la mayor sensibilidad para la identificación de microorganismos patógenos. El límite de detección de estos métodos va 10 a 100 unidades formadoras de colonia/ml de muestra [2-4].

Además de los métodos mencionados, hoy en día existe el uso de los biosensores, debido a la viabilidad que ofrecen por las cualidades de algunos de ellos como son el tiempo de respuesta, la especificidad y sensibilidad, así como el costo atractivo. En particular, algunos de estos biosensores están basados en inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos de especies bacteriales y aptameros, que a su vez pueden o no estar marcados con moléculas fluorescentes o

cromóforos [5]. Estos métodos requieren condiciones estándar para una interacción óptima de proteínas y otras moléculas de afinidad específica con: tiras reactivas, laminillas de vidrio, superficies de metálicas, microplacas, membranas y otras superficies adecuadas para separación de complejos antígeno-anticuerpo [6,7].

Recientemente, la inclusión de la nanotecnología en el campo de los biosensores acrecenta la posibilidad de mejorar las necesidades analíticas de los diagnósticos médicos. Se ha reportado el uso de nanopartículas para el desarrollo de biosensores con sensibilidad comparable a la de los métodos moleculares [8], pero además reduciendo los tiempos de respuesta y muy posiblemente los costos de producción y operación. En particular, el uso de nanopartículas de oro como base para el desarrollo de biosensores de microorganismos patógenos ha mostrado ser una estrategia promisoría en el campo del diagnóstico médico de enfermedades infecciosas [9]. En este trabajo se reporta el uso de nanopartículas de oro como base para la elaboración de un biosensor para el reconocimiento selectivo de bacterias patógenas, y de manera particular se demuestra la efectividad y viabilidad en la detección de *Salmonella* spp. y *S. aureus*.

## Resultados

Se utilizaron nanopartículas de oro sintetizadas químicamente por el método de citrato-reducción [10], obteniéndose en forma de coloide, en el cual cada una de estas nanopartículas se encuentra suspendida en agua. Estas nanopartículas de oro son esféricas y tienen un tamaño aproximado de 10 nanómetros (nm) de diámetro ( $10^{-9}$  m), como se observa en la imagen de la Figura 1(a), obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.

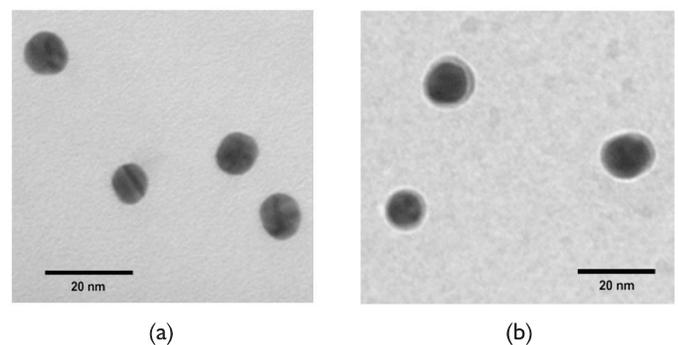


Figura 1. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de: (a) nanopartículas de oro, y (b) nanopartículas de oro recubiertas con una capa de proteína A (conjugado).

Una vez que las nanopartículas de oro han sido sintetizadas, se procedió a conjugar una capa de proteína sobre la superficie de cada nanopartícula, como se observa en la Fig. 1(b). Esto se hace agregando proteína a la suspensión coloidal para que cada nanopartícula se recubra y a su vez quede estabilizada eléctricamente para seguirse manteniendo en estado coloidal por un tiempo prolongado. De lo contrario, nanopartículas no conjugadas se vuelven inestables con el tiempo, formando agregados de tamaños micrométricos que posteriormente se precipitan. Posteriormente a la conjugación de la nanopartícula de oro con proteína, se realiza una biofuncionalización utilizando un anticuerpo policlonal marcado con una molécula fluorescente o cromóforo, para obtener finalmente partículas bioconjugadas. Son este tipo de nanopartículas las que poseen la capacidad del bioconocimiento selectivo de diferentes tipos de analitos. La Fig. 2 muestra un diagrama esquemático del proceso de conjugación y biofuncionalización para la obtención de un bioconjugado fluorescente.



Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de obtención de un bioconjugado fluorescente utilizando nanopartículas de oro.

Una vez obtenida la suspensión coloidal constituida por este tipo de nanopartículas esféricas biosensoras (bioconjugado), es posible probarla usando el analito para el cual fue diseñado. En este trabajo se muestra la elaboración de nanopartículas bioconjugadas fluorescentes para la detección de dos de las bacterias patógenas cuya presencia puede ser común en alimentos contaminados, como son *Salmonella* spp. y *S. aureus*. La Figura 3 muestra una micrografía de fluorescencia confocal tomada en tres campos diferentes (a) campo claro, (b) mezcla de campos claro+oscuro, y (c) campo oscuro. Para la obtención de esta imagen se analizó una muestra de agua contaminada intencionalmente con una mezcla de las bacterias *Salmonella* spp. (1E3 UFC/ml) y *S. aureus* (1E5 UFC/ml). Para esto se mezcló (1:1) un volumen pequeño (50  $\mu$ l) de la solución contaminada con bacterias y otro con la suspensión coloidal de nanopartículas bioconjugadas fluorescentes (biosensor). La mezcla se colocó en laminilla de vidrio y se analizó el campo visual, así como la emisión fluorescente verde (fluoresceína FITC) proveniente de las nanopartículas bioconjugadas adheridas a la superficie de los bacilos de *Salmonella* spp. selectivamente identificados por este tipo de nanopartículas [11]. En este caso las nanopartículas bioconjugadas solamente reconocen y se adhieren a la pared celular de la bacteria *Salmonella* spp.

a pesar de estar presente la bacteria *S. aureus*, la cual no muestra fluorescencia en campo oscuro.

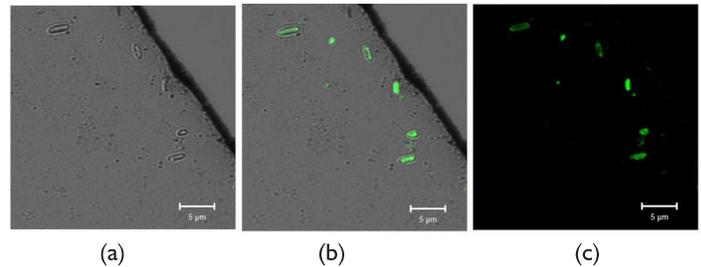


Figura 3. Micrografías de fluorescencia confocal de una muestra de agua contaminada con *Salmonella* spp. (1E3 UFC/ml) y *S. aureus* (1E5 UFC/ml). Se observa la presencia de ambas bacterias en (a) campo claro y (b) mezcla de campos claro+oscuro; en campo oscuro (c) se observa la fluorescencia verde de las nanopartículas bioconjugadas identificando selectivamente a los bacilos de *Salmonella* spp.

De manera similar al caso anterior, la Figura 4 muestra una micrografía de fluorescencia confocal de una muestra de leche contaminada intencionalmente con las bacterias *S. aureus* (1E5 UFC/ml) y *E. coli* (1E5 UFC/ml). Esta muestra de leche contaminada fue mezclada con la suspensión coloidal biosensora, colocándose posteriormente en laminilla de vidrio para su análisis en los tres campos diferentes (a) campo claro y (b) mezcla de campos claro+oscuro; en campo oscuro (c) se observa la fluorescencia roja (rodamina TRITC) proveniente de las nanopartículas bioconjugadas adheridas a la superficie de los cocos de *S. aureus* selectivamente identificados por estas [12]. A diferencia del caso anterior, las nanopartículas bioconjugadas solamente reconocen y se adhieren a la pared celular de la bacteria *S. aureus* a pesar de estar presente la bacteria *E. coli*, la cual no muestra fluorescencia en campo oscuro.

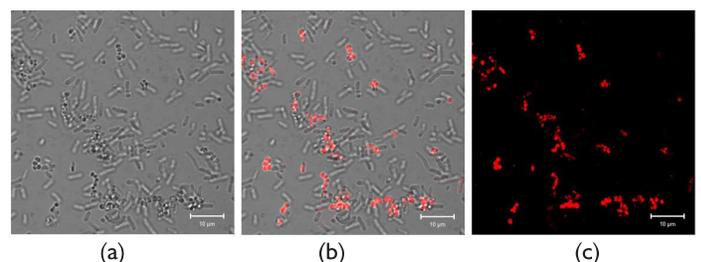


Figura 4. Micrografías de fluorescencia confocal de una muestra de leche contaminada intencionalmente con *S. aureus* (1E5 UFC/ml) y *E. coli* (1E5 UFC/ml). Se observa la presencia de ambas bacterias en (a) campo claro y (b) mezcla de campos claro+oscuro; en campo oscuro (c) se observa la fluorescencia roja de las nanopartículas bioconjugadas identificando selectivamente a los cocos de *S. aureus*.

## Conclusiones

La suspensión coloidal biosensora constituida por nanopartículas bioconjugadas fluorescentes obtenida en esta investigación puede ser utilizada para determinar la presencia de microorganismos patógenos presentes en agua y alimentos contaminados. Para este caso se probó la detección selectiva de las bacterias *Salmonella* spp. y *S. aureus*, en presencia de la bacteria *E. coli*. De esta forma, la metodología propuesta podría representar una alternativa viable de aplicación en el campo del diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas.

## Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue realizado con el apoyo del Instituto Politécnico Nacional (COFAA-IPN, CNMN-IPN)

## Referencias

1. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. and Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States Major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 7–15.
2. Poltronieri, P., de Blasi, M.D., D'Urso, O.F. 2009. Detection of *Listeria monocytogenes* through RealTime PCR and biosensor methods. *Plant Soil Environ.*, 9, 363–369.
3. D'Urso, O.F., Poltronieri, P., Marsigliante, S., Storelli, C., Hernandez, M., Rodriguez Lazaro, D. A 2009. Filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiol.*, 26, 311–316.
4. Kuang, H., Cui, G., Chen, X., Yin, H., Yong, Q., Xu, L., Peng, C., Wang, L., Xu, C. 2013. A one-step homogeneous sandwich immunosensor for *Salmonella* detection based on magnetic nanoparticles (MNPs) and quantum dots (QDs). *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 8603–8610. *Foods* 2014, 3 523.
5. Granqvist, N., Hanning, A., Eng, L., Tuppurainen, J., Viitala, 2013. T. Label-enhanced Surface Plasmon Resonance: A new concept for improved performance in optical biosensor analysis. *Sensors*, 13, 15348–15363.
6. Amaya-González, S., de-los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J.,

Lobo-Castañón, M.J. 2013. Aptamer-based analysis: A promising alternative for food safety control. *Sensors*, 13, 16292–16311.

7. Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A., Barthelmebs, L. 2013. Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. *Methods*, 64, 229–240.

8. Litos, I. K., P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, J. Synodinos, and E. Kanavakis. 2009. Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (10):3135–39.

9. Wang, Y., Ravindranath, S., and Irudayaraj, J. 2010. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:1271–78. doi:10.1007/s00216-010-4453-6.

10. Hermanson, G. 2008. *Bioconjugate techniques*. Rockford, IL, USA: Academic Press.

11. Ríos-Corripio, M.A., Arcila-Lozano, L.S., García-Pérez, B.E., Jaramillo-Flores, M.E., Hernández-Pérez, A.D., Carlos-Martínez, A., Rosales-Pérez, M. and Rojas-López, M. 2016. Fluorescent gold nanoparticle-based bioconjugate for the detection of *Salmonella*. *Analytical Letters* 49, 1-12. ISSN: 0003-2719 (Print), 1532-236X (Online).

12. Arcila Lozano, L.S., Ríos-Corripio, M.A., García-Pérez B.E., Jaramillo-Flores, M.E., González, C.A., Rocha-Gracia, R.C., Gracia-Jiménez, J.M. and Rojas-López, M. 2016. Fluorescent bioconjugate based on gold nanoparticles for the determination of *Staphylococcus aureus*. *Analytical Letters*. ISSN: 0003-2719 (Print), 1532-236X (Online). Article accepted.

