



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

VISUALIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CONJUGADAS CON EL APTÁMERO F23 Y *Pseudomonas aeruginosa*

Nombre: Esther Casiano García

Matrícula: 2192032707

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

Lugar y periodo de realización:

Instituto Nacional de Pediatría [26 de agosto de 2024 – 28 de febrero de 2025]

Asesor Interno:

Dra. Aida Hamdan Partida
No. Eco. 26343

Asesor externo:

Dr. Juan Carlos Gutiérrez Santana
Cédula profesional: 10763160

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto como estudiante de servicio social.

Agradezco a la Dra. Aida Hamdan Partida, del Departamento de Atención a la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, quien me ha guiado en el transcurso de esta etapa.

A la Dra. Ana María Fernández-Presas del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como al Dr. Luis Felipe Jiménez-García y a la Dra. Reyna Lara-Martínez, ambos adscritos al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; quienes fueron imprescindibles para la obtención de las micrografías mostradas en este documento.

Mi gratitud también se extiende a diferentes instituciones, investigadores, académicos, laboratoristas, estudiantes, entre otros, que hicieron posible la conclusión de este trabajo, tal como las estudiantes de la carrera de Ingeniería Bioquímica Industrial Martha Geovana Pérez García y Diana Laura Villegas Reyes, así como a la pasante de la licenciatura en Medicina Jimena Medina Pérez, quienes fueron de gran apoyo en los procesos de acoplamiento entre las nanopartículas de plata y los aptámeros utilizados en esta tesina.

Finalmente, agradezco profundamente al Dr. Juan Carlos Gutiérrez Santana, cuya guía experta y apoyo constante fueron cruciales en cada etapa de este proyecto. Su dedicación y sabiduría han sido una fuente invaluable de inspiración y aprendizaje para mí.

RESUMEN:

Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos es un patógeno bacteriano prioritario en el problema global de la resistencia antimicrobiana (AMR). En las personas con fibrosis quística, la infección pulmonar causada por *P. aeruginosa* se ha asociado con una mortalidad alta y una baja esperanza de vida, debido a la selección de variantes raras que complican el diagnóstico oportuno, y con alta AMR que perjudican la efectividad de los tratamientos disponibles. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado una alta actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos bacterianos, mientras que el aptámero F23 ha demostrado reconocer con alta afinidad y especificidad a *P. aeruginosa*, además de mantener su reconocimiento tras su acoplamiento con AgNPs. Sin embargo, es importante evaluar otras configuraciones de conjugación para seleccionar aquella con mayor reconocimiento por *P. aeruginosa*. Objetivo. Desarrollar complejos constituidos por AgNPs y el aptámero F23 y visualizar por microscopía electrónica su interacción con *P. aeruginosa*. Métodos. Tres configuraciones tioladas del aptámero F23 fueron conjugadas con AgNPs mediante quimiosorción. La formación de conjugados (F23-C6-AgNPs, AgNPs-C6-F23 y F23-C2-AgNPs) se determinó por el incremento de la distancia de migración electroforética y el desplazamiento del pico máximo de absorción. El reconocimiento selectivo de los conjugados se evaluó en 3 cepas de referencia de *P. aeruginosa* y 3 cepas no-*P. aeruginosa* (*Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*), mediante la detección del pico máximo de absorción de cada conjugado en los sobrenadantes de caldos de cultivo incubados con ellos, cuya absorbancia es directamente proporcional al reconocimiento del conjugado por cada bacteria. La visualización de los efectos antimicrobianos de los conjugados se evaluó por microscopía electrónica de transmisión en una cepa de referencia de *P. aeruginosa*, una cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *S. maltophilia*. Resultados. Se obtuvieron los conjugados F23-C6-AgNPs, AgNPs-C6-F23 y F23-C2-AgNPs, corroborado por el desplazamiento de su pico máximo de absorción de una densidad óptica de 396 nm (OD₃₉₆) para AgNPs no acopladas, a OD₄₀₂, OD₄₀₃ y OD₄₀₅, respectivamente, así como por el incremento evidente en su distancia de migración electroforética. El complejo F23-C2-AgNPs logró reconocer *P. aeruginosa* entre especies filogenéticamente cercanas ($p < 0.01$) y demostró un daño ultraestructural en una cepa de referencia de *P. aeruginosa* y en una cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, que no se observó en *S. maltophilia*. Estos hallazgos respaldan la factibilidad de desarrollar sistemas nanoestructurados selectivos como alternativas terapéuticas contra *P. aeruginosa*.

PALABRAS CLAVE: Resistencia antimicrobiana, *P. aeruginosa*, Aptámeros, Nanopartículas de plata, Nanomedicina.

INTRODUCCIÓN

El microorganismo más frecuentemente aislado de las secreciones respiratorias de los individuos con fibrosis quística (CF) es *Pseudomonas aeruginosa*. El ambiente pulmonar hostil de estos pacientes, caracterizado por una presión selectiva constante derivada del sometimiento a antibioticoterapias prolongadas, ha favorecido la selección de cepas cada vez más eficientes en la colonización pulmonar, la formación de biopelículas y una mayor resistencia antimicrobiana (AMR), lo que perjudica la efectividad de las terapias de erradicación actuales. La Organización Mundial de la Salud (WHO) ha reconocido a *P. aeruginosa* como una de las bacterias con mayores repercusiones en la mortalidad de los individuos infectados y como uno de los bacilos más importantes en la “crisis” de AMR; por lo que ha promovido la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, herramientas diagnósticas y vacunas que permitan combatir este problema de salud mundial. Este trabajo converge con dichas directrices, al pretender establecer las bases para el desarrollo de nuevas estrategias con potencial terapéutico específico contra *P. aeruginosa*, basadas en la selectividad del aptámero F23 por *P. aeruginosa* y en las propiedades antimicrobianas innatas de las nanopartículas de plata (AgNPs). Es imprescindible evaluar el funcionamiento de dichos complejos para reconocer a *P. aeruginosa* de entre otras especies filogenéticamente cercanas.

MARCO TEÓRICO

Resistencia a los antimicrobianos y *Pseudomonas aeruginosa*.

La AMR es un problema de salud que afecta a distintos grupos poblacionales a nivel mundial (1,2). Distintos microorganismos se han adaptado para sobrevivir en presencia de diferentes agentes antimicrobianos, lo que ha resultado en la reducción de la eficacia de los tratamientos actuales y en aumentos significativos de los gastos económicos destinados a su terapéutica (3).

Las estimaciones sugieren que, en caso de no atender el problema de manera seria, los gastos anuales para el año 2050 podrían superar los 100 billones de dólares y ocasionar cerca de 10 millones de muertes (4,5). En dicho problema de salud, las variantes resistentes a los carbapenémicos (CARB) de *P. aeruginosa* forman parte de la lista actual de patógenos bacterianos prioritarios emitida por la WHO, y en su análisis de decisiones de criterios múltiples está posicionada en la categoría de alta prioridad, debido primordialmente a la mortalidad que ocasionan sus infecciones y a su capacidad alta de desarrollar resistencia incluso a antibióticos de reciente formulación (4,6).

En ese respecto, *P. aeruginosa* es responsable de una proporción alta de las muertes por infecciones nosocomiales a nivel mundial (7,8) lo que hace evidente la necesidad de

desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas eficientes, con el objetivo de reducir la mortalidad de sus infecciones y contrarrestar el avance vertiginoso de la *AMR*.

Pseudomonas aeruginosa, una bacteria oportunista

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo de distribución amplia en el ambiente, cuyos nichos abarcan el suelo, agua, plantas, animales y humanos, aunque en muchas ocasiones sin causar infección (9).

En individuos con inmunodepresión, barreras epiteliales rotas, entre otras condiciones, este microorganismo exhibe su naturaleza oportunista, ocasionando daño tisular, degradación de membranas, muerte celular, necrosis de tejidos y evasión de la respuesta inmune del huésped, lo cual es logrado a través de la producción de compuestos tóxicos tales como las exotoxinas A y S, toxinas tipo III y enzimas hidrolíticas, que en combinación con los mecanismos de *AMR* del patógeno, pueden ocasionar la muerte de los individuos infectados (9,10,11,12).

En personas con *CF*, *P. aeruginosa* es el microorganismo más frecuentemente aislado de sus secreciones respiratorias. La presencia de esta bacteria en los pacientes con *CF* es un factor crítico que agrava la situación, puesto que ocasiona infecciones crónicas y reduce su esperanza de vida en la población (13,14).

Fibrosis Quística.

La *CF* se presenta mayormente en la población caucásica observándose en 1/3,300 nacimientos, 1/15,300 en nacimientos de ascendencia afroamericana y en 1/32,000 nacimientos de ascendencia asiático-americana (15,16). En México, se estima que la frecuencia es de 1/60, mientras que para la población europea es de 1/25 (17,18).

Esta enfermedad genética es causada por variantes patogénicas del gen que codifica para la proteína de la conductancia transmembrana de la *CF* (*CFTR*, símbolo genético aprobado) (10,19,20,21) que actúa como un canal iónico de cloruro que regula el equilibrio osmótico en las superficies de los órganos con células caliciformes (22,23), por lo que las alteraciones en la secuencia de *CFTR* pueden resultar en proteínas con funcionamientos inadecuados, e incluso su inactivación (24).

Las alteraciones en la proteína *CFTR* o su ausencia pueden ocasionar el bloqueo de la salida de iones cloro hacia el exterior de la célula y provocar concentraciones mayores en el citoplasma, lo que favorece la internalización de líquidos por gradiente de concentración, que incrementa la viscosidad de la mucosa pulmonar. A su vez, esa densa mucosidad perjudica la expulsión ciliar, por lo que el moco se acumula progresivamente (24), causando exacerbaciones constantes en las vías respiratorias de las personas con *CF* que influyen en la alta mortalidad de esta población (22,25).

En adición, la densa mucosidad en los pulmones de las personas con *CF* favorece la colonización bacteriana, por lo que padecen infecciones respiratorias constantes (26). Por ello, los pacientes son sometidos constantemente a antibioticoterapias agresivas, que se suman a diferentes condiciones particulares de estos pacientes y que ejercen presiones selectivas que favorecen la selección de fenotipos “raros”, que complican el diagnóstico microbiológico, y con alta *AMR* que repercute en la efectividad de los esquemas terapéuticos, así como en la formación de biopelículas, considerada una de sus estrategias adaptativas primordiales para persistir en ambientes adversos (27,28).

Pseudomonas aeruginosa y fibrosis quística.

Un estudio publicado en 2021 señaló que el riesgo de muerte en adultos con *CF* se duplica con el establecimiento de una infección por *P. aeruginosa* y se incrementa hasta ocho veces cuando la bacteria ha adquirido *AMR* (29).

Entre los factores que propician la infección y persistencia de *P. aeruginosa* en los pulmones de estos individuos están el exceso de viscosidad del moco, un sistema inmunológico debilitado y el daño orgánico causado por las variantes patogénicas de *CFTR* (15,30).

En ese ambiente pulmonar, la bacteria logra sobrevivir mediante mecanismos de defensa intrínsecos, como la baja permeabilidad de su membrana externa que impide la entrada de sustancias tóxicas al interior de la bacteria, la activación de bombas de eflujo que expulsan las sustancias dañinas para su sobrevivencia, así como la producción de enzimas capaces de inactivar antibióticos (particularmente β -lactamasas) (30,31).

Además de esos mecanismos, *P. aeruginosa* puede incrementar su resistencia mediante mecanismos adaptativos o adquiridos, los cuales complican el tratamiento de sus infecciones. El mecanismo de resistencia adaptativa corresponde a su capacidad de formar biopelículas, que funcionan como barrera física y fisiológica contra los antibióticos y las células del sistema inmune del hospedador (31,32).

Entre los mecanismos de resistencia adquirida están la pérdida o alteración de porinas, la producción de carbapenemasas, lo cual se adquiere mediante plásmidos, la modificación de dianas de antibióticos y la adquisición de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (1,33). En los pacientes con *CF*, la *AMR* de *P. aeruginosa* puede evolucionar rápidamente; uno de los mecanismos primordiales es la expresión de enzimas inactivadoras de antibióticos como AmpC, que es una cefalosporinasa capaz de hidrolizar distintos antibióticos β -lactámicos. La plasticidad genética de *P. aeruginosa*, favorece el desarrollo de mecanismos de *AMR* ante las presiones selectivas constantes presentes en el ambiente pulmonar de las personas con *CF*, lo que repercute en la efectividad de las opciones terapéuticas, limitando los tratamientos disponibles y aumentando la mortalidad de los individuos infectados (34,35,36).

Lo anterior subraya la importancia de un diagnóstico oportuno que permita administrar tratamientos adecuados que mejoren la calidad y la esperanza de vida de los pacientes con CF.

Diagnóstico de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística.

El diagnóstico microbiológico tradicional complica la detección temprana de los patógenos (37); ya que la identificación bacteriana mediante cultivos microbiológicos (estándar de oro) presenta limitaciones, como la baja sensibilidad en infecciones crónicas o el crecimiento lento de algunas bacterias, lo que resulta en resultados falsos negativos (38).

El diagnóstico basado en métodos moleculares, aunque son más rápidos y sensibles, presentan desafíos, tal como la dificultad para distinguir entre una infección activa y el material genético remanente derivado de antibioticoterapias previamente administradas a los pacientes, lo que puede repercutir en sobretratamientos que favorecen el incremento de la AMR (39,40).

Tratamientos para la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis quística.

Entre las estrategias para mejorar la calidad de vida de la población con CF se encuentra el cribado neonatal para el diagnóstico temprano de la enfermedad, ya que el paciente debe someterse a cuidados y tratamientos continuos que se enfocan en tratar los síntomas respiratorios y las exacerbaciones pulmonares; donde se incluye el ejercicio aeróbico, una alimentación adecuada, la eliminación del moco acumulado a través de fisioterapias y la administración de DNAsas para romper el DNA de las células dañadas y de las bacterias muertas, aunque este último ha sugerido un aumento de la viscosidad del moco, lo cual complica el tratamiento (37).

Por otro lado, el uso de antibióticos solos o combinados sigue siendo el tratamiento más utilizado para tratar las infecciones respiratorias de *P. aeruginosa* en pacientes con CF (37). Las antibioticoterapias son variadas y dependientes del estado de la infección de cada paciente, por lo que requieren un enfoque personalizado y multidisciplinario (41).

Además, la elección de los antibióticos depende del perfil de sensibilidad de la bacteria y de la respuesta individual de cada paciente. De manera general, las antibioticoterapias son clasificadas en tratamientos de infección primaria (de primera línea); tratamientos de infección crónica y tratamientos para las exacerbaciones (42).

Los tratamientos de primera línea consisten en la administración de antibióticos por vía inhalada (colistina, tobramicina, aztreonam) durante un periodo de 28 días que pueden combinarse con ciprofloxacino oral para potenciar el efecto antibacteriano. Los tratamientos para infecciones crónicas incluyen antibióticos inhalados como colistina complementada con

ciclos de combinación con aztreonam o tobramicina durante 28 días, seguidos de 28 días de descanso, con el objetivo de prevenir la progresión de la enfermedad pulmonar (42,43).

Respecto a las exacerbaciones leves a moderadas, su tratamiento consta de la administración de ciprofloxacino oral durante 2 a 3 semanas con el objetivo de reducir la carga bacteriana y aliviar los síntomas. En contraste, las exacerbaciones graves son abordadas con la administración intravenosa de β -lactámicos (ceftazidima o cefepima) combinados con un aminoglucósido (tobramicina o amikacina) o una fluoroquinolona (ciprofloxacino o levofloxacino) para intentar disminuir el progreso de la enfermedad y el riesgo de muerte de los pacientes infectados (42,43,44).

Hasta el momento, se ha reportado que los antibióticos más efectivos contra *P. aeruginosa* son cefepima, ceftriaxona y meropenem; no obstante, investigaciones recientes han demostrado que *P. aeruginosa* es capaz de persistir a pesar de la administración de altas dosis de antibióticos. Incluso, se han reportado altos porcentajes de AMR a gentamicina (55-80%), amikacina (43-70%), piperacilina/tazobactam (48-70%) y ciprofloxacina (5-60%); y recientemente se ha comunicado el desarrollo de AMR de esta especie a tobramicina, colistina, fosfomicina, meropenem, ceftazidima y combinaciones como: ceftazidima/avibactam (37.5%) o ceftolozane/tazobactam (37.5%) (45,46,47).

Existen reportes de que *P. aeruginosa* es capaz de desarrollar resistencia a antibióticos de nueva formulación, por lo que se ha evidenciado la necesidad de realizar investigaciones para combatir variantes de *P. aeruginosa* con AMR alta, así como evaluar los efectos de los moduladores de CFTR en la adquisición y erradicación de *P. aeruginosa* (48,49).

Es evidente que la AMR de *P. aeruginosa* en CF es un tema complejo, pero también es notable la necesidad de contar con nuevas opciones terapéuticas para combatir a este patógeno y así, mejorar la calidad y la esperanza de vida de las personas con CF.

Nanopartículas de plata como alternativas terapéuticas contra la resistencia a los antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se han explorado diferentes alternativas para combatir la AMR; entre ellas, se encuentra el uso de nanopartículas (NPs), ya que han demostrado cualidades resaltables para la terapéutica, el diagnóstico de enfermedades y el transporte de fármacos, incluso son capaces de dirigirse a sitios específicos con precisión, con lo que logran incrementar la biodisponibilidad de fármacos en los modelos basados en terapias dirigidas (50,51,52,53).

Entre la gama amplia de NPs, las NPs de plata (AgNPs) resaltan por poseer un efecto bactericida prometedor (54). Un ejemplo de ello se visualiza en el trabajo de Liao y cols. (2019), quienes reportaron una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 1.406–5.625 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración bactericida mínima (MBC) de 2.813–5.625 $\mu\text{g/mL}$, de un conjunto de

AgNPs, sobre *P. aeruginosa*, por lo que se han convertido en opciones adicionales para combatir las enfermedades infecciosas causadas por este patógeno (55).

Los mecanismos de acción de las *AgNPs* descritos hasta el momento, incluyen, además de la producción de ROS, la adherencia a la superficie de la bacteria, donde interactúa con proteínas que contienen azufre o fósforo provocando la ruptura de la pared celular, la acumulación en la membrana celular bacteriana altera su permeabilidad, resultando en la fuga de contenido celular (54,56).

En el interior de las bacterias, las *AgNPs* ocasionan daños irreversibles en el DNA, alteran la estructura de múltiples proteínas citoplasmáticas e incluso pueden inhibir la actividad enzimática de muchas de ellas (57,58), así como inhibir o reducir la síntesis de biopelículas (59), tal como lo reportaron Korzekwa y cols. (2021), quienes describieron dicha característica en cepas clínicas de *P. aeruginosa* con AMR alta, y que les permitió sugerir que las *AgNPs* podrían ser empleadas en el recubrimiento de materiales quirúrgicos e implantes con la finalidad de disminuir las infecciones nosocomiales ocasionadas por *P. aeruginosa* (58).

En este contexto, las *AgNPs* poseen un amplio espectro de propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. Estas propiedades han sido atribuidas a diversas características de las *NPs* entre las que se encuentran: la aglomeración, su solubilidad y su tamaño (que oscila entre 1 y 100 nm) (56,60,61).

El tamaño pequeño de las *AgNPs* le permite penetrar dentro de las células e interactuar con biomoléculas importantes para la sobrevivencia del microorganismo. Se ha reconocido que las *AgNPs* con menor tamaño poseen una alta toxicidad, lo que se ha atribuido a una mayor permeabilidad en las membranas celulares bacterianas, respecto a las *AgNPs* de mayor tamaño (54,61).

En contraste, existen reportes que señalan que la toxicidad de las *AgNPs* es relativamente baja en humanos. Sin embargo, la exposición continua a estas *NPs* puede tener consecuencias negativas. Para mitigar estos efectos, se han desarrollado estrategias como el diseño de *AgNPs* con tamaños y formas específicas, así como métodos de síntesis que evitan el uso de reactivos tóxicos. Por otra parte, la administración de dosis adecuadas y la selección cuidadosa de la vía de administración se han descrito como factores para reducir la exposición de las *AgNPs* en células y tejidos sensibles (60,62).

En general, la modificación de la superficie de las *NPs* mediante el recubrimiento con grupos funcionales o la conjugación con moléculas biocompatibles, se han convertido en estrategias populares para reducir su toxicidad, así como para mejorar su direccionalidad (63).

En nanomedicina, la unión de *NPs* con aptámeros ha abierto las puertas para el desarrollo de nuevos sistemas de detección, sistemas de administración de fármacos dirigidos, e incluso de estrategias multipropósito útiles tanto para el diagnóstico como para la terapia (64,65,66,67).

Aptámero F23 específico para *Pseudomonas aeruginosa*.

Los aptámeros se han descrito como cadenas de oligonucleótidos de DNA o RNA que se unen a una molécula complementaria específica. Están constituidos por una serie de nucleótidos que van de 20 a 80 nucleótidos y su secuencia específica les permite formar estructuras tridimensionales únicas que les confieren la capacidad de reconocer a su blanco con alta afinidad (65).

Los aptámeros se obtienen mediante un método *in vitro* denominado Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX), que consiste en la colocación directa de la molécula de interés dentro de una biblioteca de 10^{12} a 10^{15} secuencias flanqueadas de DNA o RNA (68,69). Las secuencias que no se adhieren a la molécula son eliminadas poco a poco mediante procesos de filtración, mientras que las secuencias unidas a la molécula son separadas de ella para su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciadas para determinar su composición nucleotídica (70).

Una de las desventajas de los aptámeros es su susceptibilidad a la degradación por diversas enzimas; sin embargo, este aspecto puede revertirse mediante la incorporación de bases modificadas, o su conjugación con otras biomoléculas o materiales como las *NPs* (71,72).

Entre las características promisorias de los aptámeros se encuentra su capacidad para discriminar entre blancos relacionados y de tamaño pequeño, lo que les permite reconocer específicamente a sus objetivos; su pequeño tamaño les confiere la capacidad de penetrar tejidos, así como de actuar como acarreadores de moléculas terapéuticas, lo que se añade a su buena estabilidad térmica que permite su fácil manejo (64).

Contrario a lo anterior, los anticuerpos tienden a ser susceptibles al cambio de pH y de temperatura, y aunque pueden ser modificados, su producción es más compleja, lo cual requiere más tiempo y gastos económicos. Además, su tamaño (150-160 kDa) genera complicaciones en la penetración de tejidos y en el acceso a ciertos epítomos o sitios de unión en la superficie de células o proteínas (66,73).

Por lo anterior, los aptámeros son considerados una herramienta prometedora para limitar o dirigir el efecto de compuestos terapéuticos sobre moléculas o células específicas, por lo que algunos autores han explorado su uso en diversos campos de la medicina, destacando la posibilidad de usarse en el combate de patógenos bacterianos con *AMR* (74).

Se han seleccionado con éxito aptámeros contra patógenos Gram positivos y Gram negativos que han sido utilizados para desarrollar estrategias novedosas para combatir diferentes patógenos bacterianos de importancia clínica.

Entre los artículos publicados en este contexto, se encuentra el de Jaeyeong y cols. (2022) quienes evaluaron el efecto de *NPs* de oro (*AuNPs*) cargadas con péptidos antimicrobianos

(AMP) y funcionalizadas con aptámeros, en las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* en ratones, describiendo que la administración del complejo en dichos ratones resultó en una reducción mayor de colonización en diferentes órganos, comparada con la reducción de colonización en ratones a los que únicamente se les administró AMP, o AuNPs funcionalizadas con el aptámero pero no cargadas con el AMP (75).

Por otro lado, Chang y cols. (2013), desarrollaron un método de detección de *Staphylococcus aureus* mediante la conjugación de aptámeros específicos para la bacteria con AuNPs. Para ello, los autores seleccionaron a través de SELEX, a los aptámeros que se unieron a la bacteria y mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido midieron su afinidad específica. Los aptámeros seleccionados fueron acoplados a AuNPs. Finalmente, la interacción entre los acoplados y *S. aureus* fue visualizada a través de la intensidad de dispersión de luz por resonancia. El método logró identificar a *S. aureus* con límites de detección (LOD) de una célula en tan solo 1.5 h (76).

Asimismo, Deb y cols. reportaron el diseño de un biosensor basado en aptámeros (aptasensor) donde utilizaron AuNPs que conjugaron con un aptámero anti-*Klebsiella pneumoniae*. En dicho estudio, los investigadores se basaron en el fenómeno de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) de las AuNPs, donde la presencia del patógeno ocasiona cambios específicos en la absorción en el espectro visible que permitió un LOD de 3.4×10^3 UFC/mL (77).

En el caso de *P. aeruginosa*, el aptámero denominado F23 ha sido objeto de mayor estudio. La selección de este aptámero fue realizada por Wang y cols. (2011), quienes seleccionaron inicialmente nueve candidatos de ssDNA mediante el método SELEX de bacteria completa. Los aptámeros denominados F17 y F23 mostraron las afinidades más promisorias, por lo que fueron marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y expuestos a la bacteria para determinar la intensidad de fluorescencia de las células reconocidas por cada aptámero, obteniéndose valores de K_d de 57.63 ± 11.64 nM para F17 y de 17.27 ± 5.00 nM para F23; este último fue sometido a una prueba de especificidad por citometría de flujo, donde se demostró que reconoce a *P. aeruginosa* sin mostrar señal fluorescente contra *S. maltophilia* y *A. baumannii* (78).

Este aptámero se ha acoplado a puntos cuánticos (QDs) y nanomateriales, demostrando mantener su reconocimiento específico por la bacteria (79).

Por ejemplo, Liu y cols. (2025) diseñaron un aptasensor para el reconocimiento específico de *P. aeruginosa*, el cual consistió en la formación de una sonda de DNA tipo horquilla conformada por el aptámero F23 y una secuencia de DNA complementaria. Esta sonda, al entrar en contacto con la bacteria, se unió a ella a través del aptámero F23, liberando a su vez a la cadena complementaria, la cual se unió mediante complementariedad con una sonda de doble etiquetado (que contiene un colorante diferente en cada extremo), lo que generó

una señal fluorescente. El complejo formado se amplificó por el método de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) por DNA/polimerasa/endonucleasa, por lo que se obtuvo una cascada de señales de fluorescencia, las cuales fueron registradas en un espectrofotómetro de fluorescencia con un LOD de 1.6 UFC/mL (80).

Por otro lado, Chaimae y cols. (2025) evaluaron la detección específica de *P. aeruginosa* mediante microscopía confocal. Para ello, utilizaron cepas de *P. aeruginosa* marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP; verde intenso) y tiñeron cultivos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* con los colorantes DAPI (azul) y SYTO9 (verde). Adicionalmente, conjugaron el aptámero F23 con cianina 5 (Cy5-F23), otorgándole emisión en el espectro rojo/rosado. Tras exponer ambas especies bacterianas al conjugado Cy5-F23, observaron un cambio de coloración exclusivo en *P. aeruginosa* y en *P. aeruginosa*-GFP, debido a la colocación de señales. Las bacterias teñidas con SYTO9 viraron de verde a amarillo, las teñidas con DAPI de azul a morado, y las marcadas con GFP de verde intenso a amarillo intenso. En contraste, *S. aureus* no presentó cambios en su fluorescencia y mantuvo su coloración original. Estos resultados confirmaron la especificidad del aptámero Cy5-F23 por *P. aeruginosa*. Los autores también desarrollaron un software para cuantificar las imágenes de microscopía electrónica, lo que les permitió detectar 1122 células de un total de 1123, utilizando este método (81).

Tabla 1. Selección de aptámeros específicos para *P. aeruginosa* y su potencial aplicación en el diagnóstico y terapia de enfermedades infecciosas

Aptámero	SELEX	Blanco	K_d	Cepa bacteriana	Modificación	Enfoque
F23		<i>P. aeruginosa</i>	17.27 ± 5.00 nM	ATCC 10145	QDs FITC	Detección
				ATCC 27853	MG-NPA SWNT	Detección Terapia
				ATCC 15442	MNP	Detección
				ATCC 27853	FAM-cDNA FAM	Detección
				ATCC 27853	GOQDs	Detección
				ATCC 27853	AuNPs	Detección
				ATCC 27853	MB	Detección
					Poly(A)DNA GCE-HZIF-8	Detección
					Fc-GO	Detección
					AgNPs-GCE	Detección
					ECV-NCs	Detección
				ATCC 15442	PDA-PEI	Detección
				ATCC 10145	Ag-NCs	Terapia
					ssDNA	Detección
				ATCC 27853	PU-PCDA	Detección
					PU-TCDA	Detección
				ATCC 27853	Au-SPE	Detección
					HP	Detección
				ATCC 15692	Cy5	Detección
				ATCC 27853	SPCEs/c-MWCNTs	Detección
				PAO1		

Pie de tabla: SELEX: Evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial; K_d : Constante de disociación; QDs: Puntos cuánticos, FITC: Isotiocianato de fluoresceína (82); MG-NPA: Chip de matriz de nanopartículas recubiertas de oro de múltiples puntos (83); SWNT: Nanotubos de carbono de pared simple (84); MNP: Nanopartículas magnéticas, FAM- cDNA: ADN complementario marcado con fluoresceína (85); GOQDs: Puntos cuánticos de óxido de grafeno (86); AuNPs: Nanopartículas de oro (87); MB: Microesfera magnética, Poly(A)DNA: ADN poliadenilado (88); GCE-HZIF-8: Electrodo de carbono vítreo/ Imidazolato de zeolita-8 hueco; Fc-GO: Ferroceno-óxido de grafeno (89); AgNPs-GCE: Nanopartículas de plata con electrodo de carbono vítreo (90); ECV-NCs: Electrodo de carbono vítreo con nanopartículas de quitosano (91); PDA-PEI: Puntos de copolímero fluorescente con polietilenimina (92); Ag-NCs: Nanoclústeres de plata (93); ssDNA: ADN de cadena sencilla (94); PU/PCDA: Poliuretano unido con 10,12-ácido 10,12-pentacosadiinoico; PU/TCDA: Poliuretano unido con ácido 10,12-tricosadiinoico (95); Au-SPE: Sistema

de electrodos serigrafiados de oro desechable (79); HP: Sonda alostérica tipo horquilla (80); Cy5: Cianina (81); SPCEs/c-MWCNTs: Superficies del electrodo de carbono serigrafiado con nanotubos de carbono multipared carboxilados (96).

OBJETIVOS

GENERAL:

- Desarrollar complejos constituidos por nanopartículas de plata (*AgNPs*) y el aptámero F23 y visualizar por microscopía electrónica su interacción con *P. aeruginosa*.

ESPECÍFICOS:

- Obtención de complejos nanoestructurados basados en *AgNPs* y el aptámero F23 tiolado en tres posiciones (F23- C6-Tiol, Tiol-C6-F23 y F23-C2-Tiol).
- Evaluación por espectrofotometría del reconocimiento de cada complejo (F23-C6-*AgNPs*, *AgNPs*-C6-F23 Y F23-C2-*AgNPs*) hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.
- Visualización por microscopía electrónica de la interacción entre complejos y *P. aeruginosa*.
- Identificar entre los conjugados, la configuración con mayor reconocimiento por *P. aeruginosa*.

DESARROLLO EXPERIMENTAL:

Material

Se utilizaron tres cepas de referencia de *P. aeruginosa* (ATCC® 15692™, ATCC® 27853™ y ATCC® 27855™) (grupo 1) y tres cepas no-*P. aeruginosa* de especies filogenéticamente cercanas (*Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*) (grupo 2) que fungieron como controles de la selectividad de los complejos constituidos por *AgNPs* y diferentes variantes tioladas del aptámero F23 (descritas en el siguiente párrafo) por *P. aeruginosa*.

- Aptámero F23 modificado en su extremo 3' con un grupo tiol ubicado en el carbono 6 (F23- C6-Tiol).
- Aptámero F23 modificado en su extremo 5' con un grupo tiol ubicado en el carbono 6 (Tiol-C6-F23)
- Aptámero F23 modificado en su extremo 3' con un grupo tiol ubicado en el carbono 2 (F23- C2-Tiol).

Los aptámeros F23 tiolados en C6 (F23-C6-Tiol y Tiol-C6-F23) fueron adquiridos de T4 oligo® (ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México). El aptámero tiolado en C2 (F23-C2-Tiol)

fue adquirido de la casa comercial Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canadá), mientras que las *AgNPs* fueron adquiridas de Sigma-Aldrich® (Silver, dispersión, Sigma-Aldrich®, USA).

Condiciones de los cultivos microbiológicos

Las cepas bacterianas, almacenadas a 4 °C en viales de gelosa especial en el cepario bacteriológico del Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (LBE-INP), fueron reactivadas mediante la inoculación de una alícuota de cada cepa en tubos de ensayo previamente preparados con 3 mL de caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI, Becton Dickinson, USA) estéril, seguida de su incubación a 37 °C durante 24 h.

Cada caldo de cultivo fue sembrado por estría cruzada en placas de agar MacConkey (AMC, Becton, Dickinson, USA) e incubado a 37 °C durante 24 h para obtener colonias aisladas de cada cepa bacteriana.

A pesar de que las cepas almacenadas en el cepario bacteriológico ya cuentan con su tipificación bioquímica y molecular, las cepas seleccionadas fueron sometidas a una identificación bioquímica básica basada en la fermentación de carbohidratos mediante su inoculación en medio de Kligler (Becton Dickinson, USA), complementado con la prueba de descarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina y arginina [LOA's]), los cuales fueron preparados con medio de descarboxilasa complementado con los aminoácidos.

Una vez confirmada la especie bacteriana, se procedió a inocular cada cepa en caldo BHI y, tras su crecimiento, a sembrar por estría cruzada en placas de AMC, con el objetivo de obtener colonias aisladas que se utilizaron en los procesos metodológicos descritos a continuación.

Acoplamiento entre nanopartículas de plata y el aptámero F23

El acoplamiento de las tres variantes tioladas del aptámero F23 se realizó conforme a lo descrito por Gutiérrez Santana JC (2023), utilizando dos controles negativos (C-), el primero (Control 1) se constituyó únicamente por agua libre de nucleasas (H_2O_{LN}), y el segundo (Control 2) por un oligonucleótido no-tiolado llamado "Primer OPY-2" (97).

Un total de 10 µL de cada variante tiolada del aptámero F23, así como de cada C- fueron mezclados con 5 µL de buffer de acetatos 500 mM a pH 5.2, y 10 µL de tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP, Sigma-Aldrich®, USA) (Liu & Lu, 2006), seguido de su incubación a 70 °C durante 3 min, proseguido por una incubación adicional a 37 °C durante 1 h (98).

La solución resultante fue incubada a 37 °C durante 18-24 h con 2 mL de *AgNPs* previamente atemperadas a 37 °C. A dichas soluciones se agregaron 366 µL de PBS 1X y se incubaron en agitación constante a 37 °C durante 3 h, continuado por tres adiciones de NaCl (63 µL, 63 µL y 78 µL), cada una seguida de una incubación de 1 h (Hu et al., 2014), finalizando con una

cuarta adición de 156 μL de NaCl, la cual fue mantenida a las mismas condiciones de incubación durante 18-24 h (99).

Los conjugados fueron recuperados por centrifugación a $20,817 \times g$ durante 35 min; el sedimento resultante se lavó con 300 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$, y se resuspendió en 100 μL de PBS 0.1X (100). La formación de conjugados fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa 1 %, cargando un total de 10 μL de la solución resultante de cada variante tiolada y de cada C-, mezclados con 4 μL de glicerol 10 %. Los geles fueron sometidos a 85 V durante 10 min y visualizados en luz visible para identificar cambios en la distancia de migración de los acoplados respecto a las AgNPs no-acopladas (101).

Adicionalmente, los conjugados fueron analizados por espectrofotometría UV-Vis, para la detección de variaciones en los picos de absorbancia respecto a los de las AgNPs no-acopladas (100).

Evaluación de la interacción de los acoplados con *Pseudomonas aeruginosa*

Una colonia única de cada cepa fue inoculada por duplicado en tubos de ensayo previamente preparados con 3 mL de BHI e incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Los cultivos resultantes fueron centrifugados a $1,301 \times g$ durante 10 min (102), lavados con PBS 1X en una ocasión y con PBS 0.1X en dos ocasiones.

El tubo correspondiente al primer duplicado se ajustó a una absorbancia de 0.185 ± 0.005 a una densidad óptica de 625 nm (OD_{625}) y en un volumen de 400 μL ; el cultivo fue centrifugado ($1,301 \times g$ durante 10 min) y resuspendido en 200 μL de PBS 0.1X.

El botón bacteriano del segundo duplicado se incubó a temperatura ambiente (TA) con 500 μL de etanol 80 % durante 5 min, conforme a la estrategia de inactivación descrita por Wang K-Y (2011); el botón celular se recuperó por centrifugación ($1,301 \times g$ durante 10 min) y se lavó en dos ocasiones con PBS 0.1X (bacterias inactivas) y se resuspendió en 200 μL de PBS 0.1X (bacterias inactivadas).

Un total de 40 μL de cada conjugado fue ajustado a valores de absorbancia de 0.5 ± 0.05 a una longitud de onda de 402 nm (OD_{402}), posteriormente se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min, inmediatamente se pasaron a hielo durante 5 min y se incubaron a 37 °C durante 18 h con los 200 μL de los cultivos bacterianos de ambos duplicados.

La medición de absorbancias se realizó en dos momentos, la primera procedió del sobrenadante resultante de la centrifugación a $4,487 \times g$ durante 10 min de la mezcla de bacterias con acoplados (sobrenadante 1; S1), donde el valor de absorbancia a OD_{402} sería inversamente proporcional al reconocimiento de los acoplados por *P. aeruginosa*.

La siguiente medición resultó del lavado con 200 μL de PBS 0.1X del botón celular obtenido con la primera centrifugación, el cual fue resuspendido en 200 μL de PBS 0.1X, desnaturalizado a 95 °C durante 10 min y enseguida, centrifugado a $4,487 \times g$ durante 1 min;

del sobrenadante resultante se recuperó un volumen total de 100 μL (sobrenadante 2; S2), cuyo valor de absorbancia a OD_{402} sería directamente proporcional al reconocimiento de los acoplados por *P. aeruginosa*.

Visualización por microscopía electrónica de los complejos *Pseudomonas aeruginosa* acoplados

Se utilizó el acoplado con mayor reconocimiento por *P. aeruginosa*, de acuerdo con los datos obtenidos en los ensayos de interacción. Las cepas bacterianas seleccionadas para visualizar la interacción fueron ATCC® 27853™, la cepa clínica Pa06r con resistencia a los CARB y *S. maltophilia*.

Una colonia aislada de cada cepa bacteriana fue inoculada en tubos cónicos previamente preparados con 15 mL de caldo de Mueller-Hinton (MHB, Becton, Dickinson, USA) e incubada a 37 °C durante 16 h, bajo agitación constante, para impedir la formación de biopelículas. Los cultivos líquidos de cada cepa fueron centrifugados a 1,301 x g durante 10 min; los botones bacterianos fueron tratados con 500 μL de etanol 80 % durante 5 min, seguidos de dos lavados con 1 mL de PBS 0.1X.

Cada botón bacteriano fue tratado con 10 μL de acoplado ajustado a valores de absorbancia de 0.1 ± 0.02 a OD_{402} durante 18 h de acuerdo con lo descrito en los ensayos de interacción del apartado anterior. Posteriormente, los botones celulares fueron lavados en 2 ocasiones con 1 mL de PBS 0.1X, para separar los acoplados que no reconocieron a las cepas bacterianas, se centrifugaron a 1,301 x g durante 10 min y se resuspendieron en 100 μL de PBS 0.1x.

Los botones bacterianos tratados con los acoplados fueron colocados en microtubos de 1.5 mL depositados en una gradilla de poliestireno, que se introdujo en un contenedor de espuma aislante. De esta manera, las muestras fueron trasladadas al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y entregadas a la Dra. Ana María Fernández-Presas, quien en colaboración con el Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dra. Reyna Lara-Martínez, del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM, llevaron a cabo el proceso de fijación y visualización por microscopía electrónica de transmisión de las muestras, conforme al método descrito por Campo-Beleño C. y cols (2022) (103).

Las bacterias fueron resuspendidas en cacodilato de sodio 0.15 M, que actúa como tampón isotónico para mantener la presión osmótica y evitar la deformación bacteriana. Después se fijaron con solución Karnovsky durante 1 hora a temperatura ambiente para estabilizar proteínas y prevenir la autólisis. A continuación, fueron transferidas a cacodilato 0.1 M con tetróxido de osmio al 1% para fijar lípidos y aumentar el contraste de las membranas. Las muestras se deshidrataron con etanol, se aclararon con óxido de propileno y finalmente se

incluyeron en resina epóxica Poly/Bed 812 con DMP-30. Las secciones ultrafinas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio TEM Jeol JEM 1200 EXII) (103)

Análisis estadístico

Se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Los datos se analizaron con SPSS versión 32.0 (IBM Corp.). Para comparaciones entre las seis cepas individuales se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn con corrección de Bonferroni. Para comparaciones entre grupos *P. aeruginosa* vs. *no-P. aeruginosa* se empleó la prueba t de Student para muestras independientes cuando se cumplieron los supuestos paramétricos, o la U de Mann-Whitney en caso contrario. El nivel de significancia se estableció en $p < .05$.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante este servicio social se hizo un uso constante de la autoclave para la preparación de medios de cultivo, tanto líquidos como agares, así como para la esterilización de diversos materiales de laboratorio, incluidos puntas para micropipetas, microtubos, tubos cónicos y cristalería, entre otros.

En adición, se trabajó con cepas bacterianas de diferentes especies, no solo las que se describen en este documento, lo que es parte del entrenamiento microbiológico habitual para los alumnos de pre y posgrado que se integran al LBE-INP.

Se trabajó con cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de niños con CF atendidos en el Departamento de Neumología y Cirugía de Tórax del INP (DNCT-INP); algunas de ellas mostraron características de multirresistencia (*MDR*) y extenso-resistencia antimicrobiana (*XDR*).

Las técnicas microbiológicas aplicadas incluyeron la reactivación bacteriana de cepas preservadas en el cepario bacteriológico del LBE-INP, inoculación en caldos nutritivos, estriado en agares selectivos y no-selectivos, obtención de colonias únicas, seguido de la aplicación de pruebas bioquímicas elementales para la confirmación de la especie bacteriana. Además, se trabajó con ácidos nucleicos, tanto con iniciadores (empleados comúnmente para la PCR), como con el aptámero F23.

Se recibió entrenamiento en el uso y manipulación de las *AgNPs*, además de participar activamente en la inmovilización de ácidos nucleicos sobre la superficie de *AgNPs*.

Fue posible formar acoplados entre las *AgNPs* y las diferentes variantes tioladas del aptámero F23.

Se aplicaron diferentes técnicas para inferir la formación de acoplados, tales como la electroforesis en geles de agarosa y la espectrofotometría UV-vis (desde equipos que

funcionan con celdas, con placas de micropozos e incluso los que funcionan mediante gotas como el Nanodrop®), todo ello previo al traslado de las muestras para su visualización por microscopía electrónica.

Cabe recalcar que la preparación de las muestras procedentes de los ensayos de interacción fue un proceso complicado, debido a la carencia de protocolos descritos para la visualización de acoplados entre *AgNPs* y aptámeros sobre la superficie de células bacterianas, donde los primeros ensayos exhibieron bacterias extremadamente lisadas (ensayos de 18 h), por lo que se hicieron los ajustes metodológicos pertinentes para visualizar una integridad aceptable en las células bacterianas.

Además, en el transcurso de este trabajo, la variante tiolada del aptámero en C2, dejó de estar disponible en territorio mexicano, por lo que se buscaron alternativas internacionales, que evidentemente contaban con tiempos de entrega más prolongados, además de enfrentarnos con cuestiones arancelarias de las naciones vecinas que incrementaron los costos drásticamente.

A lo anterior se suma las fallas y/o la no disponibilidad de algunos de los equipos imprescindibles para el progreso de este trabajo, tales como la descompostura de los espectrofotómetros UV/vis, inicialmente el basado en microplacas y que nos obligó a buscar otros equipos en la institución, y posteriormente el basado en celdas, el cual fue reparado 2 meses después; esto aunado a la larga lista de espera para poder utilizar el microscopio electrónico de la UNAM; todo ello repercutió en un tiempo prolongado y no contemplado para finalizar este trabajo.

METAS ALCANZADAS

Las metas propuestas para este servicio social fueron logradas, aun cuando se presentaron dificultades como las señaladas en el párrafo anterior.

Se adquirieron conocimientos relacionados con el desorden genético de la *CF*, así como del patógeno oportunista *P. aeruginosa*, tales como su identificación bioquímica y su implicación en el problema de salud global de la *AMR*, que en unos años podría ser una de las principales causas de muerte, mostrando la importancia de realizar investigación para desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas contra diferentes patógenos bacterianos que permitan combatir esta problemática.

Otro aspecto importante fue la realización de acoplamientos exitosos entre aptámeros y *AgNPs*, que podrían ser útiles para el desarrollo de nanomateriales con actividad específica y que han sido de interés particular en la investigación contra el cáncer, pero también podrían ser dirigidos a otros problemas de salud, como las enfermedades infecciosas.

RESULTADOS

Preparación de las muestras biológicas

Todas las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio fueron reactivadas y procesadas según lo descrito en la sección metodológica. Las características morfológicas de las colonias aisladas se visualizan en la figura 1 y se describen en la tabla 2.

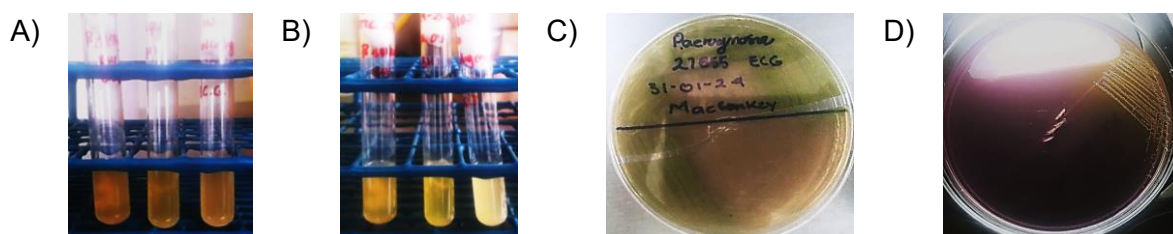


Figura 1. Cultivo de cepas de *P. aeruginosa* y no-*P. aeruginosa*. A) Caldos de cultivo inoculados con *P. aeruginosa* ATCC® 27853™, ATCC® 27855™ y ATCC® 15692™; B) Caldos de cultivo inoculados con *P. alcaligenes*, *B. cepacia* y *S. maltophilia* en caldo BHI; C) Placa de AMC con crecimiento de *P. aeruginosa*; D) Placa de AMD con crecimiento de no-*P. aeruginosa*.

Tabla 2. Características morfológicas de *P. aeruginosa* y No-*P. aeruginosa* utilizadas en el estudio

Grupo	Cepa	Características morfológicas
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Colonias planas, con forma y margen irregular. de tonalidad verdosa y consistencia mucosa
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27855	Colonias planas, con forma y margen irregular de tonalidad azul-grisácea y consistencia mucosa
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	Colonias planas, con forma regular y tonalidad transparente
No- <i>P. aeruginosa</i>	<i>P. alcaligenes</i>	Colonias planas, con forma y margen regular y tonalidad grisácea clara
	<i>B. cepacia</i>	Colonias con forma y margen regular, elevación convexa y tonalidad rosada
	<i>S. maltophilia</i>	Colonias con forma y margen regular, elevación convexa y tonalidad amarilla-transparente

Pie de tabla: Características morfológicas de las cepas de *P. aeruginosa* y cepas no *P. aeruginosa* utilizadas en el estudio. Se describen la forma, margen de elevación, tonalidad y consistencia de colonias crecidas en agar MacConkey tras 24 h de incubación a 37 °C. Se observaron diferencias en la forma del margen, la elevación y la consistencia entre las cepas.

El aspecto no fermentador de glucosa/lactosa se identificó en todas las cepas estudiadas, concordando con las especies bacterianas seleccionadas (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *B.*

cepacia y *S. maltophilia*, que son filogenéticamente cercanas entre sí), lo que se visualizó por la ausencia de acidificación del medio de Kligler (Figura 2A).

En cuanto a la descarboxilación de aminoácidos, solo las cepas de *P. aeruginosa* descarboxilaron la arginina, lo cual se observó como un cambio de coloración del medio, que pasó de marrón claro a morado debido a su acidificación (Figura 2B).

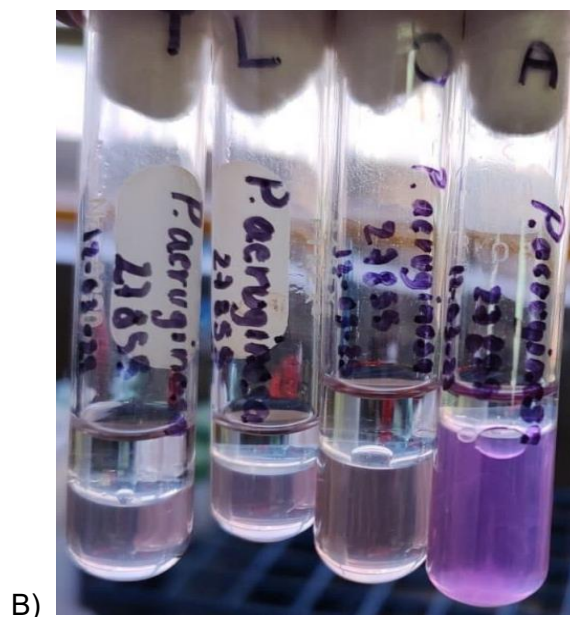


Figura 2. Comportamiento bioquímico de cepas de *P. aeruginosa* y *no-P. aeruginosa*; (A) Medio de Kligler inoculado con cada cepa bacteriana y que demuestra la no fermentación de glucosa/lactosa; (B) Ensayo de descarboxilación de aminoácidos (testigo, lisina, ornitina y arginina) de *P. aeruginosa* que muestra la descarboxilación de arginina (color morado intenso).

Obtención de nanopartículas de plata conjugadas con F23

El proceso de acoplamiento de las *AgNPs* con las tres variantes tioladas del aptámero F23 (F23-C6-Tiol; Tiol-C6-F23 y F23-C2-Tiol) permitió la formación de los acoplados F23-C6-*AgNPs*, *AgNPs*-C6-F23 y F23-C2-*AgNPs*, incluso, el procedimiento metodológico desarrollado por Gutiérrez-Santana JC (2023) fue mejorado a grado tal, de obtener acoplados entre el iniciador OPY-2 y las *AgNPs* (OPY-2-*AgNPs*), lo que se infiere por el incremento de migración electroforética entre cada acoplado respecto a las *AgNPs* sin acoplar (Figura 3); así como por un desplazamiento de 2 nm para OPY-2-*AgNPs*, de 5 nm para F23-C2-*AgNPs*, y de 7 nm para las *AgNPs* acopladas con aptámeros tiolados en C6 (F23-C6-*AgNPs* y *AgNPs*-C6-F23) (Figura 4).

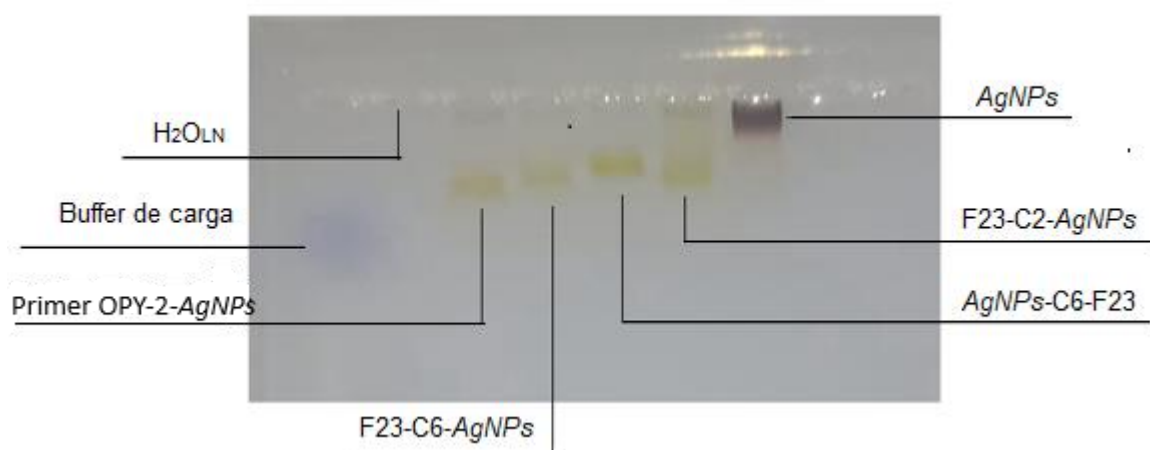
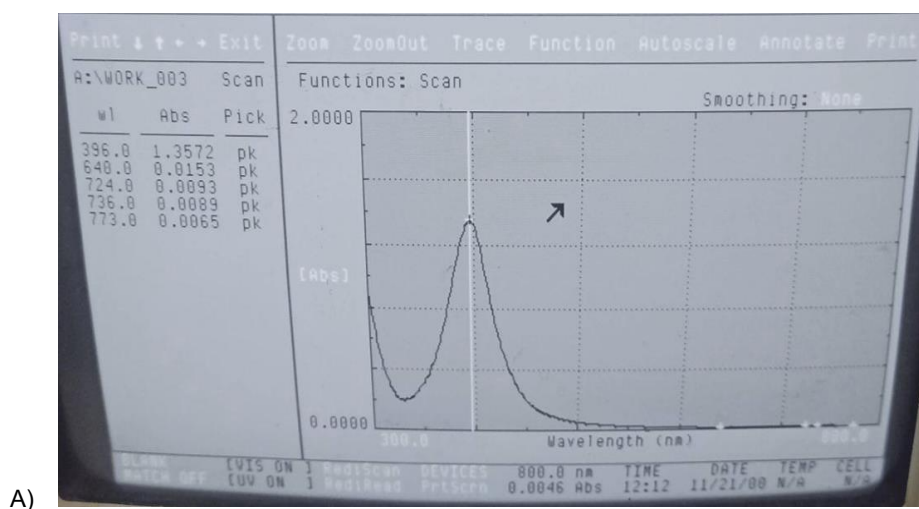


Figura 3. Lecturas espectrofotométricas de los acoplamientos entre *AgNPs* y aptámeros. A) *AgNPs* sin acoplar; B) Primer OPY-2-*AgNPs*; C) F23-C6-*AgNPs*; D) *AgNPs*-C6-F23; E) F23-C2-*AgNPs*



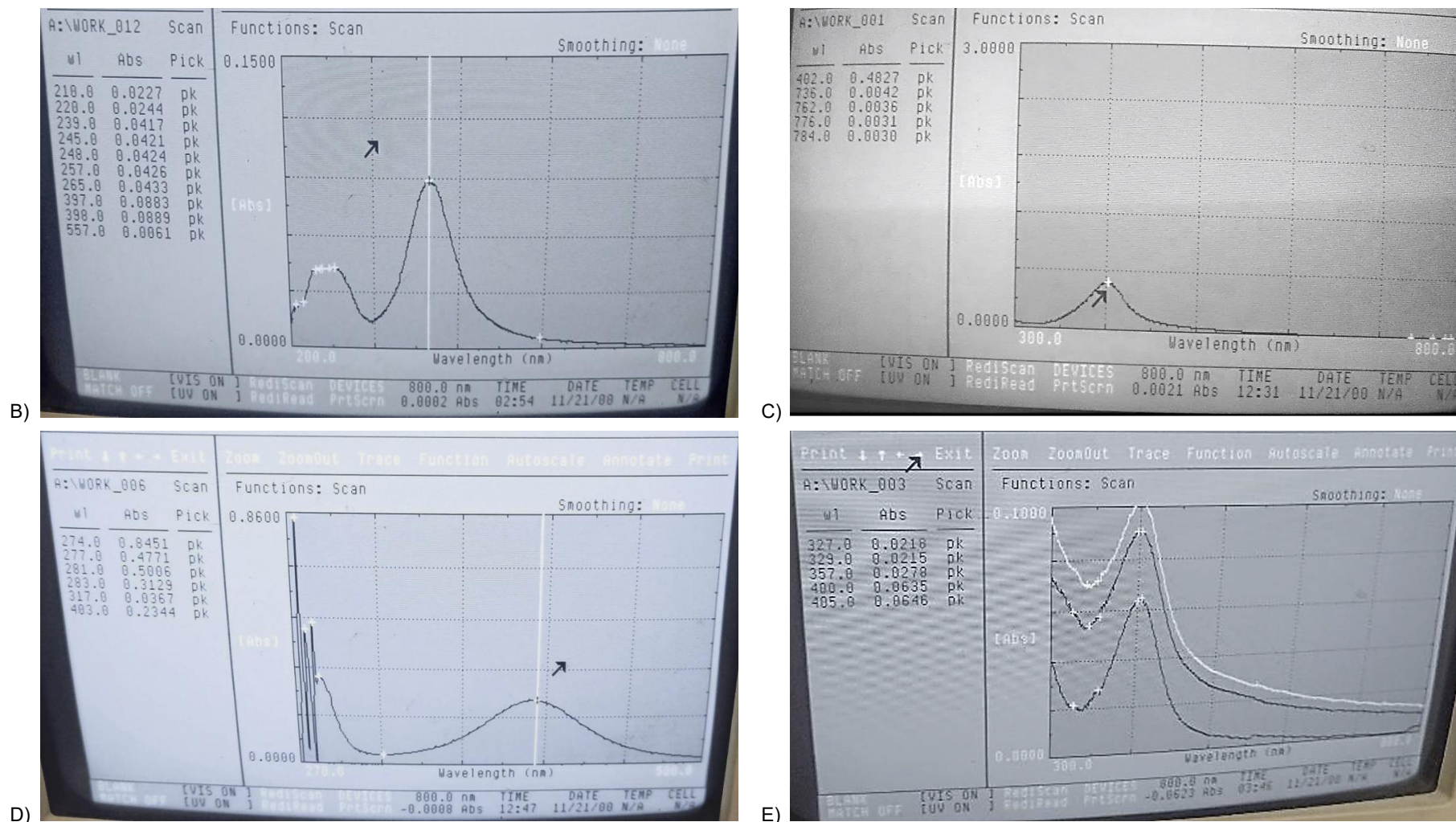


Figura 4. Picos máximos de absorción de los acoplados entre *AgNPs* con aptámeros. A) *AgNPs* sin acoplar; B) Primer OPY-2-*AgNPs*; C) F23-C6-*AgNPs*; D) *AgNPs*-C6-F23; E) F23-C2-*AgNPs*. En el presente estudio, las lecturas espectrofotométricas arrojaron picos máximos de absorción a una OD_(402, 403 y 405) para los conjugados F23-C6-*AgNPs*, *AgNPs*-C6-F23 y 2 F23- C2-*AgNPs* respectivamente.

Lo anterior converge con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación que han acoplado nanomateriales a biomoléculas. Por ejemplo, Manisheeta y cols. (2025), acoplaron aptámeros a *NPs* biodegradables marcadas con clorfenamina y observaron una migración electroforética mayor en los acoplados en comparación con las *NPs* sin acoplar (104).

De manera similar, en este estudio se identificaron variaciones nanométricas en los picos máximos de absorción de los acoplados ($OD_{402-405}$) respecto a las *AgNPs* sin acoplar (OD_{396}), resultando en un desplazamiento del pico máximo de absorción respecto a las *NPs* no acopladas. Este comportamiento es similar a lo reportado por Min Yoo y cols. (2015), quienes realizaron acoplamientos entre aptámeros de DNA y *QDs* de CdSe/ZnS y la posterior unión con cepas bacterianas, resultando en un desplazamiento de 20 nm del pico máximo de absorción (OD_{440}) respecto a los *QDs* no acoplados (105).

Interacción de los conjugados con *Pseudomonas aeruginosa*

Evaluación de la especificidad de los conjugados

Respecto a los ensayos de interacción de 18 h entre los acoplados y las bacterias sin tratamiento con etanol, los resultados de las absorbancias se resumen en la tabla 3 (los datos completos se describen en la sección “Anexos”), donde no se distinguieron diferencias entre las absorbancias identificadas en cada cepa de *P. aeruginosa* y las cepas no-*P. aeruginosa*.

Tabla 3. Parámetros descriptivos de la interacción de los conjugados con bacterias activas

Acoplado	Cepa	Sobrenadante 1			Sobrenadante 2		
		Mediana	Media	Desviación estándar	Mediana	Media	Desviación estándar
AgNPs-C6-F23	ATCC® 27853™	0.0649	0.0626	0.0040	0.0729	0.0696	0.0058
	ATCC® 27855™	0.0609	0.0596	0.0023	0.0769	0.0746	0.0049
	ATCC® 15692™	0.0609	0.0612	0.0006	0.0709	0.0689	0.0035
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0649	0.0629	0.0035	0.0739	0.0726	0.0032
	<i>B. cepacia</i>	0.0609	0.0596	0.0023	0.0749	0.0722	0.0046
	<i>S. maltophilia</i>	0.0589	0.0576	0.0023	0.0729	0.0706	0.0040
F23-C6-AgNPs	ATCC® 27853™	0.0690	0.0683	0.0012	0.0560	0.0567	0.0012
	ATCC® 27855™	0.0700	0.0697	0.0015	0.0650	0.0640	0.0017
	ATCC® 15692™	0.0690	0.0677	0.0023	0.0640	0.0640	0.0000
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0700	0.0713	0.0023	0.0650	0.0640	0.0017
	<i>B. cepacia</i>	0.0680	0.0690	0.0017	0.0640	0.0637	0.0006
	<i>S. maltophilia</i>	0.0680	0.0700	0.0035	0.0660	0.0647	0.0023
F23-C2-AgNPs	ATCC® 27853™	0.0052	0.0053	0.0005	0.0166	0.0161	0.0008
	ATCC® 27855™	0.0056	0.0051	0.0008	0.0216	0.0215	0.0002
	ATCC® 15692™	0.0032	0.0029	0.0006	0.0196	0.0198	0.0004
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0116	0.0107	0.0015	0.0166	0.0162	0.0006
	<i>B. cepacia</i>	0.0082	0.0085	0.0004	0.0089	0.0090	0.0002
	<i>S. maltophilia</i>	0.0016	0.0016	0.0003	0.0232	0.0238	0.0013

En paralelo, los resultados de los ensayos de 18 h con cepas inactivadas se resumen en la tabla 4, donde el único conjunto de datos que mostró diferencias significativas correspondió al sobrenadante 2 de los ensayos con cepas inactivadas, donde las cepas de *P. aeruginosa*

mostraron mayores absorbancias que las cepas no-*P. aeruginosa* ($p \leq 0.001$), como se puede observar en la figura 5.

Tabla 4. Parámetros descriptivos de la interacción de los conjugados con bacterias inactivas

Acoplado	Cepa	Sobrenadante 1			Sobrenadante 2		
		Mediana	Media	Desviación estándar	Mediana	Media	Desviación estándar
AgNPs-C6-F23	ATCC® 27853™	0.0580	0.0573	0.0012	0.0640	0.0643	0.0006
	ATCC® 27855™	0.0580	0.0617	0.0064	0.0680	0.0640	0.0069
	ATCC® 15692™	0.0610	0.0590	0.0035	0.0680	0.0693	0.0023
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0680	0.0643	0.0072	0.0740	0.0743	0.0006
	<i>B. cepacia</i>	0.0580	0.0570	0.0026	0.0720	0.0703	0.0047
	<i>S. maltophilia</i>	0.0600	0.0593	0.0021	0.0720	0.0710	0.0017
F23-C6-AgNPs	ATCC® 27853™	0.0620	0.0800	0.0312	0.0670	0.0653	0.0029
	ATCC® 27855™	0.0680	0.0683	0.0006	0.0650	0.0643	0.0012
	ATCC® 15692™	0.0680	0.0700	0.0035	0.0650	0.0643	0.0012
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0750	0.0740	0.0017	0.0660	0.0650	0.0017
	<i>B. cepacia</i>	0.0680	0.0683	0.0006	0.0650	0.0640	0.0017
	<i>S. maltophilia</i>	0.0710	0.0713	0.0006	0.0660	0.0647	0.0023
F23-C2-AgNPs	ATCC® 27853™	0.0087	0.0086	0.0022	0.0420	0.0437	0.0032
	ATCC® 27855™	0.0047	0.0044	0.0010	0.0423	0.0422	0.0022
	ATCC® 15692™	0.0070	0.0070	0.0007	0.0433	0.0436	0.0007
	<i>P. alcaligenes</i>	0.0140	0.0140	0.0003	0.0120	0.0122	0.0010
	<i>B. cepacia</i>	0.0113	0.0116	0.0004	0.0063	0.0064	0.0005
	<i>S. maltophilia</i>	0.0073	0.0076	0.0004	0.0080	0.0079	0.0012

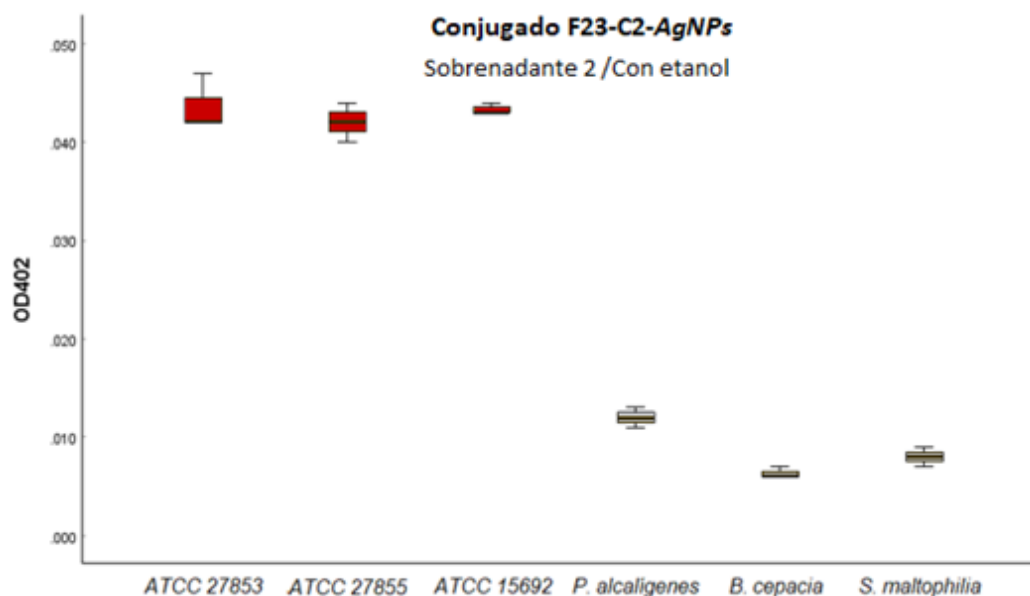


Figura 5. Diagrama de caja de las absorbancias detectadas en las cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853, ATCC 27855, ATCC 15692) y las cepas no-*P. aeruginosa* (*P. alcaligenes*, *B. cepacia* y *S. maltophilia*).

La agrupación de los datos por especie bacteriana (*P. aeruginosa* y no-*P. aeruginosa*) se ilustra en la figura 6 (F23-C2-AgNPs), figura 7 (F23-C6-AgNPs) y en la figura 8 (AgNPs-C6-F23).

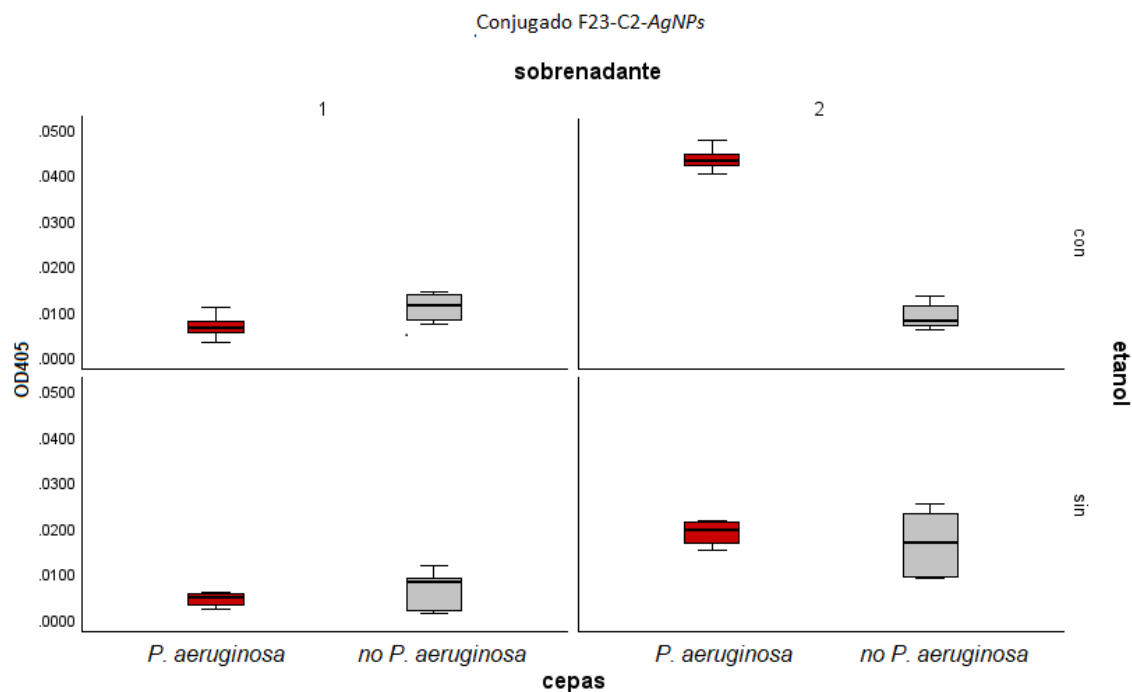


Figura 6. Diagramas de caja de la absorbancia detectada en las cepas tratadas con etanol (gráficos de la parte superior) y las cepas en su forma no inactivada (gráficos de la parte inferior), donde la separación grupal entre las especies (*P. aeruginosa* y no-*P. aeruginosa*) es evidente en el sobrenadante 2 de los ensayos con etanol (gráfico de la parte superior derecha).

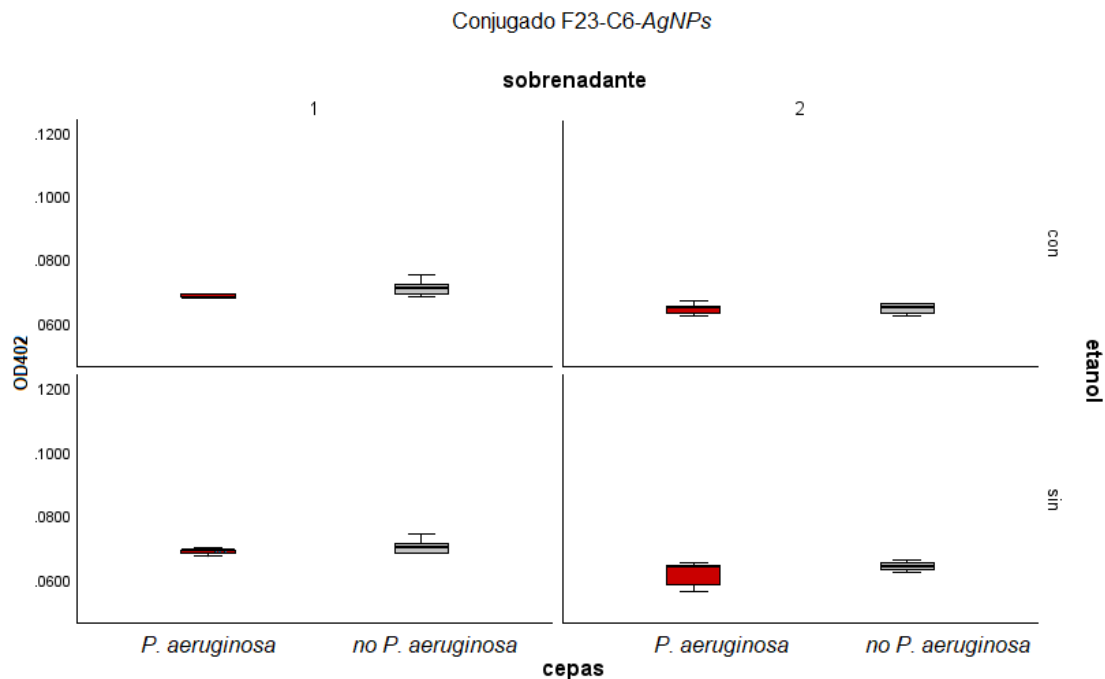


Figura 7.- Diagramas de caja de la absorbancia de las cepas tratadas con etanol (gráficos de la parte superior) y las cepas en su forma no inactivada (gráficos de la parte inferior), donde la separación grupal entre especies (*P. aeruginosa* y no *P. aeruginosa*) no fue evidente en ninguno de los casos evaluados.

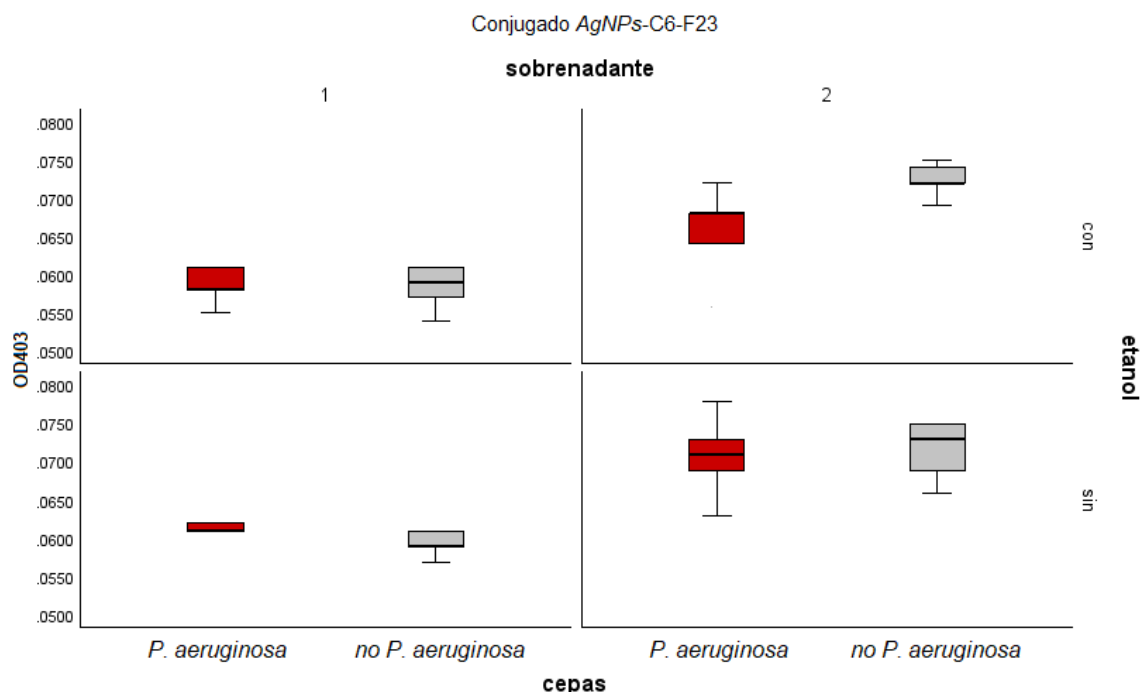


Figura 8.- Diagramas de caja de las absorbancias de las cepas tratadas con etanol (gráficos de la parte superior) y las cepas en su forma no inactivada (gráficos de la parte inferior) donde la separación grupal entre especies (*P. aeruginosa* y no *P. aeruginosa*) fue evidente en el sobrenadante 2 de los ensayos con etanol de manera inversa a lo planteado.

Por lo anterior, se ha inferido que la inactivación con etanol es un paso crítico para el reconocimiento de *P. aeruginosa* por F23-C2-AgNPs, mientras que las variantes F23-C6-AgNPs y AgNPs-C6-F23 parecen no ser funcionales para reconocer a *P. aeruginosa*.

Visualización de los complejos F23-C2-AgNPs-*Pseudomonas aeruginosa*

Una vez determinado que F23-C2-AgNPs fue el acoplado con el mejor reconocimiento por *P. aeruginosa*, se pretendió visualizar los acoplados sobre la membrana de dicha especie bacteriana, utilizando los siguientes microorganismos para tal fin: ATCC® 27853™, la cepa clínica Pa06r con resistencia a los CARB, y *S. maltophilia*.

La visualización de F23-C2-AgNPs no fue conseguida, sin embargo, se identificó un daño ultraestructural importante en ambas cepas de *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™ y Pa06r) y un efecto nulo en *S. maltophilia*.

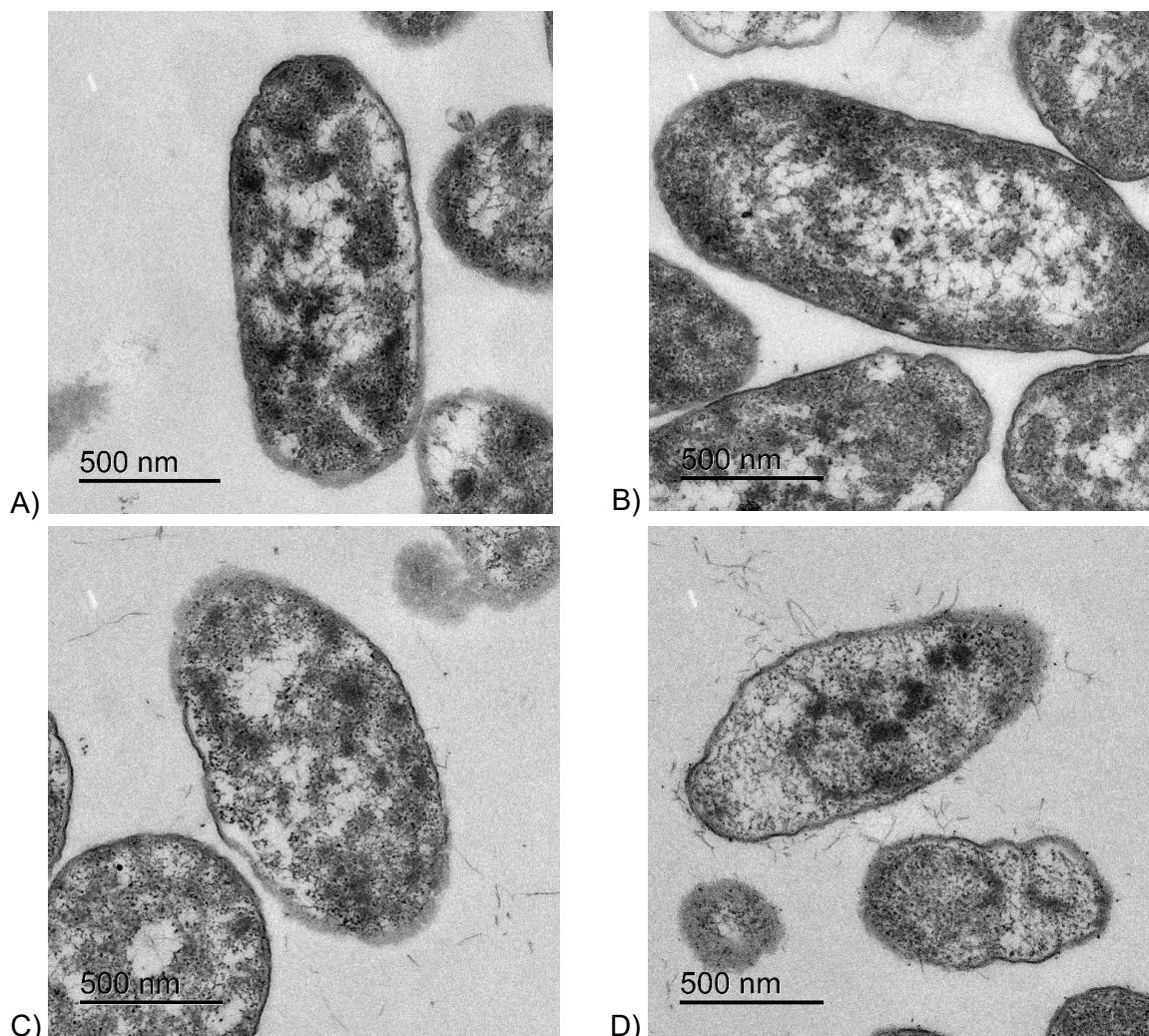


Figura 11.- Micrografías electrónicas de transmisión de cepas bacterianas inactivadas con etanol al 80% y expuestas al conjugado F23-C2-AgNPs. A) *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ inactivada con etanol 80% sin conjugado como control negativo; B-D) Cepas inactivadas con etanol 80% y tratadas con el conjugado F23-C2-AgNPs durante 18 h; B) *S. maltophilia*, sin evidencia de unión del conjugado; C) cepa clínica de *P. aeruginosa* con daño en la pared celular D) *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ con lisis celular.

CONCLUSIONES:

En el presente trabajo se logró desarrollar complejos constituidos por nanopartículas de plata conjugadas con el aptámero F23, con el objetivo de visualizar su interacción con *Pseudomonas aeruginosa* mediante microscopía electrónica. Los resultados demuestran solo el conjugado F23-C2-AgNPs es capaz de reconocer selectivamente a *P. aeruginosa* y que la inactivación con etanol es un paso crítico para el reconocimiento. Si bien no se logró visualizar directamente el complejo F23-C2-AgNPs, se identificó un daño ultraestructural importante en ambas cepas de *P. aeruginosa* evaluadas (ATCC® 27853™ y Pa06r) y un efecto nulo sobre *Stenotrophomonas maltophilia*, lo que sugiere selectividad. Lo anterior indica que este conjugado es factible para el desarrollo de nanomateriales con actividad antimicrobiana selectiva contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (CARB), un enfoque aún poco

explorado en el área de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, este trabajo aporta evidencia sobre la factibilidad de los sistemas nanométricos como una nueva alternativa con potencial terapéutico frente a patógenos multirresistentes.

RECOMENDACIONES

Ajustar los ensayos de interacción a tiempos de incubación menores con los acoplados (30 min), ya que, de acuerdo con lo observado en las micrografías electrónicas, un tiempo de 18 h da lugar a bacterias lisadas, lo que pudo repercutir en las absorbancias identificadas en dicha sección metodológica.

Es importante evaluar otras configuraciones tioladas para seleccionar la variante de F23 acoplada a *AgNPs* más eficiente para reconocer selectivamente a *P. aeruginosa*.

Evaluar cada variante de acoplados sobre cepas bacterianas no-inactivadas para distinguir la configuración más eficiente para reconocer a *P. aeruginosa*.

Analizar el reconocimiento del mejor acoplado en un mayor número de cepas clínicas, especialmente en cepas con *AMR* alta.

Determinar la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los acoplados y contrastarlas con las de las *AgNPs* y de antibióticos convencionales.

REFERENCIAS

1. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogénesis, factores de virulencia, resistencia a los antibióticos, interacción con el huésped, avances tecnológicos y terapias emergentes. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022 Junio 25; 7(199).
2. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. [Online].; 2020 [cited 2024 Mayo 7]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
3. Salud, Organización Mundial de la. Resistencia a los antimicrobianos: acelerar las respuestas nacionales y mundiales. ; 2023.
4. Camacho Silvas LA. La resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de Salud Pública*. 2023 Febrero 20;(97): p. e202302013.
5. Organización Panamericana de la Salud. PAHO. [Online].; 2021 [cited 2024 Mayo 08]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>.
6. Organization, World Health. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. World Health Organization; 2024.
7. Vanegas JM. Principales características de la bacteria genética de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia. *Hechos Microbiológicos*. 2014 Noviembre; 4(2): p. 98-105.
8. Hernández A, Yague G, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, Canteras M, et al. Infecciones nosocomiales causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

- multirresistente (incluidos los carbapenémicos): factores predictivos y pronósticos. Un estudio prospectivo (2016-2017). Revista Española de Quimioterapia. 2018 Julio 12; 31(2): p. 123-130.
9. Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Microbiología Médica. 27th ed.: Mc Graw Hill Education; 2016.
 10. Díaz Santos E, Mora Jiménez C, del Río Carbajo L, Vidal-Cortés P. Tratamiento de las infecciones graves por Pseudomonas aeruginosa multirresistente. medicina intensiva. 2022 Septiembre 09; 46(9): p. 508-520.
 11. García Clemente M, de la Rosa D, Maíz L, Girón R, Blanco M, Oliveira C, et al. Impacto de la infección por Pseudomonas aeruginosa en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias. Journal of Clinical Medicine. 2020 Noviembre 24; 9(12): p. 3800.
 12. Huemer M, Shambat SM, Brugger SD, Zinkernagel AS. Resistencia y persistencia de los antibióticos: implicaciones para la salud humana y perspectivas de tratamiento. EMBO reports. 2020 Diciembre 08; 21(EMBR202051034).
 13. Cambridge University Hospitals. [Online].; 2024 [cited 2025 Agosto 25. Available from: <https://www.cuh.nhs.uk/patient-information/cystic-fibrosis-management-of-respiratory-infections/>.
 14. Milczewska J, Syunyaeva Z, Zabinska Jaron A, Sands D, Thee S. Perfil cambiante de la infección bacteriana y el microbioma en la fibrosis quística: cuándo utilizar antibióticos en la era de la terapia moduladora de CFR. Revista Respiratoria Europea. 2024; 33(174): p. 240068.
 15. Sawicki G. MSD Manuals. [Online].; 2025 [cited 2025 Agosto 19. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/salud-infantil/fibrosis-qu%C3%ADstica/fibrosis-qu%C3%ADstica>.
 16. FOUNDATION CF. ; 2022.
 17. Shaffer, C. News Medical Life Sciences. [Online].; 2022 [cited 2026 Marzo 08. Available from: <https://www.news-medical.net/health/Cystic-Fibrosis-Evolution.aspx#:~:text=The%20most%20common%20mutation%20leading,rate%20of%20cystic%20fibrosis%20today>.
 18. Santillán ML. Ciencia UNAM. [Online].; 2020 [cited 2026 March 8. Available from: <https://ciencia.unam.mx/leer/962/en-el-dia-mundial-de-las-enfermedades-raras-fibrosis-quistica>.
 19. Díaz Cáceres L, Girón Moreno RM, Caballero Sánchez Robles P. Fibrosis química: calidad de vida y estudio radiológico. Archivos de Bronconeumología. 2021 Septiembre; 57(9).
 20. National Human Genome Research Institute (NHGRI). [Online].; 2017 [cited 2024 Marzo 24. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fibrosis-quistica>.
 21. López Valdez JA, Aguilar Alonso LA, Gándara Quezada V, Ruiz Rico GE, Ávila Soledad JM, Reyes AA, et al. Fibrosis quística: conceptos actuales. Hospital Infantil Bol Me Mex. 2021; 78(6): p. 584-596.

22. Malhotra S, Hayes Jr. D, Wozniak DJ. Fibrosis quística y Pseudomonas aeruginosa : la interfaz huésped-microbio. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Clinical Microbiology Reviews. 2019 Mayo 29; 32(3).
23. Scientis Cindy. Cystic Fibrosis for Anatomy and Physiology. 2022 Enero 29..
24. GARD Genetic and Rare Diseases Information Center. Genetic and Rare Diseases Information Center. [Online].; 2017 [cited 2024 Mayo 09. Available from: <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/12467/fibrosis-quistica>.
25. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagenses JA, Sommer LM, et al. Adaptación y evolución de Pseudomonas aeruginosa en pacientes con fibrosis quística. nature reviews microbiology. 2020 Noviembre 19; 19: p. 331-342.
26. Divjak M. YouTube. [Online].; 2022 [cited 2024 Mayo 07. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=Ihx19-56Kzc>.
27. Jurado Martín I, Sainz Mejías M, McClean S. Pseudomonas aeruginosa : un patógeno audaz con un arsenal adaptable de factores de virulencia. Revista Internacional de Ciencias Moleculares. 2021; 22(6): p. 3128.
28. Hernández A, Yague G, García Vázquez E, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, et al. Infecciones nosocomiales causadas por Pseudomonas aeruginosa multirresistente (incluidos los carbapenémicos): factores predictivos y pronósticos. Un estudio prospectivo (2016-2017). Revista Española de Quimioterapia. 2018 Julio 12; 31(2): p. 123-130.
29. Durda-Masny M, Gozdzik- Spychalska J, John A, Czainski W, Strozewska W, Pawlowska N, et al. Los determinantes de la supervivencia en adultos con fibrosis quística: un estudio de cohorte. Journal of Physiological Anthropology. 2021 Noviembre 18; 40(19).
30. Jarzynka S, Makarewicz O, Weiss D, Zochniak AM, Iwanska A, Skorupa W, et al. El impacto de la infección por Pseudomonas aeruginosa en pacientes adultos con fibrosis quística: un estudio en un solo centro polaco. pathogens. 2023 Diciembre 12; 12(12): p. 1440.
31. Avakh A, Grant GD, Cheesman MJ, de Tejaswini K, Hall S. El arte de la guerra contra Pseudomonas aeruginosa: Apuntar directamente a las bombas de eflujo de Mex para mejorar estratégicamente la eficacia de los fármacos antipseudomónicos. Antibióticos. 2023 Agosto 9; 12(8): p. 1304.
32. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, et al. Resistencia antimicrobiana de Pseudomonas aeruginosa: análisis de los impactos clínicos, las tendencias actuales e resistencia y las innovaciones en terapias innovadoras. Fronteras en microbiología. 2024 Abril 04; 15.
33. Hu M, Lin Chua S. Pseudomonas aeruginosa resistente a los antibióticos: desafíos actuales y terapias alternativas emergentes. Microorganismos. 2025 Abril 16; 13(4): p. 913.
34. Billón MF, Llambías Cabot AE, Jordana Lluch E, Oliver A, Macia MD. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en biopelículas de Pseudomonas aeruginosa. Biofilm. 2023 Mayo 2; 5: p. 100129.
35. Meletis G, Karastergiou E. Mecanismos de resistencia y estrategias terapéuticas para las infecciones por Pseudomonas aeruginosa. Therapeutic Advances in Infectious Disease. 2025 Octubre 29; 12.

36. Pang Z, Raudonis R, R. Glick B, Jun Lin T, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019 Enero-Febrero; 37(1): p. 177-192.
37. Buchanan PJ, JG. British Society for Immunology. [Online].; 2015 [cited 2025 Septiembre 19]. Available from: <https://www.immunology.org/es/public-information/inmunolog%C3%ADa-bitesized/pathogens-disease/infeccion-microbiana-e-implicacion-en>.
38. Da Silva Correia A, Luna Correia N, Navarro Sancho P, Carnicer Isla B, Blasci Ranz EM, Pinos Serrano P. Toma de muestra microbiológicas: Errores frecuentes y prevención. *Ocronos*. 2026 Enero; 9(1): p. 132.
39. Bursle E, Robson J. Métodos sin cultivo para detectar infecciones. *Australian Prescriber*. 2016 Octubre 1; 39(5): p. 171-175.
40. Macia MD, del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018 Junio-Julio; 36(6): p. 375-381.
41. Bassetti D, Bassetti M, Mantero E. Estrategias para selección de antibióticos en la terapia empírica. *Microbiología clínica e infecciones*. 2015 Diciembre 28; 6(3): p. 98-100.
42. Cantón R, Máiz L, Escribano A, Oliveira C, Oliver A, Asensio O, et al. Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección bronquial por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Archivos de bronconeumología*. 2015 Marzo; 51(3): p. e13-e18.
43. Reynolds D, Kollef M. Epidemiología, patogénesis y tratamiento de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*: una actualización. *Drugs*. 2021 Noviembre 7; 81: p. 2117-2131.
44. Alqasbi M. Therapeutic Interventions for *Pseudomonas* Infections in Cystic Patients: A Review of Phase IV Trial. *Journal of Clinical Medicine*. 2024 Octubre 30; 13(21): p. 6530.
45. Chatterjee M, Anju C, Biswas L, Kumar VA, Gopi C, Biswas R. Resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa* y opciones terapéuticas alternativas. *Revista Internacional de Microbiología Médica*. 2016 Enero; 306(1): p. 48-58.
46. Peña Ramírez DS, Medrano Santos E, Taño Tamayo D, Rivas Vega CL. Aspectos microbiológicos de las infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística en el Hospital Pediátrico de Holguín, octubre-2021-junio 2022. 2023 Abril 12..
47. Zamudio R, Hijazi K, Joshi C, Aitken E, R Oggioni M, M Gould I. Phylogenetic analysis of resistance to ceftazidime/avibactam, ceftolozan/tazobactam and carbapenems in piperacillin/tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019 Marzo 02; 53(6): p. 774- 780.
48. Fernandez Fernández R, Badillo Carrasco A, Chueca Porcuna N, Martínez Cabezas A, Colmenero Ruiz M. Resistencia a cefiderocol en *Pseudomonas aeruginosa* ST175: Informe de un caso con análisis genómico. *Antibióticos*. 2025 Noviembre 17; 14(11): p. 1162.
49. Teran N, L. Egge S, Phe K, P. Baptista R, H. Tam V, R. Miller W. La aparición de resistencia al cefiderocol en *Pseudomonas aeruginosa* a partir de un aislado

- heteroresistente durante una terapia prolongada. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2022 Diciembre 8; 68(1).
50. Aguilar Vela ED, Paraguay Delgado F, Pariona Mendoza N. Nanopartículas de origen natural. [Online].; 2022 [cited 2026 Enero 11. Available from: <https://www.cronica.com.mx/academia/nanoparticulas-origen-natural.html>.
 51. Díaz Acosta EM. Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión. Mundo nano, Revista internacional en nanociencias y nanotecnología. 2020 Junio 15; 12(22).
 52. Gómez Villarraga F. Nanopartículas metálicas y sus aplicaciones. 2016 Julio 22..
 53. Gómez Garzón M. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. Revista Repertorio de Medicina y Cirugía. 2018 Agosto 15; 27(2): p. 75-80.
 54. Rajendra Más P, Pandit S, De Filippis A, Franci G, Mijakovic I, Galdiero M. Nanopartículas de plata: Enfoque bactericida y mecanicista contra patógenos resistentes a los medicamentos. microorganisms. 2023 Febrero 1; 11(2): p. 369.
 55. Liao S, Zhang Y, Pan X, Zhu F, Jiang C, Liu Q, et al. Actividad antibacteriana y mecanismo de acción de las nanopartículas de plata contra Pseudomonas aeruginosa multirresistente. Dovepress Taylor & Francis Group. 2019 Febrero 25; 14: p. 1469-1487.
 56. Mammari N, Lamouroux E, Boudier A, E Duval R. Conocimientos actuales sobre las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas mediadas por el estrés oxidativo. microorganisms. 2022 Febrero 14; 10(2): p. 437.
 57. Bruna T, Maldonado Bravo F, Jara P, Caro N. Nanopartículas de plata y sus aplicaciones antibacterianas. IJMS. 2021 Mayo 21; 22(13): p. 7202.
 58. Korzekwa K, Kedziora A, Stanczykiewicz B, Bugla-Ploskonska G, Wojnicz D. Beneficios del uso de nanopartículas de plata inmovilizadas como factores antibiofilm de Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Diciembre 28; 23(1): p. 284.
 59. de Lacerda Coriolano D, Barbosa de Sousa J, Vicente Bueno E, Ramos dos Santos Medeiros SdF, Lima Cavalcanti ID, Ferro Cavalcanti IM. Potencial antibacteriano y antibiofilm de nanopartículas de plata contra cepas de Pseudomonas aeruginosa sensibles a antibióticos y resistentes a múltiples fármacos. Brazilian Journal of Microbiology. 2020 Noviembre 24; 52(1): p. 267-278.
 60. Tripathi N, Kumar Goshisht M. Avances recientes y conocimientos mecanísticos sobre la actividad antibacteriana, la actividad antibiopelícula y la citotoxicidad de las nanopartículas de plata. ACS publications Applied Bio Materials. 2022 Marzo 31; 5(4): p. 1391-1463.
 61. Xiaoxue Yin I, Zhang J, Shuping Zhao I, Lei Mei M, Li Q, Hung Chu C. Mecanismo antibacteriano de las nanopartículas de plata y su aplicación en odontología. Dovepress Taylor & Francis Group International Journal of Nanomedicine. 2020 Abril 17; 15: p. 2555-2562.
 62. Camargo Merchán LN. Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas empleando el modelo animal de Artemia salina. 2025..
 63. Laib I, Gheraissa N, Benaissa A, Benkhira L, Azzi M, Benaissa Y, et al. Diseño de nanopartículas de plata innovadoras para la medicina moderna: La importancia del

- control del tamaño y la forma, y las modificaciones funcionales. *ELSEVIER Materials Today BIO*. 2025 Julio 9; 33: p. 102071.
64. Fasogbon IV, Nyakundi Ondari E, Tusubira D, Kabuuka T, Babangida I, Makena W, et al. Avances y perspectivas futuras de las nanoparículas funcionalizadas con aptámeros para el diagnóstico de enfermedades en el punto de atención. *Biology Methods & Protocols*. 2025 Junio 5; 10(1): p. bpaf046.
 65. Han J, Gao L, Wang J, Wang J. Aplicación y desarrollo de aptámeros en el cáncer: del diagnóstico clínico a la terapia oncológica. *Journal of Cancer*. 2020; 11(23): p. 6902-6915.
 66. Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Z. Kouzani A, Feng Zhou S, et al. Terapias y diagnósticos oncológicos guiados por aptámeros de ácidos nucleicos: la próxima generación de la medicina oncológica. *Theranostics*. 2015; 5(1): p. 23-42.
 67. Urmi R, Banerjee P, Singh M, Singh R, Chhillar S, Sharma N, et al. Revolucionando la biomedicina: nanomateriales y nanodispositivos basados en aptámeros para aplicaciones terapéuticas. *Informes de Biotecnología*. 2024 Junio; 42: p. e00843.
 68. Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Factores críticos y estrategicos de optimización para una selección exitosa de aptámeros. *Biotechnología y Bioquímica Aplicada*. 2021 Agosto 24; 69(5): p. 1771-1792.
 69. Xu Y, Jiang X, Zhou Y, Ma M, Wang M, Ying B. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Technologies and Aptamer-Based Applications: Recent Progress and Challenges in Precision Medicine of Infectious Diseases. *frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021 Agosto 10; 9: p. 704077.
 70. Sefah K, Shangguan D, Xiong X, B O'Donoghe M, Hong Tan W. Desarrollo de aptámeros de ADN mediante Cell-SELEX. *natureprotocols*. 2010 Junio 3; 5: p. 1169-1185.
 71. Kratschmer C, Levy M. Efecto de las modificaciones químicas sobre la estabilidad de los aptámeros en el suero. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2017 Diciembre 1; 27(6): p. 335-344.
 72. Ospina JD. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2020 Mayo 1; 40(1): p. 148-165.
 73. Zheng X, Gao S, Wu J, Hu X. Recent Advances in Aptamer-Based Biosensors for Detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *frontiers in Microbiology*. 2020 Diciembre 22; 11.
 74. Mahmoudian F, Ahmari A, Shabani S, Sadeghi B, Fahimirad S, Fattahi F. Los aptámeros como enfoque para la terapia dirigida contra el cáncer. *Cancer Cell International*. 2024 Marzo 16; 24(108).
 75. Jaeyeong P, Shin E, Hyun Yeom J, Choi Y, Joo M, Lee M, et al. La administración asistida por aptámeros de ADN y nanopartículas de oro de péptidos antimicrobianos inhibe eficazmente la infección por *Acinetobacter baumannii* en ratones. *Revista Microbiológica*. 2021 Diciembre 29; 60(1): p. 128-136.
 76. Chang YC, Ying Yang C, Sun RL, Cheng YF, Kao WC, Yang PC. Detección rápida de *Staphylococcus aureus* en células individuales mediante nanopartículas de oro conjugadas con aptámeros. *scientific reports*. 2013 Mayo 21; 3(1863).

77. Deb A, Gogoi M, K Mandal T, Sinha S, Gooh Pattader PS. Detección instantánea específica de *Klebsiella pneumoniae* para el diagnóstico de infecciones urinarias con un aptasensor conjugado con nanopartículas de oro plasmónicas. 2023 Agosto 21; 6(8): p. 3309-3318.
78. K.-Y. W, Y.-L. Z, W.-B. L, X.-P. L. Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detectio of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clinic Microbiol Infec Dis. 2011; 30: p. 273-278.
79. Somayeh Maghsoomi JWMBMLP. Un nuevo aptasensor basado en un indicador de azul de metileno para la detección rápida de *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Molecular Sciences. 2024 Octubre 30; 25(21): p. 11682.
80. Li Lui JLZWZYJCJC. Análisis sensible de *Pseudomonas aeruginosa* basado en el reconocimiento de dianas mediante aptámeros y doble auto-hibridación. Análisis sensible de *Pseudomonas aeruginosa* basado en el reconocimiento de dianas mediante aptámeros y doble auto-hibridación. 2025 Junio; 213(113687).
81. Chaimae Mezouarhi RVBARJMQHABSPFLC. Bioimágenes con aptámeros de ácidos nucleicos fluorescentes para la detección y cuantificación específicas de *Pseudomonas aeruginosa*, tanto sola como en poblaciones bacterianas heterogéneas. MicrobiologyOpen. 2025 Diciembre 22; 14(6): p. e70202.
82. Lan Hee Kim HWYYHKISKAJ. Potential of Fluorophore Labeled Aptamers for *Pseudomonas aeruginosa* Detection in Drinking Water. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2013 Abril 30; 56: p. 165-171.
83. Seung Min Yoo DKKSYL. Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species. Talanta. 2015 Enero 15; 132: p. 112-117.
84. Sheng Wang BMMWJLLD. Influencia de los agentes antibiopelícula dirigidos por aptámeros para el tratamiento de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie van Leeuwenhoek. 2017 Noviembre 02; 111: p. 199–208.
85. Zitao Zhong XGRGLJ. Selective capture and sensitive fluorometric determination. Microchim Acta. 2018 Julio 16; 185(377).
86. Ran Gao ZZXGLJ. Graphene Oxide Quantum Dots Assisted Construction of Fluorescent Aptasensor for Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in Food Samples. J. Agric. Food Chem. 2018 Octubre 17; 66(41): p. 10898–10905.
87. Zhengzong Wu DHBCZJ. A bimodal (SERS and colorimetric) aptasensor for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*. Microchimica Acta. 2018 Octubre 31; 185(528).
88. Xiaohong Shi JZFH. A New Aptamer/polyadenylated DNA Interdigitated Gold Electrode Piezoelectric Sensor for Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosensors and Bioelectronic. 2019 Mayo 1; 132: p. 224-229.
89. Saeed Shahrokhian SR. Development of a Sensitive Diagnostic Device Based on Zeolitic Imidazolate Frameworks-8 by Using Ferrocene-Graphene Oxide as Electroactive Indicator for *Pseudomonas aeruginosa* Detection. ACS Sustainable Chemistry &Engineering. 2019 Agosto 5; 7(15): p. 12760–12769.
90. Mahmoud Roushani MSFP. Impedimetric aptasensor for *Pseudomonas aeruginosa* by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles. Microchimica Acta. 2019 Octubre 26; 186(725).

91. Sarabaegi M. A nano-sized chitosan particle based electrochemical aptasensor for sensitive detection of *P. aeruginosa*. *Analytical Methods*. 2019 Octubre 02; 11(43): p. 5591–5597.
92. Zitao Zhong RGQCLJ. Dual-aptamers labeled polydopamine-polyethyleneimine copolymer dots assisted engineering a fluorescence biosensor for sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in food samples. *SPECTROCHEMICA ACTA*. 2020 Enero 5; 224: p. 117417.
93. Bidisha Sengupta PAEMRHPP. Estudio espectroscópico del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de nanocúmulos de plata con andamiaje de aptámero-ADN. *Moléculas*. 2020 Agosto 10; 25(16): p. 3631.
94. Jiangchun Hu LLMHYL. Análisis sensible y directo de *Pseudomonas aeruginosa* mediante extensión de cadena asistida por autocebadores y reacción de color basada en CRISPR-Cas12a. *ACS OMEGA*. 2023 Agosto 11; 8: p. 34852–34858.
95. Sarah Currie AJCdITAKSLaSL. Next-Generation Wound Care: Aptamer-Conjugated Next-Generation Wound Care: Aptamer-Conjugated Selective In Situ Colorimetric Detection of *Pseudomonas*. *ADVANCED FUNTIONAL MATERIAL*. 2024 Julio 18; 34(2403440).
96. Boobalan Thulasinathan SMRNPM. Aptasensor sin reactivos basado en nanotubos de carbono depositados electroforéticamente para la detección en el punto de atención de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de orina. *Biosensores y bioelectrónica: X*. 2026 Mayo 29; 29: p. 100745.
97. Gutierrez Santana JC. Desarrollo de nanopartículas de plata acopladas al aptámero F23 con reconocimiento específico por *Pseudomonas aeruginosa*. 2023 Junio 21..
98. Mayer G, Menger MM, editors. *Nucleic Acid Aptamers: Selection, Characterization, and Application*. 2nd ed.: Springer US; 2022.
99. Liu L, Li J, Wang Z, Yao Z, Cao J. Análisis sensible de *Pseudomonas aeruginosa* basado en autohibridación dual mediada por reconocimiento de dianas basado en aptámeros. *Revista de microquímica*. 2025 Junio; 213: p. 113687.
100. Hu H, Li H, Zhao Y, Dong S, Li W, Qiang W, et al. Aptamer-funtionalized silver nanoparticles for scanometric detection of platelet-derived growth factor-BB. *Analytica Chimica Acta*. 2014 Febrero 17; 812: p. 152-160.
101. Deka J, Mech R, Ianeselli L, Amenitsch H, Cacho-Nerin F, Parisse P, et al. Surface passivation improves the synthesis of highly stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Abril 1; 7(12): p. 7033-40.
102. Yu M, Wang H, Fu F, Li L, Li J, Li G, et al. Dual-Recognition Förster Resonance Energy Transfer Based Platform for One-Step Sensitive Detection of Pathogenic Bacteria Using Fluorescent Vancomycin-Gold Nanoclusters and Aptamer-Gold Nanoparticles. *Analytic Chemistry*. 2017 Marzo 13; 89(7): p. 4085-4090.
103. Campo Beleño C, Villamizar Gallardo RA, López Jácome LE, Gonzáles EE, Muñoz Carranza S, Franco B, et al. Biologically syntesis silver nanoparticles as potent antibacterial effective against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Aplied Microbiology, Applied Microbiology International*. 2022 Septiembre 1; 75(3): p. 680-688.

104. Ray M, Al Hoque A, Chatterjee S, Adhikary S. La nanopartícula biodegradable conjugada con aptámeros y cargada con clofarabina se dirigió con éxito a las células HL60 con sobreexpresión de CD117 y potencialmente indujo la apoptosis. Heliyon. 2025 Febrero; 11(4): p. e42450.
105. Dwarakanath S, G. Bruno J, Shastry A, Phillips T, John A, Kumar A, et al. Quantum dot-antibody and aptamer conjugates shift fluorescence upon binding bacteria. Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica. 2004 Diciembre 17; 325(3): p. 739-743.

ANEXOS

			Valores de absorbancia a OD ₄₀₂ /									
			SOBRENADANTE 1					SOBRENADANTE 2				
			Repetición			$\bar{x}$	SD	Repetición			$\bar{x}$	SD
			1	2	3			1	2	3		
Control negativo (PBS 0.1X)			0.001	0.001	0.001	0.001	0	0.001	0.001	0.001	0.001	0

AgNPs-C6-F23	Cepas no-inactivadas	ATCC 27853 TM	0.058	0.065	0.065	0.0626	0.0040	0.065	0.073	0.073	0.0696	0.0058
		ATCC 27855 TM	0.057	0.061	0.061	0.0596	0.0023	0.069	0.077	0.078	0.0746	0.0049
		ATCC 15692 TM	0.061	0.062	0.061	0.0612	0.0006	0.065	0.071	0.071	0.0689	0.0035
		<i>P. alcaligenes</i>	0.059	0.065	0.065	0.0629	0.0035	0.069	0.075	0.074	0.0726	0.0032
		<i>B. cepacia</i>	0.057	0.061	0.061	0.0596	0.0023	0.067	0.075	0.075	0.0722	0.0046
		<i>S. maltophilia</i>	0.055	0.059	0.059	0.0576	0.0023	0.066	0.073	0.073	0.0706	0.0040
	Cepas inactivadas	ATCC 27853 TM	0.057	0.059	0.059	0.0573	0.0012	0.066	0.065	0.065	0.0643	0.0006
		ATCC 27855 TM	0.070	0.059	0.059	0.0617	0.0064	0.057	0.069	0.069	0.0640	0.0069
		ATCC 15692 TM	0.056	0.062	0.062	0.0590	0.0035	0.073	0.069	0.069	0.0693	0.0023
		<i>P. alcaligenes</i>	0.057	0.070	0.069	0.0643	0.0072	0.076	0.075	0.075	0.0743	0.0006
		<i>B. cepacia</i>	0.055	0.060	0.059	0.0570	0.0026	0.066	0.075	0.073	0.0703	0.0047
		<i>S. maltophilia</i>	0.058	0.062	0.061	0.0593	0.0021	0.070	0.073	0.0073	0.0710	0.0017

F23-C6-AgNPs	Cepas no-inactivadas	ATCC 27853 TM	0.068	0.070	0.070	0.0800	0.0312	0.059	0.057	0.057	0.0653	0.0029
		ATCC 27855 TM	0.069	0.071	0.072	0.0683	0.0006	0.063	0.066	0.066	0.0643	0.0012
		ATCC 15692 TM	0.066	0.070	0.070	0.0700	0.0035	0.065	0.065	0.065	0.0643	0.0012
		<i>P. alcaligenes</i>	0.075	0.071	0.071	0.0740	0.0017	0.063	0.066	0.066	0.0650	0.0017
		<i>B. cepacia</i>	0.072	0.069	0.069	0.0683	0.0006	0.064	0.065	0.065	0.0640	0.0017
		<i>S. maltophilia</i>	0.075	0.069	0.069	0.0713	0.0006	0.063	0.067	0.067	0.0647	0.0023
	Cepas inactivadas	ATCC 27853 TM	0.117	0.063	0.063	0.0683	0.0012	0.063	0.068	0.068	0.0567	0.0012
		ATCC 27855 TM	0.070	0.069	0.069	0.0697	0.0015	0.064	0.066	0.066	0.0640	0.0017
		ATCC 15692 TM	0.075	0.069	0.069	0.0677	0.0023	0.064	0.066	0.066	0.0640	0.0000
		<i>P. alcaligenes</i>	0.073	0.076	0.076	0.0713	0.0023	0.064	0.067	0.067	0.0640	0.0017
		<i>B. cepacia</i>	0.070	0.069	0.069	0.0690	0.0017	0.063	0.066	0.066	0.0637	0.0006
		<i>S. maltophilia</i>	0.073	0.072	0.072	0.0700	0.0035	0.063	0.067	0.067	0.0647	0.0023

F23-C2-AgNPs	Cepas no-inactivadas	ATCC 27853 TM	0.006	0.005	0.005	0.0053	0.0005	0.017	0.015	0.017	0.0161	0.0008
		ATCC 27855 TM	0.006	0.006	0.004	0.0051	0.0008	0.022	0.022	0.021	0.0215	0.0002
		ATCC 15692 TM	0.003	0.003	0.002	0.0029	0.0006	0.020	0.020	0.020	0.0198	0.0004
		<i>P. alcaligenes</i>	0.012	0.009	0.012	0.0107	0.0015	0.017	0.017	0.016	0.0162	0.0006
		<i>B. cepacia</i>	0.009	0.008	0.008	0.0085	0.0004	0.009	0.009	0.009	0.0090	0.0002
		<i>S. maltophilia</i>	0.001	0.002	0.002	0.0016	0.0003	0.023	0.025	0.023	0.0238	0.0013
	Cepas inactivadas	ATCC 27853 TM	0.010	0.012	0.007	0.0086	0.0022	0.048	0.043	0.043	0.0437	0.0032
		ATCC 27855 TM	0.006	0.006	0.004	0.0044	0.0010	0.043	0.045	0.041	0.0422	0.0022
		ATCC 15692 TM	0.008	0.007	0.009	0.0070	0.0007	0.044	0.045	0.044	0.0436	0.0007
		<i>P. alcaligenes</i>	0.015	0.015	0.015	0.0140	0.0003	0.012	0.014	0.013	0.0122	0.0010
		<i>B. cepacia</i>	0.012	0.012	0.013	0.0116	0.0004	0.007	0.008	0.007	0.0064	0.0005
		<i>S. maltophilia</i>	0.008	0.008	0.009	0.0076	0.0004	0.009	0.008	0.010	0.0079	0.0012