



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN RÁPIDA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE
Escherichia coli A LA FOSFOMICINA MEDIANTE FLUORESCENCIA
INDUCIDA POR LÁSER EN UN DISPOSITIVO DE MICROFLUÍDICA.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

JEANNETTE CAROLINA BELMONT SÁNCHEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

VOCAL: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

SECRETARIO: Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

1ER SUPLENTE: Dr. Samuel Canizales Quinteros

2DO SUPLENTE: Dra. Tania Rojo Portillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 309 DE BIO FISICOQUÍMICA, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Luis Fernando Olguín Contreras

SUSTENTANTE:

Jeannette Carolina Belmont Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto titulado: “Búsqueda masiva de compuestos antibacterianos producidos por microorganismos no cultivables utilizando una plataforma de microfluídica” (Clave: 284240) con el que se compraron equipos y materiales para la realización de este proyecto.

Al programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (Clave: PAIP 5000-9023) para la compra de materiales.

DEDICATORIA

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
ÍNDICE	5
TABLA DE ABREVIATURAS	8
RESÚMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
HIPÓTESIS.....	13
ANTECEDENTES	14
MICROFLUÍDICA BASADA EN MICROGOTAS.....	14
MICROFLUÍDICA DE GOTAS Y SUS APLICACIONES MICROBIOLÓGICAS.....	16
VIABILIDAD CELULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	19
MÉTODOS CLÁSICOS DE DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	20
DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROFLUIDICA.....	22
MÉTODO DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	24
TINCIÓN DIFERENCIAL.....	26
FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	27
PRINCIPIOS DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER.....	28
MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.....	30
FLUORÓFOROS.....	31
BROMURO DE ETIDIO.....	32
FOSFOMICINA.....	33
SURFACTANTES FLUORINADOS.....	34
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	35
MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO.....	35
ARREGLO MICROSCÓPICO EXPERIMENTAL.....	35
ARREGLO ÓPTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR EL MÉTODO DE LIF Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	35
DISPOSITIVOS DE MICROFLUIDICA.....	36
DISEÑO DE MICROCHIPS EN ADOBE ILLUSTRATOR.....	36
FABRICACIÓN DE MOLDES MEDIANTE LA TÉCNICA DE FOTOLITOGRAFÍA SUAVE.....	38
CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS.....	39
FORMACIÓN DE MICROGOTAS.....	40

TINCIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> BL21 PARA ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR .40	
PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	40
TINCIÓN DE CÉLULAS NO VIABLES DE <i>E. coli</i> CON BROMURO DE ETIDIO PARA	
CONTROLES POSITIVOS.....	41
ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>E. coli</i> BL21 EN	
MICROCHIPS POR LA TÉCNICA DE CONTEO LIF	41
MONTAJE DEL ARREGLO EXPERIMENTAL PARA LA DETECCIÓN DE	
FLOURESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER DENTRO DE A MICROGOTAS	41
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR	
LÁSER DE CÉLULAS NO VIABLES TRATADAS POR CALENTAMIENTO	
(CONTROLES POSITIVOS)	42
CONTEO DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> MEDIANTE SCRIPT PROGRAMADO EN MATLAB	
.....	43
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR	
LÁSER DE CÉLULAS TRATADAS CON FOSFOMICINA DURANTE 6 HORAS	46
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR DE <i>E. coli</i> BL21 MEDIANTE TÉCNICAS DE	
CONTEO	47
ENSAYOS DE CONTEO CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE	
CÉLULAS TRATADAS CON FOSFOMICINA DURANTE 6 HORAS	47
CONTEO DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> MEDIANTE PROGRAMA IMAGE J	48
ENSAYOS DE CONTEO EN PLACAS DE COLONIAS TRATADAS CON FOSFOMICINA	
DURANTE 6 HORAS	48
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	51
CONTEO CELULAR MEDIANTE LA TÉCNICA LIF	51
ENSAYOS DE CONTEO CELULAR DE <i>E. coli</i> BL21 MEDIANTE TÉCNICAS DE	
CONTEO TRADICIONALES	63
TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	64
CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO	64
EXPERIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	
.....	65
TÉCNICA DE CONTEO EN PLACAS	68
CONTROLES NEGATIVOS	69
EXPERIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONTEO DE PLACAS	69
COMPARACIÓN DEL MÉTODO LIF CON MÉTODOS TRADICIONALES DE CONTEO	
CELULAR.....	72
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	75
CONCLUSIÓN	78
BIBLIOGRAFÍA.....	80
ANEXOS.....	85
ANEXO I.....	85
MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO	85
ANEXO II.....	87
CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS DE MICROFLUIDICA	87
ANEXO III.....	90

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	90
ANEXO IV	97
MONTAJE ÓPTICO PARA DETECCIÓN EN LIF	97
ANEXO V	98
COMANDOS DE SCRIPT EN MATLAB PARA CONTEO AUTOMATIZADO POR LIF	98
ANEXO VI	99
COMANDOS DEL PROGRAMA IMAGE J para CONTEO por MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	99
ANEXO VII.....	105
SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 1) ...	105
ANEXO VIII.....	109
SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 2) ...	109
ANEXO IX	115
SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 3) ...	115

TABLA DE ABREVIATURAS

Siglas	Significado
OMS	Organización Mundial de la Salud
nm	nanómetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
λ	lambda
DNA	Deoxyribonucleic Acid
kHz	kilohertzio
PDMS	polidimetilsiloxano
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
PSA	prueba de susceptibilidad antibiótica
°C	grados Celsius
UFC	unidad formadora de colonias
PCR	polymerase chain reaction
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindo
μg	microgramos
<i>mL</i>	mililitros
μM	micromolar
LED`s	Light Emitting Diode
nM	nanomolar
LIF	laser induced fluorescence
BrEt	bromuro de etidio
RNA	Ribonucleic Acid
μL	microlitros
DO	densidad óptica
NA	numeric aperture
NaCl	Cloruro de sodio
KCl	Cloruro de potasio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio
KH₂PO₄	Fosfato de potasio

g	gramos
mM	milimolar
mW	miliwatts
mm	milímetros
u.a.	unidades arbitrarias
CMI	Concentración mínima inhibitoria
rpm	revoluciones por minuto

RESÚMEN

La resistencia de las bacterias a los antibióticos de uso común y de última generación es un fenómeno de grandes consecuencias. Por ende, es uno de los problemas más apremiantes de salud pública de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Por lo anterior existen al menos dos escenarios en donde es muy importante determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico. El primero es en la identificación de microorganismos con resistencia en muestras de pacientes. Esto permite elegir el mejor tratamiento posible en cada caso. También, esta información es de gran utilidad con fines epidemiológicos que permitan crear políticas adecuadas para controlar la resistencia antimicrobiana. El segundo escenario es en el desarrollo de nuevos antibióticos. Esto es de gran importancia para combatir bacterias multirresistentes a los antibióticos ya existentes.

Una propuesta para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de manera rápida es la utilización de microgotas generadas en microchips de microfluídica. El uso de microgotas para estudiar microorganismos presenta muchas ventajas en comparación con métodos clásicos que conllevan el uso de matraces, cajas Petri y platos de múltiples pozos.

En este proyecto se tiene un dispositivo de microfluídica el cual permite el conteo de células no viables, en este caso *Escherichia coli* (*E. coli*), dentro de microgotas mediante el método de fluorescencia inducida por láser o por sus siglas en inglés, laser induced fluorescence (LIF). Para ello, el haz de un láser de $\lambda=532$ nm, es enfocado por un objetivo de microscopio en un microcanal de manera que solo una pequeña porción sea iluminada; por lo tanto, solo una gota a la vez se hace fluorescente. Las células en suspensión son encapsuladas en microgotas junto con un fluoróforo (bromuro de etidio) y un antibiótico (fosfomicina) las cuales fluyen en una sola fila a través de una zona iluminada por el láser. En este punto las células no viables marcadas con el fluoróforo absorben la luz y emiten fluorescencia, que es recolectada y transformada en valores digitales y almacenados en una computadora.

El método de fluorescencia inducida por láser en un microchip de microfluídica para la determinación de viabilidad celular nos permitió analizar en promedio 47 microgotas por minuto y los resultados obtenidos fueron congruentes y comparables con los métodos de microscopía de fluorescencia y conteo en placas.

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia de las bacterias a los antibióticos de última generación es un fenómeno de grandes consecuencias. Por ende, es uno de los problemas más apremiantes de salud pública de acuerdo con la OMS.^[1] La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos (como antibióticos, antivirales y antipalúdicos) actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas.^[1]

Esta resistencia ha ido en aumento debido al tratamiento no prescrito para combatir enfermedades infecciosas, la protección de personas con baja inmunidad y la prevención de enfermedades en animales destinados al consumo humano. Sin embargo, este consumo masivo de antibióticos ha llevado drásticamente a la aparición de patógenos que son resistentes a uno o a una combinación de algunos antibióticos.^[2]

Los ensayos para la determinación de la resistencia de diversas bacterias a antibióticos específicos deben ser bien estudiados y comprendidos tanto por los profesionales de la salud como por el público en general.^[3]

Además de servir para encontrar nuevos antibióticos, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana sirven para diagnosticar a los pacientes y para estudios epidemiológicos.

Por lo anterior, encontrar nuevos compuestos antibióticos es de gran importancia para combatir bacterias multi resistentes a los fármacos ya existentes. Una propuesta para encontrar de manera rápida un compuesto con posible actividad bactericida es la utilización de microgotas generadas en microchips de microfluídica.^[4]

La microfluídica se ha convertido rápidamente en una de las tecnologías clave que abre nuevas posibilidades experimentales en microbiología.^[5] La microfluídica es la ciencia que estudia el comportamiento de los fluidos a través de microcanales y la tecnología de fabricación de dispositivos microminiaturizados que contienen cámaras y túneles a través de los cuales fluyen o son confinados los fluidos.^[6] Además, estos dispositivos son capaces de generar microgotas en las cuales pueden realizarse diversos ensayos.

La capacidad de generar, manipular y monitorear gota por gota las cuales transportan células individuales o en pequeñas poblaciones de manera paralela y de alto rendimiento crea nuevos enfoques para resolver problemas de diagnóstico, viabilidad y determinación de resistencia antimicrobiana en la investigación microbiológica.^[5]

Una de las características más importantes a resaltar con respecto al empleo de esta técnica es la capacidad de analizar cantidades enormemente grandes de gotas individuales, así como la posibilidad de realizar estudios y protocolo de investigación más complejos.^[5]

Así se podría automatizar el agregar reactivos adicionales, dividiendo, clasificando e incubando incluso durante tiempos muy prolongados lo cual permitiría realizar múltiples mediciones en las mismas gotas o monitorear la evolución de una población en ambientes químicos particulares que pueden cambiar de forma controlable.^[5]

La microfluídica basada en microgotas representa una gran promesa, ya que cuenta con las características necesarias para manipular cantidades minúsculas de líquidos (nano a femtolitros) y poder realizar un gran número de pruebas químicas y biológicas en tiempos razonablemente cortos.^[7]

El uso de microgotas para estudiar microorganismos presenta muchas ventajas en comparación con métodos clásicos que conllevan el uso de matraces, cajas Petri y platos de múltiples pozos. Evita problemas de dispersión o contaminación de la muestra, requerimiento de una mínima cantidad de muestra y de reactivos y por ende una menor producción de residuos.^[8]

La fluorescencia inducida por láser ofrece la detección sensible y ultrarrápida donde se recolecta una señal de fluorescencia de fondo que define los límites de la gota mientras que las ráfagas de fotones en la parte superior del fondo (picos) se utilizan para identificar el número de células viables o no viables, dependiendo del ensayo a realizar.^[9]

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar microgotas en microchips de microfluídica que puedan encapsular células de *E. coli* que hayan estado en presencia de un antibiótico conocido (fosfomicina) y de un fluoróforo (bromuro de etidio) para así determinar el aumento de células no viables en función del tiempo mediante el método de fluorescencia inducida por láser y verificar la susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* al antibiótico.

OBJETIVOS PARTICULARES

Diseñar, fabricar y poner en funcionamiento un dispositivo de microfluídica que genere microgotas.

Montar un arreglo óptico de fluorescencia inducida por láser para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

Generar un código de programación en MatLab para la automatización del ensayo el cual sea capaz de contar las señales de células no viables dentro de cada microgota.

Comparar el método de fluorescencia inducida por láser con el método clásico de conteo en placas y el de microscopía de fluorescencia para determinar el grado de eficiencia de esta técnica en la determinación de la muerte celular en función del tiempo.

HIPÓTESIS

Si el método de fluorescencia inducida por láser permite identificar el aumento de células no viables de *E. coli* en un cultivo cuando se pone en contacto con un antibiótico conocido y un fluoróforo utilizando microgotas generadas en un microchip de microfluídica de manera continua y detectando células individuales, entonces, será posible determinar la susceptibilidad de *E. coli* al antibiótico de manera más rápida y automatizada en comparación con los métodos clásicos de conteo.

ANTECEDENTES

MICROFLUÍDICA BASADA EN MICROGOTAS

La microfluídica se ha descrito como una herramienta analítica adaptable y dinámica que permite la manipulación de pequeños volúmenes (generalmente de los microlitros a los femtolitros) de fluidos de manera precisa, lo cual implica el uso de dispositivos con dimensiones del orden de decenas a cientos de micrómetros.^[10]

Un área especializada de la microfluídica es la microfluídica basada en microgotas las cuales se forman al hacer pasar el flujo de al menos dos líquidos inmiscibles, llamados fase dispersa y fase continua, por la intersección de los microcanales dentro del microchip de microfluídica (Figura 1). La fase dispersa o acuosa es el líquido del cual están hechas las microgotas y la fase continua es el medio en el que quedan contenidas (generalmente aceite).

Con la geometría y dimensiones que presentan estos microchips en la intersección de las fases (*flow focusing*), así como la relación de flujos de las fases continua y dispersa se tendrán diferentes tamaños específicos de las microgotas, así como diferentes frecuencias de formación. Esta reportado que las microgotas se pueden generar a una frecuencia por arriba de los 11 kHz y seguir siendo monodispersas.^[11]

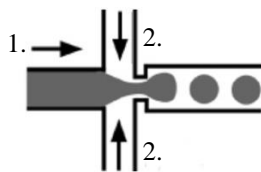


Figura 1. Representación de formación de microgotas tipo flow focusing (tomada de doi:10.1088/0022-3727/46/11/114002)

Para realizar un ensayo dentro de una sola microgota de microfluídica, se utilizan típicamente volúmenes en la escala de picolitros a nanolitros. Esta característica puede ofrecer mejoras considerables en el rendimiento de cada análisis revolucionando diversas aplicaciones, desde la ingeniería de proteínas hasta la identificación de fármacos.

La formación de estas microgotas es una ventaja en el camino a la miniaturización y paralelización entre los diferentes aspectos de estudio en la biología y la química en cuanto a la investigación orientada a la experimentación de alto número de muestras ya que disminuye el tiempo de experimentación al poder manipular y analizar rápidamente las reacciones que se llevan a cabo dentro estas.^[12]

Algunas de las operaciones que se pueden hacer con las microgotas de microfluídica son: la mezcla de gotas, clasificación por dielectroforésis, electrocoalescencia, división de gotas, incubación fuera del chip y reinyección en escala de gotas en volúmenes de pico y nanolitros, aunque también se escalan a femtolitros.^[13]

Los dispositivos microfluídicos también pueden emplearse en ámbitos multidisciplinarios de gran interés como en el análisis ambiental y de alimentos.^[13]

La microfluídica se ha vuelto de particular importancia para el diagnóstico clínico, siendo los inmunoensayos y el análisis de DNA candidatos aptos para la miniaturización.^[14-15]

Disminuir el tamaño de las microgotas es altamente deseable para muchas aplicaciones ya que aumenta la producción de las microgotas para la misma cantidad de reactivo y tiempo, lo que a su vez permite el acceso a una mayor diversidad de estudios.^[12]

Otra de las características más destacadas de la microfluídica basada en microgotas es la capacidad de analizar cantidades enormes de hasta millones de gotas individuales, cada una de ellas con células individuales, cultivos, proteínas, moléculas sintéticas y biológicas u otros análisis de interés.

Otra ventaja es que los volúmenes de muestras y reactivos se reducen significativamente, ahorrando costos en reactivos y produciendo menos residuos, lo cual provee una alternativa complementaria estratégica para incrementar el rendimiento.

Los métodos más comunes para impulsar los flujos de tal forma que se generen las microgotas dentro de los canales son a partir de gradientes de presión aplicados por bombas de pulso continuo, unidas al dispositivo o campos eléctricos aplicados externamente.

También se emplean fuerzas capilares, acústicas y magnéticas para mover fluidos a través de los microcanales. La mayoría de los métodos para fabricar sistemas microfluídicos son adaptaciones de técnicas para fabricar dispositivos microelectrónicos y la fotolitografía es el principio de estos métodos.^[16]

Los dispositivos microfluídicos pueden fabricarse a partir de diversos materiales, siguiendo el proceso de formar canales en la superficie de un sustrato sólido, posteriormente el corte y perforación de orificios de acceso en el sustrato y finalmente se une a otra placa para sellar los canales. Posteriormente se conectan tubos o depósitos a los orificios de acceso, lo que permite la entrada de las soluciones que se emplean en el ensayo. Los microchips fabricados de polímeros y elastómeros flexibles, como por ejemplo el polidimetilsiloxano (PDMS), se han vuelto comunes debido a la facilidad de su fabricación en masa.^[16]

MICROFLUÍDICA DE GOTAS Y SUS APLICACIONES MICROBIOLÓGICAS

Si bien la Microfluídica comenzó como una herramienta en el área Química, particularmente en el análisis, desde entonces se ha desarrollado y evolucionado hasta convertirse en una herramienta potencial dentro del estudio de muchas otras áreas, particularmente de la Biología Celular.

La función de los sistemas microfluídicos es guiar, distribuir y determinar el flujo de reactivos en pequeños canales y cámaras. Esta funcionalidad es importante ya que permite un control preciso del entorno químico de las células y organismos tratados o cultivados en cámaras pequeñas de tal forma que facilita y homogeniza sus condiciones de estudio.

La introducción de tecnologías de microfluidos para ensayos con bacterias, levaduras, algas y hongos dentro de microgotas abre nuevas posibilidades de enfoques de estudio en el área de la Microbiología como por ejemplo en la detección e identificación de patógenos, pruebas de susceptibilidad a antibióticos, estudios de la fisiología microbiana y aplicaciones biotecnológicas.^[17]

El uso de microgotas en el estudio de microorganismos presenta ventajas con respecto a los métodos clásicos que emplean biorreactores, matraces, placas Petri o placas de pocillos

múltiples. La primera sería su capacidad de confinar volúmenes ultra pequeños (menores a 1 nanolitro por gota) trabajar con un gran número de muestras simultáneamente e incorporar mecanismos de manipulación y automatización para la lectura y análisis de diferentes propiedades de los analitos a estudiar evitando su contaminación y disminuyendo los tiempos de reacción.

Se ha desarrollado una amplia gama de métodos de detección en los dispositivos microfluídicos para así poder observar efectos “*in situ*” y en tiempo real de distintos ensayos. A menudo se emplean métodos de detección óptica en particular la fluorescencia, pero también la absorbancia o quimioluminiscencia y estas pueden observarse con el empleo de fibras ópticas, microlentes y filtros.^[18]

Los estudios de células individuales se pueden realizar encapsulándolas en microgotas, es decir reteniéndolas en el medio continuo dentro de cámaras del microchip, o realizando procedimientos sobre ellas mientras todavía fluyen a través de los microcanales.^[19] Las plataformas microfluídicas pueden adaptarse a condiciones más controladas y específicas en comparación a los métodos tradicionales de cultivo de células basados en matraces, placas o pozos.^[20]

En estos estudios empleando células, la Microfluídica se emplea como una herramienta de identificación de microorganismos, que además puede funcionar como una técnica de separación de alto rendimiento y a su vez un poderoso método de conteo de células, que se usa ampliamente para la clasificación celular.^[21]

La utilidad de la clasificación activada por fluorescencia o Fluorescence Activated Cell Sorting por sus siglas en inglés (FACS), empleando dispositivos de Microfluídica se ha demostrado en muchos estudios relacionados con microalgas, incluidos los análisis de las propiedades relacionadas con el desarrollo y el crecimiento de los cultivos de microalgas, así como el monitoreo de comunidades de fitoplancton en los océanos, especialmente las fracciones de pico y nano plancton de gran interés en el área de la microbiología, lo que permite el análisis “*in situ*” de ecosistemas microbianos marinos.^[22]

Una de las características que vale la pena resaltar en los dispositivos microfluídicos es la capacidad de paralelización de experimentos lo cual proporciona datos estadísticos que pueden ayudar a la estandarización de diferentes ensayos microbiológicos, por ejemplo, en el screening de un gran número de compuestos o la búsqueda de características de interés en grandes grupos de moléculas u organismos.

Otra de las ventajas de los sistemas microfluídicos es que dependiendo del diseño que se realice a la hora de su fabricación, este puede tener efectos en la forma de funcionamiento como por ejemplo mediante la reordenación de los canales y cámaras del dispositivo, este puede ser capaz de mezclar los reactivos en una de las fases para así poder estudiar una matriz más compleja a lo largo del tiempo de tal forma que en lugar de crear una intersección de canales sea solo una cámara aislada de estudio continuo.

En los ensayos de microgotas, cada gota forma un ambiente acuoso aislado por la fase oleosa circundante teniendo como resultado un microrreactor el cual puede aislarse y recolectarse para un estudio posterior.

Por lo tanto, el resultado de las reacciones que se efectúan dentro de las microgotas se puede analizar y estas pueden ser recuperadas para clasificarse de acuerdo con su fluorescencia u otras señales ópticas.

El empleo de microgotas también permite la encapsulación de células individuales para estudios de heterogeneidad poblacional.

Los sistemas microfluídicos pueden localizar y analizar analitos de interés con un alto grado de control lo que permite direccionar ópticamente incluso a células bacterianas individuales.

En diversos ensayos se han empleado microgotas como cámaras de estudio para la identificación del recubrimiento celular en las bacterias.^[23] Los microcanales se pueden utilizar para colocar las microgotas una tras otra, con o sin flujo.

También se han demostrado configuraciones de canales simples para investigar la motilidad de las bacterias, localizarlas y retenerlas para su análisis y la obtención de imágenes las

cuales se emplean como una herramienta para monitorear la aparición de mutaciones en células individuales, pruebas rápidas de susceptibilidad antimicrobiana y para el análisis de diferentes fenotipos de bacterias.^[24, 25]

De las múltiples aplicaciones que tiene la Microfluídica en la microbiología (Tabla 1) se encuentra la determinación de la viabilidad celular y la susceptibilidad antimicrobiana en microgotas empleando a su vez distintas técnicas de conteo para el desarrollo y monitoreo de la efectividad de nuevos antibióticos, así como del desarrollo de resistencia que generan ciertas cepas a antibióticos ya existentes.

Tabla 1. Aplicaciones de microbiología utilizando microfluídica en microgotas.

Aplicaciones	Referencia
Detección de microorganismos mediante citometría de flujo	Katsuragi, T. y Tani, Y. (2000).
Detección de microorganismos y clasificación unicelular	Katsuragi, T. y Tani, Y. (2000).
Cuantificación microscópica de invasión bacteriana	Agerer, F., Waeckerle, S., Hauck, C. (2004).
Descubrimiento de fármacos en dispositivos de microfluídica	Dittrich, P., & Manz, A. (2006).
Recuento de células bacterianas totales en agua potable	Hammes, F., Berney, M., <i>et al</i> (2008).
Captura de partículas y células en sistemas de microfluidos	Nilsson, J., Evander, <i>et al.</i> (2009)
Detección de tensión mecánica implicada en la recuperación de la forma celular en <i>Escherichia coli</i> .	Wong, F., Renner, L., <i>et al</i> (2017).
Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	Baltekin, Ö., Boucharin, A., <i>et al</i> (2017).
Seguimiento de la dinámica de mutación y sus efectos en células.	Robert, L., Ollion, J., <i>et al</i> (2018).
Prueba directa de susceptibilidad a antibióticos de hemocultivos de bacilos gramnegativos utilizando dispositivos de microfluidos	Mizoguchi M., Matsumoto Y., <i>et al</i> (2020)

En el desarrollo de esta tesis se empleará la Microfluídica para realizar el conteo celular y la determinación de la viabilidad y muerte celular de bacterias de *E. coli* en microgotas empleando a su vez la técnica de fluorescencia inducida por láser del cual se hablará en los apartados siguientes.

VIABILIDAD CELULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La viabilidad celular es la determinación de células vivas o muertas presentes en un cultivo celular. De acuerdo con el concepto usado en microbiología, las células vivas o viables son aquellas que retienen la capacidad de replicarse bajo un cierto tiempo. Por otro lado, las

células muertas o no viables serán aquellas que han perdido de forma permanente su capacidad para reproducirse, incluso bajo condiciones óptimas de crecimiento.^[26]

En algunos artículos se considera a la viabilidad celular como una propiedad que describe mejor a una comunidad de bacterias más que a una sola.

Los ensayos de viabilidad celular, basados en células se utilizan a menudo para determinar si las moléculas que están a prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conduzcan a la muerte celular.

Un recuento de células viables permite identificar el número de células en crecimiento-división activa en una muestra, no obstante, el recuento de células no viables permite determinar si las cepas que se están estudiando son o no resistentes a diferentes antibióticos.

Es extremadamente urgente que se desarrolle la investigación de la resistencia a los antibióticos para que podamos combatir esta crisis. La prueba de susceptibilidad antibiótica (PSA) se ha utilizado de forma rutinaria para determinar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos e identificar la resistencia potencial. Sin embargo, los métodos convencionales para PSA son cada vez más incompetente debido a la velocidad de prueba insatisfactoria, el alto costo y la confiabilidad deficiente.^[27]

Independientemente del tipo de ensayo basado en células que se utilice, el objetivo de estos es saber cuántas células viables o no viables quedan al final del experimento según sea el caso y existe una variedad de métodos de ensayo que pueden usarse para este fin.

En el siguiente apartado se proporcionará una descripción general de algunos de los principales métodos utilizados en formatos de pozos múltiples donde los datos se registran con un lector de placas, el método de difusión en disco y cultivos en placas de agar.

MÉTODOS CLÁSICOS DE DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las técnicas y métodos clásicos de conteo celular permiten la cuantificación de los microorganismos viables en un cultivo que puede aplicarse en diferentes áreas de la industria tales como, farmacéutica, cosmética, ambiental, alimentos, entre otras. Estos métodos son

altamente confiables ya que están probados, aprobados, validados y certificados de tal forma que están totalmente regulados.

Estos métodos de conteo celular, por lo general implican el uso de pruebas bioquímicas, serológicas y morfológicas adicionales para la confirmación de resultados lo que implica que estos sean más laboriosos y que la obtención de resultados pueda tomar días o semanas.^[28]

Un método clásico es el método de conteo en placas de agar. Se basa en bacterias que se hacen crecer en un medio nutritivo a una temperatura específica (muchas veces de 37 °C), de tal forma que las colonias se vuelven visibles y se pueden contar. Un recuento de células viables a simple vista permite identificar el número de células que crecen y se dividen activamente en una placa.

Cuando la concentración es baja, se procede a filtrar la muestra a través de una membrana que será pasada al medio de cultivo hacia una placa de Petri para permitir su cuantificación. Cuando la concentración es alta, se procede a la preparación de diluciones seriadas en una secuencia de 1:10 alcanzándose así diluciones de 10^{-7} o de mayor concentración, obteniendo así pequeñas alícuotas que son sembradas en la placa con el medio nutritivo de cultivo.

Si la concentración de la alícuota es alta, las bacterias formaran crecimiento masivo de colonias y será más complicado el conteo, sin embargo, si la concentración es muy baja el número de unidades formadoras de colonias (UFC) será muy bajo. Entre los dos extremos de las diluciones, algunas de las placas contendrán un número de UFC entre 30 y 300 permitiendo así su cuantificación. En este caso se puede hacer un estimado del número de bacterias por colonias, sin embargo, este conteo posee muy baja sensibilidad y especificidad. A este cultivo puede agregarse alguna sustancia con posibles propiedades antibióticas de tal forma que el número de colonias que crezca será menor o nulo probando así su eficacia.^[29]

El método de conteo mediante zona de difusión empleando discos de antibióticos ha sido ampliamente utilizada en los laboratorios para evaluar la susceptibilidad antibacteriana a diferentes tipos de antibióticos y su resistencia, estos pueden ser colocados de manera

individual o bien pueden tratarse de multidiscos. Este conteo se realiza con una simple inspección visual del diámetro del halo alrededor de los discos que se forma en la reacción entre el cultivo biológico y el disco con antibiótico, con la ayuda de una escala graduada. Para mejorar esta técnica se han empleado diferentes dispositivos como cámaras digitales unidas a un software de procesamiento de imagen de tal forma que el conteo de las colonias pueda ser más preciso.^[29]

El análisis de electroforesis capilar en zona también se puede aplicar a la cuantificación de microbios, Palenzuela “*et al.*” así como Lim “*et al.*” describieron la cuantificación de la contaminación bacteriana en los alimentos empleando esta técnica combinada con otras técnicas como PCR y la detección por microscopía de fluorescencia.^[30,31]

La detección de células por medio de la microscopía de fluorescencia se desarrolla con el empleo de un microscopio óptico, tintas fluorescentes como por ejemplo DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindo), Sytox Green®, naranja de acridina, Syto 9®, Yoduro de Propidio, bromuro de etidio entre otros, y una fuente de luz con una longitud de onda determinada, para así poder detectar y cuantificar de manera rápida el número de bacterias viables o no viables, según sea el caso, realizando un análisis de las imágenes obtenidas con la ayuda de un software conectado a una cámara acoplada al microscopio.^[32]

Los métodos y técnicas que se han desarrollado en los últimos años hacen que los procesos de detección clásicos sean más rápidos, sensibles y eficientes de tal forma que aún son vigentes, por lo que las nuevas técnicas no reemplazan del todo a las técnicas tradicionales, sin embargo, estos métodos clásicos se caracterizan por su baja sensibilidad y especificidad, lo que hace necesario desarrollar y optimizar nuevos procesos de detección y cuantificación de viabilidad celular.^[32]

DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROFLUIDICA

La Microfluídica es una técnica que puede ayudar a la hora de la optimización de los métodos de conteo vistos en el capítulo anterior y además diseñar otro tipo de técnicas como por ejemplo la detección de fluorescencia en línea o encapsulando cultivos en microgotas, las

cuales son una alternativa más sensible y puede emplearse en diversas aplicaciones biológicas, entre ellas la determinación de viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular en microgotas de microfluídica es muy útil ya que permite el registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales fluorescentes de bacterias individuales dentro de cada microgota.

Profundizando en las ventajas mencionadas anteriormente cabe mencionar que una particularidad de los ensayos realizados con microfluídica empleando bacterias es su confinamiento estocástico, es decir aleatorio en donde se aíslan células en cada compartimento diminuto y su crecimiento dentro de un volumen pequeño permite que los productos del metabolismo y moléculas secretadas por la célula se acumulen más rápido y se reproduzca a una mayor velocidad a que si se cultivara en grandes cantidades.^[33] Esta característica hace posible la detección temprana de células y moléculas secretadas y posibilita el aislar y cultivar individuos de interés o de alto impacto para la investigación o diagnóstico oportuno.

Otra de las ventajas de los sistemas microfluídicos para el estudio de células específicamente es la capacidad de analizar grandes cantidades de cultivo de incluso millones de cultivos en tiempos excesivamente cortos en comparación a métodos tradicionales mencionados anteriormente, lo cual nos da acceso a la posibilidad de estudiar variabilidades fenotípicas y genéticas a nivel células individuales o poblaciones y el diagnóstico de alto rendimiento donde se prueben diversas hipótesis y/o la selección de grandes conjuntos de células con propiedades deseables según convenga en cada estudio. Con ello se pueden desarrollar protocolos experimentales más complejos en donde de manera automatizada se pueda formar, aislar, controlar, fusionar y analizar las microgotas para así clasificarlas e incluso incubarlas por tiempos prolongados y realizar múltiples mediciones en las mismas teniendo un control sobre ellas y los análisis que estas contengan para un rendimiento aún mayor.^[34]

Uno de los retos del empleo de esta técnica para el conteo del número de células viables y/o no viables es la de interpretar las señales de objetos tan pequeños como las bacterias, aunque se han aplicado cada vez más en el ambiente de la microbiología en los últimos

años.^[35] Con esta técnica es posible analizar comunidades microbianas mediante el uso de una o hasta tres tintes fluorescentes diferentes para apuntar a biomoléculas específicas y procesos fisiológicos.^[35] Estas respuestas se pueden observar con respecto al tiempo usando fotografías, encapsulando las bacterias en microgotas y evaluando su respuesta en algún par de horas a diferencia de los métodos clásicos donde la detección y análisis se realiza al menos 72 horas después del cultivo.^[35] Este tipo de ensayos nos da resultados de alta resolución y reproducibilidad, así como una gran eficiencia al disminuir el tiempo de respuesta y los reactivos empleados, además un ambiente perfectamente controlado y automatizado. De esta manera es posible obtener curvas de crecimiento y farmacodinámica de antibióticos, así como proporcionar información comparable a las técnicas estándar de la concentración inhibitoria mínima dentro de las microgotas.^[35]

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano ($\mu\text{g}/\text{mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C, además confirma resistencias a antibióticos y da respuestas definitivas cuando el resultado por otros métodos es indeterminado.^[36]

En el caso de este proyecto se analizó un antibiótico ya conocido frente a *E. coli*, todo el proceso, incluido el análisis de datos, tomó entre 6 y 8 horas.

El aumento del rendimiento del manejo de fluidos y la miniaturización del volumen del ensayo permite el acceso a bibliotecas más grandes, pero la infraestructura que sustenta las bibliotecas basadas en placas ha agotado esencialmente su modularidad y escalabilidad.^[37]

MÉTODO DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La fluorescencia inducida por láser se ha acoplado a dispositivos de microfluídica que generan microgotas con la idea de cuantificar la concentración de un fluoróforo dentro de cada microgota. En un estudio, Gruner y Baret realizaron la detección de gotas conteniendo fluoresceína mediante un proceso de tinción, determinando así la concentración de la fluoresceína. La sensibilidad de la detección dependía simplemente del rendimiento volumétrico y de la señal que esta producía por medio de la tinción.^[38]

Gruner & Baret integraron sistemas de microfluídica y de sistemas de microlentes que les permitió la detección rápida de las microgotas con y sin fluoresceína, alrededor de 2 kHz usando una cámara de alta velocidad. El dispositivo, que cuenta con una superficie de canal reflectante para dirigir la luz emitida para su recolección, es capaz de medir una concentración de fluoresceína de hasta 2.5 μM con ello vieron la posibilidad de emplear este sistema para la detección de viabilidad celular.^[38]

Kaminski “*et al.*” demostraron que usando una configuración de microscopía láser confocal se incrementa el nivel de detección hasta 40 millones de veces de las medidas obtenidas mediante un fotodetector, detectando con precisión una gota con un alcance hasta de un 77% de confianza.^[39]

Por ello, la fluorescencia inducida por láser es capaz de realizar la detección hasta por debajo de una concentración de fluoresceína de 250 nM. Para ensayos que requieran el estudio de una población mayor dentro de una microgota, el cuello de botella dentro de los sistemas microfluídicos funcionan como zonas con circuitos de clasificación rápida por fluorescencia activada, que llegan a operar de 2 a 3 kHz.^[36]

La técnica LIF tiene diversas aplicaciones en el campo de la microbiología como por ejemplo la detección e identificación de patógenos, pruebas de susceptibilidad a antibióticos, estudios de fisiología microbiana y selección biotecnológica y mejora de cepas.^[40]

Anteriormente, en el grupo de investigación del laboratorio 309 de biofísicoquímica de la Facultad de Química UNAM, Romero García realizó un ensayo de determinación de viabilidad celular empleando fluorescencia inducida por láser en donde determinó algunos parámetros que afectan la intensidad de fluorescencia de las señales que emiten las células dependiendo de si son o no viables.^[41]

Estos parámetros son la potencia del láser, velocidad del flujo y la concentración del fluoróforo empleado.^[41]

En el caso de este proyecto se determinará la susceptibilidad antimicrobiana de las células de *E. coli* en lugar de su viabilidad celular.

Además, se emplean condiciones de trabajo diferentes al trabajo anteriormente mencionado como por ejemplo la longitud de onda del láser empleado, las tintas fluorescentes y el antibiótico empleado, adicionalmente se realiza además una comparación de los resultados obtenidos con métodos de determinación empleados tradicionalmente como la microscopía de fluorescencia y conteo en placas, esto con la finalidad de evaluar su eficiencia.

TINCIÓN DIFERENCIAL

El microscopio es una herramienta fundamental a la hora del desarrollo de la investigación en microbiología, sin embargo, a la hora de emplearlo hay dos parámetros importantes que tener en cuenta para la eficiencia de este al observar células y en particular bacterias.

El primero de estos parámetros es la resolución que suele ser una limitación de la cual no podemos hacer demasiado, ya que la mayoría de las células bacterianas están cerca del límite de resolución de la mayoría de los microscopios ópticos, por lo cual depende generalmente del poder de resolución del microscopio en sí.

Otro de los parámetros es el contraste el cual es posible mejorar empleando diferentes tipos de sistemas ópticos como, por ejemplo, contrastando fases tiñendo células con una tinta.

En microbiología, las técnicas de tinción diferencial se utilizan con más frecuencia que las tinciones simples, esto para recopilar aún más información sobre las bacterias.

Estos métodos de tinción diferencial requieren de varios pasos y se denominan así ya que permiten la diferenciación de tipos de células, estructuras celulares y fases de la célula para saber en qué estado se encuentran. Además, existen tintas del tipo catiónicas y aniónicas dependiendo de si se quiere teñir a la célula o el fondo del medio donde se encuentran o si se requiere detectar, diferenciar y contabilizar el número de células vivas, muertas o ambas.^[42]

Para el caso de la tinción únicamente de células no vivas tenemos diversos fluoróforos como, por ejemplo, bromuro de etidio o bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio, Sytox Green®, yoduro de propidio, entre otros.

Para el caso de la tinción simultánea de células vivas y no vivas tenemos diversos fluoróforos como por ejemplo, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina o N,N,N',N'-Tetrametil-3,6-acridindiamina, Syto 9®, entre otros.

Cuando las moléculas de los fluoróforos mencionados anteriormente presentan cargas positivas o negativas estas son incapaces de penetrar la membrana celular de tal forma que solo pueden teñir células no viables cuando su membrana se encuentra dañada o comprometida.

Por otro lado los fluoróforos que no presentan cargas en su estructura son permeables a la membrana celular por lo que pueden teñir células viables y no viables.

En el caso de este proyecto en particular se emplea bromuro de etidio el cual es una tinta que se une a la célula cuando esta está comprometida o no viable para así poder detectarla en el sistema LIF.^[43]

FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano se refiere al incremento en el número de células microbianas de una población el cual ocurre por fisión binaria, es decir, que a partir de una célula se forman dos. Durante este ciclo de división celular todos los componentes estructurales de la célula se duplican.

La velocidad de crecimiento es el incremento en el número de células o en la masa celular por unidad de tiempo. La velocidad específica de crecimiento es característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo o sustrato.

El tiempo de generación es el tiempo requerido para que, a partir de una célula, se formen dos células, es decir, es el tiempo que tarda una población microbiana en duplicarse. Este tiempo varía considerablemente con los microorganismos y las condiciones ambientales como la temperatura.

La curva típica de crecimiento de un organismo unicelular va variando, dependiendo el tipo de microorganismo y según varíen las condiciones del cultivo, pero a pesar de ello todos presentan la misma serie de fases (Figura 2).

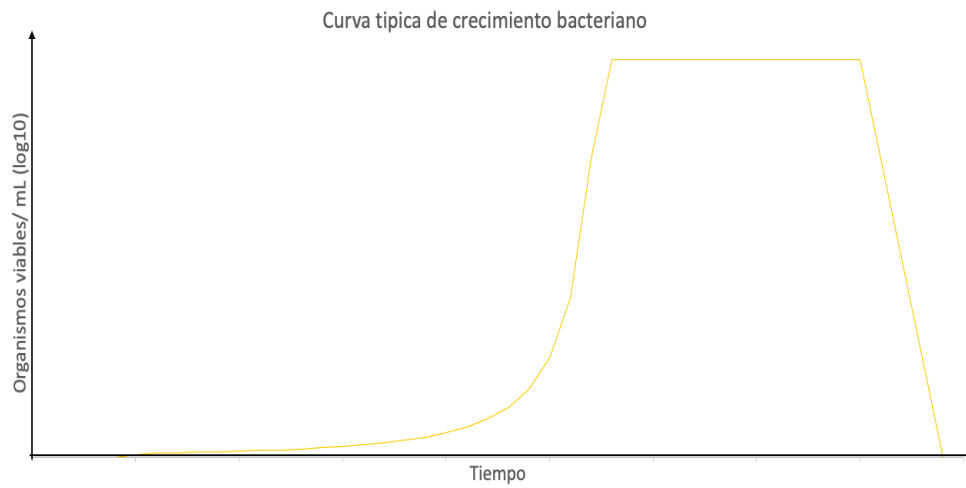


Figura 2. Comportamiento de una curva de crecimiento típico microbiano.

Fase de lag o fase de latencia: es la fase de adaptación en donde el número de UFC permanece prácticamente constante. Hay un crecimiento lento, donde las células se preparan para comenzar una elevada tasa de biosíntesis.

Fase logarítmica o exponencial: es la fase en la cual los microorganismos se multiplican con mayor rapidez ya que durante cada intervalo de duplicación se producen tantas nuevas células de manera acumulada. Esta fase continúa mientras no existan factores que limiten el crecimiento en el cultivo, como por ejemplo el agotamiento de nutrientes, la acumulación de productos metabólicos tóxicos o una combinación de ambos.

Fase estacionaria: es la fase donde no varía el número de microorganismos en el cultivo, como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. Las células reducen drásticamente su actividad metabólica y comienzan a utilizar proteínas celulares no esenciales como fuente energética.

Fase de muerte: En la cual el número de microorganismos empieza a disminuir progresivamente. Algunas bacterias dejan de dividirse, pero siguen siendo viables y a menudo son resistentes a antibióticos.

PRINCIPIOS DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER

La fluorescencia inducida por láser fue desarrollada por primera vez por Richard Zare en 1968 para fines de detección de átomos y moléculas en fase gaseosa basándose en el

principio de la espectroscopia de fluorescencia en donde en lugar de una lámpara como fuente de luz, la sustituyó por un láser.

La fluorescencia inducida por láser en principio es una técnica espectroscópica óptica en la que una molécula específica contenida en una muestra se excita con un láser de una longitud de onda específica y la fluorescencia emitida por la muestra es captada posteriormente por un fotodetector.

Dependiendo de la densidad de átomos o moléculas marcadas y detectadas se puede medir la intensidad del espectro de emisión obtenido mediante excitación de una molécula fluorescente con una fuente de luz de longitud de onda específica.

El espectro que se obtiene de la absorción de luz de una longitud de onda específica del haz del láser incidente se denomina espectro de absorción.

Sin embargo, una observación precisa de los espectros de absorción es muy difícil porque deben detectarse los cambios de intensidad de la luz, por lo que se emplean además distintos filtros específicos que discriminen otras longitudes de onda y lentes convergentes que poseen una distancia focal positiva.

Esta distancia focal positiva se define como la distancia desde el eje central de la lente hasta donde un haz de luz de rayos paralelos colimado atraviesa la lente y se enfoca en un único punto, aumentando así la señal que obtenemos.

Esta señal obtenida se denomina a partir de la observación de la intensidad de fluorescencia provocada por la transición radiativa, en donde una molécula emite radiación electromagnética para retornar a un estado de menor energía (menor cantidad de energía y mayor longitud de onda), debido a la fotoexcitación de átomos o moléculas y se denomina espectro de excitación de fluorescencia.

Por lo que se puede observar la fluorescencia emitida por las moléculas o átomos excitados electrónicamente al promoverlos de un estado fundamental de energía a través de una transición resonante a un estado excitado. A medida que los átomos o moléculas se relajan y regresan a su estado fundamental el fotodetector empleado detecta la fluorescencia (Figura 3).

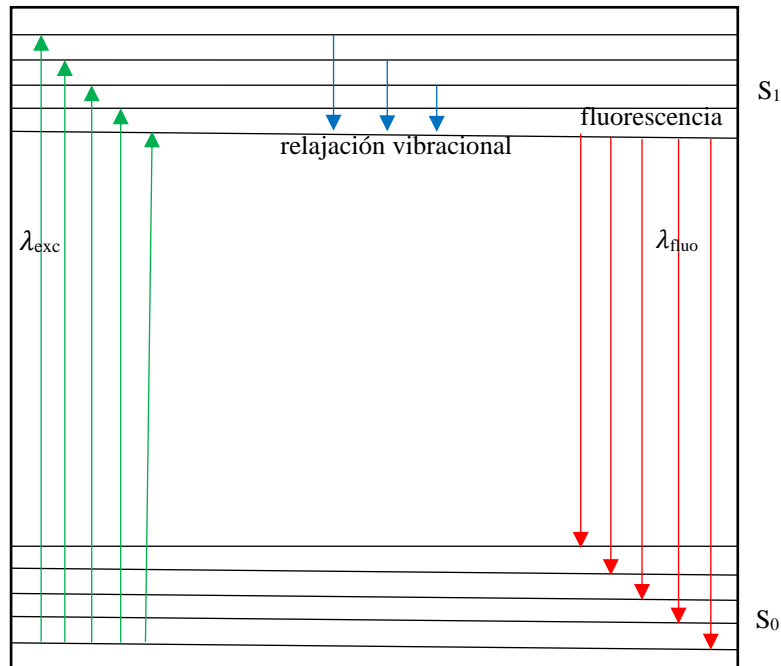


Figura 3. Esquemas de la excitación y emisión electrónica.

La técnica de fluorescencia inducida por láser tuvo potencial como técnica analítica debido a la relación directamente proporcional entre la señal obtenida de la intensidad de fluorescencia emitida por el analito y su concentración.^[44]

Esta técnica, por lo tanto, ofrece ventajas sobre otras técnicas espectroscópicas, como, por ejemplo, la selectividad hacia un analito en particular dependiendo la longitud de onda del láser. Además, es un método no invasivo que se emplea en mediciones de alta resolución que lo hace extremadamente útil para cuantificar con precisión el contenido de analito, en este caso de las células de *E. coli*, dentro de cada microgota.

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

El microscopio de fluorescencia está equipado con una fuente de luz ultravioleta, varios filtros, lentes, espejos y una cámara digital.

Se emplea generalmente para examinar muestras teñidas con tintas fluorescentes, los cuales absorben energía de longitudes de onda cortas invisibles, pero emiten señales de longitudes de onda mayores visibles a este fenómeno se le denomina fluorescencia.

La fluorescencia es uno de los fenómenos físicos más utilizados en estudios biológicos y analíticos debido a su especificidad y sensibilidad, con ello se emplean microscopios de fluorescencia para su uso.

Los microscopios de fluorescencia se basan en la utilización de un conjunto de filtros ópticos de excitación y emisión, así como de un divisor de haz dicróico.

De tal forma que el filtro de excitación selecciona las longitudes de onda para excitar un fluoróforo concreto dentro de la muestra, el filtro de emisión deja pasar únicamente las longitudes de onda de interés emitidas por el fluoróforo y la función del espejo dicróico es reflejar la luz en la banda de excitación y transmitir la luz en la banda de emisión.

Esta técnica permite la identificación rápida de algunos microorganismos, así como su viabilidad celular de tal forma que se empleó como soporte y método comparativo de los resultados obtenidos mediante la técnica de fluorescencia inducida por láser.

FLOURÓFOROS

Los fluoróforos son moléculas que emiten fluorescencia después de ser excitadas por una fuente de luz. La intensidad y longitud de onda de excitación y emisión de la luz dependerá del fluoróforo que se emplee y de su ambiente químico.

Cuando un fotón excita a un fluoróforo, ocurre una transición electrónica aumentando sus niveles de energía y vibracionales. Cuando el fluoróforo vuelve a su estado inicial se libera energía en forma de fotones de menor energía (mayor longitud de onda) que la absorbida.

Existen diferentes fluoróforos disponibles, cada uno con diferentes características de excitación y emisión que se emplean como indicadores o marcadores para obtener imágenes microscópicas. Estos pueden ser dirigidos hacia estructuras o moléculas específicas por interacciones de grupos químicos específicos como proteínas y DNA.

La fluorescencia de estas moléculas son una herramienta muy útil ya que se emplean como un método de contraste en imágenes microscópicas, principalmente en el área biológica. Con ellas se pueden obtener simultáneamente imágenes de diferentes estructuras celulares o con diferentes moléculas. En este proyecto se emplea bromuro de etidio para teñir específicamente células no viables.

BROMURO DE ETIDIO

El bromuro de etidio (BrEt) o Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio (Figura 4) es un compuesto capaz de intercalarse en el DNA y RNA de doble cadena de tal forma que es empleado como tinta fluorescente en la rama de investigación de la biología molecular.

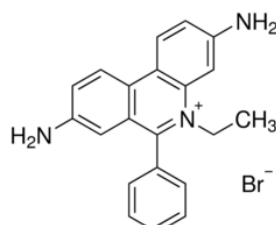


Figura 4. Bromuro de etidio o bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio.

El bromuro de etidio penetra a la célula únicamente cuando la membrana citoplasmática se encuentra comprometida, ya que al ser una molécula con cargas en su estructura es impermeable si la célula es viable, de tal forma que cuando la célula está dañada el bromuro de etidio puede intercalarse en la doble hélice del DNA, así como en el material genético ribosomal RNA y la fluorescencia generada aumenta 21 veces al unirse al RNA de cadena doble y 25 veces al unirse al DNA de cadena doble con respecto a la fluorescencia propia del compuesto (Figura 5).^[45]

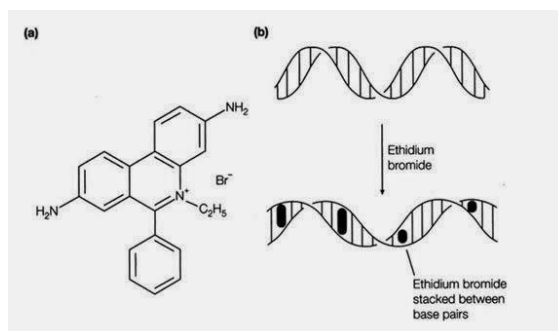


Figura 5. (a) Estructura química del bromuro de etidio. (b) Representación del bromuro de etidio intercalado entre los pares de bases del DNA.^[46]

El bromuro de etidio se emplea en este proyecto para identificar y contabilizar mediante la técnica de fluorescencia inducida por láser específicamente el número de células bacterianas no viables en los cultivos, con membrana citoplasmática dañada, cuando estas se exponen a una fuente de luz, en este caso un láser de longitud de onda de 532 nm,

emitiendo una luz roja-anaranjada, que se intensifica al unirse a una cadena de DNA, cuando la membrana celular se compromete.

El máximo de absorción del bromuro de etidio en fase acuosa se encuentra a 526 nm, mientras que el máximo de emisión se encuentra a una longitud de onda de 605 nm. El máximo de absorción hacia el rojo a longitudes de onda mayores al unirse a los ácidos nucleicos (Figura 6).^[47]

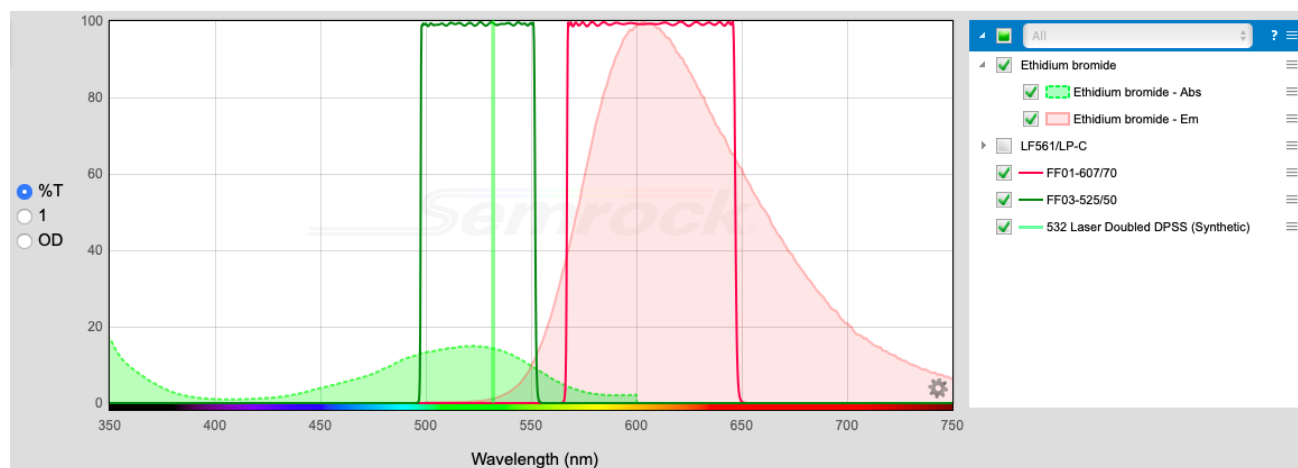


Figura 6. Espectro de absorción (verde) y emisión (rojo) de la molécula de bromuro de etidio. Banda del filtro de excitación (FF03-525/50). Banda del filtro de emisión (FF01-607/70). Laser 532 nm (línea verde).^[48]

FOSFOMICINA

La fosfomicina es un antibiótico bactericida natural de estructura epoxídica (ácido (-) cis -1.2-epoxipropilfosfónico) de amplio espectro que interfiere con la síntesis de la pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas como por ejemplo *E. coli*.^[49]

El espectro de acción de la fosfomicina reportada es de (Sensible (CMI) $\leq 64 \mu\text{g/mL}$, Intermedio 128 y Crítico $\geq 256 \mu\text{g/mL}$).^[50]

Para el conteo del aumento de número de células no viables con respecto al tiempo mediante la técnica de fluorescencia inducida por láser se empleó fosfomicina como antibiótico de amplio espectro, de tal forma que entrando en contacto con el cultivo de *E. coli* las células no viables aumenten en función del tiempo y puedan detectarse con la técnica LIF.

SURFACTANTES FLUORINADOS

Los surfactantes, también llamados tensoactivos o sustancias anfifílicas, que proviene de la raíz griega “*anfi*” que significa doble y “*filo*” que significa amigo o afinidad, son sustancias que poseen una doble afinidad por una molécula polar y una no polar.

La parte polar de estas sustancias poseen afinidad por los solventes polares en particular el agua y se le denomina parte hidrofílica, por otro lado, el grupo no polar es la parte hidrofóbica que posee afinidad por solventes no polares como los aceites o algunos disolventes orgánicos.^[51]

Hay diferentes tipos de surfactantes, entre ellos están los surfactantes fluorinados los cuales tienen una alta actividad superficial, excelente resistencia al calor y estabilidad química.

Estas propiedades son fundamentales para aplicaciones en el área de la microfluídica ya que lo que se busca con el uso de ellos es crear una interfase que permita generar microgotas estables las cuales puedan retener dentro de ellas componentes para su estudio o incluso que puedan almacenarlas por un largo lapso como microreactores sin coalescer entre ellas.

De tal forma que para tener tiempos de incubación mayores se busca obtener un medio o fase continua que contenga a las gotas y no reaccione con estas ni su contenido o que haya difusión del contenido de las microgotas a esta fase por lo que para estos ensayos se emplea surfactante fluorinado, el cual se sintetizó asegurando con ello que los componentes que se encuentran confinados en las microgotas no interactúen con la fase oleosa.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO

La preparación de los medios de cultivo de células de *E. coli* se detalla en el [ANEXO I](#).

ARREGLO MICROSCÓPICO EXPERIMENTAL

ARREGLO ÓPTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR EL MÉTODO DE LIF Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En este proyecto se empleó un láser de longitud de onda 532 nm (Laser Glow Technologies 532nm *Low Cost PPSS Laser System*) para excitar al fluorocromóforo en este caso, bromuro de etidio, que tiñe células no viables para de esta manera detectarlas y cuantificarlas dentro de las microgotas.

El procedimiento que se llevó a cabo en este proyecto se realizó en dos microscopios diferentes. El primero es un microscopio invertido (Leica DM IL Led, Alemania) para llevar a cabo el conteo de células no viables por el método de fluorescencia inducida por láser (Laser Glow Technologies 532nm *Low Cost PPSS Laser System*). Se utilizó un objetivo 40x (NA=0.55) empleando un filtro de excitación (BLP01-635R-25 Semrock), los espejos dicróicos (FF660-Di02-25x36 & Di01-R488-25x36 Semrock) y filtros de emisión (FF01-607/70-25 Semrock 572-642 nm). Las señales de fluorescencia fueron captadas con una lente concentradora plano convexa (LA1951-A, NBK7 Thorlabs) hacia un fotodetector de avalancha de fotodiodo (APD-100, Hinds Instruments) conectado a una tarjeta de adquisición de datos (USB.6351, National Instruments), que a su vez está conectada a una computadora. Se utilizó una cámara de alta velocidad (Phantom Miro M110, AMETEK) acoplada al microscopio para visualizar las microgotas en flujo.

El segundo es un microscopio invertido de fluorescencia ((DMI3000 B, Leica Microsystems, Alemania) para llevar a cabo el conteo de células no viables por el método de microscopía de fluorescencia, utilizando el objetivo 20x (Leica Microsystems, NA = 0.3) teniendo acoplado una lámpara de halógeno (Photo Fluor, North 89, E.U.A) y empleando un set de filtros (LF561/LP-C-L01/561&568 nm BrightLine® Longpass Filter Set, Leica Large) específico para el fluoróforo bromuro de etidio (MKBD5725V, Sigma Aldrich) para poder observar y

contabilizar las células no viables. Para ello se tuvo además acoplado al microscopio una cámara digital (Canon SX260 HS, E.U.A.).

DISPOSITIVOS DE MICROFLUIDICA

DISEÑO DE MICROCHIPS EN ADOBE ILLUSTRATOR

Con el software Adobe Illustrator se realizó el diseño de los microchips empleados en los ensayos, estableciendo las dimensiones (ancho) de los canales para así tener un control de la estabilidad, tamaño y algunos otros parámetros de las microgotas dependiendo de las dimensiones del microcanal. Estos se diseñaron de 120 μm de ancho.

Al tener la plantilla de los diseños, se imprimió el negativo en acetato para su posterior caracterización y empleo en la fabricación de los moldes. (Figura 7)

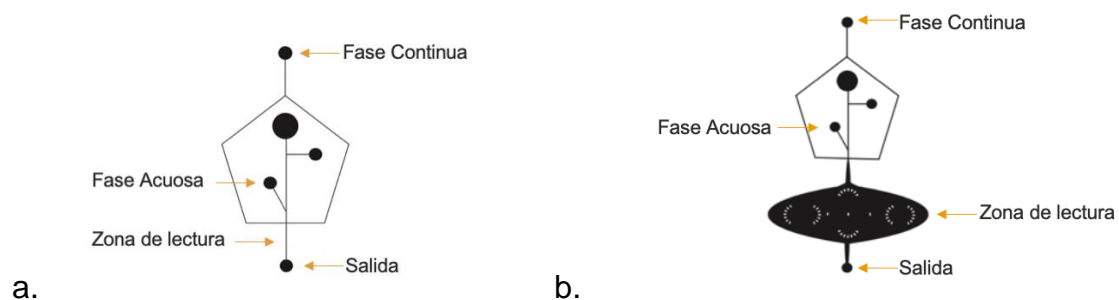


Figura 7. Diseños de microchips creados en Adobe Illustrator. (a) Diseño empleado para conteo por LIF. (b) Diseño empleado para conteo por microscopía de fluorescencia

Ambos diseños se emplean para generar microgotas en los ensayos y las zonas de lectura se diseñaron de manera particular para cada una de las técnicas de conteo.

En el caso del conteo por LIF la zona de lectura es un canal de 120 micrómetros de ancho a través del cual pasan las microgotas y el láser se encuentra enfocado en un punto dentro del canal, por el cual algunas de las células presentes dentro de las microgotas se iluminan y se registran de manera rápida al pasar por este punto, mediante un software. La idea de este diseño es que las microgotas se generen de forma ovalada y por ello se alargan de tal forma que una cantidad mayor de células en una sola microgota se puedan visualizar y contar. Esto se realiza a un flujo constante de tal forma que puedan analizarse un gran

número de ensayos (microgotas) en tan solo un minuto. En el caso de este ensayo solo se contabilizan las células que pasan por el punto donde está enfocado el láser por lo que no se contabilizan el 100% de las que se encuentran dentro de la microgota.

En el caso de la zona de lectura en los ensayos realizados por la técnica de microscopía de fluorescencia, se buscó que esta fuera un área grande para disminuir la velocidad de las microgotas después de formarse, y que con el tiempo pudieran permanecer quietas al detener el flujo de las jeringas para así poder tomar las fotografías de ellas y poder analizarlas una por una. En este diseño no se busca cambiar la forma de las microgotas así que estas tienen un aspecto esférico y así podemos observar y contar casi el 100% de las células que se encuentran dentro.

Estas plantillas se caracterizan para comprobar que las medidas del diseño correspondan con las medidas del canal que esperamos fabricar. Esta se llevó a cabo en el microscopio (DMI3000 B, Leica Microsystems, Alemania) usando el objetivo 20x con una cámara acoplada (Dino-Eye AM7023 5.0MP Microscope Camera) y empleando el programa Image J, realizando las mediciones del ancho del diseño de los canales. El procedimiento es el mismo que se menciona posteriormente en el apartado [CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS](#).

FABRICACIÓN DE MOLDES MEDIANTE LA TÉCNICA DE FOTOLITOGRAFÍA SUAVE

El procedimiento para fabricar el molde maestro con el diseño de los dispositivos se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Esquema de la elaboración de moldes mediante litografía suave.

La elaboración de las réplicas de los microchips se describe en la Figura 9.



Figura 9. Elaboración de las réplicas de microchips con PDMS.

CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS

La caracterización de las réplicas de PDMS nos permitió conocer las dimensiones reales de los canales que se emplearon en los ensayos. Este procedimiento se encuentra descrito en el [ANEXO II](#).

Las dimensiones promedio del ancho y profundidad de los canales del microchip empleado en las lecturas por LIF y microscopía de fluorescencia fueron de 148.47 μm x 124.92 μm y 153.32 μm x 122.37 μm respectivamente

FORMACIÓN DE MICROGOTAS

Las microgotas se forman al intersectarse el flujo dos líquidos inmiscibles, llamados fase dispersa y fase continua. La fase dispersa o acuosa es el líquido del cual están hechas las microgotas y la fase continua es el medio en el que quedan contenidas (aceite fluorinado en este trabajo). El tamaño y frecuencia de las microgotas generadas en la intersección de las fases (flow focusing), depende de la geometría y el flujo que se les aplique a ambas fases.

1. Fase dispersa o acuosa (suspensión de las células no viables + bromuro de etidio ± fosfomicina + buffer de fosfatos)
2. Fase continua (Aceite fluorinado HFE-7500+E2K066 (1.8% con respecto al aceite))

Los flujos que pasan a través de unas mangueras que se insertan a las entradas de cada una de las fases del microchip (Figura 10), se controlan mediante unas jeringas que contienen ambas fases acopladas a bombas de infusión (NewEra 300).

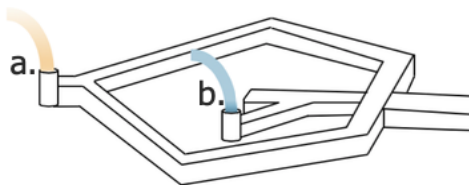


Figura 10. Representación de la inserción de mangueras en el microchip con cada una de las fases. **a.** Fase continua (Aceite fluorinado HFE-7500+E2K066) **b.** Fase dispersa o acuosa (suspensión de las células no viables + bromuro de etidio ± fosfomicina + buffer de fosfatos)

TINCIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21 PARA ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

La preparación del buffer de fosfatos, bromuro de etidio, surfactante y aceite fluorinado, necesarios para la tinción de las células *E.coli* para los ensayos de conteo celular por LIF y Microscopía de Fluorescencia, se describen en el [ANEXO III](#).

TINCIÓN DE CÉLULAS NO VIABLES DE *E. coli* CON BROMURO DE ETIDIO PARA CONTROLES POSITIVOS

Se tomaron colonias de *E. coli* de una placa de agar, sembrado un día antes, se suspendieron en el buffer de fosfatos (1 mL/ 20 mM/ pH 7.4), se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en el buffer, posteriormente se midió su densidad óptica a 600 nm y se llevó a cabo una microdilución para obtener una $DO_{600nm}=0.6$. La suspensión de bacterias se calentó en un baño de agua a 65 °C por 30 minutos.

Después se agregaron 2 microlitros del stock de bromuro de etidio [20.03 mM] para la tinción de las células no viables y se dejaron en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente.

Transcurridos los 10 minutos se tomó una pequeña cantidad del cultivo (2µL) para comprobar en el microscopio, con el set de filtros mencionados en el apartado ARREGLO MICROSCÓPICO EXPERIMENTAL, que la tinta había teñido el total de las células que después del calentamiento eran no viables.

ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *E. coli* BL21 EN MICROCHIPS POR LA TÉCNICA DE CONTEO LIF

MONTAJE DEL ARREGLO EXPERIMENTAL PARA LA DETECCIÓN DE FLOURESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER DENTRO DE A MICROGOTAS

Se realizó un montaje óptico con un láser con longitud de onda de 532 nm y 20 mW en un microscopio óptico invertido con una cámara de alta velocidad acoplada, junto con un fotodetector de avalancha acoplado a una tarjeta de datos y este a su vez conectado a una computadora ([Anexo IV](#)). El láser se enfocó al canal de zona de lectura del dispositivo de microfluídica por donde fluyen las microgotas (Figura 11).

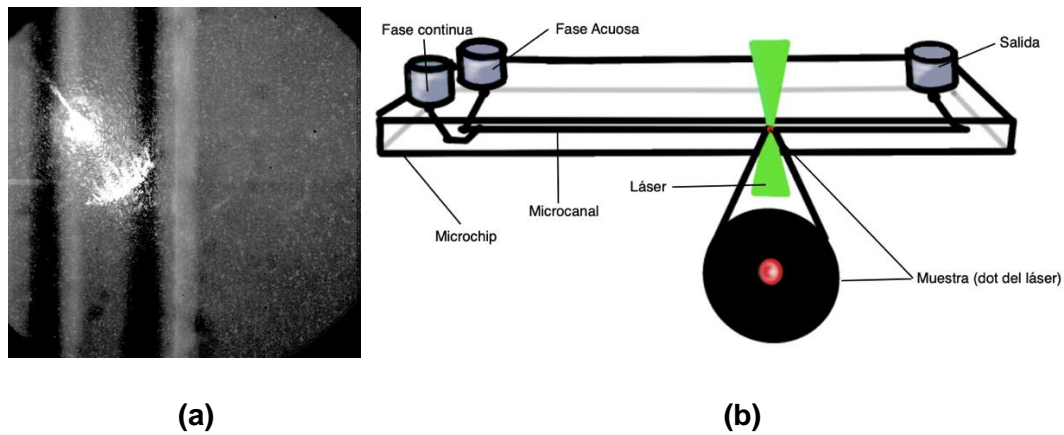


Figura 11. (a) Enfoque del láser en el microcanal. (b) Esquema del ajuste de spot dentro del canal del microchip (zona de lectura).

Durante el ensayo se tiene la luz apagada para evitar cualquier tipo de ruido en las señales obtenidas, así como el uso de lentes de protección en todo momento.

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER DE CÉLULAS NO VIABLES TRATADAS POR CALENTAMIENTO (CONTROLES POSITIVOS)

Se cargaron en jeringas de 1 mL (Becton Dickinson) la disolución de la fase continua (HFE-7500+E2K066) y la fase acuosa (suspensión de las células no viables + bromuro de etidio) para la formación de las microgotas dentro del microchip.

Estas se conectaron a través de la aguja al extremo de un tubo flexible (PTFE, Cole Parmer, Diámetro externo 1.07 mm) a las entradas del microchip como se describe en el apartado FORMACIÓN DE MICROGOTAS y ambas jeringas se colocaron en bombas de presión (Syringe Pumps NE-1002X, New Era, E.U.A) de inyección continua. El flujo de la fase continua u oleosa para la formación de microgotas fue de 80 μ L/hora para cada fase.

La estabilidad de las microgotas se determinó observando su comportamiento con ayuda del microscopio (DM IL Led Leica) utilizando el objetivo 40x (NA=0.55) y teniendo acoplada a él una cámara Phantom (Miro M110, AMETEK) que a su vez está conectada a la computadora.

Se logró una detección de alta sensibilidad obteniendo luz de fluorescencia emitida dentro del microcanal a través de la pared de vidrio en la base del microchip y se agregó un filtro que solo permite una longitud de onda determinada para reducir al máximo la interferencia

de luz dispersada por la fuente del láser, obteniendo así un límite de detección de 20 μM de bromuro de etidio en los ensayos con bacterias.

Las microgotas son consideradas como microreactores en donde las bacterias están en contacto con la fosfomicina y el bromuro de etidio. Cuando la pared celular de las bacterias se ve comprometida por acción del antibiótico, el bromuro de etidio es capaz de intercalarse en el DNA y de esta manera emitir fluorescencia por lo cual podemos detectar a cada célula no viable mediante LIF.

CONTEO DE CÉLULAS DE *E. coli* MEDIANTE SCRIPT PROGRAMADO EN MATLAB

Con la ayuda del fotodiodo de avalancha se obtuvieron los datos de las señales que se graficaron mediante un script en Matlab en el cual se estableció un tiempo de adquisición de datos de 60 segundos a una frecuencia de 1000 datos/segundo.

Se realizó un experimento control (blanco) con una disolución de bromuro de etidio [40 μM] sin células para establecer la intensidad de fluorescencia base captada por el fotodetector avalancha de fotodiodo (APD-100, Hinds Instruments) conectado a una tarjeta de adquisición de datos (USB.6351, National Instruments) y se realizaron las gráficas correspondientes empleando el script mencionado anteriormente, para determinar la fluorescencia basal de microgotas que contenían únicamente el bromuro de etidio y el buffer empleado, pero sin contener células. y que el programa solo contabilice aquellas que correspondan a las células teñidas.

En la Figura 12 se observan las señales acumuladas durante un minuto correspondientes a 43 microgotas. Como se observa las señales de las microgotas son menores a una intensidad de 0.1 unidades arbitrarias (a.u.).

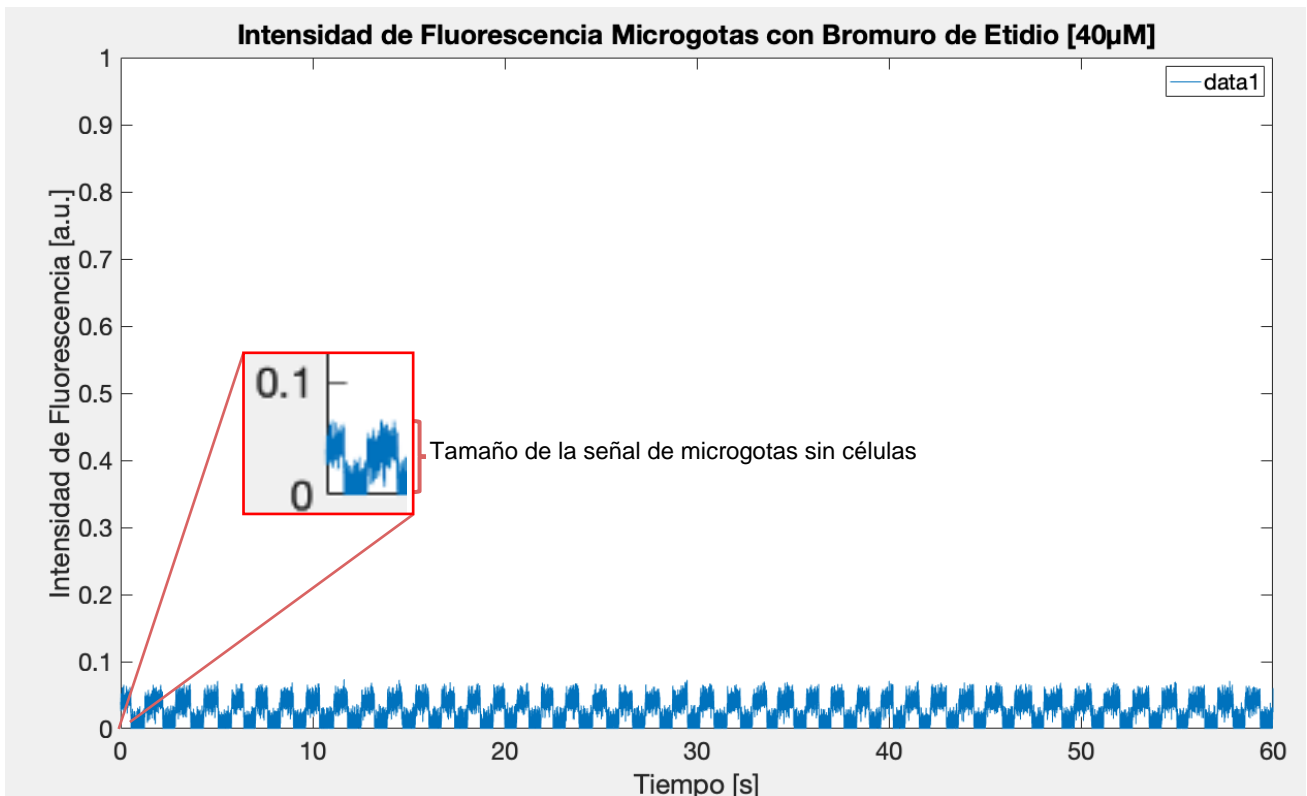


Figura 12. Señales de fluorescencia inducida por láser de microgotas con bromuro de etidio y buffer, sin células (zoom de la señal de una microgota).

También se tomó como un control positivo con células no viables teñidas con el bromuro de etidio, para saber las intensidades y el número máximo de señales que deben esperarse en los ensayos posteriores de las microgotas en las que las células estarán en contacto con un antibiótico.

La adquisición de datos es el proceso de medir, mediante una tarjeta de adquisición de datos conectada a una computadora, un fenómeno eléctrico (corriente). Un sistema de adquisición de datos (DAQ) consiste en un sensor específico (fotodetector de avalancha), hardware de medidas DAQ (tarjeta de adquisición) y una computadora (PC) con software programable (Matlab) (Figura 13).



Figura 13. Esquematación de las partes de un sistema DAQ
 [Tomada https://www.stimx.org/service_adquisicion_datos.html
 Fecha de consulta: 3 junio 2022]

Al emplearse el fotodiodo de avalancha, este pre amplifica y transduce la corriente provocada por la incidencia de fotones y la multiplicación de los portadores de carga en el semiconductor, a una señal de voltaje, los datos de la cantidad de corriente eléctrica que pasa por el fotodetector en función del tiempo son obtenidos por la tarjeta de adquisición y simultáneamente traducidos con ayuda del software Matlab en datos numéricos y gráficas las cuales son interpretadas con ayuda de los programas Excel y Matlab. En Matlab se programó la velocidad y el tiempo de la adquisición de datos que se empleó, en este caso en particular fueron 1000 datos/segundo durante 60 segundos.

Los datos que se obtienen en Matlab de las señales generadas dentro del microchip se copiaron y pegaron en una hoja Excel. Este proceso se repite al menos 10 veces para cada uno de los ensayos realizados, los datos obtenidos se guardaron en la hoja de Excel correspondiente.

Se creó una hoja nueva de Excel llamada análisis de datos la cual se emplea para graficar cada uno de los ensayos realizados empleando Matlab. Se copia una por una las columnas de los datos adquiridos en cada uno de los ensayos y se pega en la hoja de Excel análisis de datos, para posteriormente importarlos a Matlab donde se graficaron y se realizó el conteo de las células fluorescentes.

Se creó un script en el programa Matlab que funciona como un archivo ejecutable el cual grafica los datos obtenidos, captados por el fotodetector avalancha de fotodiodo (APD-100, Hinds Instruments) conectado a una tarjeta de adquisición de datos (USB.6351, National

Instruments) durante un minuto con una velocidad de adquisición de 1000 datos por segundo, y simultáneamente contabiliza la cantidad de máximos que se encuentran en la gráfica obtenida las cuales se traducen como el número de células no viables dentro de las microgotas.

Dentro del script se determina un valor mínimo en el eje Y (`MinPeakHeight`) el cual se emplea como ajuste para discriminar puntos según convenga, en este caso se ajustó en 0.20. También se determinó el título de los ejes de las gráficas que se realizaron, para el eje y Intensidad de Fluorescencia (a.u.) y para el eje **x** Tiempo (s).

Los comandos para el conteo de células no viables en las microgotas dentro del microchip, utilizando el script llamado **findpeaks** diseñado en Matlab, se describen en el [ANEXO V](#).

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER DE CÉLULAS TRATADAS CON FOSFOMICINA DURANTE 6 HORAS

Se preparó una suspensión en un tubo eppendorf de *E. coli* ($DO_{600nm} = 0.6$) + fosfomicina [250 μ g/mL] + Bromuro de Etidio [40 μ M] llevando a volumen final de 1 mL con el buffer de fosfatos (20 mM, pH 7.4).

La concentración final de fosfomicina se empleó muy por arriba de la CMI reportada en la literatura para esta cepa tratada con fosfomicina a fin de descartar que no haya resistencia a este antibiótico (Sensible (CMI) $\leq 32 \mu\text{g/mL}$).^[50]

Se cargaron las jeringas de 1 mL con las disoluciones de la fase continua y la fase acuosa acoplándolas al microchip, como se describe en el apartado anterior y se realizó la optimización de los flujos para cada fase (80 μ L/hora).

Posteriormente se enfocó el láser al canal por donde pasan las microgotas con ayuda de la cámara Phantom. Se adquirieron los datos de voltaje obtenidos por el fotodetector con el objetivo de 40x, empleando el script de Matlab a una frecuencia 1000 datos/segundo durante 60 segundos, obteniendo gráficas de 60,000 puntos.

Cada adquisición de datos se realizó 10 veces, en un intervalo de 2 horas hasta tener un tiempo total de 6 horas, incluyendo el tiempo cero (al inicio del ensayo).

Cada 2 horas justo antes de la adquisición de datos se procedió a agitar cuidadosamente la fase acuosa de manera que las células no se depositaran en el fondo de la jeringa y no afectara el conteo.

Los datos obtenidos se guardaron en hojas de Excel para su análisis empleando un script realizado en Matlab para el conteo de picos (señales de las células no viables) en función del tiempo, en este caso 1 minuto.

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR DE *E. coli* BL21 MEDIANTE TÉCNICAS DE CONTEO

ENSAYOS DE CONTEO CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS TRATADAS CON FOSFOMICINA DURANTE 6 HORAS

Para poder asegurar que el método de LIF tiene la capacidad de determinar la susceptibilidad antimicrobiana igual que el método de microscopía de fluorescencia y el conteo de placas se realizó una comparación utilizando el mismo tratamiento de los cultivos en todos los casos.

La microscopía de fluorescencia de células teñidas por distintos fluoróforos se utilizó para el conteo de células y la determinación de su viabilidad o susceptibilidad según sea el caso, observando el número de células teñidas, a una longitud de onda determinada, contando los cuerpos fluorescentes con un programa de análisis de imágenes, tomadas con ayuda de una cámara y una fuente de luz UV adaptados a un microscopio.

Para ello se preparó como fase acuosa 1 mL de una suspensión de células como se describe en el apartado anterior y se realizó el mismo procedimiento de acoplamiento de esta y la fase continua al microchip, descrito en el apartado [FORMACIÓN DE MICROGOTAS](#).

Se colocó el microchip en la platina del microscopio (DMI3000 B, Leica Microsystems, Alemania) que tiene acoplado una fuente de luz de amplio espectro (North89 Photo Fluor, E.U.A.) empleando el set de filtros LF561/LP-C, se enfocó el canal donde pasan las microgotas con el objetivo 20x, donde se tomaron fotografías de estas en el mismo periodo de tiempo, cada 2 horas, incluyendo el tiempo cero (al inicio del ensayo) con la ayuda de una cámara digital (Canon SX260 HS EUA) acoplada al ocular observando la fluorescencia emitida en función del tiempo de las células teñidas con bromuro de etidio. Posteriormente

a partir de las fotografías digitales se realiza el conteo de las células no viables en función del tiempo empleando Image J.

CONTEO DE CÉLULAS DE *E. coli* MEDIANTE PROGRAMA IMAGE J

El conteo celular se realizó con el programa Image J. Los comandos empleados para el análisis de las imágenes tomadas por la cámara digital se describen en el [ANEXO VI](#).

Los resultados obtenidos de este conteo se despliegan en una tabla, la cual se genera automáticamente, en la que se observan datos como el nombre del archivo .jpg, el conteo de las señales fluorescentes, el área total analizada, entre otras.

Estos datos se copiaron y pegaron en un archivo .xlsx de Excel para su posterior manejo de datos y análisis.

ENSAYOS DE CONTEO EN PLACAS DE COLONIAS TRATADAS CON FOSFOMICINA DURANTE 6 HORAS

De manera tradicional la susceptibilidad antibacteriana se puede determinar mediante el método de conteo en placa el cual consiste en la preparación de diluciones de un cultivo celular, siembra de los microorganismos en placas Petri con medio sólido y el conteo de las colonias formadas.

Para llevar a cabo este procedimiento se requiere de 16 horas mínimo de incubación del cultivo aproximadamente para obtener los resultados.

Se tomó una colonia de *E. coli* BL21 y se sembró en una placa de agar como se describe en el apartado [CULTIVO DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21 EN PLACAS DE AGAR](#).

Al día siguiente se tomaron colonias de esta placa y se suspendieron en 1 mL en buffer de fosfatos. Se midió la densidad óptica a 600 nm.

Se prepararon 4 suspensiones, la primera de *E. coli* ($DO_{600nm} = 0.6$) + Bromuro de Etidio [40 μ M] llevando a un volumen final de 1 mL con Buffer de fosfatos (20 mM, pH 7.4) para el tiempo cero y para el resto suspensiones *E. coli* ($DO_{600nm} = 0.6$) + Fosfomicina [250 μ g/mL] + Bromuro de Etidio [40 μ M] llevando a volumen final de 1 mL con Buffer de fosfatos (20 mM pH 7.4) para el tiempo dos, cuatro y seis.

Se etiquetaron definiendo el tiempo que estuvieron en contacto con la fosfomicina dentro de la suspensión.

A partir de estas suspensiones stock se realizaron tres microdiluciones para cada uno de los conteos, de manera que se tuvieran concentraciones finales 100 veces más diluidas (Figura 14).

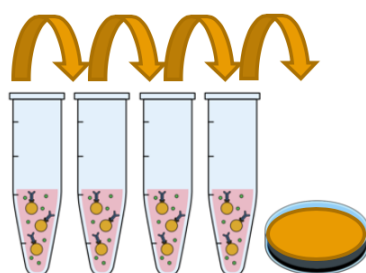


Figura 14. Representación de las microdiluciones realizadas

Para la suspensión a las cero horas, esta se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad para que la muestra estuviera en contacto con la tinta y se comprueba que esta no daña al cultivo.

Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en el buffer de fosfatos.

Finalmente se realizó a esta nueva suspensión las microdiluciones mencionadas a continuación y se etiquetó con la leyenda “tiempo 0”.

Para las suspensiones de 2, 4 y 6 horas se realizó un tratamiento similar antes de realizar las microdiluciones, con la diferencia de que a estas se les agregó fosfomicina. Así el cultivo tiene menor tiempo de contacto con la tinta y solo tienen un tiempo específico en contacto con el antibiótico, de tal forma que el conteo en las placas sea comparable con los otros métodos realizados.

Al cabo de 2 horas se tomaron 10 microlitros de la suspensión stock y se llevó a 1 mL, se realizaron las microdiluciones tres veces en total de la misma manera, tomando 10 microlitros y llevando a 1 mL, para finalmente tomar de la última de ellas 200 microlitros y se depositaron en la placa con el medio sólido y se dispersó uniformemente con un asa triangular estéril.

La placa se cerró y se aisló con plástico film, se etiquetó con la leyenda "tiempo 2,4 y 6 horas" respectivamente.

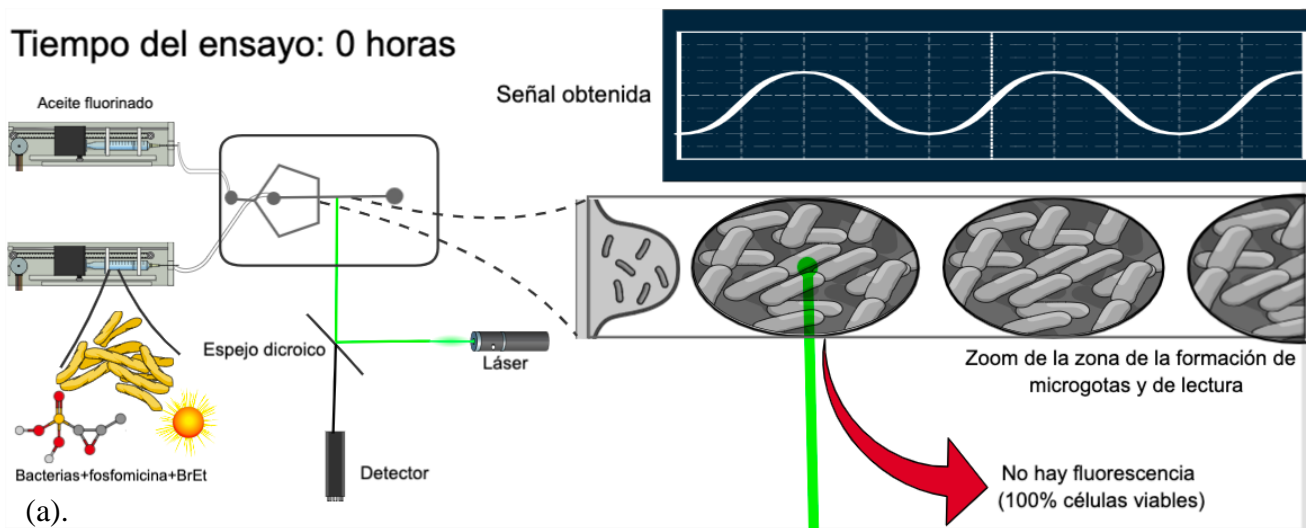
Posteriormente se metieron a la incubadora (IC 103 CW, Yamato Scientific, China) al mismo tiempo, durante 24 horas a 37 °C y concluido este tiempo, se realizó el conteo de colonias en cada placa en función del tiempo y finalmente se realizaron los cálculos necesarios tomando en cuenta las microdiluciones y la cantidad de volumen agregado a la placa para determinar la cantidad total de UFC/mL a lo largo de las 6 horas de estudio.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

CONTEO CELULAR MEDIANTE LA TÉCNICA LIF

Los ensayos de conteo empleando fluorescencia inducida por láser de la suspensión de células de *E. coli* con fosfomicina, se realizaron de acuerdo a los criterios interpretativos basados en la concentración de los espectros de acción de la fosfomicina con *E. coli*, indicados por las Normas de Rendimiento para las Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos.^[50] Además, se agregó bromuro de etidio como marcador fluorescente de células no viables, de tal forma que conforme pasa el tiempo se puede observar mediante la detección de señales fluorescentes, la acción antimicrobiana de la fosfomicina en *E. coli* (Figura 15).

Tiempo del ensayo: 0 horas



Tiempo del ensayo: 4 horas

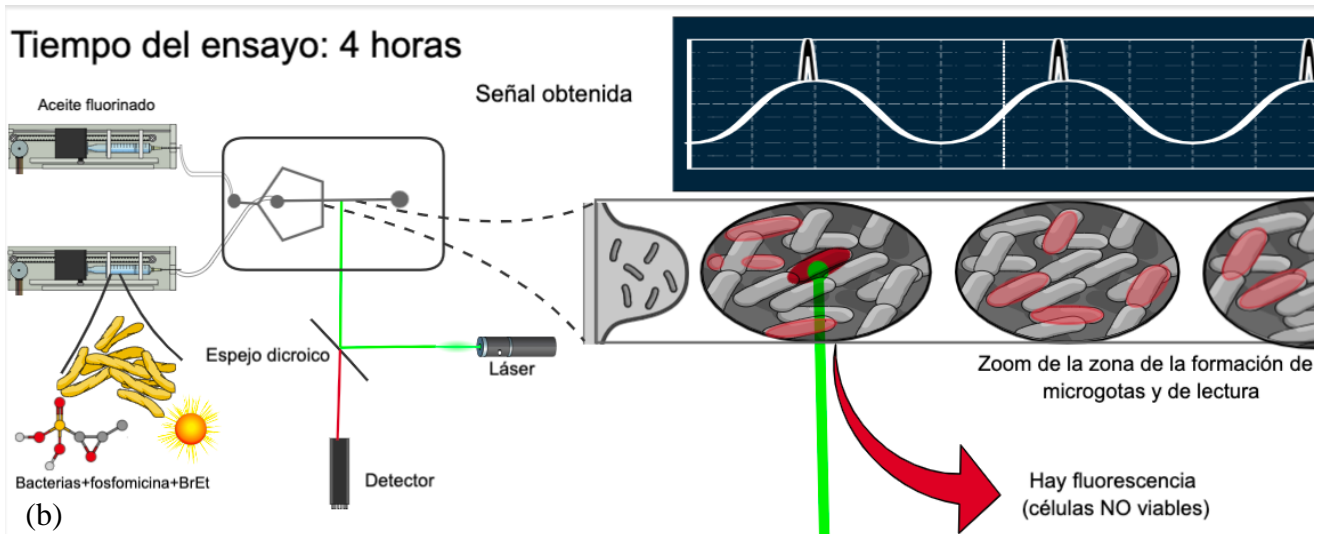


Figura 15. Esquematización de sistema LIF (a) A 0 horas del ensayo en donde las células son 100% viables. (b) A las 4 horas de ensayo observando células no viables en el cultivo.

Los resultados del conteo celular mediante LIF se compararon con los obtenidos con el método de dilución en agar y microscopía de fluorescencia empleados como métodos de referencia.

Los controles positivos se realizaron empleando una suspensión de células 100% no viables producidas por tratamiento de calentamiento a una concentración conocida y agregando el marcador fluorescente BrEt. Esto con la finalidad de determinar el número máximo de células no viables detectadas en las microgotas mediante el método LIF y compararlo con el número de bacterias que se contabilizan a lo largo de los ensayos con las suspensiones en contacto con fosfomicina durante 6 horas para determinar la eficiencia de la técnica LIF.

Es importante mencionar que el tratamiento por calor no destruye (disgrega) las células, pero si produce un 100% de células teñidas con BrEt.

En la Figura 16 se muestran las señales obtenidas a lo largo de un minuto en los ensayos de controles positivos con cultivos 100% no viables tratadas por calentamiento y se registran de manera gráfica mediante el programa "peaks". En estos se puede observar cada una de las microgotas con una intensidad apenas por encima de las 0.1 a.u. pero con picos intensos de entre 0.2 y 0.9 a.u. correspondientes a una o varias células fluorescentes que pasaron por el punto focal del láser.

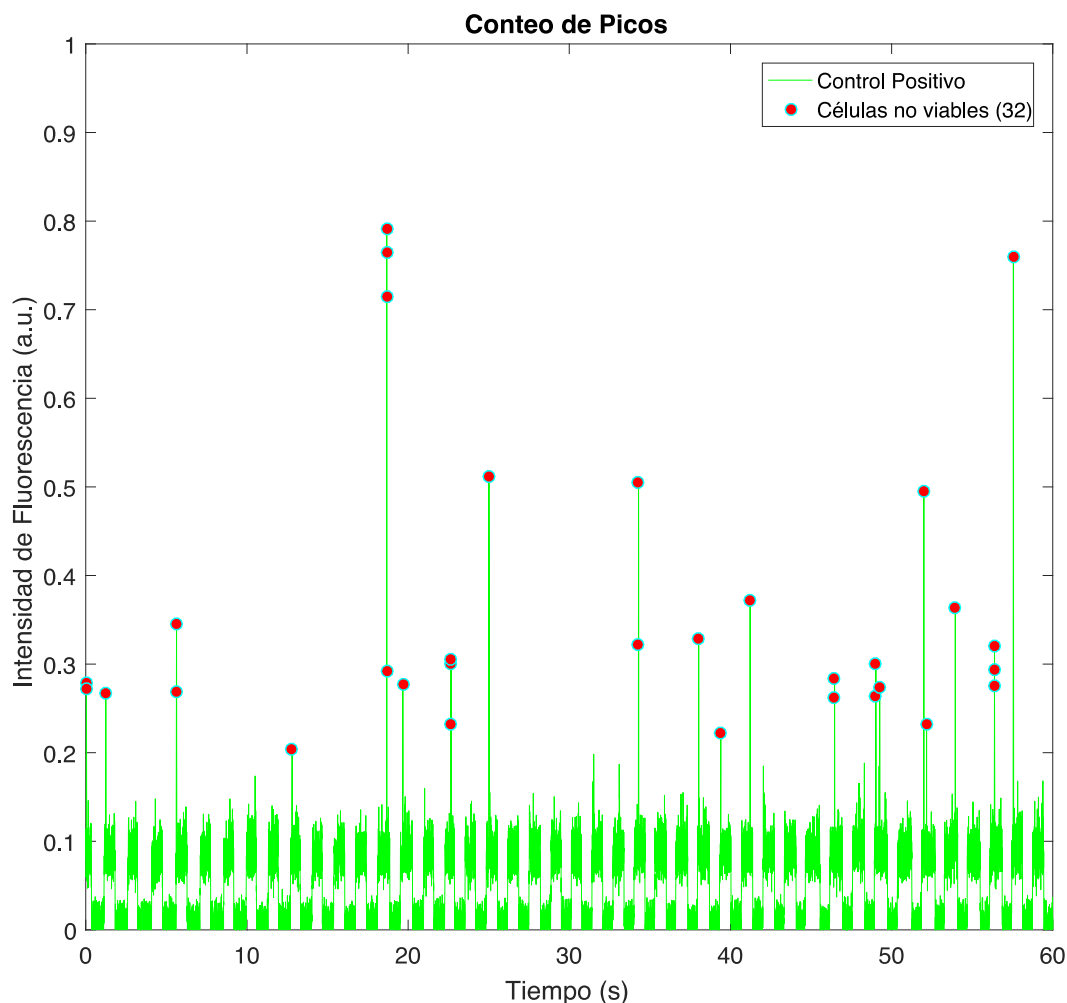


Figura 16. Conteo de 32 picos correspondientes a células 100% no viables (control positivo) en microgotas detectadas en el punto focal del laser durante un minuto.

Se tiene un promedio de 47 microgotas, con un máximo de 32 señales totales en los controles positivos, por minuto, los cuales se compararon posteriormente con los ensayos de conteo celular de *E. coli* en contacto con la fosfomicina en función del tiempo, con el fin de identificar la eficiencia del conteo a lo largo de un estudio de 6 horas.

Posteriormente se realizaron 3 ensayos en donde se encapsularon células de *E. coli* junto con fosfomicina y bromuro de etidio en las concentraciones indicadas anteriormente, en las microgotas y se realizaron los conteos mediante LIF. En la siguiente figura (Figura 17) podemos observar la tendencia en aumento del número de células no viables en función del tiempo al estar en contacto con la fosfomicina dentro de las microgotas. También se puede observar que los cambios más abruptos de esta tendencia van de las cero a las seis horas

y de las seis a las veinte horas la pendiente del cambio es menos pronunciada, además podemos comparar con el máximo de células encontradas en el control positivo, es decir aquel con células 100% no viables.

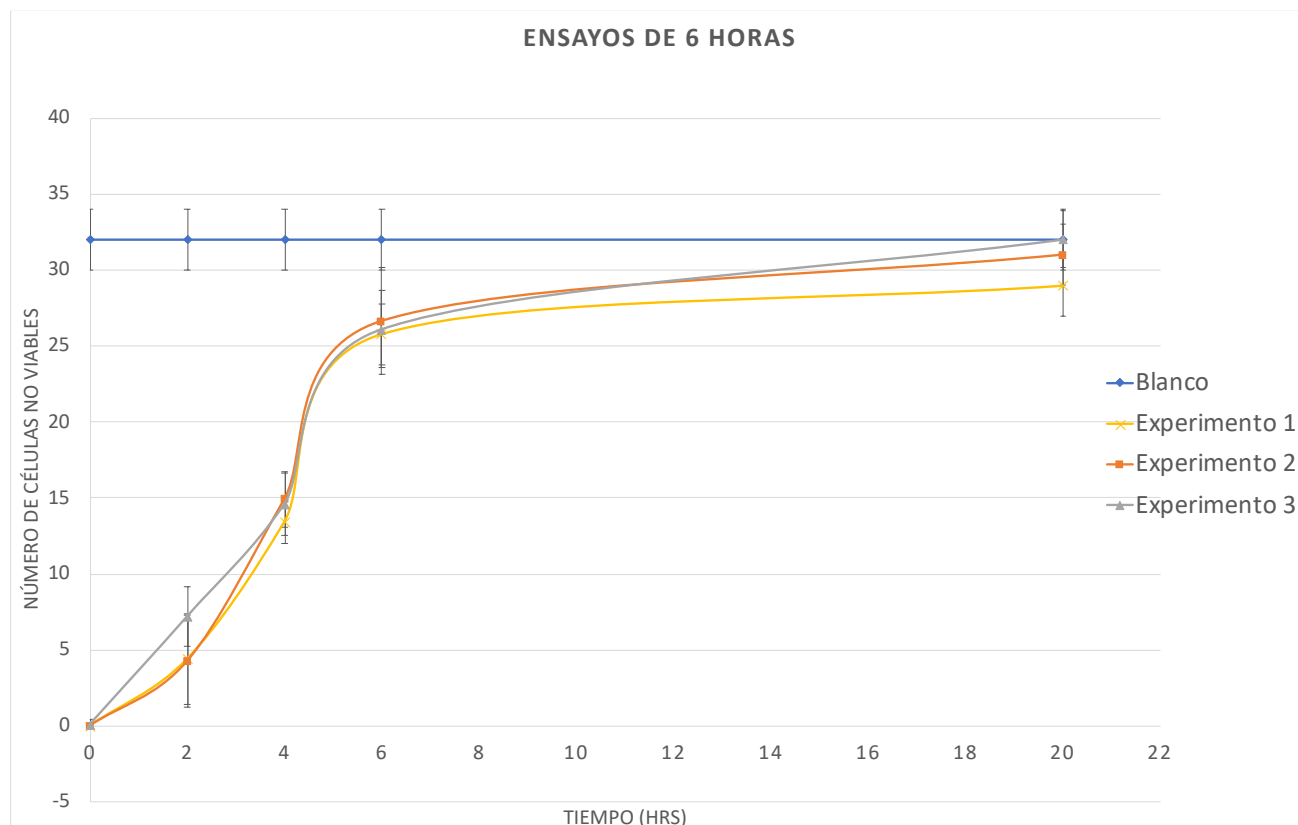


Figura 17. Conteo de células no viables en función del tiempo (6 horas en contacto con fosfomicina).

Además del poder de detección, el sistema tiene ventajas como la automatización de la recolección de datos, rapidez y conteo en tiempo real, así como la disminución de la contaminación de la muestra. Para los siguientes ensayos el flujo se mantuvo constante en 80 $\mu\text{L/h}$ para el agua y el aceite.

En el primer ensayo las lecturas de detección se realizaron a las 0, 2, 4 y 20 horas para comprobar el avance de la acción antibiótica de la fosfomicina con las células. Las mezclas contenían también bromuro de etidio para ir tiñendo a las células no viables. Para cada tiempo se tomó el promedio del conteo de 10 muestras cada una de un minuto de duración.

Se observó una tendencia de aumento de la detección de señales de células no viables en función del tiempo al estar en contacto con el antibiótico.

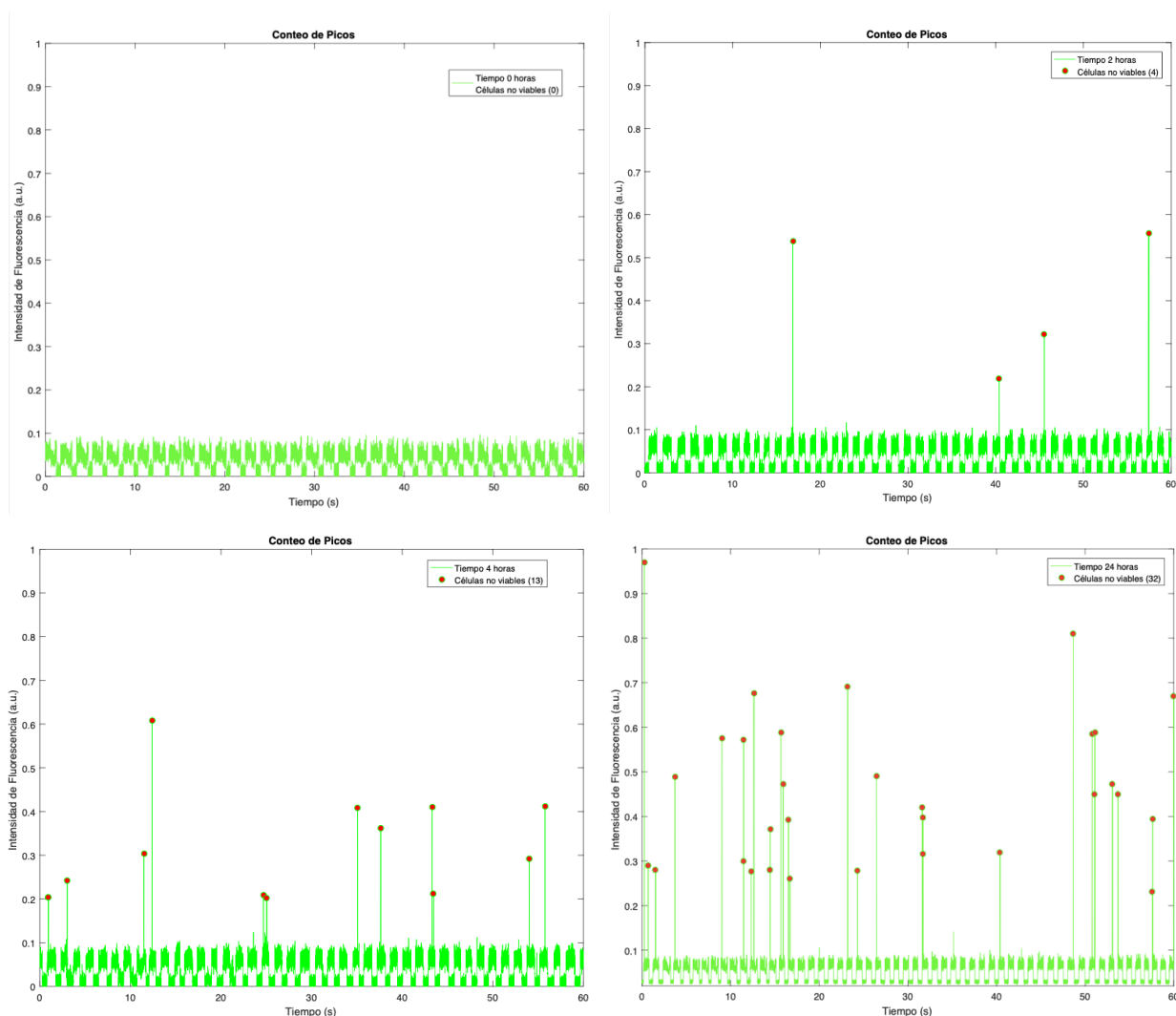


Figura 18-21. Ejemplos de señales de LIF a diferentes horas de un ensayo de susceptibilidad antibiótica de células de *E. coli* no viables tratadas con fosfomicina

A las 20 horas del ensayo se tuvo un promedio de picos detectados igual al obtenido con los controles positivos (100% de células no viables). De tal forma que, a ese tiempo todas las bacterias en presencia de fosfomicina eran no viables. En el [ANEXO VII](#) se muestran las señales LIF adquiridas en cada tiempo del Ensayo 1.

Para poder confirmar lo observado se repitió el procedimiento dos veces más, bajo las mismas condiciones. Un cambio importante es que el tiempo final se redujo a 6 horas ya que

en ese periodo se puede observar un número de señales muy cercano o igual al obtenido con los controles positivos de 100% células no viables.

Para el caso de los ensayos 2 ([ANEXO VIII](#)) y 3 ([ANEXO IX](#)) también se observaron aumentos en el número de señales detectadas al avanzar el tiempo de la interacción del antibiótico con las células de *E. coli* (Figuras 22-25 y 26-29).

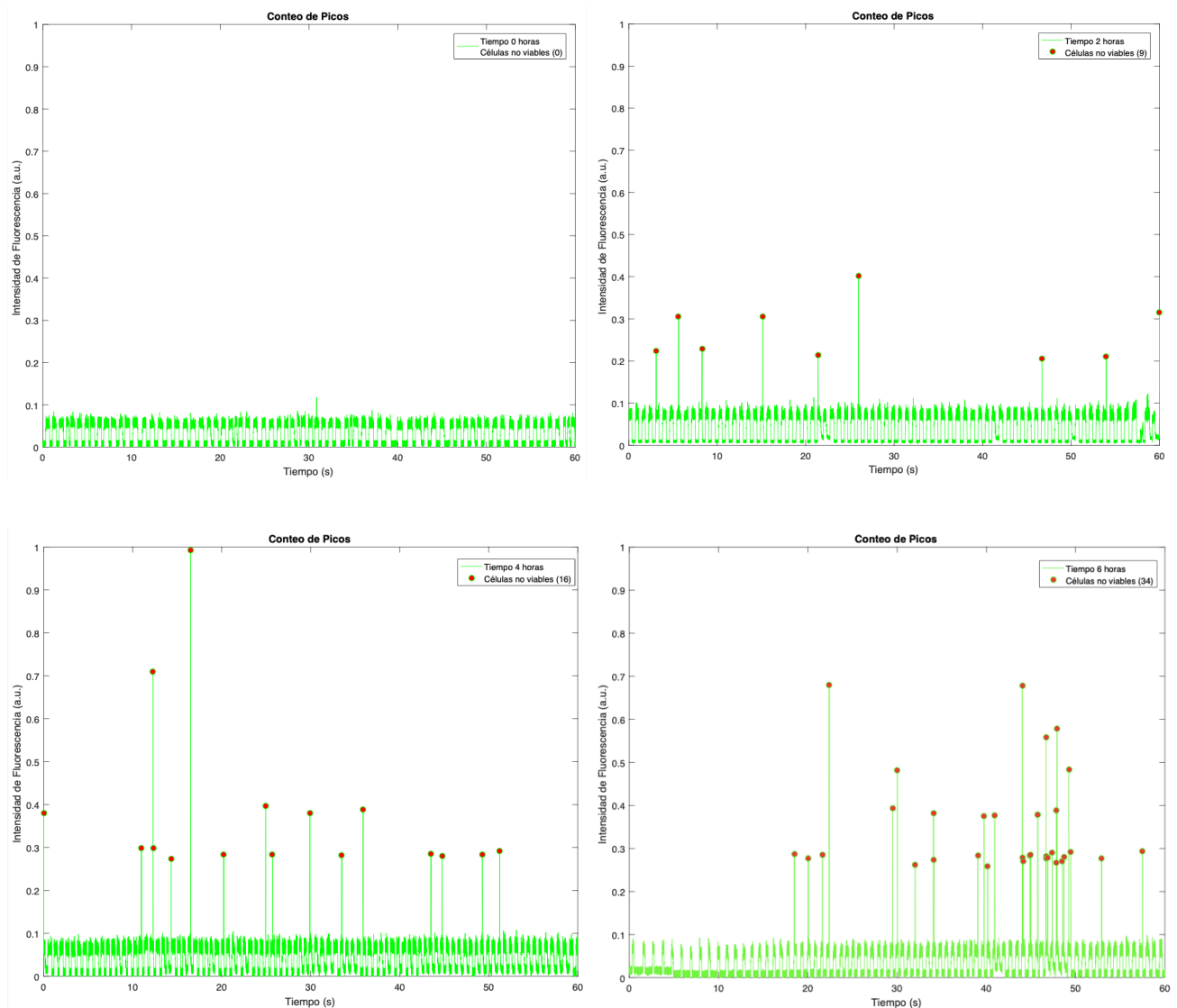


Figura 22-25. Ensayo de conteo de células no viables tratadas con fosfomicina en función del tiempo. (Ensayo 2).

A las 6 horas del ensayo se detectó un 95.6% de señales de células no viables, con respecto a los controles positivos de cultivos con el 100% de células no viables.

En este ensayo la formación de microgotas fue más estable esto debido a la alineación y atenuación correcta del “spot” del láser de tal forma que en esta ocasión no se dañó el microchip durante las lecturas. Además, se encontró una manera más eficiente para poder agitar la suspensión de células sin perturbar la formación de las microgotas.

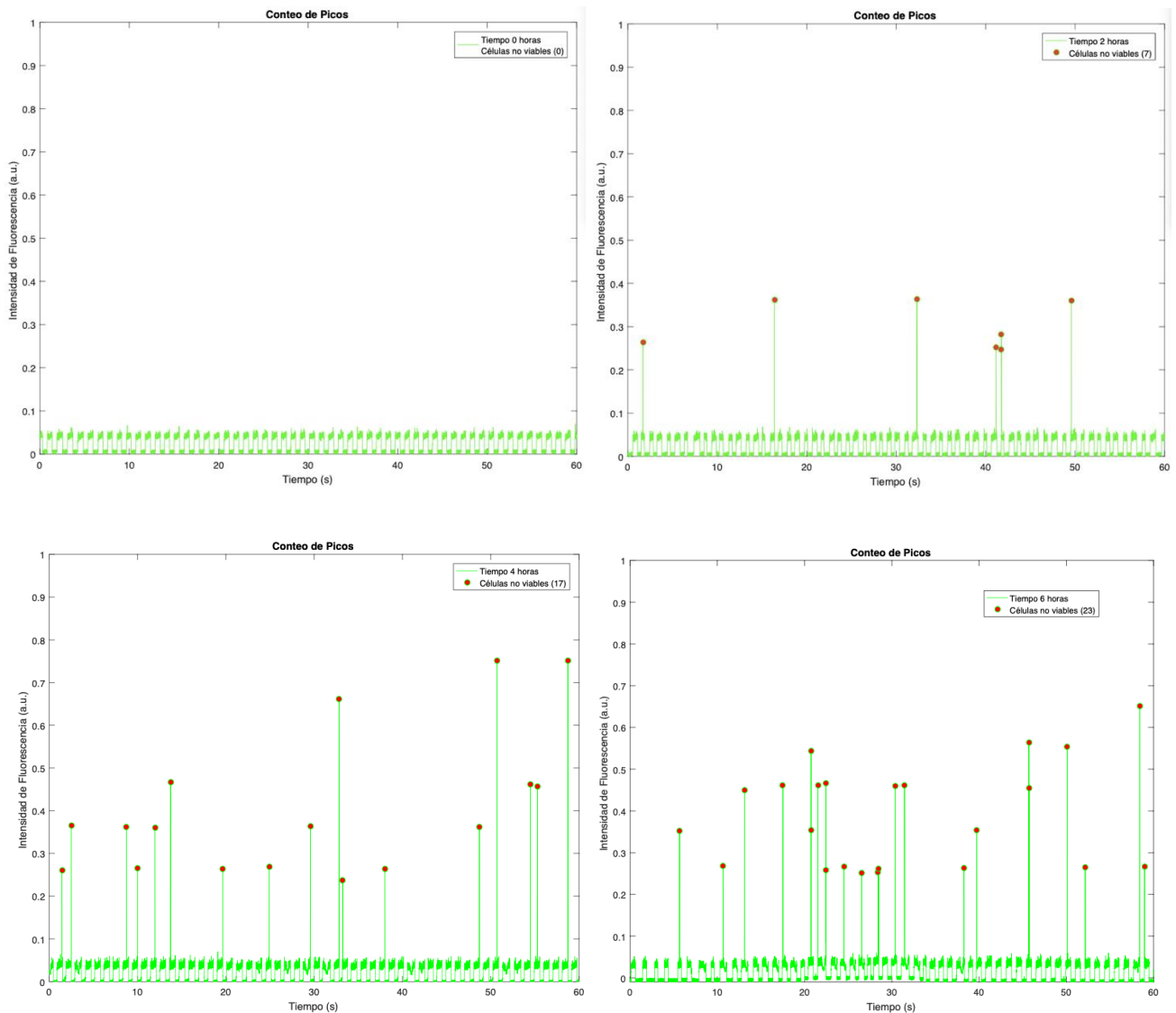


Figura 26-29. Ensayo de conteo de células no viables tratadas con fosfomicina en función del tiempo. (Ensayo 3).

En el último ensayo se observó una tendencia muy similar a los ensayos anteriores en donde el número de células no viables va en aumento en función del tiempo

Al igual que en los ensayos anteriores se puede observar que a las 4 horas de estudio se detectan más del 50% de células no viables comparado con los controles de células 100% no viables.

A las 6 horas de estudio se llegó a una detección del 93.6% de células no viables, este porcentaje comparado con el control positivo.

Como se puede observar el número de células no viables detectadas, en el microchip con ayuda del software, aumenta en función del tiempo en tendencias similares en cada uno de los ensayos realizados (Tabla 2). La formación de microgotas de manera estable y bajo condiciones exactamente iguales asegura que al generar gotas de tamaños similares también tendrán por estadística, un conteo homogéneo a lo largo de cada uno de los estudios.

Tabla 2. Lectura promedio de señales de células no viables en ensayos de 24 horas.

Tiempo (h)	0	2	4	6	20
Experimento 1	0	4±3	13±1	26±2	32±2
Experimento 2	0	4±3	15±2	27±4	31±2
Experimento 3	0	7±2	15±2	26±3	29±3

La formación de microgotas fue estable y el número de bacterias en cada lectura fue menos afectado por la decantación de estas en la manguera y en la jeringa que las contienen.

Hablando en porcentajes podemos decir que en 4 horas se llega al 50% del estudio el cual es un tiempo extremadamente corto a diferencia de métodos tradicionales de determinación de viabilidad celular donde este puede llegar a ser de 16, 24 o hasta 48 horas. A las 6 horas el ensayo detecto casi el 100% de células no viables en la microgota, basado en los controles positivos, a diferencia de los tiempos de incubación en métodos tradicionales, además de que esta detección se realiza en tiempo real (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de detección de células no viables en ensayos de 20 horas con respecto al promedio en blancos positivos.

Tiempo (h)	0	2	4	6	20
Experimento 1 (%)	0.0	15.8	48.2	92.6	104.1
Experimento 2 (%)	0.0	15.3	53.5	95.6	111.3
Experimento 3 (%)	0.4	25.8	52.4	93.7	114.9

Previamente se variaron algunos parámetros como el flujo de las fases dentro del dispositivo de microfluídica y el tiempo de agitación del cultivo antes de su inyección para así encontrar los parámetros adecuados para los ensayos y como estos en las mediciones.

Se determinó que es importante de conservar los flujos de agua y aceite que se introduce al microchip en cada uno de los ensayos tanto en los controles como en los ensayos con fosfomicina para mantener constante el número de microgotas por minuto para que los conteos sean comparables.

Un control en donde se variaron los flujos de agua y aceite que se introducen al microchip mostró que a mayor flujo se detecta menor cantidad de señales. Esto debido a que conforme aumenta el flujo se disminuye el tamaño de las microgotas de tal forma que hay menor cantidad de células en cada microgota (Figura 30).

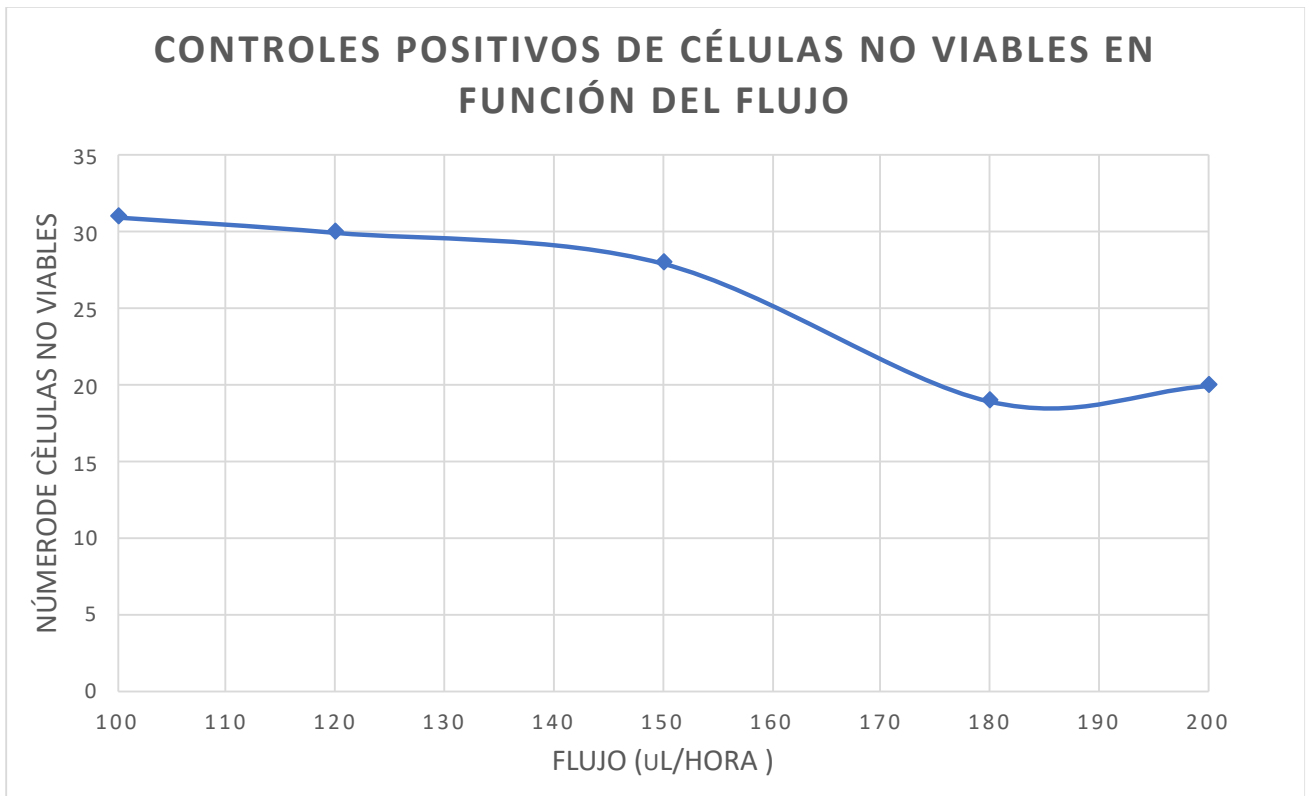


Figura 30. Número de señales de células no viables detectadas por LIF utilizando microgotas cargadas con células 100% no viables (control positivo) durante 1 min de adquisición en función del flujo del agua y del aceite.

Otra de las cuestiones importantes para el correcto conteo de las células en las microgotas es la agitación constante de la muestra dentro de la jeringa ya que las células tienden a asentarse de tal forma que la cantidad de células que se detecta va disminuyendo con el tiempo. (Figura 31)

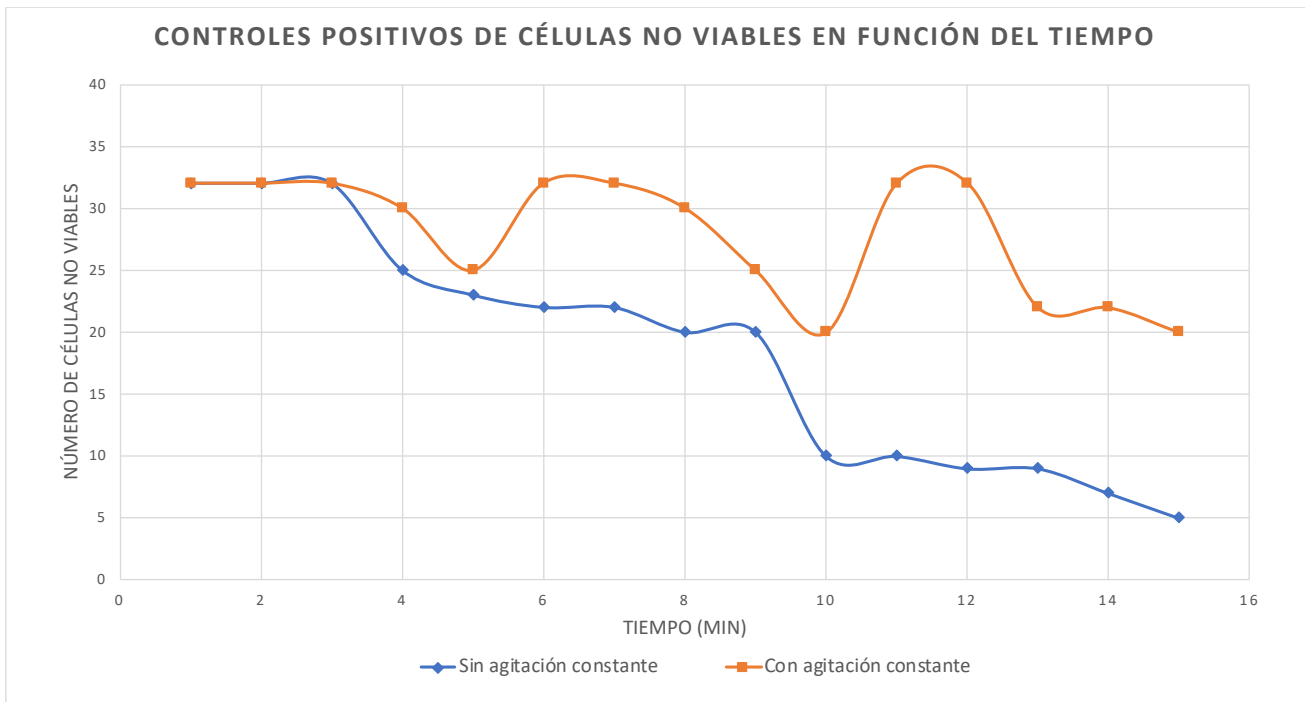


Figura 31. Número de señales de células no viables detectadas por LIF para los controles positivos con una suspensión de 100% células no viables en función del tiempo con y sin agitación constante.

Se registró que a los 3 minutos de no agitarse la muestra hay una decantación de las células en un 21.87 % y a los 5 minutos de 31.25 %. De tal forma que se decidió agitar cada 5 minutos esto con la finalidad de obtener la mayor cantidad de lecturas sin perturbar el flujo que afecta a la formación de microgotas en el dispositivo.

Si la muestra no se agita en 10 minutos hay una decantación de células en un porcentaje de 68.75 % y a los 15 minutos de 84.375% por lo cual se descartan los conteos realizados en esas condiciones.

Una de las desventajas de la agitación es la perturbación del flujo dentro del microcanal de tal forma que después de cada agitación hay que esperar un momento que se estabilicen los flujos y haya una correcta formación de las microgotas.

Para el caso de los controles positivos además de hacer lecturas con las células no viables recién tratadas, se midieron después de 6 horas para comprobar que no variaba la cantidad

de células no viables con respecto al tiempo ya que se trata de una suspensión de células 100% no viables.

Si el número de células variara con respecto al tiempo se podría deber a una disgregación total de la célula evitando que se pudiera detectar. Sin embargo, no es el caso (Figura 32).

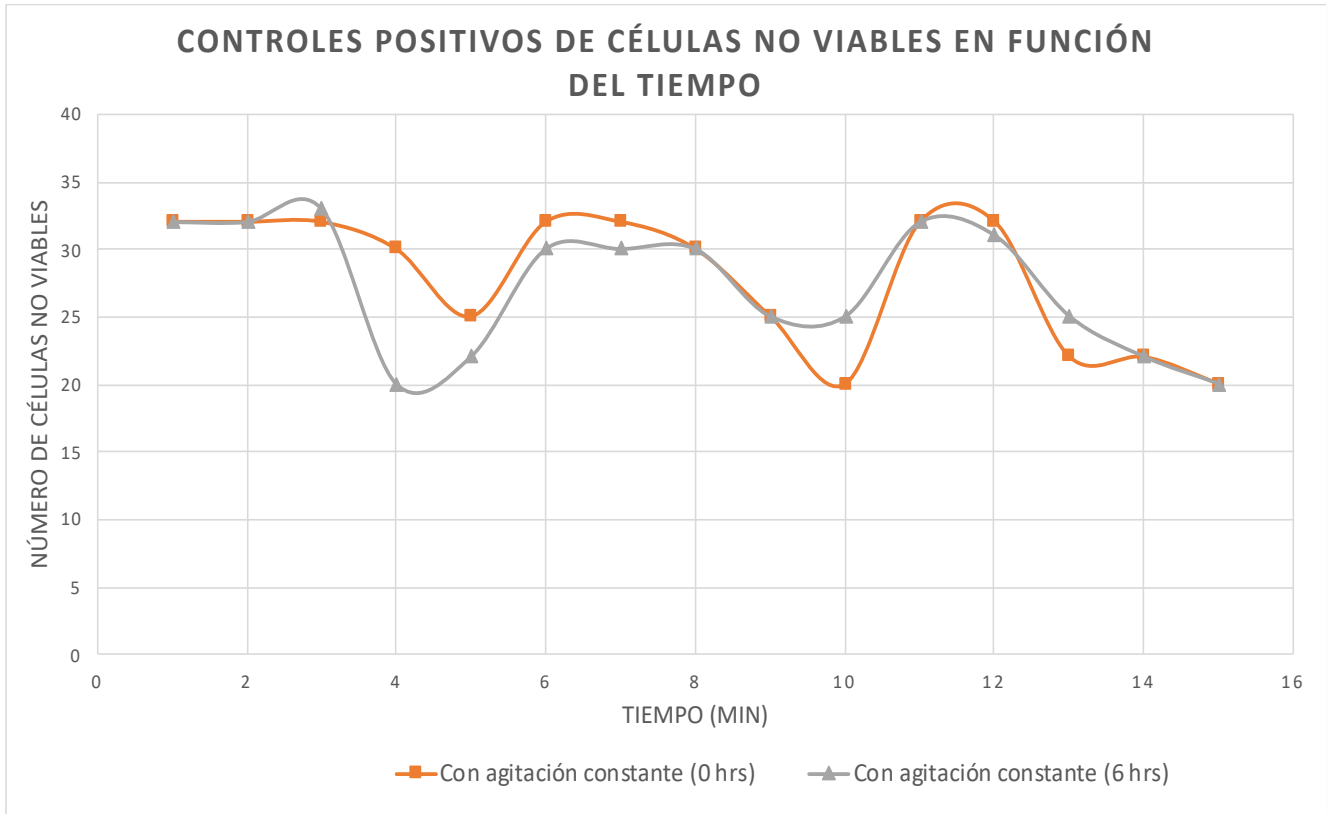


Figura 32. Controles positivos con agitación constante de con una suspensión de células 100% no viables medidas durante 15 cuando recién se cargaron en la jeringa (0 h) y medidas después de estar 6 horas en la jeringa (6 h).

La cantidad máxima de señales de células no viables acumuladas durante un minuto en los controles positivos es de 32 células no viables y el promedio de células no viables detectadas en una suspensión de células 100% no viables es de 27.86 considerando la agitación cada 5 minutos. Sin agitación constante hay un número promedio 18.53 células no viables detectadas de tal forma que la eficiencia sin agitación decae un 33.49%.

También se realizaron ensayos control en donde se encapsularon en cada microgota bacterias viables en contacto solamente con el bromuro de etidio para constatar que la tinta

no dañe a las células y así asegurar que el aumento de células no viables en ensayos posteriores se deba únicamente al antibiótico que se empleará. Las mediciones de estos controles con bromuro de etidio se realizaron en un periodo de 6 horas tomando lecturas cada 2 horas y se pudo constatar que las células en contacto únicamente con el bromuro de etidio no se ven afectada es este tiempo (Figura 33).

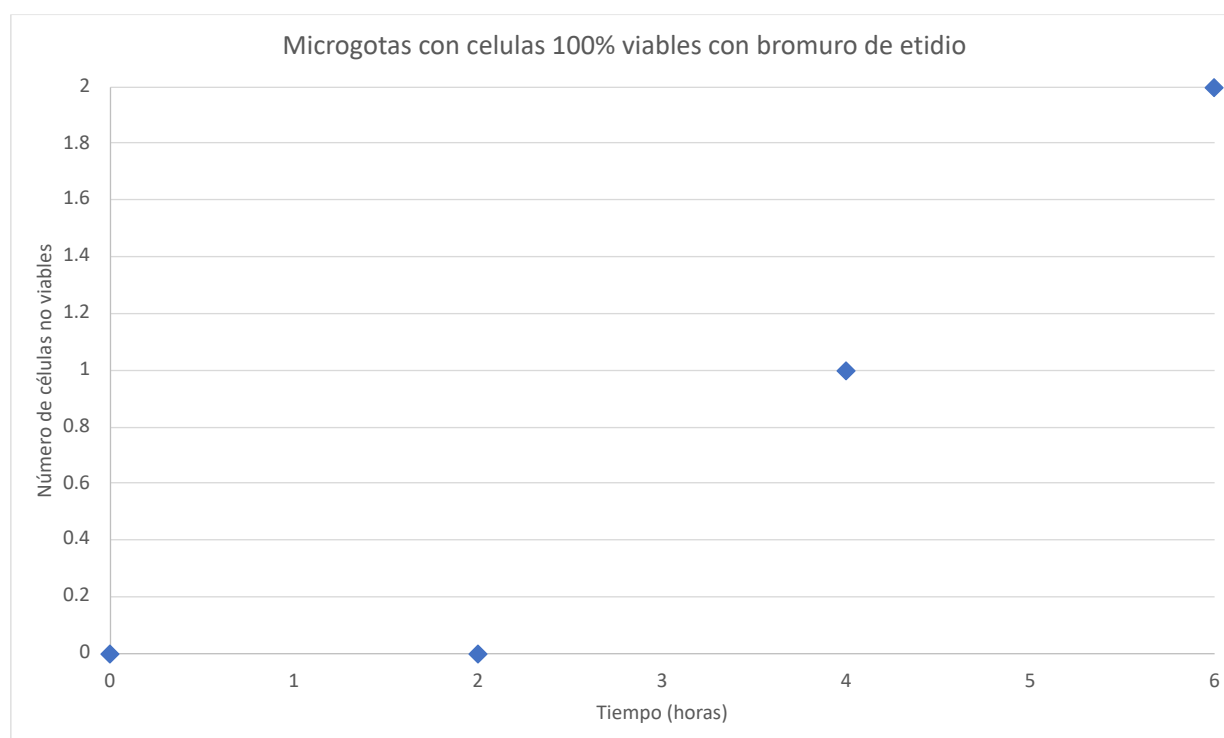


Figura 33. Controles positivos con agitación constante de con una suspensión de células 100% viables con bromuro de etidio durante 6 horas.

Con estos controles de células no viables podemos estimar un máximo posible de señales obtenidas de células no viables dentro de las microgotas, cuando la misma concentración de células se ponga en contacto con fosfomicina a lo largo de varias horas y todas las células mueran.

ENSAYOS DE CONTEO CELULAR DE *E. COLI* BL21 MEDIANTE TÉCNICAS DE CONTEO TRADICIONALES

Se realizan ensayos de conteo empleando técnicas ya conocidas como el conteo por microscopía de fluorescencia y el conteo en placas para comparar y determinar la eficiencia del método LIF empleado en este proyecto con respecto a estas.

Además, se realizaron algunos controles negativos para asegurar que el método empleado para el manejo de las células dentro de las microgotas no afecte su viabilidad al estar en contacto con la tinta fluorescente o el buffer en el que se encuentran suspendidas, sino únicamente sea efecto de la fosfomicina.

TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO

Los controles positivos se realizaron de la misma manera que los ensayos de control de LIF con una muestra de células 100% no viables para identificar el promedio máximo de células no viables en una microgota.

Los controles negativos se realizaron en un lapso de 6 horas al igual que los ensayos LIF y además las suspensiones se sometieron al mismo tratamiento y condiciones idénticas a las de LIF (Tabla 4).

En estos ensayos se realizaron algunos controles con el fin de determinar y comprobar que el efecto del aumento del número de células no viables en los ensayos anteriormente descritos son únicamente efecto de la fosfomicina y no de la tinta fluorescente empleada o del buffer de fosfatos que las contiene.

Las diferencias entre esta técnica y LIF son el tipo de fuente de luz que excita a la muestra, el área de estudio de la muestra y que la muestra no se encuentra bajo un flujo constante, sino que más bien las microgotas con la muestra se almacenan dentro del microchip durante el ensayo.

Tabla 4. Conteo en ensayos de control mediante microscopía de fluorescencia.

Blanco	
Células 100% no viables	2641±381
Células no viables en presencia de bromuro de etidio	60±14

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos esperar que se alcance el 100% del ensayo cuando haya un conteo de células no viables cercano al promedio obtenido en el control positivo que fue de 2641 ± 381 células no viables dentro de la microgota.

Para el caso del control negativo podemos observar que a las 6 horas del ensayo no hay resultados en los conteos realizados que nos indiquen que las células son afectadas considerablemente con la presencia del bromuro de etidio en las microgotas.

EXPERIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Posterior a los ensayos control se realizan los ensayos de conteo durante 6 horas, empleando las mismas condiciones que en los controles anteriores y en los ensayos LIF, de tal forma que podamos compararlos.

En estos experimentos se encapsulan las células en las microgotas durante 6 horas realizando un conteo en el tiempo cero y cada dos horas hasta completar seis horas de análisis.

Se toman fotografías de diferentes microgotas con el filtro especificado en el apartado de procedimiento experimental y se hacen los conteos del número de células no viables dentro de estas, cada dos horas empleando un programa de formato de imágenes.

En estos ensayos podemos observar que el número de células no viables va en aumento en función del tiempo al estar en contacto con la fosfomicina (Figura 34).

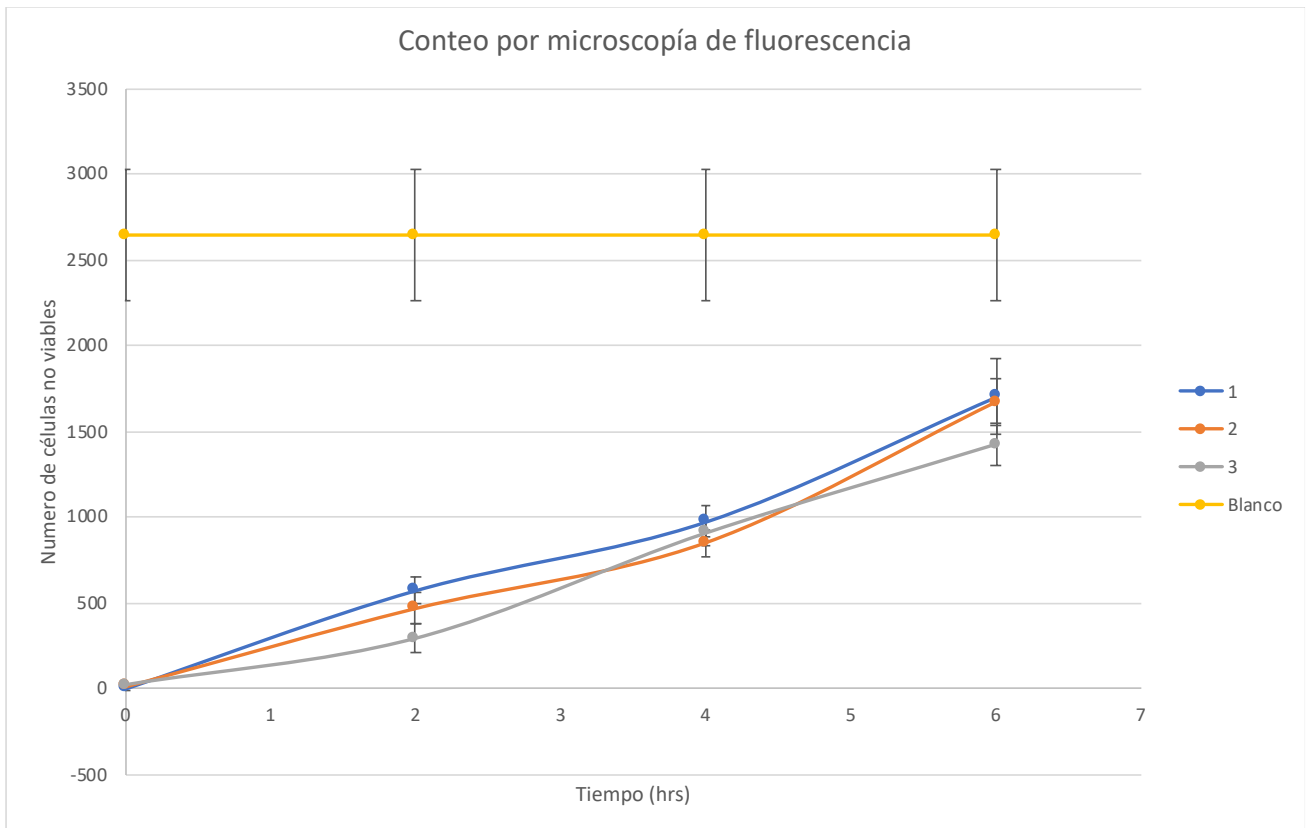


Figura 34. Ensayos de conteo de células no viables empleando microscopía de fluorescencia.

Con este ensayo podemos constatar lo que sucede dentro de las microgotas a lo largo del estudio, y como se afecta su viabilidad al estar en contacto con el antibiótico como se puede ver detalladamente en la Tabla 5.

Tabla 5. Conteo en ensayos empleando células viables en contacto con fosfomicina y bromuro de etidio mediante microscopía de fluorescencia.

Experimento	Tiempo 0 h	Tiempo 2 h	Tiempo 4 h	Tiempo 6 h
1	2±3	575±76	974±94	1701±221
2	9±9	465±92	850±77	1670±131
3	20±13	292±84	905±69	1423±123

Al estar marcadas con el bromuro de etidio las señales color rojo aumentan y se contabilizan realizando un contraste de color y empleando un software que contabiliza cada una de ellas (Figura 35).

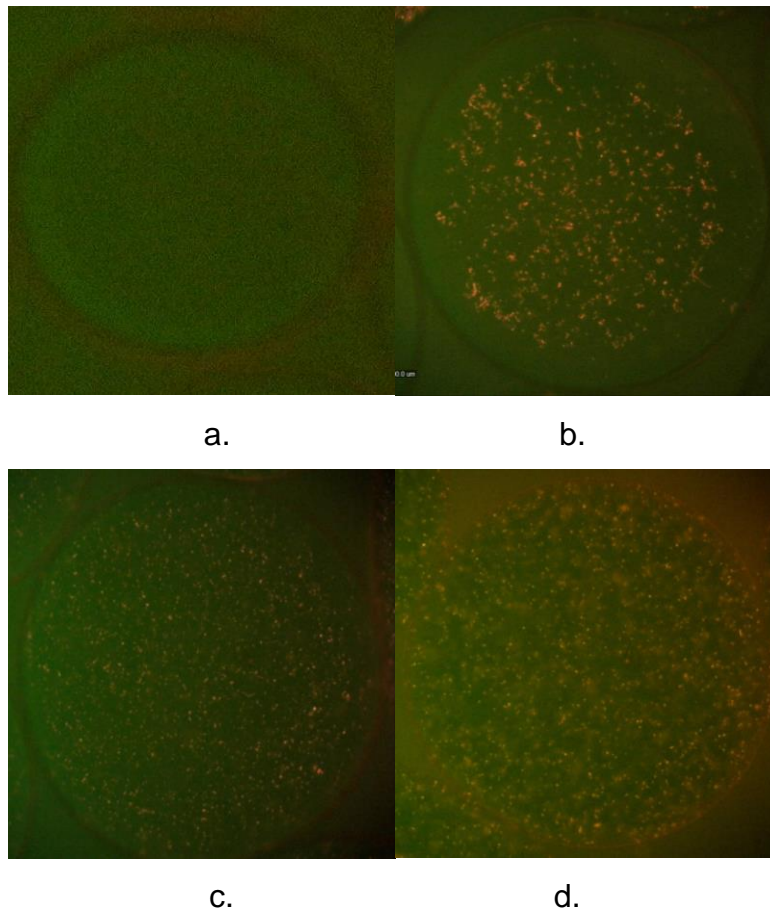


Figura 35. Aumento de células no viables en función del tiempo al contacto con fosfomicina. (a) tiempo cero. (b) tiempo dos. (c) tiempo cuatro. (d) tiempo seis.

El número de células contabilizadas es mayor en comparación con LIF ya que en el caso de la técnica de microscopía de fluorescencia se realiza el conteo en toda el área de la microgota y en el caso de la técnica LIF se realiza en un punto específico a lo largo de cada una de las microgotas.

Con el método de microscopía de fluorescencia pudimos observar el comportamiento de las bacterias en contacto con la fosfomicina y el bromuro de etidio dentro de las microgotas ya que el método LIF es una técnica donde las microgotas se desplazan a altas velocidades por los canales del microchip y no es posible observar su comportamiento durante el ensayo de conteo.

Una de las ventajas de ese método es su área de estudio ya que se realiza en toda el área de la microgota por lo que llega a ser posible detectar el 100% del cultivo en cada una de las microgotas. En el caso de LIF el conteo se realiza en un punto en donde se localiza el “spot” del láser empleado (Figura 36).

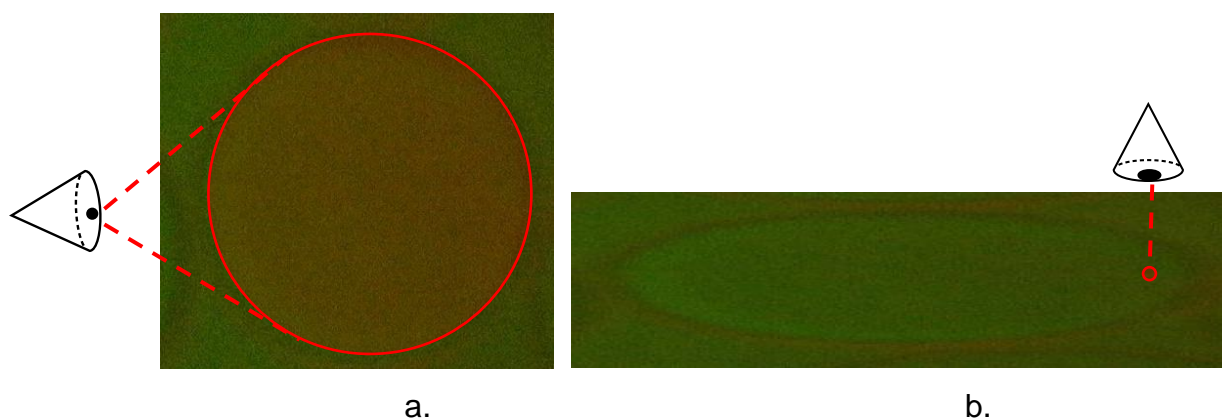


Figura 36. Área de detección con (a) Método de Microscopía de Fluorescencia y (b) LIF.

Una de las desventajas del método de microscopía de fluorescencia es que las microgotas al estar almacenadas en el microchip empiezan a aglomerarse con el tiempo e incluso las bacterias empiezan a depositarse en el fondo de la microgota y a aglomerarse entre ellas de tal forma que el conteo de cada una de las células a lo largo del tiempo resulta imposible, además el conteo no se realiza en tiempo real ya que se debe hacer un tratamiento de cada una de las fotografías tomadas.

El porcentaje del número de células no viables detectadas al tiempo seis, es decir al final del ensayo es un 60.51% del total de células no viables que se pueden detectar comparandolo con el ensayo de control positivo del cultivo de células 100% no viables, esto puede deberse a la decantación de las bacterias dentro de las microgotas a lo largo del tiempo.

TÉCNICA DE CONTEO EN PLACAS

Este método de conteo es diferente a las técnicas anteriores por varias razones, entre ellas el tiempo para obtener un resultado es mucho mayor, doce horas como mínimo. Además, el

conteo se realiza contabilizando unidades formadoras de colonias ya que en esta técnica no es posible el conteo de cada una de las células.

CONTROLES NEGATIVOS

Para comprobar que el medio de cultivo no está contaminado se realizó un control en una placa sin muestra, otra placa con una muestra de buffer en el cual se suspenden las bacterias para comprobar que ese no este contaminado y otro con bacterias suspendidas en el buffer y en contacto con bromuro de etidio para observar si esta tinta daña de manera considerable a las células.

Además, se realizó un cultivo con células 100% no viables al igual que en los métodos anteriores para comparar los resultados en todos los métodos empleados.

Para el caso de las placas de buffer y de medio de cultivo solo no se observaron UFC de tal forma que podemos concluir que ni el medio de cultivo ni el buffer se encontraban contaminados.

Por otro lado, se sembraron dos suspensiones de células a la misma concentración de los ensayos anteriores, a uno de ellos se le adicionó el bromuro de etidio de tal forma que se pueda observar si esta tinta daña de alguna manera a las células, sin embargo, los conteos de UFC fueron muy similares por lo que se puede concluir que el bromuro de etidio no interfiere con los ensayos de viabilidad celular tal y como se vio con los métodos empleados anteriormente.

En el caso de la placa con el cultivo de células 100% no viables no se contabilizaron UFC de tal forma que el control también coincide con los resultados esperados.

EXPERIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONTEO DE PLACAS

Para el caso de este ensayo los resultados esperados son distintos a los anteriores ya que en este se contarán células viables que son capaces de crecer y reproducirse en el medio de cultivo.

Se esperaron 16 horas para poder contabilizar los UFC de las placas, y cada uno de los cultivos se sometieron a las mismas condiciones de trabajo, así como al mismo número de diluciones.

La idea en este método es que las células están en contacto con la fosfomicina y las tintas fluorescentes a diferentes intervalos de tiempo. El primer cultivo se siembra al instante de tal forma que no tiene en realidad contacto con el antibiótico, el segundo se encuentra en contacto dos horas, el siguiente cuatro y el último seis horas.

Es de esperarse que el cultivo que tienen mayor tiempo en contacto con el antibiótico (seis horas) sea el que al finalizar el ensayo contenga el menor número de UFC y aquel que casi no tuvo contacto con el antibiótico sea el de mayor numero de UFC en el conteo.

En los ensayos se puede observar que las unidades formadoras de cultivo (UFC) disminuyen en función del tiempo, debido a que las células suspendidas en el cultivo permanecen cada vez más tiempo en contacto con la fosfomicina (Figura 37).

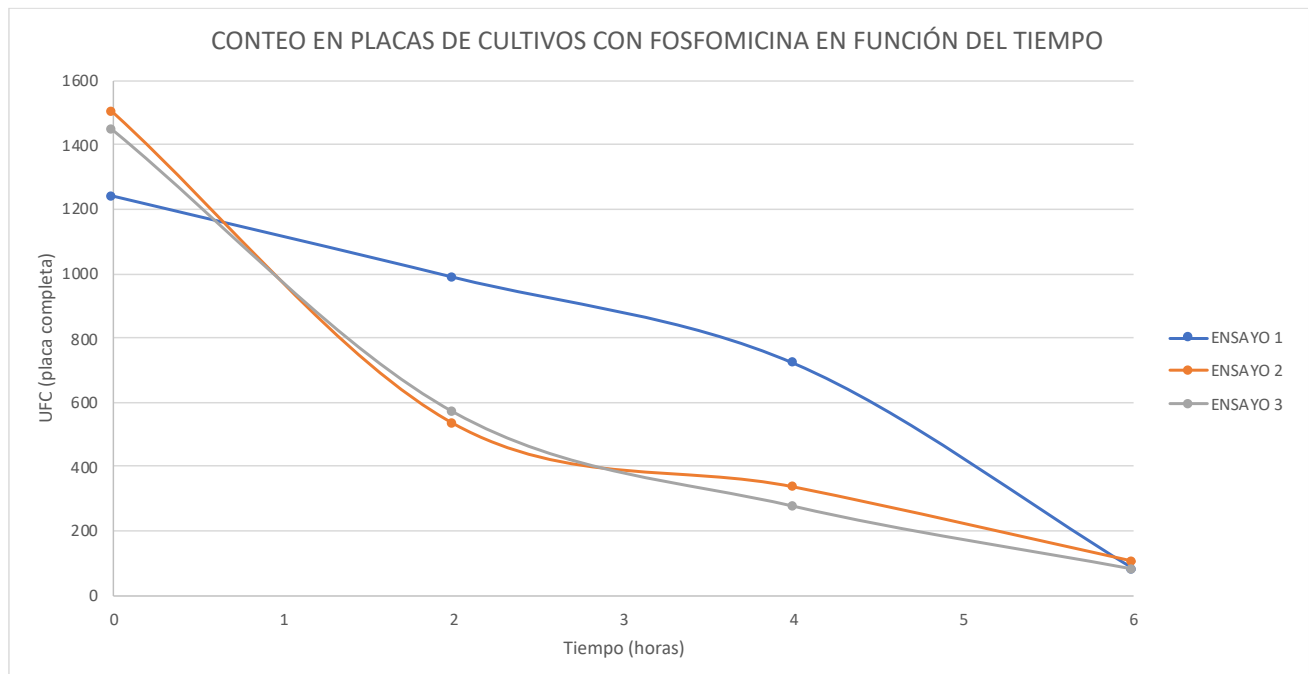


Figura 37. Ensayos de conteo de células no viables empleando el método de conteo en placas.

Hay varios métodos para contabilizar las colonias dentro de una placa de cultivo, entre ellas equipos con softwares especializados los cuales realizan un conteo automático. En este caso se realizó el conteo dividiendo la placa en cuatro para contar a mano las UFC de uno de los cuadrantes y posteriormente multiplicar esa cifra por cuatro (Figura 38).

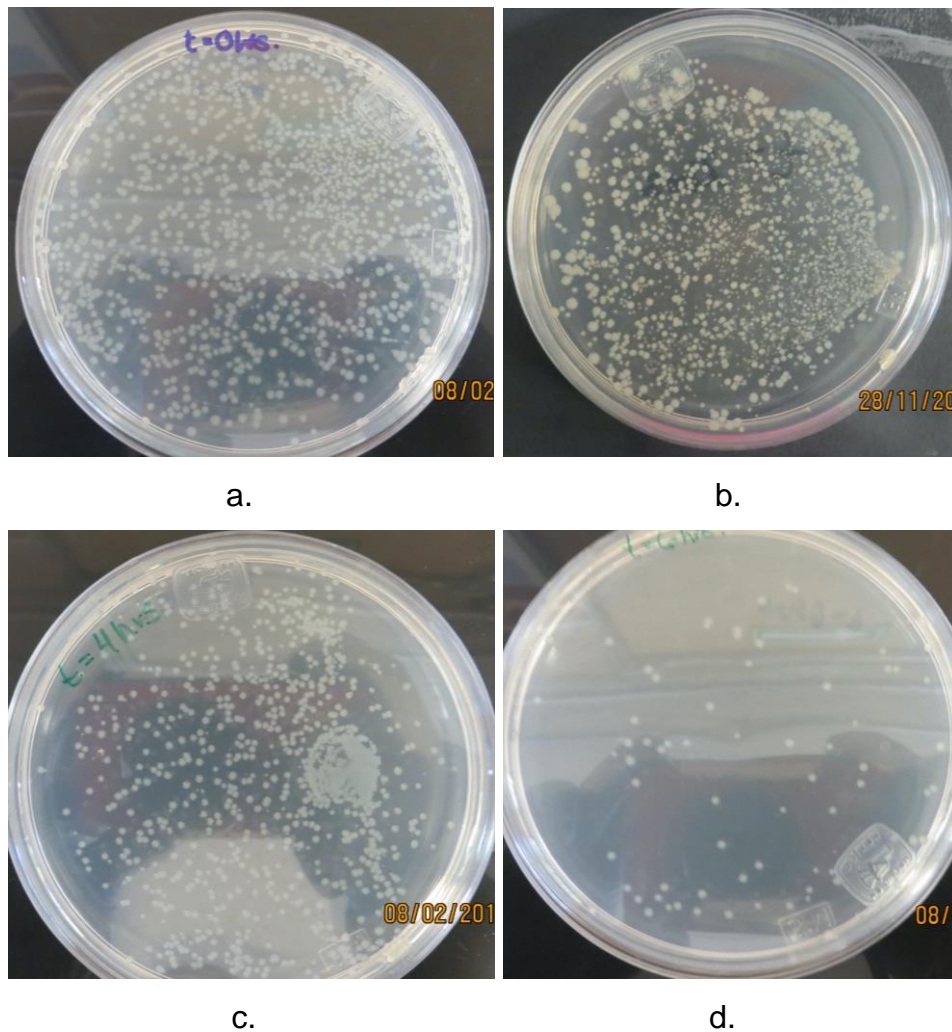


Figura 38. Disminución de UFC al contacto con fosfomicina a diferentes tiempos.

(a) tiempo cero. (b) tiempo dos. (c) tiempo cuatro. (d) tiempo seis.

Finalmente se tomaron en cuenta las diluciones para registrar los valores en unidades de UFC/mL (Tabla 6).

Tabla 6. Cálculo de UFC/ml por el método de conteo en placas por microdiluciones.

UFC	UFC (1 CUADRANTE)	UFC (PLACA COMPLETA)	UFC/mL
TIEMPO 0	310	1240	6.20E+09
	375	1500	7.50E+09
	361	1444	7.22E+09
TIEMPO 2	247	988	4.94E+09
	133	532	2.66E+09
	142	568	2.84E+09
TIEMPO 4	180	720	3.60E+09
	84	336	1.68E+09
	69	276	1.38E+09
TIEMPO 6	20	80	4.00E+08
	26	104	5.20E+08
	20	80	4.00E+08

COMPARACIÓN DEL MÉTODO LIF CON MÉTODOS TRADICIONALES DE CONTEO CELULAR

La comparación entre la susceptibilidad antimicrobiana empleando LIF y métodos tradicionales como el conteo en placas de agar involucra dos enfoques diferentes para evaluar la respuesta de microorganismos a los agentes antimicrobianos.

En el caso de LIF para la susceptibilidad antimicrobiana, se basó principalmente en la detección de las señales de la fluorescencia emitida por las células tratadas con el bromuro de etidio y el aumento de estas señales en función del tiempo indica la efectividad de la fosfomicina en el cultivo.

Una de las grandes ventajas de este método fue la rapidez en la obtención de datos ya que proporcionó de manera inmediata datos del conteo celular en concentraciones extremadamente bajas que van de los pico a los microgramos, de tal forma que es útil como un método de respuestas ultrarrápido en estudios a posibles compuestos antimicrobianos.

Algunas de las desventajas de la técnica LIF son el uso de equipos específicos, así como la alineación correcta del láser y el empleo tintas fluorescentes que muchas veces pueden ser tóxicas o mutagénicas.

Además la interpretación de las señales individuales son subjetivas ya que la señal obtenida puede tratarse de una o varias células que se están detectando pero el conteo no es estrictamente cuantitativo.

En el caso de los métodos tradicionales como por ejemplo la microscopía de fluorescencia el principio es similar al de LIF sin embargo el conteo no fue inmediato ya que se tienen que realizar un tratamiento de las imágenes obtenidas para su conteo con ayuda de un software. Además el cultivo se deposita en los microcanales o en las microgotas en el transcurso del ensayo y puede segregarse a lo largo del tiempo.

En el caso del método de conteo mediante el conteo en placas de agar, consistió principalmente en sembrar una concentración conocida del cultivo de *E. coli* con una concentración conocida de la fosfomicina y se observa el crecimiento de las colonias después de una incubación de 16 horas a 37 °C.

Las principales ventajas de este método sobre el método de LIF es que proporciona datos cuantitativos al contabilizar los UFC en la placa determinando así la concentración mínima inhibitoria, además es el método más utilizado y estandarizado en prácticas clínicas proporcionando información sobre la resistencia de diversas cepas a los antimicrobianos.

Una de las principales desventajas del método de conteo en placas es el tiempo necesario que se debe esperar para el crecimiento celular, para realizar el conteo que van de las 12 a las 24 horas.

La elección del método correcto dependerá de los objetivos del ensayo y de las características del cultivo que se desee analizar. LIF puede ser útil para evaluar respuestas rápidas de *E. coli* y otras cepas a los antimicrobianos mientras que las placas de agar como método tradicional puede proporcionar información cuantitativa sobre la CMI y la resistencia antimicrobiana. Por lo cual, ambos métodos pueden funcionar de manera complementaria para el estudio de un cultivo en respuesta a un antimicrobiano específico.

En la siguiente tabla (Tabla 7) se enlistan algunas de las diferencias principales de los métodos de conteo estudiados en este proyecto.

Tabla 7. Principales diferencias de los métodos de conteo empleados.

Diferencias de LIF y métodos de conteo celular tradicionales			
Método	LIF	Microscopía de Fluorescencia	Placas
Sensibilidad	4 células	20 células	≥30 UFC
Especificidad	Células individuales	Células individuales	Número de colonias
Velocidad de ensayo	6 hrs	6 hrs	12 - 24 hrs
Velocidad de lectura	Inmediato	≈1 hr	≈1 hr
Facilidad de uso	Técnicas de microbiología, tinción, óptica, software y microfluídica.	Técnicas de microbiología, tinción, óptica, software y microfluídica.	Técnicas de microbiología y tinción.
Requisitos de equipo especializado	Microscopio, láser, lentes y filtros, cámara de alta velocidad, fotodetector y software.	Microscopio, fuente de luz, lentes y filtros, cámara digital y software.	Placas, campanas de flujo laminar, medios de cultivo e incubadora.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El método de fluorescencia inducida por láser nos permitió determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las células de *E. coli* empleando bromuro de etidio, a través de su exposición a un láser de 532 nm dentro de microgotas generadas en un microchip de microfluídica. En estos ensayos se utilizó fosfomicina y se pudo observar que el conteo de señales fluorescentes intensas provenientes de bacterias no viables fue en aumento en función del tiempo, esto debido a la acción del antibiótico sobre las células del cultivo.

Se tienen un par de hipótesis con respecto a las diferencias en la intensidad de las señales obtenidas por el detector. La primera tiene que ver con la presencia de bacterias en diferentes planos respecto del punto focal del láser. Si el haz del láser pega de lleno sobre una bacteria en el punto focal, la señal aumenta. Pero si solo una parte de la bacteria está en foco o se encuentra ligeramente por encima o por debajo del punto focal, la señal disminuye. La segunda hipótesis es que el aumento en la intensidad de la señal podría deberse a la aglomeración de las bacterias, lo que causaría picos de fluorescencia más altos.

Algo importante de notar es que el montaje óptico experimental no permitió determinar el total de células no viables en las microgotas, sino solo una pequeña fracción de ellas que pasaron por el punto focal. En futuros experimentos sería deseable probar otros elementos ópticos como un expansor de haz y canales microfluídicos más pequeños para detectar un porcentaje mayor de células en las microgotas y utilizar concentraciones menores de células.

Otra característica importante del método utilizado es el uso de microgotas en lugar de un flujo continuo del cultivo celular por el microcanal. Las microgotas encapsulan a las bacterias y las transportan eficientemente por el microcanal evitando deposiciones de células y contaminación del conducto. La formación de microgotas en el aceite fluorinado empleado se logró gracias a la síntesis del surfactante fluorinado, el cual disminuye la tensión interfacial, favorece su formación y les brinda la estabilidad necesaria para moverse sin fusionarse. Además, el aceite y surfactante evitaron el paso de la tinta fluorescente fuera de la fase acuosa. Esto permitió delimitar la fluorescencia de las señales tanto de las gotas como de las células dentro de ellas mejorando así el conteo de estas.

En este trabajo también se pudo comprobar que el bromuro de etidio es un marcador fluorescente útil para observar a las células no viables por el método de calentamiento y con el uso de la fosfomicina. Este compuesto nos dio una señal intensa fácil de identificar con el fotodetector, e inclusive a simple vista en el dispositivo microfluídico se podía ver un destello rojo dentro del canal donde pasaba la muestra. El bromuro de etidio resultó mejor que otras tintas comerciales como las del kit Live & Dead (Invitrogen) que contienen yoduro de propidio y SYTO 9 y que, en un trabajo previo en nuestro grupo de investigación, no funcionaron adecuadamente para detectar células no viables debido a que se registró una lisis y degradación de las células.^[42]

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana a partir del método de fluorescencia inducida por láser brindo resultados con una tendencia esperada y similar a métodos ya conocidos como lo es la microscopía de fluorescencia y el conteo en placas. En trabajos futuros podría utilizarse cepas bacterianas con resistencia antimicrobiana para corroborar que en esos casos las señales de células no viables no aumentan con el tiempo.

Una característica particular de estos ensayos es que se realizaron contabilizando al momento (en tiempo real) las células muertas empleando del programa “peaks”. El tiempo total (6 h) para observar un 95% de muerte celular fue más corto y con una menor cantidad de reactivos comparado con el método de conteo en placas (16 h).

Una de las aplicaciones de esta técnica y objetivo principal de este proyecto es la investigación cuantitativa del efecto antibacteriano de antibióticos en las bacterias empleando dispositivos microfluídicos.

Una de las posibles perspectivas de este tipo de ensayos es el de estudiar los efectos farmacodinámicos de antibióticos en bacterias de forma rápida y con un rango de concentraciones que varíe a lo largo del experimento de manera automatizada.

Comparados con los sistemas de medidas tradicionales, como conteo en placas o la microscopía de fluorescencia, los sistemas DAQ basados en PC's aprovechan la potencia del procesamiento, la productividad, la visualización y las habilidades de conectividad de las computadoras proporcionando medidas más confiables, rápidas y automatizadas.

La ventaja principal de este sistema de detección es que se puede contabilizar en tiempo real, una pequeña muestra de cultivo dentro de las microgotas de microfluídica sin tener que esperar 16 horas o más a que estas sean visibles para poder contabilizarlas.

Al teñir las células no viables, el bromuro de etidio nos da una señal intensa fácil de detectar y esto puede verse a simple vista en el dispositivo microfluídico al ver un destello rojo dentro del canal donde pasa la muestra.

Estos resultados nos confirman que LIF puede ser una excelente alternativa para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en la industria farmacéutica o alimenticia teniendo así grandes beneficios como por ejemplo el tiempo de respuesta, el aumento del número de ensayos o cepas a estudiar, el conteo automatizado, la disminución de reactivos y residuos y la nula contaminación de los reactores empleados.

Con estos ensayos podemos confirmar que LIF es un método de estudio rápido, controlado y totalmente automatizado que identifica células no viables de las viables, empleado BrEt, en un cultivo que se encuentra contenido en microgotas formadas por un dispositivo microfluídico y que los resultados obtenidos son comparables por su eficiencia con el de métodos clásicos de conteo.

Si el método de fluorescencia inducida por láser es más eficiente comparada con técnicas clásicas para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de un cultivo, entonces podría emplearse en la industria farmacéutica para monitorear el efecto de nuevos compuestos con posible actividad bactericida de manera rápida y eficaz combatiendo de manera proactiva un problema grave de carácter mundial como lo es la resistencia de las bacterias a antibióticos ya existentes.

La capacidad de generar, manipular y analizar gotas que transportan células individuales o pequeñas poblaciones de bacterias de una manera homogénea crea nuevos enfoques para la resolución de problemas presentes en esta rama de estudio empleando otras técnicas de identificación y diagnóstico.

CONCLUSIÓN

Se generaron microgotas en microchips de microfluídica las cuales contenían células de *E. coli* en contacto con bromuro de etidio y el antibiótico fosfomicina para así determinar la susceptibilidad antimicrobiana en función del tiempo mediante el método de fluorescencia inducida por láser.

Se optimizó el sistema para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana con el empleo de un programa para la automatización del ensayo el cual contabilizó células no viables dentro de cada microgota.

El análisis generado en sistemas de microfluídica que se ha desarrollado a lo largo de los años ha hecho posible el tener un microlaboratorio en un microchip teniendo múltiples ventajas.

Entre estas ventajas esta la alta sensibilidad de detección, la cantidad mínima de analíto necesario, la disminución en los tiempos de análisis y procesamiento de datos, la disminución de contaminación del medio de análisis, la cantidad mínima de desechos y la automatización de los sistemas.

El método de fluorescencia inducida por láser en un microchip de microfluídica para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana nos permitió combinar las ventajas de un método de detección rápido y eficiente como lo es LIF y las ventajas propias de trabajar con microgotas como microreactores para así determinar la viabilidad de las células de *E. coli* empleando bromuro de etidio, a través de su exposición a un láser de 532 nm en ensayos de 6 horas realizando 47 pruebas en promedio, por minuto.

Los resultados obtenidos fueron congruentes y comparables con los métodos de microscopía de fluorescencia y conteo en placas.

Estos resultados nos ofrecen grandes oportunidades de desarrollo en el ámbito farmacéutico, clínico y alimenticio resolviendo problemas actuales como lo es el monitoreo de la resistencia antimicrobiana en cepas de bacterias aisladas de pacientes en servicios

hospitalarios y ambulatorios; la búsqueda de nuevos antibióticos de manera rápida, o la identificación de bacterias en alimentos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud. (2017). La resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>
- [2] Gelband, H., Molly-Miller, P., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., ... Laxminarayan, R. (2015). The state of the world's antibiotics. *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*, Washington, D.C.
- [3] CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, (2019) *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, 10. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- [4] Beebe, D., Mensing, G., & Walker, G. (2002). Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review Of Biomedical Engineering*, 4(1), 261-286. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>
- [5] Kaminski, T., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab on a Chip*, 16(12), 2168-2187. <https://doi.org/10.1039/c6lc00367b>
- [6] Team, E. (2022). A general overview of Microfluidics. *Microfluidics*. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/>
- [7] Song, H., Chen, D., & Ismagilov, R. (2006). Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(44), 7336-7356. <https://doi.org/10.1002/anie.200601554>
- [8] Gupta, R., Baldock, S., Carreras, P., Fielden, P., Goddard, N., & Mohr, S. et al. (2011). A microfluidic device for self-synchronized production of droplets. *Lab on a Chip*, 11(23), 4052. <https://doi.org/10.1039/C1LC20695H>
- [9] Shim, J., Olguin, L., Whyte, G., Scott, D., Babbie, A., & Abell, C. et al. (2009). Simultaneous Determination of Gene Expression and Enzymatic Activity in Individual Bacterial Cells in Microdroplet Compartments. *Journal of the American Chemical Society*, 131(42), 15251-15256. <http://dx.doi.org/10.1021/ja904823z>
- [10] Chiu, D. T., Lorenz, R. M., & Jeffries, G. D. (2009). Droplets for ultrasmall-volume analysis. *Analytical chemistry*, 81(13), 5111–5118. <https://doi.org/10.1021/ac900306q>

- [11] Leman, M., Abouakil, F., Griffiths, A. D., & Tabeling, P. (2015). Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale. *Lab on a chip*, 15(3), 753–765.
<https://doi.org/10.1039/c4lc01122h>.
- [12] Shim, J. U., Ranasinghe, R. T., Smith, C. A., Ibrahim, S. M., Hollfelder, F., Huck, W. T., Klenerman, D., & Abell, C. (2013). Ultrarapid generation of femtoliter microfluidic droplets for single-molecule-counting immunoassays. *American Chemical Society Nano*, 7(7), 5955–5964. <https://doi.org/10.1021/nn401661d>
- [13] Jokerst, J., Emory, J., & Henry, C. (2012). Advances in microfluidics for environmental analysis. *The Analyst*, 137(1), 24-34. <https://doi.org/10.1039/c1an15368d>
- [14] Jiang, H., Weng, X., & Li, D. (2010). Microfluidic whole-blood immunoassays. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(5), 941-964.
<https://doi.org/10.1007/s10404-010-0718-9>
- [15] Zhang, Y., & Ozdemir, P. (2009). Microfluidic DNA amplification—A review. *Analytica Chimica Acta*, 638(2), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.02.038>
- [16] Stroock, A. (2008). Optical Biosensors. *Microfluidics*, 659-681.
<https://doi.org/10.1016/b978-044453125-4.50019-x>.
- [17] Kaminski, T., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab on a Chip*, 16(12), 2168-2187.
<https://doi.org/10.1039/c6lc00367b>
- [18] Johnson, M., & Landers, J. (2004). Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems. *Electrophoresis*, 25(21-22), 3513-3527. <https://doi.org/10.1002/elps.200406086>
- [19] Nilsson, J., Evander, M., Hammarström, B., & Laurell, T. (2009). Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. *Analytica Chimica Acta*, 649(2), 141-157.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.017>
- [20] Lenshof, A., & Laurell, T. (2010). Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3), 1203-1217.
<https://doi.org/10.1039/b915999c>
- [21] Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., & Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, 42(1-2), 269-277.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.009>

- [22] Crosbie, N., Pöckl, M., & Weisse, T. (2003). Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal Of Microbiological Methods*, 55(2), 361-370.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00167-2](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00167-2)
- [23] Wong, F., Renner, L., Özbaykal, G., Paulose, J., Weibel, D., van Teeffelen, S., & Amir, A. (2017). Mechanical strain sensing implicated in cell shape recovery in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology*, 2(9).
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.115>
- [24] Robert, L., Ollion, J., Robert, J., Song, X., Matic, I., & Elez, M. (2018). Mutation dynamics and fitness effects followed in single cells. *Science*, 359(6381), 1283-1286.
<https://doi.org/10.1126/science.aan0797>
- [25] Baltekin, Ö., Boucharin, A., Tano, E., Andersson, D., & Elf, J. (2017). Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), 9170-9175.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1708558114>
- [26] Barer, M. & Harwood, C. (1999). Bacterial Viability and Culturability. *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press. 41(1), 93-137. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60166-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60166-6)
- [27] Qin, N., Zhao, P., Ho, E. A., Xin, G., & Ren, C. L. (2020). Microfluidic technology for antibacterial resistance study and antibiotic susceptibility testing: Review and perspective. *American Chemical Society Sensors*, 6(1), 3–21.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02175>
- [28] Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.313.93>
- [29] Ramírez S, J., Parra V., J., & Alvarez Aldana, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 01-08.
https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665
- [30] Palenzuela, B., Simonet, B., García, R., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2004). Monitoring of Bacterial Contamination in Food Samples Using Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 76(11), 3012-3017. <https://doi.org/10.1021/ac0352732>

- [31] Lim, O., Suntornsuk, W., & Suntornsuk, L. (2009). Capillary zone electrophoresis for enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yogurt. *Journal Of Chromatography B*, 877(8-9), 710-718.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.014>
- [32] Vazquez, B., Olguin, L., Qureshi, N., & Oropeza, L. (2012, November). Characterization of a laser induced fluorescence detection system for microdroplets fluorescence quantification. In *Latin America Optics and Photonics Conference*, Optica Publishing Group (LT 3C- 3).
- [33] Vincent, M., Liu, W., Haney, E., & Ismagilov, R. (2010). Microfluidic stochastic confinement enhances analysis of rare cells by isolating cells and creating high density environments for control of diffusible signals. *Chemical Society Reviews*, 39(3), 974.
- [34] Kaminski, T., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab on a Chip*, 16(12), 2168-2187.
- [35] Hou, Z., An, Y., Hjort, K., Hjort, K., Sandegren, L., & Wu, Z. (2014). Time lapse investigation of antibiotic susceptibility using a microfluidic linear gradient 3D culture device. *Lab Chip*, 14(17), 3409-3418. <https://doi.org/10.1039/c4lc00451e>
- [36] Horna Quintana, Gertrudis, Silva Díaz, María, Vicente Taboada, William, & Tamariz Ortiz, Jesús. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39-45.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007&lng=es&tlng=es.
- [37] Price, A. K., & Paegel, B. M. (2016, January 5). Discovery in Droplets. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04139>.
- [38] Lim, J., Gruner, P., Konrad, M., & Baret, J. C. (2013). Micro-optical lens array for fluorescence detection in droplet-based microfluidics. *Lab on a chip*, 13(8), 1472–1475.
<https://doi.org/10.1039/c3lc41329b>.
- [39] Kang, D. K., Ali, M. M., Zhang, K., Huang, S. S., Peterson, E., Digman, M. A., Gratton, E., & Zhao, W. (2014). Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nature Communications*, 5, 5427.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6427>.

- [40] Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., & Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 8(5), 870–891. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.046>.
- [41] García, A. R. (2015). Viabilidad de células de *E. coli* bl21 dentro de microgotas en microchips por medio de fluorescencia inducida por láser (tesis). <http://132.248.9.195/ptd2015/febrero/0725578/Index.html>
- [42] Ahern, H. (2018). *Microbiology: A Laboratory Experience* (1st ed.). New York: Open SUNY Textbooks.
- [43] Garfias González, K. I. (2016). Monitoreo de la actividad bactericida de tres antibióticos usando tintas fluorescentes en microchips de microfluídica (tesis). <http://132.248.9.195/ptd2016/noviembre/0752833/Index.html>
- [44] What is Laser Induced Fluorescence? | LIF Experiment. (2020). Retrieved 25 May 2020, from <https://www.edinst.com/blog/what-is-laser-induced-fluorescence/>
- [45] Merck (2020). Retrieved 6 July 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/genomics/nucleic-acid-labeling-and-detection/ethidium-bromide>
- [46] DNA, M. (2020). Mechanism of Interaction of Ethidium Bromide with DNA. Retrieved 7 July 2020, from <http://technologyinscience.blogspot.com/2014/05/mechanism-of-interaction-of-ethidium.html#.YscZ-OxBxQJ>
- [47] Green, F. J. (1990). *The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes, and indicators*. Milwaukee, Wis: Aldrich Chemical Co.
- [48] SearchLight Spectra Viewer from Semrock. (2020). Retrieved 7 July 2020, from <https://searchlight.semrock.com/>
- [49] Michalopoulos, A., Livaditis, I., & Gougoutas, V. (2011). The revival of fosfomicin. *International Journal Of Infectious Diseases*, 15(11), e732-e739.
- [50] de Cueto, M., López, L., Hernández, J. R., Morillo, C., & Pascual, A. (2006). In vitro activity of fosfomicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(1), 368–370. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.368-370.2006>
- [51] Salager, J. L. (2022, May 18). Los surfactantes, Tipos y Usos. Laboratorio FIRP. Retrieved November 30, 2022, from <https://es.firp-ula.org/los-surfactantes/>

ANEXOS

ANEXO I

MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO

PLACAS DE AGAR MEDIO LURIA BELTRANI (LB) PARA LA SIEMBRA Y CRECIMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS

- 5 g de peptona (P6838, Sigma Aldrich, EUA)
- 2.5 g de extracto de levadura (70161, Sigma Aldrich EUA)
- 2.5 g de NaCl (L-F0809, Distribuidora Química AIVI, México)
- 7.5 g de agar para la solidificación del medio (A1296, Sigma Aldrich, EUA)

Se pesaron y mezclaron todos los productos y se disolvieron con agua destilada hasta obtener un volumen de 500 mL. El medio se esterilizó en una autoclave (SK100C, Yamato Scientific America, E.U.A.) a 120 °C durante 20 minutos y posteriormente se vertió en cajas Petri hasta cubrir la base completamente, se dejó enfriar y solidificar durante unos minutos (Figura 39) y se guardó en un empaque cerrado en el refrigerador con la finalidad de evitar su contaminación y se almacenó para su uso posterior.



Figura 39. Placas con medio LB agar que se emplearon para realizar cultivos de *E. coli*

CULTIVO DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21 EN PLACAS DE AGAR

Dentro de una campana con flujo laminar (PURAIR FLOW-24, Airscience, EUA) se tomó una porción de una colonia de células de *E. coli* BL21 de un cultivo crecido en una placa de agar,

denominada como inóculo y se estrió en la superficie de una placa nueva que fue colocada en una incubadora a 37 °C por 14-16 horas.

Las placas con bacterias se almacenaron en refrigeración para evitar su contaminación, cada que se realizó un ensayo se preparó un cultivo nuevo con un día de anticipación, ya que con el tiempo y aún en refrigeración el medio puede secarse y/o contaminarse

CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS DE MICROFLUIDICA

Esto se llevó a cabo en el microscopio (DMI3000 B, Leica Microsystems, Alemania) usando el objetivo 20x con una cámara acoplada (Dino-Eye AM7023 5.0MP Microscope Camera) y se realizaron las mediciones del ancho y profundidad del microchip empleando el programa Image J (Versión 1.50b) el cual genera una relación entre el número de pixeles y la medida de los canales en micrómetros.

Para obtener estas mediciones se realizó una calibración previa, midiendo una retícula de dimensiones ya conocidas (Figura 40). La calibración se realiza tomando una fotografía de una retícula de 250 micras la cual equivale a 254.667 pixeles según lo que nos indica el programa, posteriormente la conversión en cada una de las fotografías que se analizaron para la calibración se realizó de manera automática.

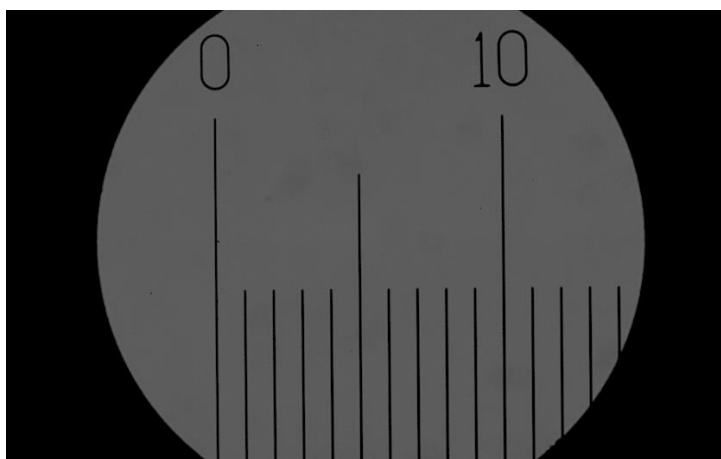


Figura 40. Retícula tomada con objetivo 20x.

Se hicieron varios cortes transversales en el microchip, de tal forma que se pudiera observar el perfil de los microcanales y determinar el ancho y la profundidad de cada uno. Las mediciones se hicieron por triplicado y se hizo un promedio, comprobando que el microchip cumpliera con las especificaciones de las dimensiones con las que se diseñó. (Figura 41 y 42).

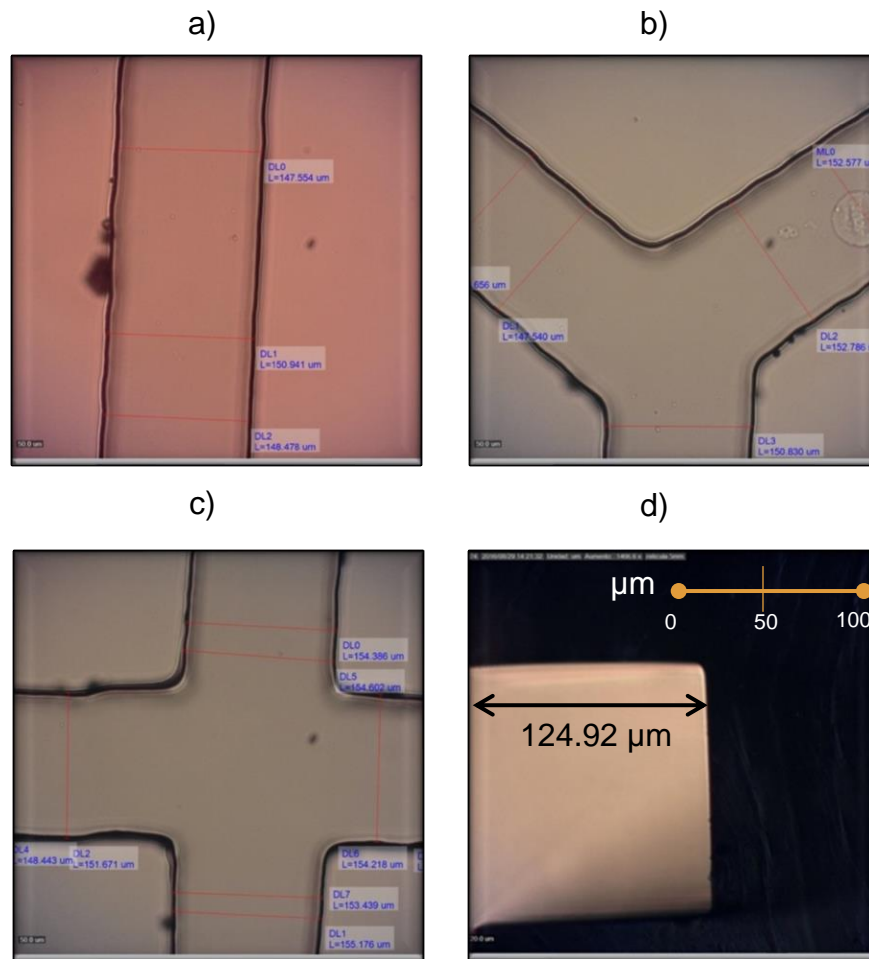


Figura 41. Caracterización de microchip diseñado para el conteo de células no viables por el método LIF. (a) Zona de lectura. (b) Canal por donde pasa la fase continua del sistema. (c) Canal por donde pasa la fase dispersa o acuosa del sistema y zona del microchip donde se interceptan ambas fases y se forman las microgotas. (d) Profundidad del canal.

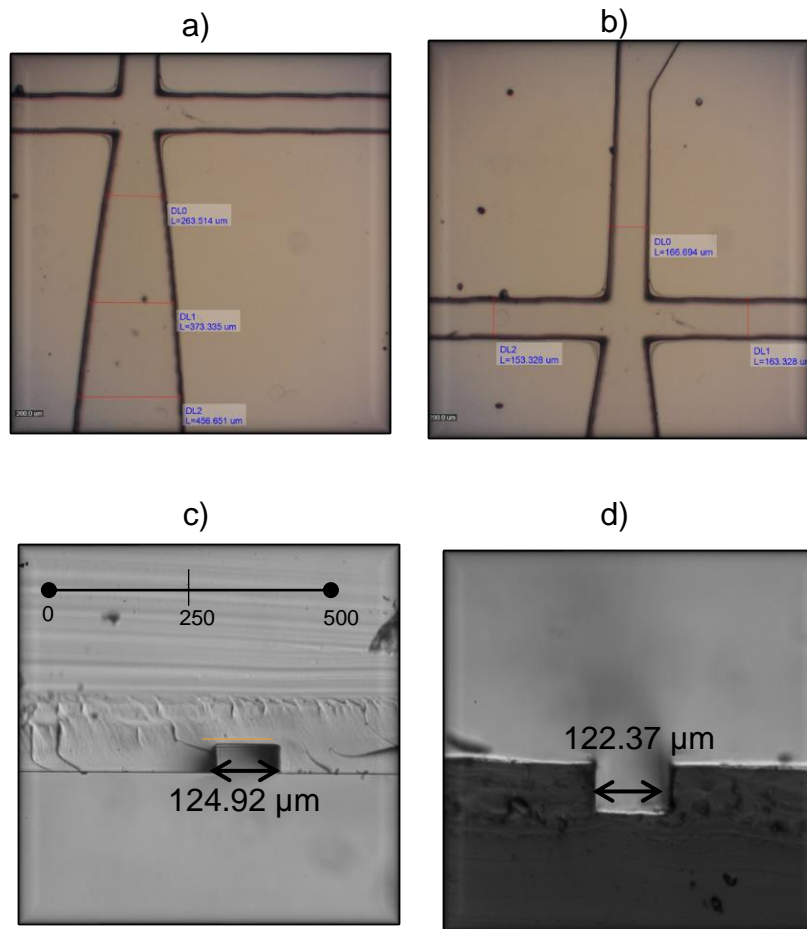


Figura 42. Caracterización de microchip diseñado para el conteo de células no viables por el método de Microscopía de Fluorescencia. a) Zona de lectura b) Canal por donde pasa la fase continua y dispersa del sistema y zona donde se interceptan ambas fases para formar las microgotas. c) Profundidad de zona de lectura. d) Profundidad del canal de salida.

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

BUFFER DE FOSFATOS PH 7.5

- 0.8 gramos de NaCl
- 0.02 gramos de KCl
- 0.144 gramos de Na₂HPO₄
- 0.024 gramos de KH₂PO₄

Se pesaron y disolvieron todos los compuestos en agua destilada, se ajustó el pH a 7.5 y se utilizó un matraz aforado de 100 mL para completar el volumen. Finalmente se vertió en tubos falcón de 10 mL y se congelaron para evitar contaminación.

BROMURO DE ETIDIO

- 0.00158 g de bromuro de etidio (Sigma Aldrich, Lote: MKBD5725V)

Se pesó y se disolvió en 200 µL de Buffer de Fosfatos (20 mM pH 7.4), teniendo así una disolución stock de bromuro de etidio con una concentración final de 20.03 mM.

Se almacenó en un tubo Eppendorf en refrigeración para evitar su contaminación y se cubrió con papel aluminio para evitar su descomposición con la luz.

SURFACTANTE FLUORINADO (E2K066)

- Tensoactivo (Krytox FH 7500 DuPont)
- Jeffamina (ED-900 Sigma- Aldrich)
- Aceite Fluorinado (HFE 7500 Novec, 3M)
- Cloruro de oxalilo (Sigma- Aldrich)

Se lleva a cabo la síntesis del surfactante fluorinado (Figura 43) para la estabilidad del medio continuo en el dispositivo. El procedimiento de la síntesis se describe a continuación.

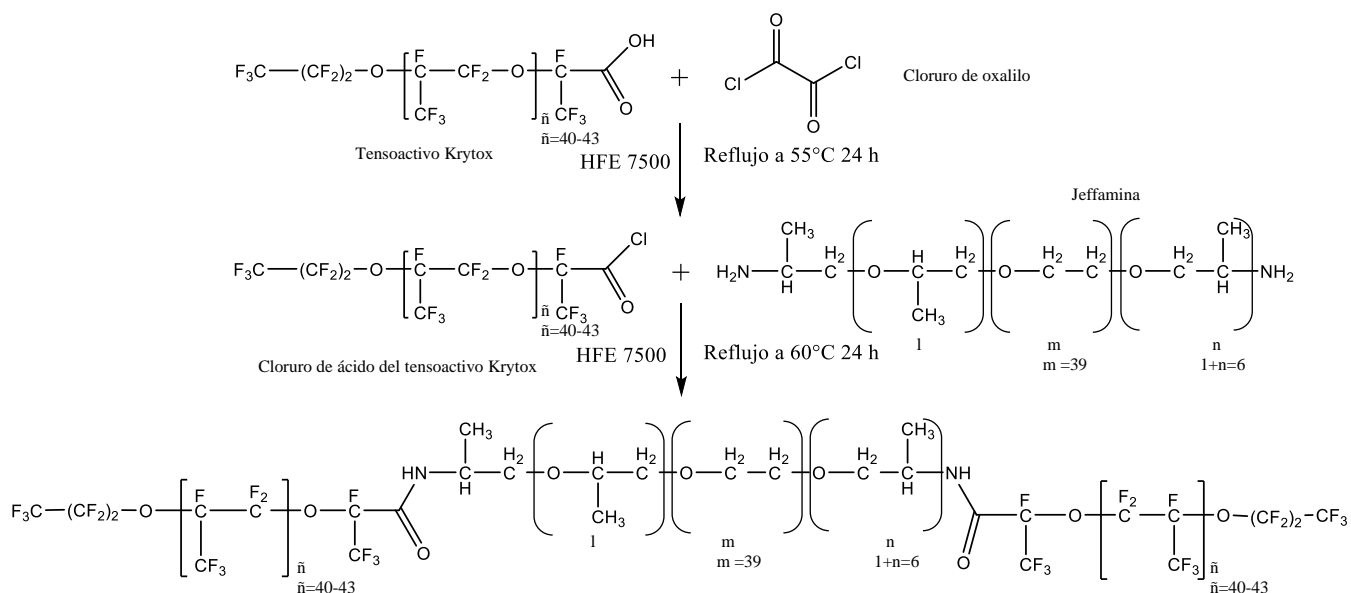


Figura 43. Esquema de la reacción de síntesis del surfactante fluorinado (E2K066)

Día 1/ 17:00 horas

Se pesaron 10 gramos de tensoactivo (Krytox FH 7500 DuPont) y 1.3 gramos de Jeffamina (ED-900 Sigma-Aldrich) en matraces Schlenk por separado.

Los matraces se conectaron a la línea de vacío para asegurarse que los reactivos no contengan agua; se dejaron conectados hasta el siguiente día (Figura 44).



Figura 44. Reacción día 1/ 12:00 horas

Las llaves de los matraces conectados a la línea de vacío se cerraron y se procedió a girar la llave de vacío para entonces intercambiarla por la de nitrógeno.

Día 2/ 17:00 horas

Se agregaron 25 mL de aceite fluorinado (HFE 7500 Novec, 3M) al matraz con el tensoactivo Krytox bajo la atmosfera de N₂ seco y una barra de agitación por la boca del matraz para aumentar el flujo de nitrógeno y no alterar la atmosfera inerte de la reacción.

Se agregaron 1.15 mL de cloruro de oxalilo (Sigma Aldrich) con una cánula bajo atmosfera de nitrógeno. Para ello se tiene el cloruro de oxalilo en un matraz Schlenk bajo atmosfera de nitrógeno de manera que la presión del gas lo empuje al matraz que contiene la mezcla (Krytox+ aceite fluorinado). Para ello se cerró la llave de paso a la línea de vacío y se liberó la presión de este, perforando el tapón con una aguja para el escape del exceso de nitrógeno (Figura 45).



Figura 45. Reacción día 2/ 17:00 horas

Después de haber transferido todo el cloruro de oxalilo se obtuvo una solución translúcida la cual se dejó agitando y en reflujo a 50 °C durante 24 horas. El reflujo consta de un baño de aceite el cual se calienta a 45 °C y se deja en agitación a 700 rpm para que la temperatura se estabilizara y se mantuviera a 50 °C (Figura 46).



Figura 46. Reacción día 3/ 17:00 horas

Día 4/ 9:30 horas

Después de las 24 horas de reflujo se obtuvo una solución turbia con un precipitado en el fondo del matraz (Figura 47).



Figura 47. Reacción día 4/ 9:30 horas

El matraz con la mezcla se desconectó del reflujo y una vez concluido el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó el exceso de cloruro de oxalilo que no

reaccionó, así como el aceite fluorinado que también se evaporó a presión reducida (Figura 48).



Figura 48. Tiempo completo de reacción para la formación del surfactante.

Al matraz que contenía Jeffamina ED-900 se le agregaron 25 mL de aceite fluorinado HFE 7500 con presentando una apariencia translúcida. A este se le transfirió la mezcla previamente descrita de Krytox, por medio de una cánula generando una emulsión de aspecto lechoso. El exceso de cloruro de oxalilo se eliminó por vacío. (Figura 49)



Figura 49. Jeffamina ED-900 + Krytox,

Día 4/ 11:30 horas

Para evaporar el disolvente restante se conectó un dedo frío con las mangueras al matraz de reacción. Primero se cerró la llave y se conectó al vacío para asegurarse de que no hubiera oxígeno, se sumergió en el Dewar con el nitrógeno líquido, posteriormente se conectó el matraz. (Figura 50).



Figura 50. Evaporación del disolvente.

Día 5/ 16:30 horas

La mezcla final se dejó bajo reflujo a 60 °C por 24 horas con agitación en rotavapor (Figura 51).



Figura 51. Producto final en rotavapor.

Finalmente se procedió a pesar el producto dando una masa final de 13.28 gramos.

ACEITE FLUORINADO

- 10 mL de HFE-7500 (CAS 297730-93-9 Synquest Laboratories).
- Surfactante fluorinado (E2K066) sintetizado en el punto anterior.

Se pesaron los 10 mL de aceite HFE-7500 para así saber la cantidad de surfactante fluorinado (E2K066) que se debe agregar, de tal forma que se encuentre al 1.8% en peso con respecto al aceite. Este surfactante se agrega para mejorar la monodispersión de las gotas y previene la coalescencia durante el monitoreo de las microgotas.

FOSFOMICINA

- 0.00413 g de Fosfomicina (125M4168V, Sigma Aldrich, E.U.A.)

Se pesó y se disolvió la fosfomicina en 1 mL de Buffer de Fosfatos (20 mM pH 7.4). Se congeló para evitar su contaminación.

MONTAJE ÓPTICO PARA DETECCIÓN EN LIF

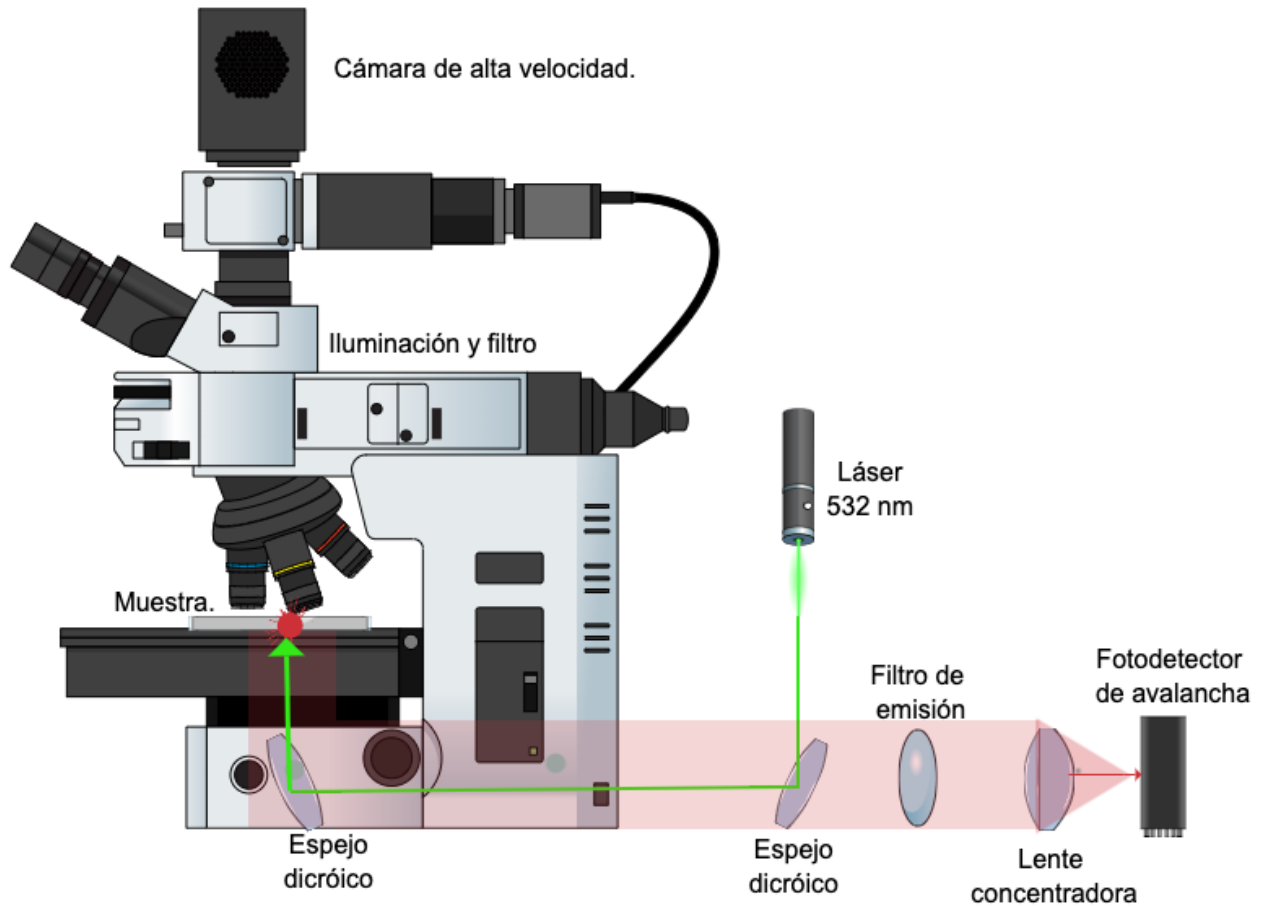


Figura 52. Representación esquemática de equipo de espectroscopia LIF con láser modulable y láser de longitud de onda específica.

ANEXO V

COMANDOS DE SCRIPT EN MATLAB PARA CONTEO AUTOMATIZADO POR LIF

1. Home > Import Data

Se seleccionó el archivo .xlsx: **análisis de datos** en el cual se cargaron previamente los 60000 datos adquiridos de un ensayo x. En la ventana emergente se observa una hoja de datos en la cual se cargan los datos en una de las columnas, la cual se renombró como **data1**.

2. Editor > Run > Add to Path

Se colocó el cursor en las líneas del script para que este se puede ejecutar.

3. > Introducir el tiempo guardado en segundos > 60

El programa solicita introducir en segundos el tiempo de adquisición de los datos, que en este caso son 60 segundos.

4. > Introducir número de muestras por segundo > 1000

El programa solicita introducir la velocidad de adquisición de los datos, que en este caso es 1000 datos / segundo.

Al terminar de correr el programa se generó la gráfica correspondiente y el programa arroja el número de máximos que se encuentran por arriba de 0.2 u.a.,

```
%Programa para graficar los datos generados en labview escritos en un bloc
%de notas
%Borrar variables data 1 y data 2 del Workspace
%Importar datos (HOME-> IMPORT DATA-> Cambiar nombre data 1 data 2)
%Correr programa (EDITOR -> RUN)
%SE feliz

data1=data1;
segundo=input('Introduce el tiempo guardado en segundos:\n');
muestras=input('Introduce el número de muestras por segundo:\n');
figure
a=1/muestras;
X=0:a:segundo-a;
e=muestras*segundo;

[pkt,lct] = findpeaks(data1,X,'MinPeakHeight',0.20);
num=size(pkt)
plot(X, data1(1:e))
hold on
plot(lct,pkt,'co')
title('Conteo de Picos')
xlabel('Tiempo (s)')
ylabel('Intensidad de Fluorescencia (a.u.)')
```

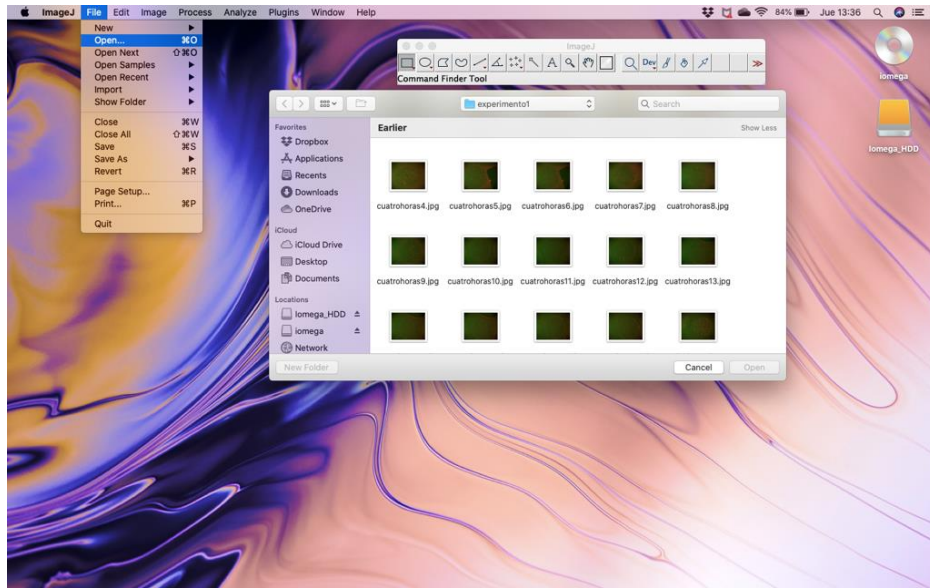
Figura 53. Script del programa Findpeaks programado en Matlab.

ANEXO VI

COMANDOS DEL PROGRAMA IMAGE J PARA CONTEO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

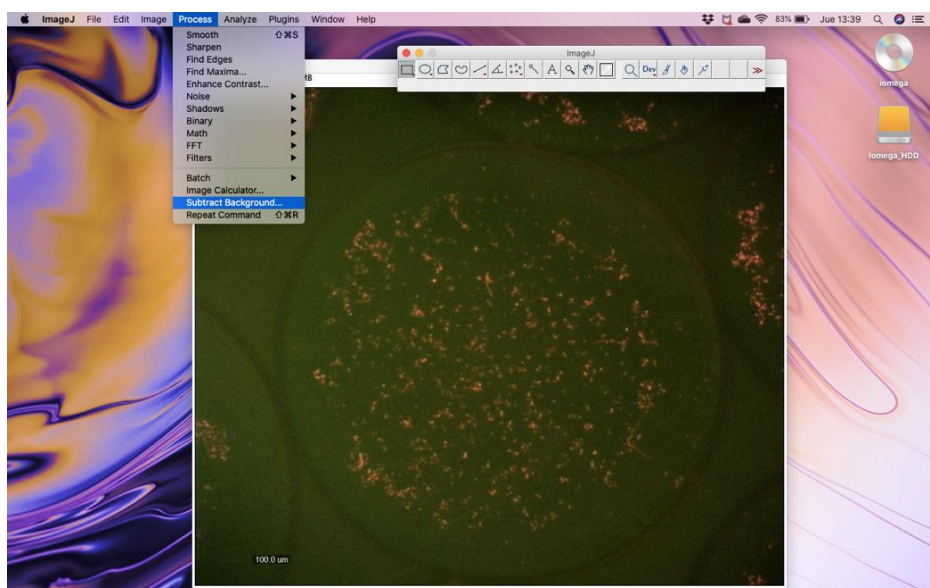
1. File > Open

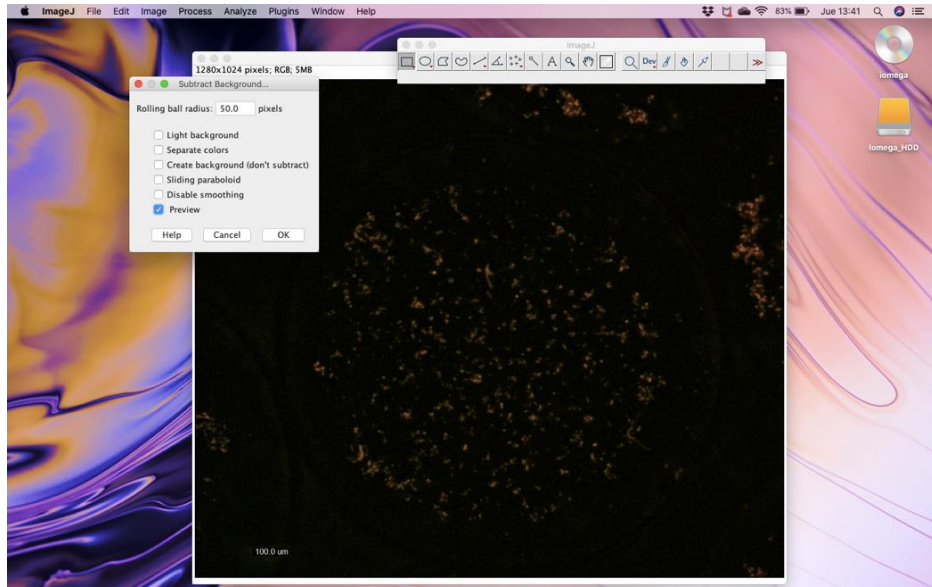
Abre la fotografía que se vaya a analizar dentro de la carpeta correspondiente



2. Process > Subtract background

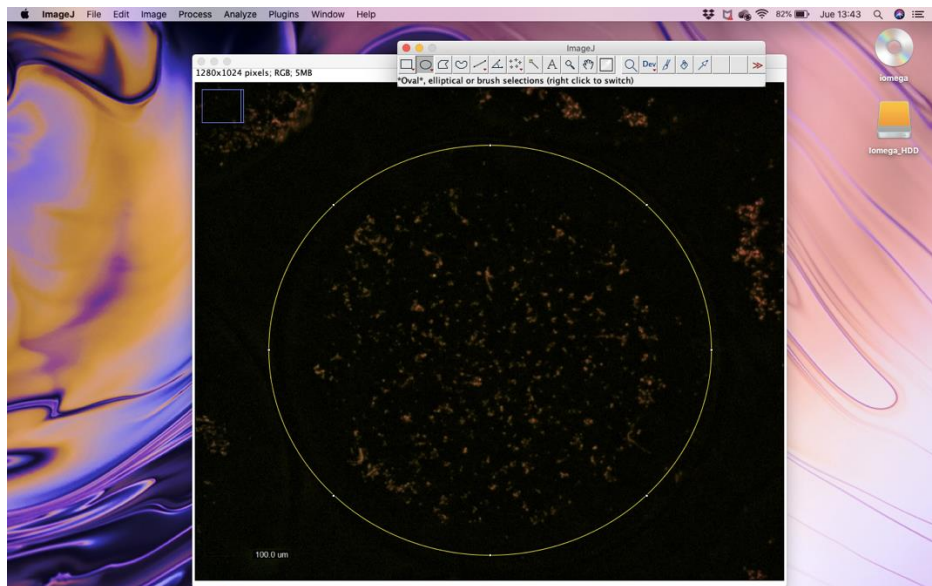
Elimina el fondo de la imagen para así visualizar mejor las células fluorescentes contrastando sobre un fondo negro.





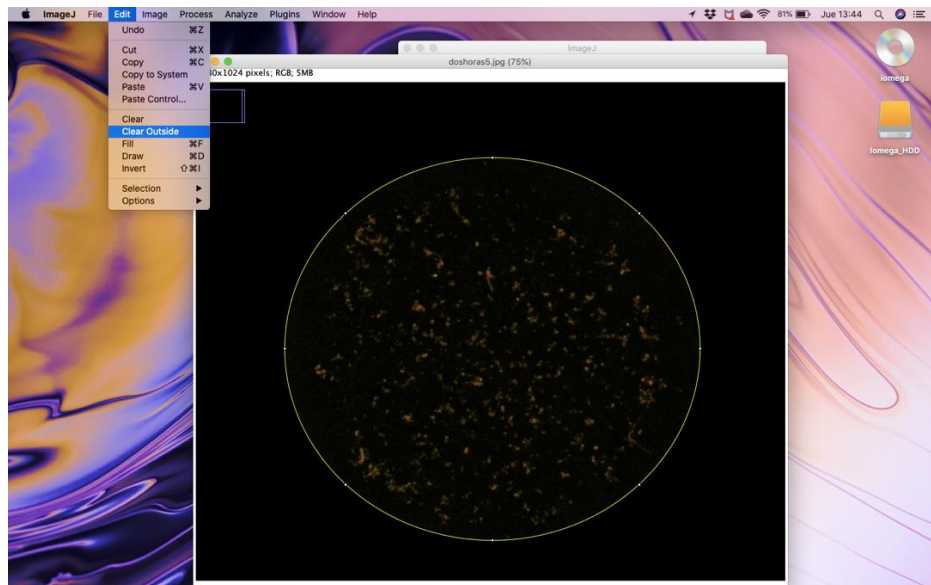
3. Seleccionando 'Oval', elliptical selection

Seleccionando un área específica para su análisis.



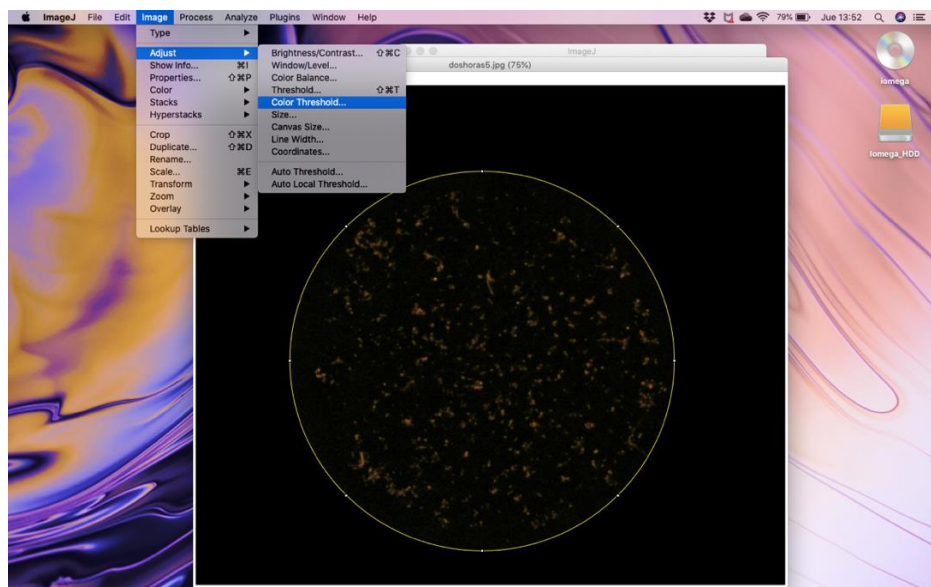
4. Edit > Clear Outside

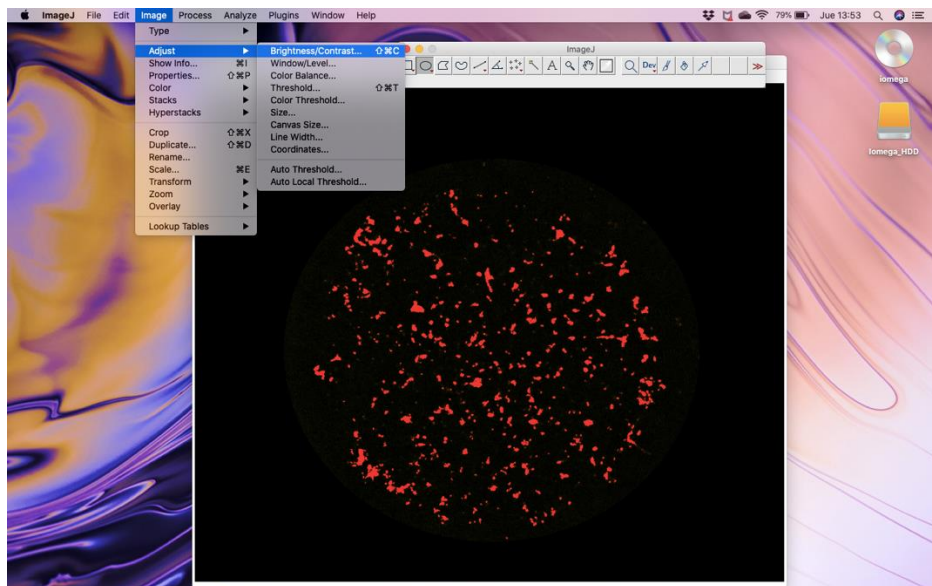
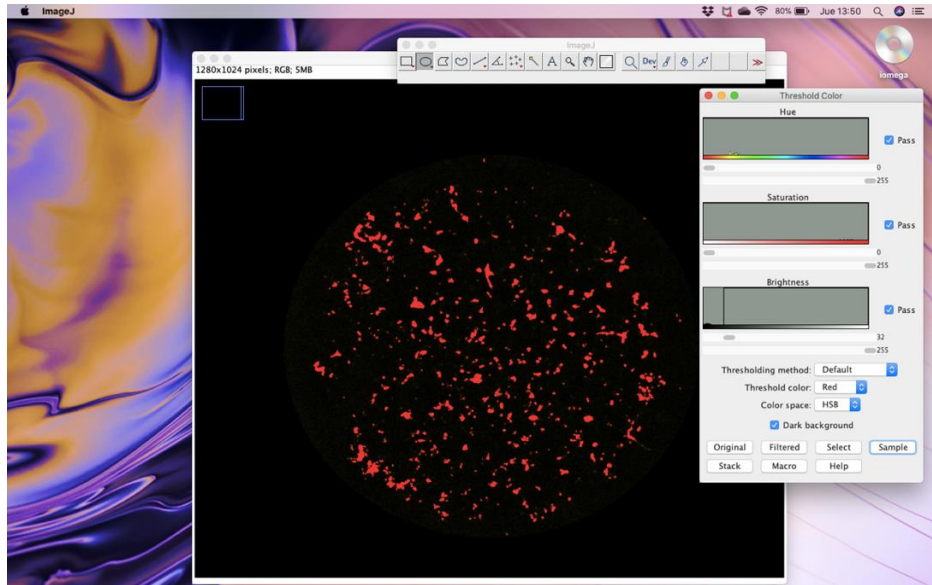
Se descarta el resto de la imagen que no fue seleccionado para su análisis.



5. Image > Adjust > Color Threshold > Brightness

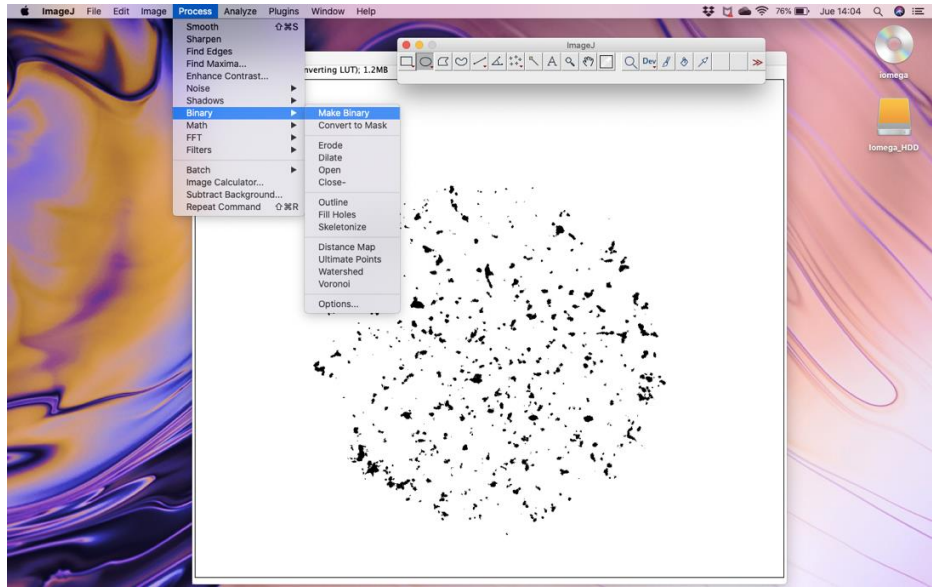
Se ajusta la entrada de color para así visualizar las células fluorescentes de color color rojo, creando una imagen binaria.





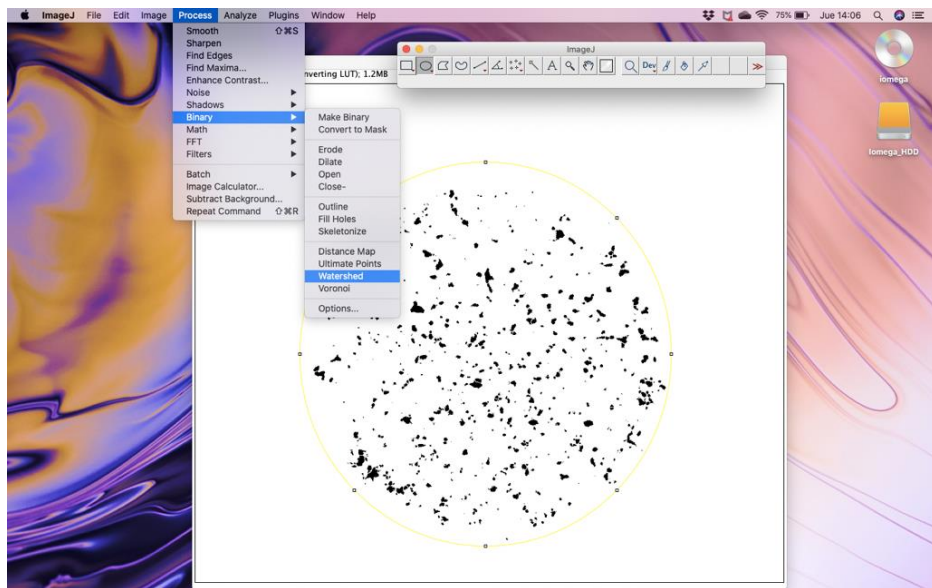
6. Process > Binary > Make Binary

La imagen se edita en blanco y negro, así los cuerpos fluorescentes se observan de color negro y destacan sobre el fondo blanco.



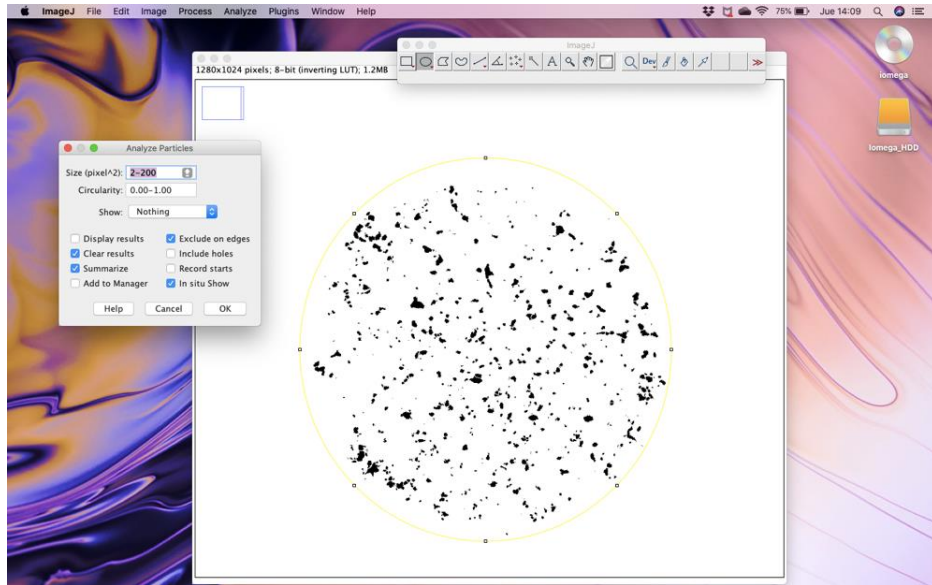
7. Process > Binary > Watershed

En caso de que haya conglomeraciones de células se aplica este comando para así poder analizarlas como independientes y no como una sola.



8. Analyze > Analyze Particles > Size > 2-200

Permite establecer un intervalo del tamaño en pixeles. En primer plano las células se ven más grandes que en segundo plano por lo que así se cubren las de ambos.



9. Analyze > Analyze Particles >

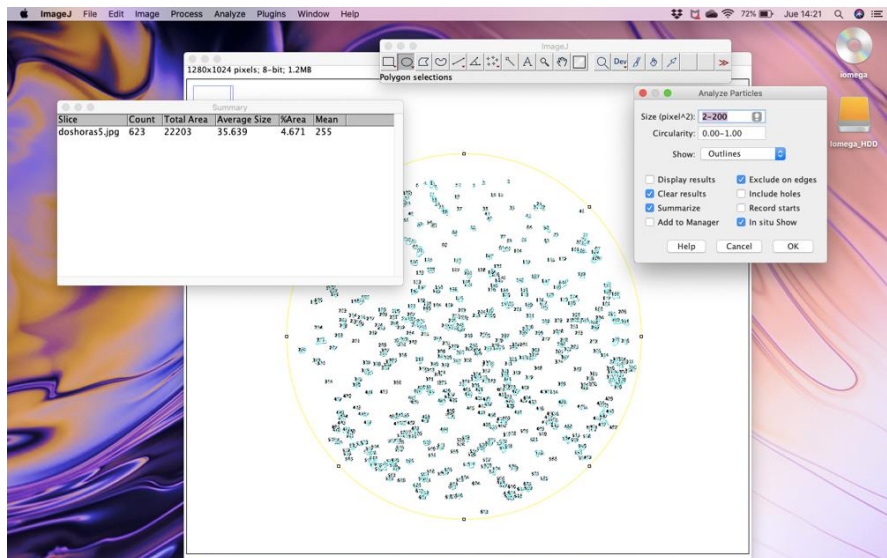
Show > Outlines

Muestra los contornos para así delimitar los cuerpos contabilizados.

✓ Exclude edges ✓ Clear results ✓ Summarize ✓ In Situ Show > Ok

Así el programa excluye los bordes de la imagen al realizar el conteo, muestra el resumen de los resultados, borra el análisis para que no interfiera con los resultados del próximo análisis y muestra las células que fueron contabilizadas dentro de la misma imagen.

El análisis después de ejecutarse muestra un resumen el cual contiene el número de células totales, el área total analizada y la medida promedio de los cuerpos contabilizados.



ANEXO VII

SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 1)

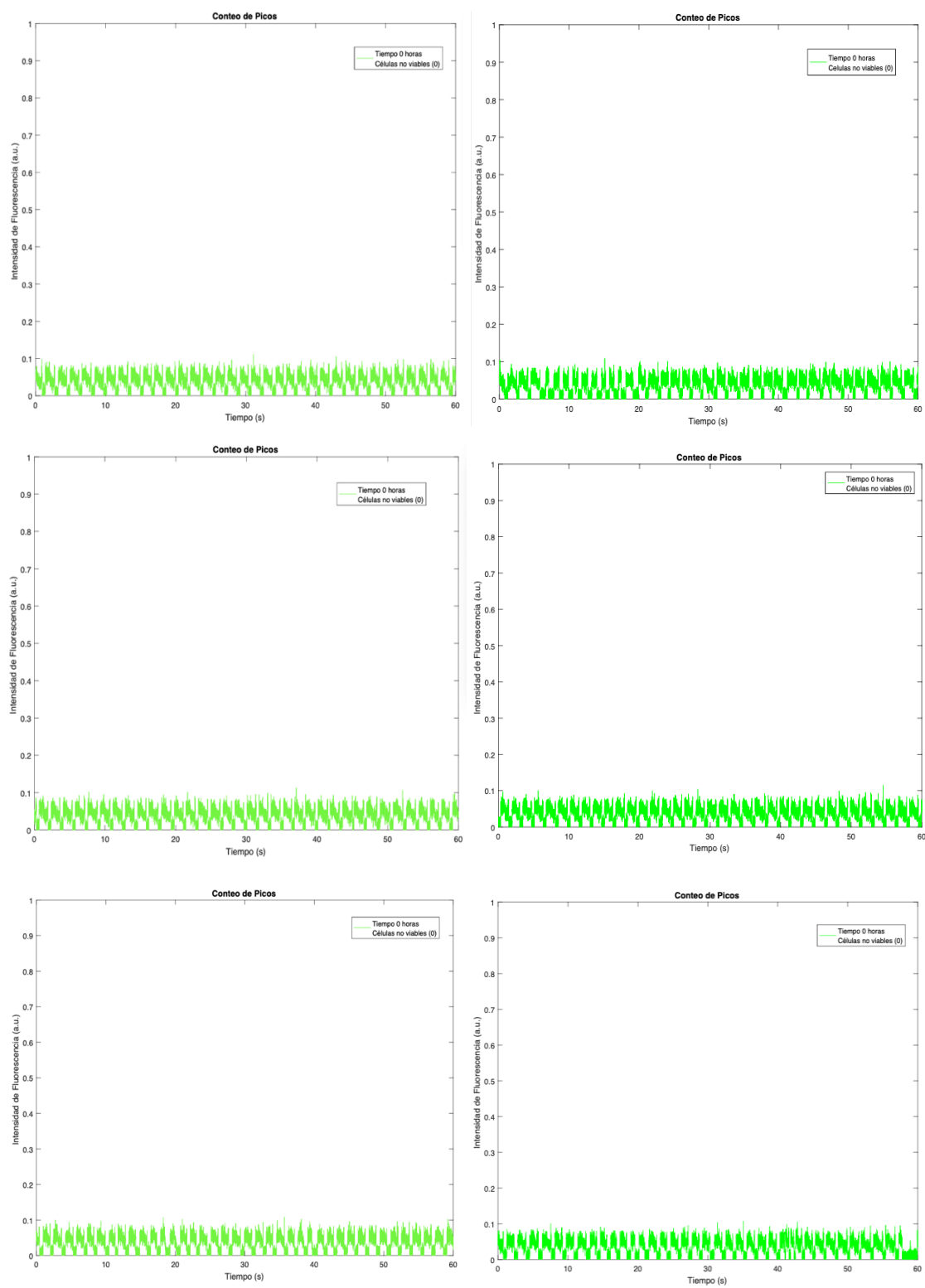
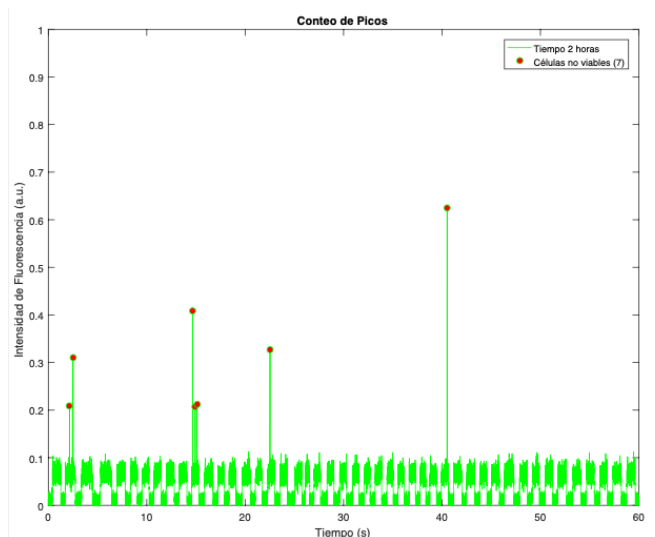
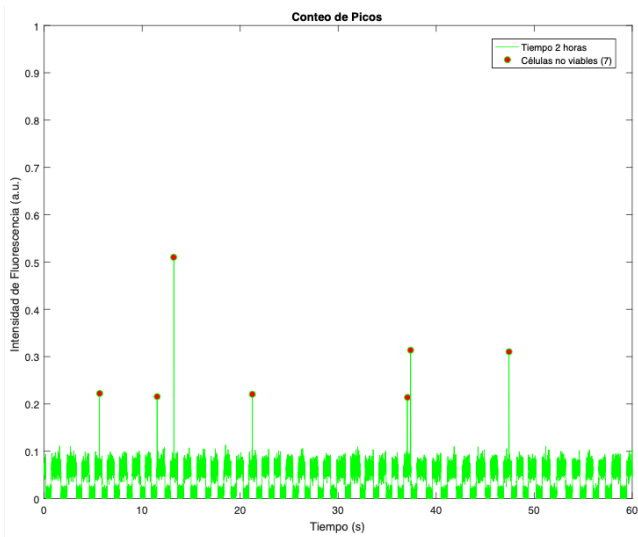
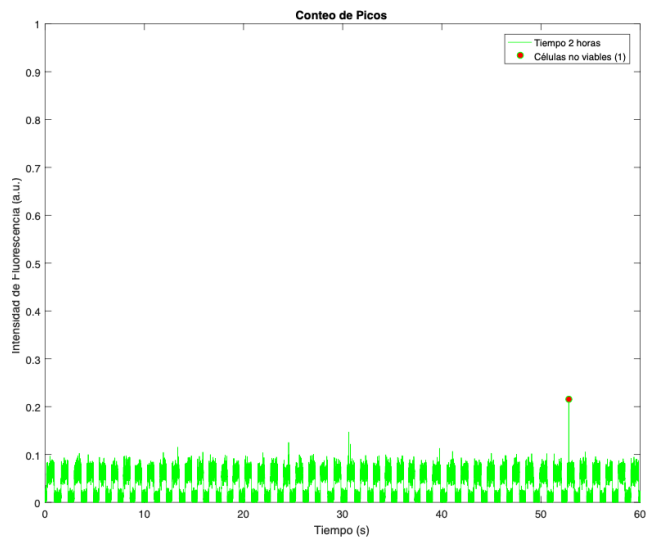
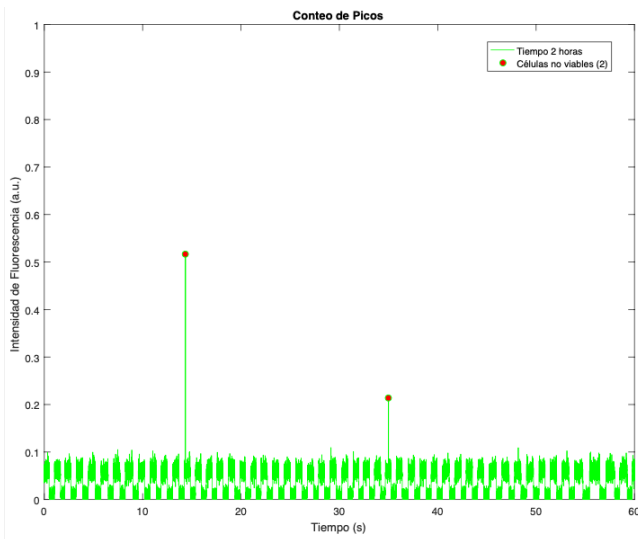
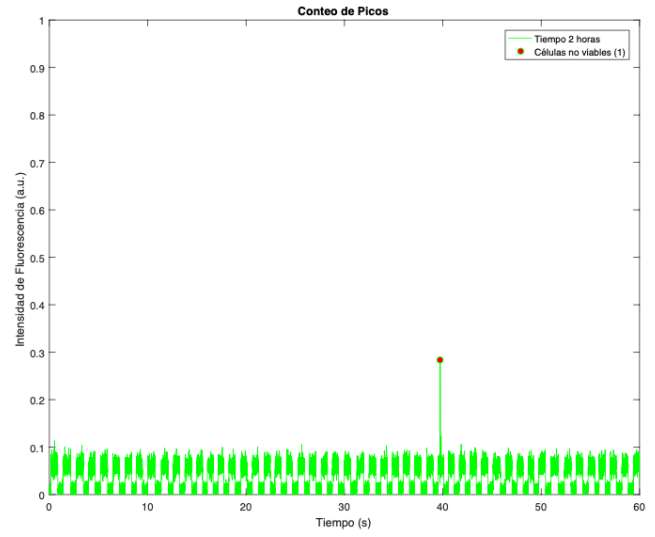
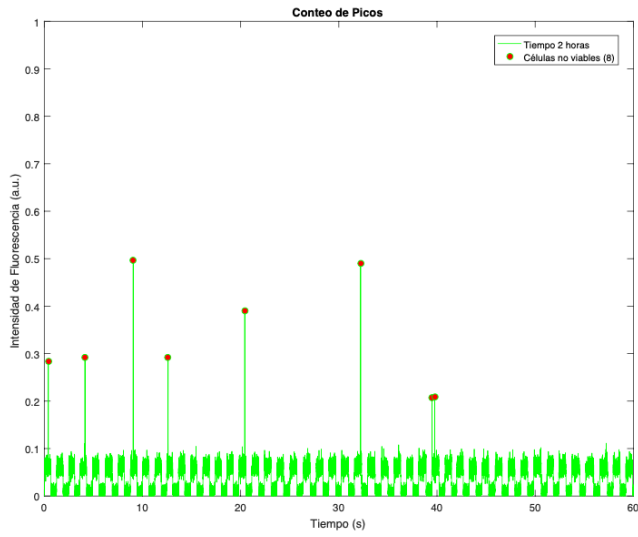


Figura 54-59. Conteo de picos en tiempo cero (Ensayo 1).



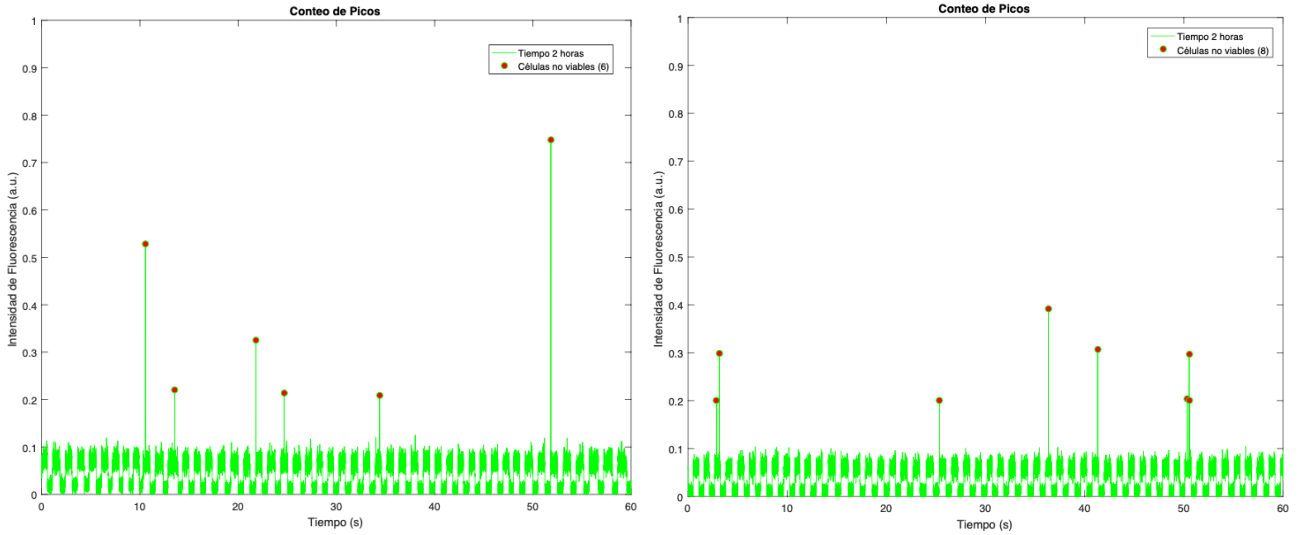
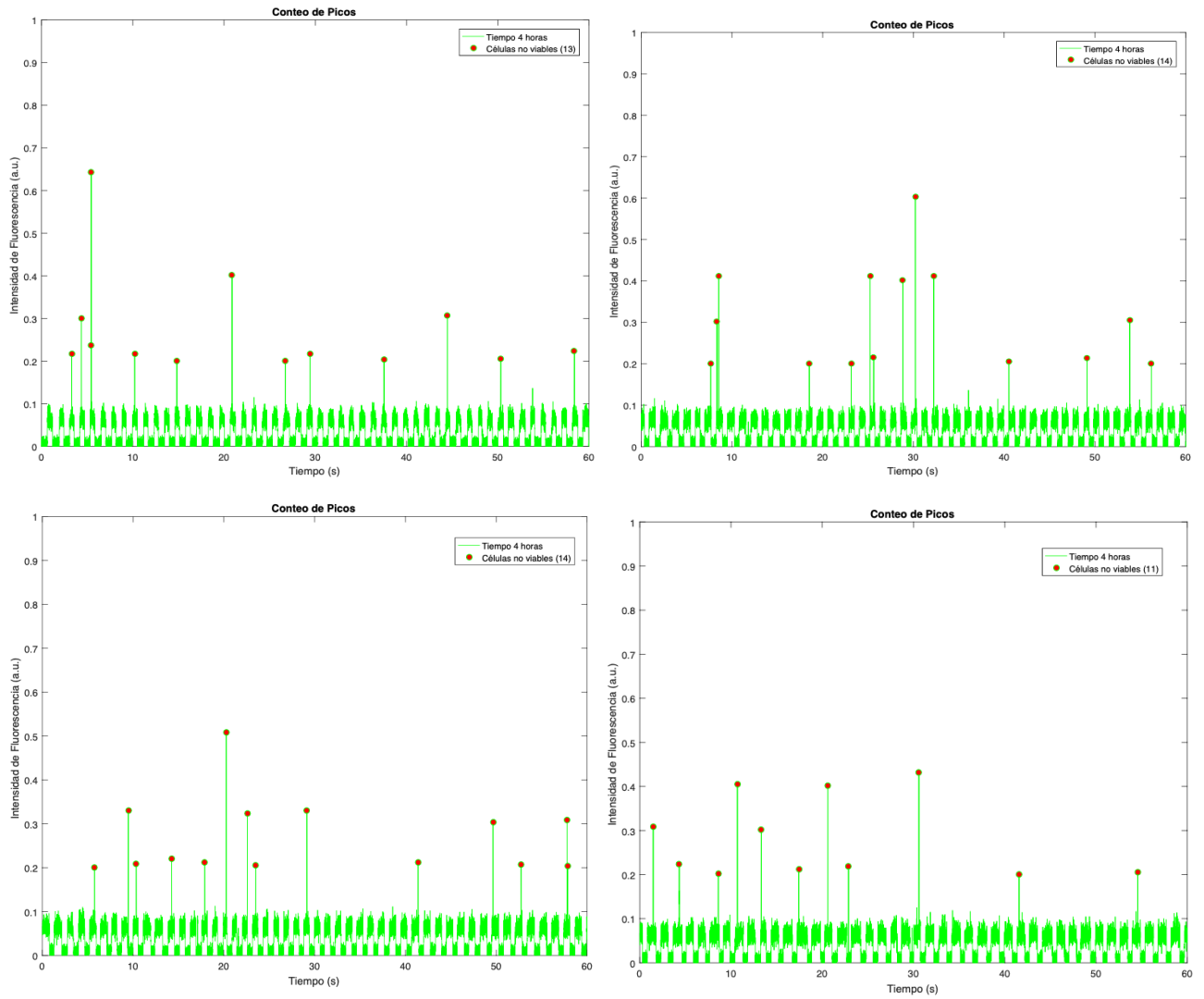


Figura 60-67. Conteo de picos en tiempo dos (Ensayo 1).



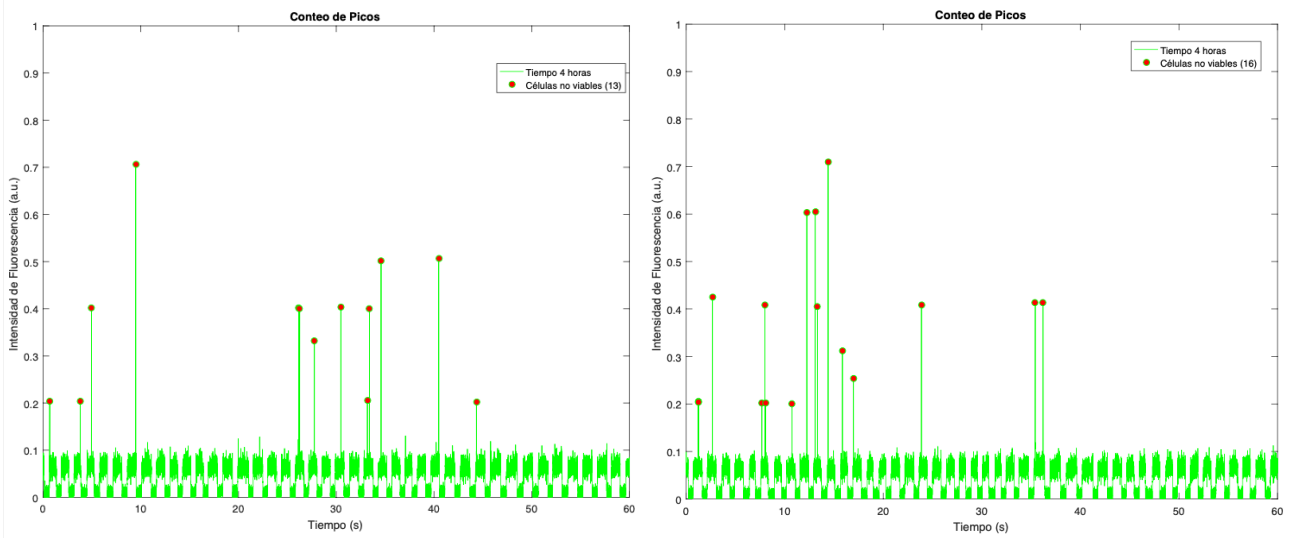


Figura 68-73. Conteo de picos en tiempo cuatro (Ensayo 1).

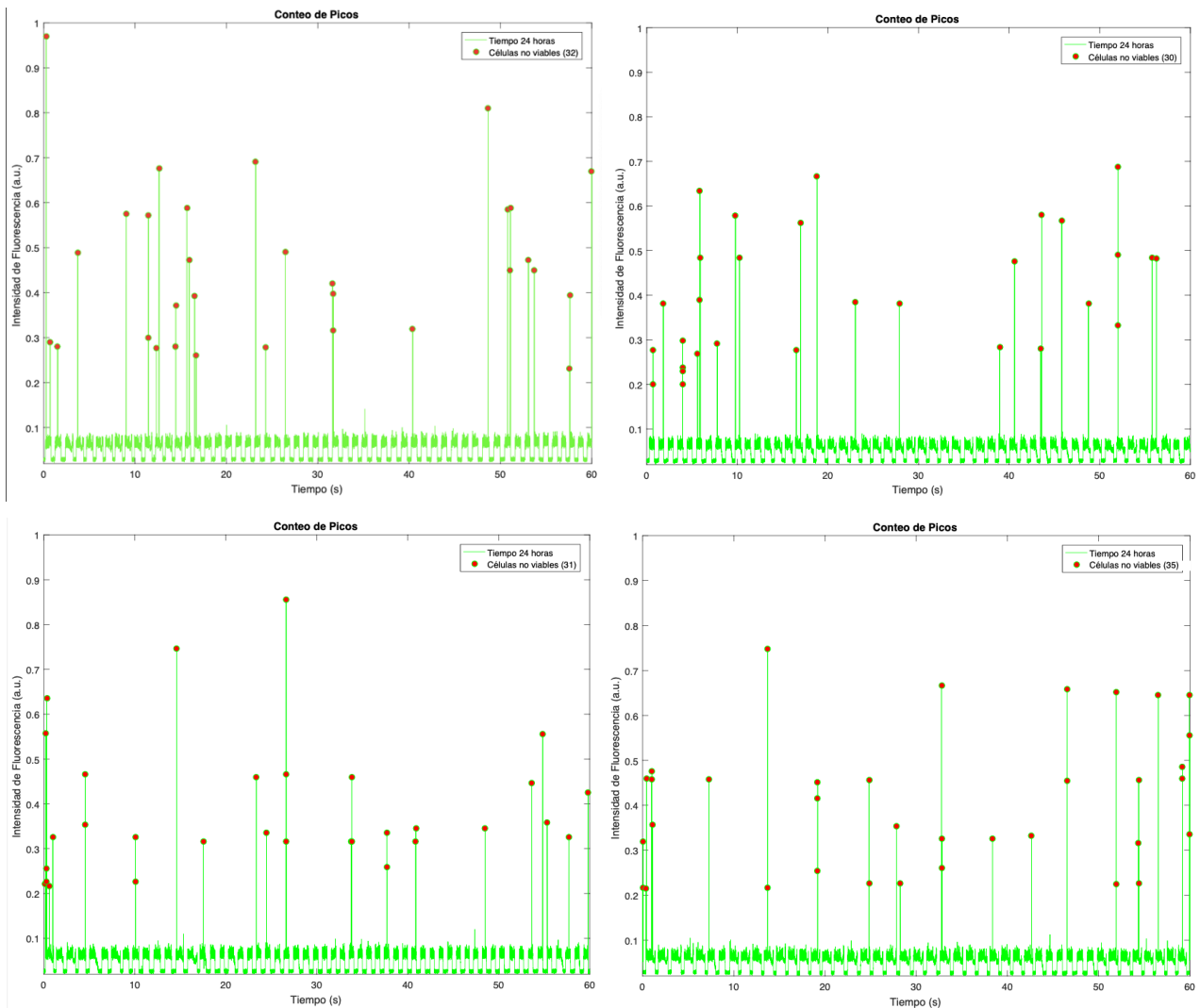


Figura 74- 77. Conteo de picos en tiempo veinte (Ensayo 1).

ANEXO VIII

SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 2)

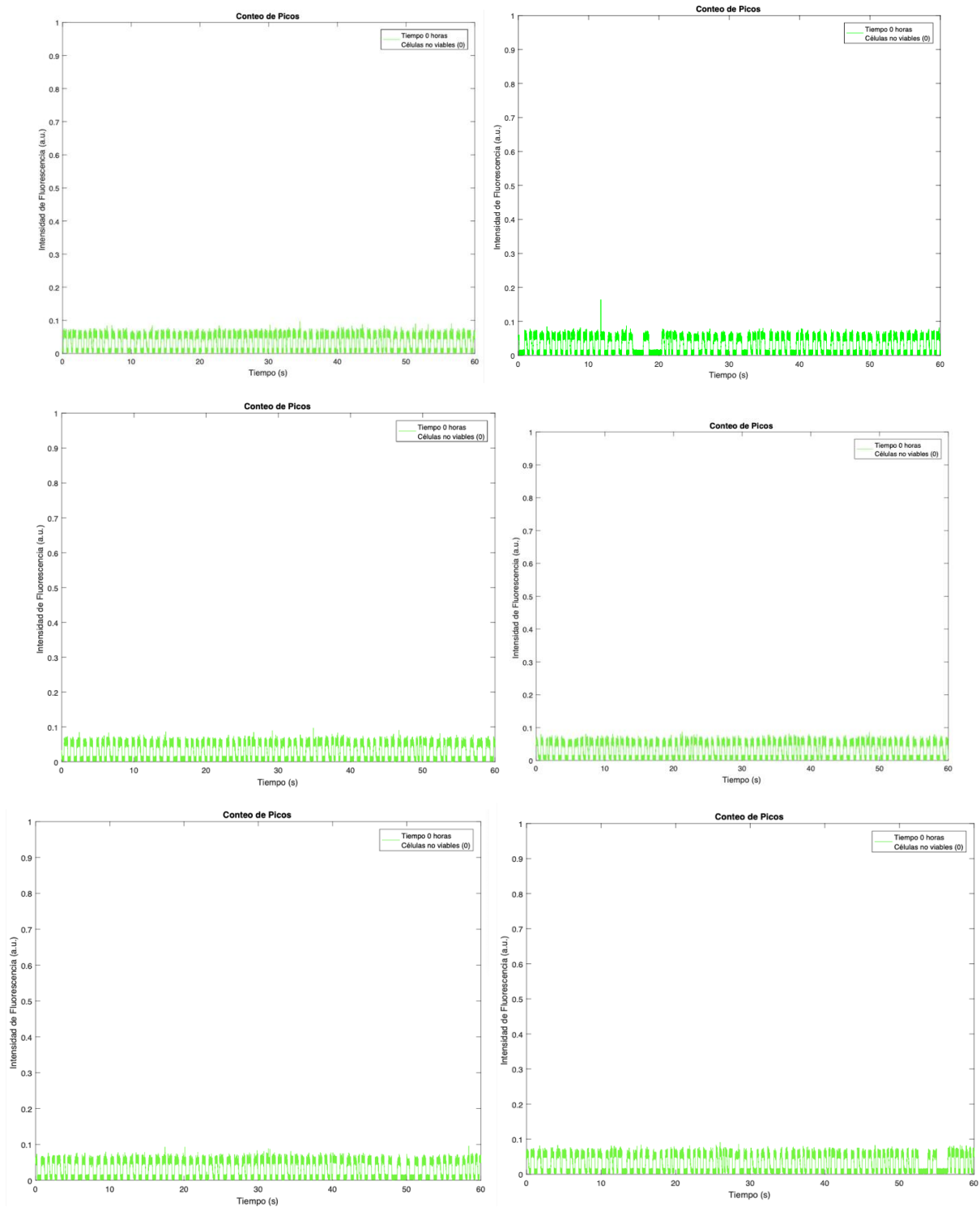
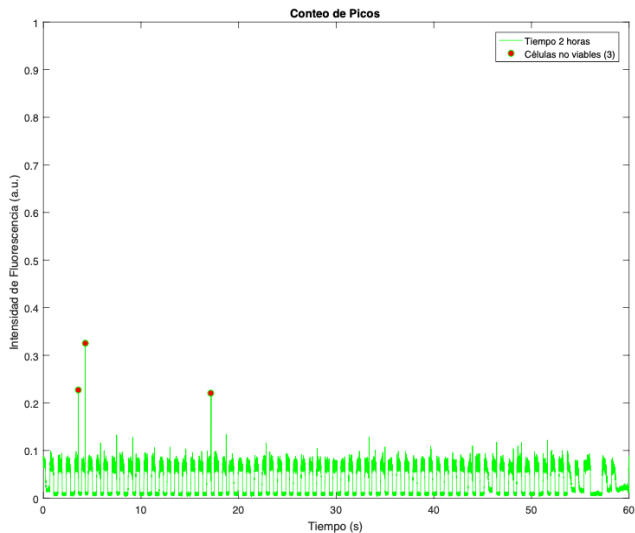
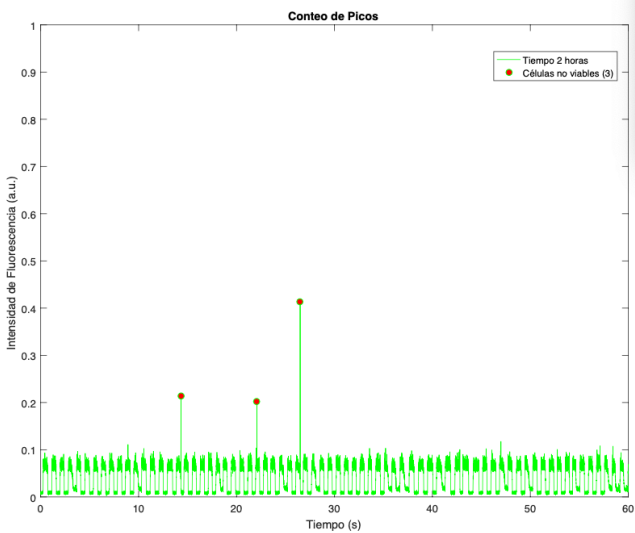
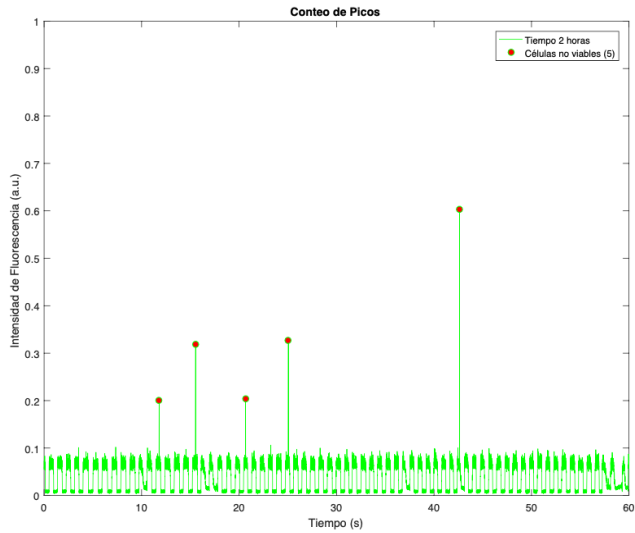
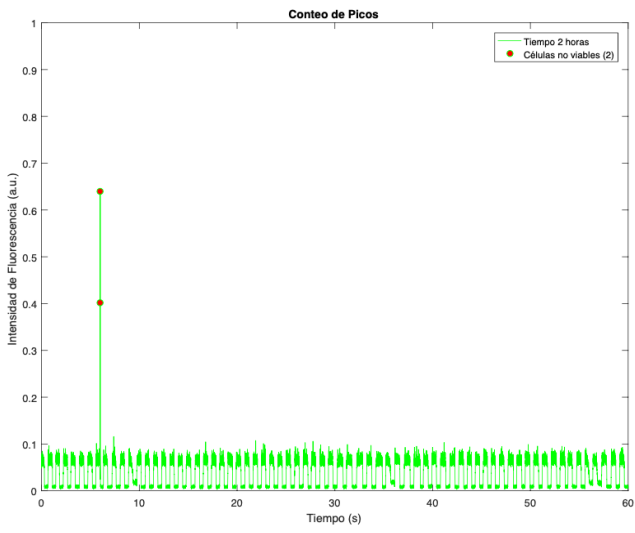
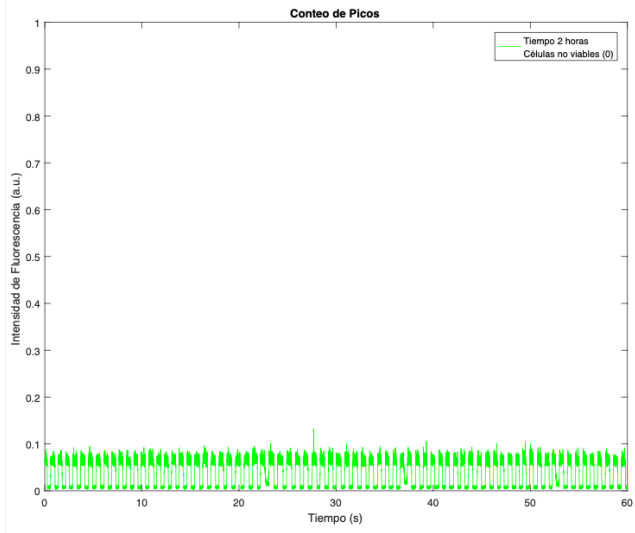
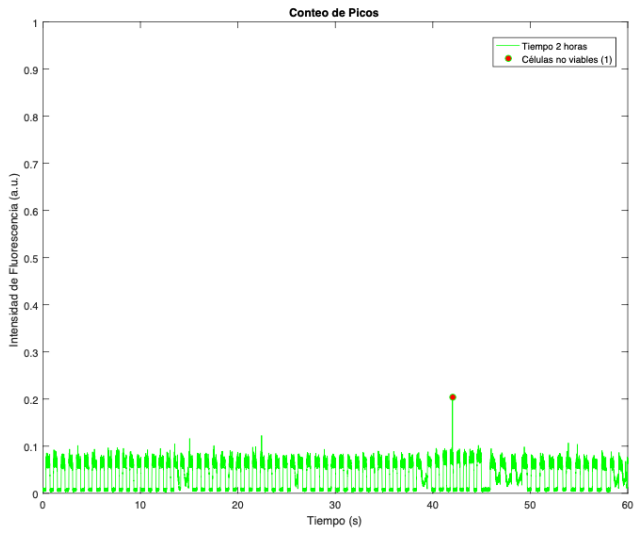


Figura 78-83. Conteo de picos en tiempo cero (Ensayo 2).



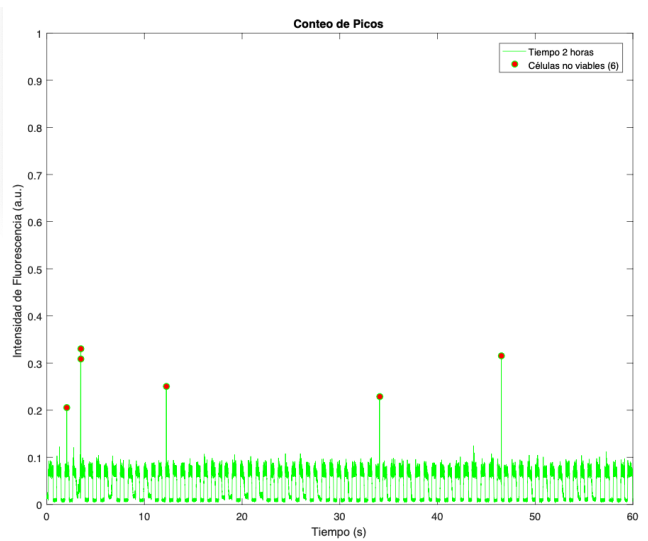
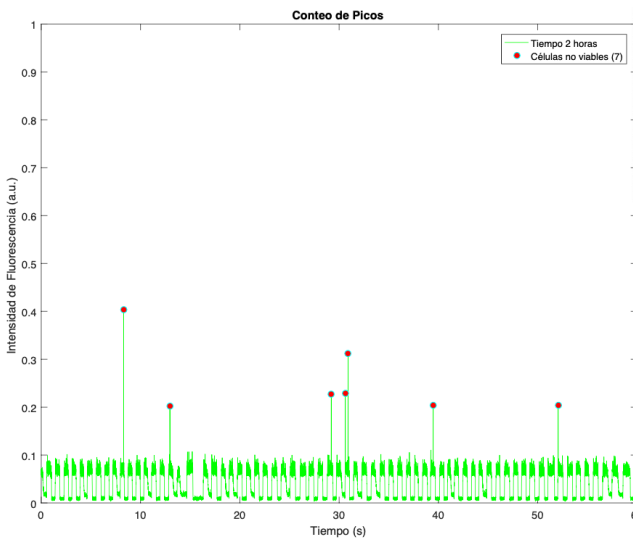
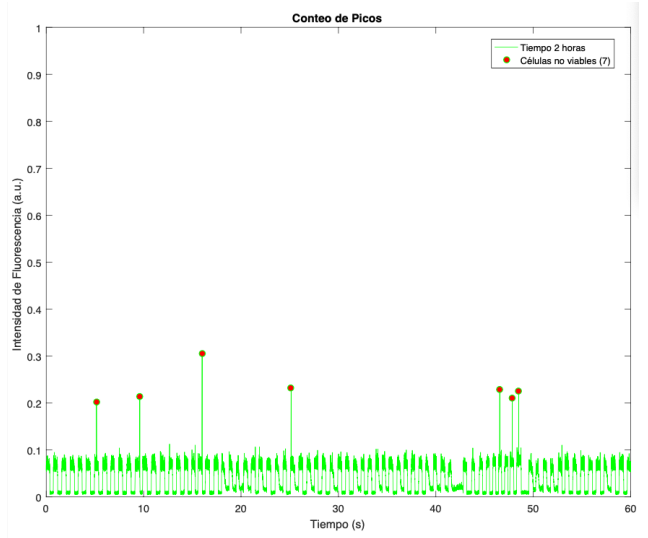
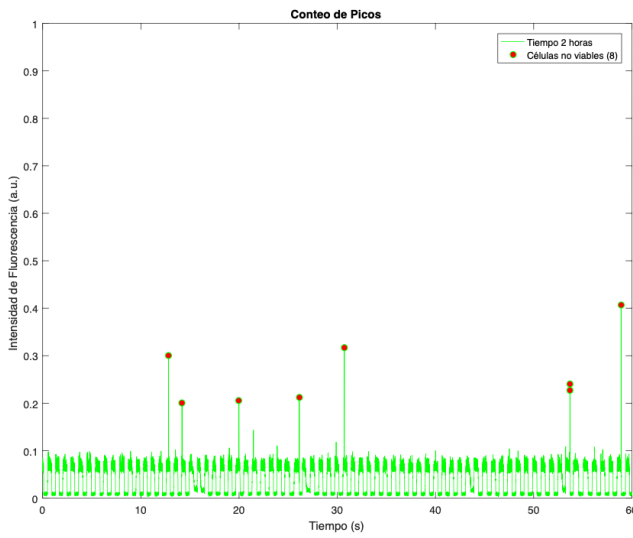
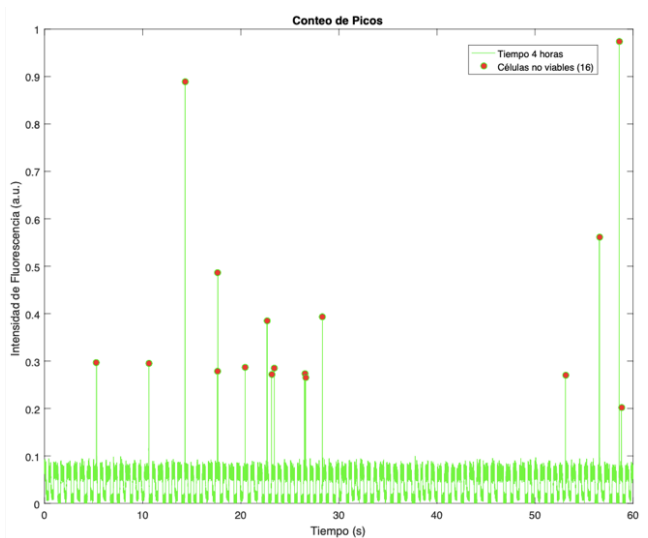
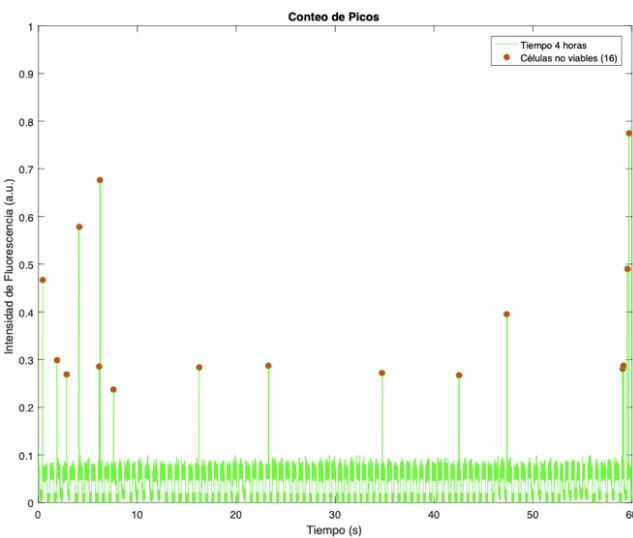
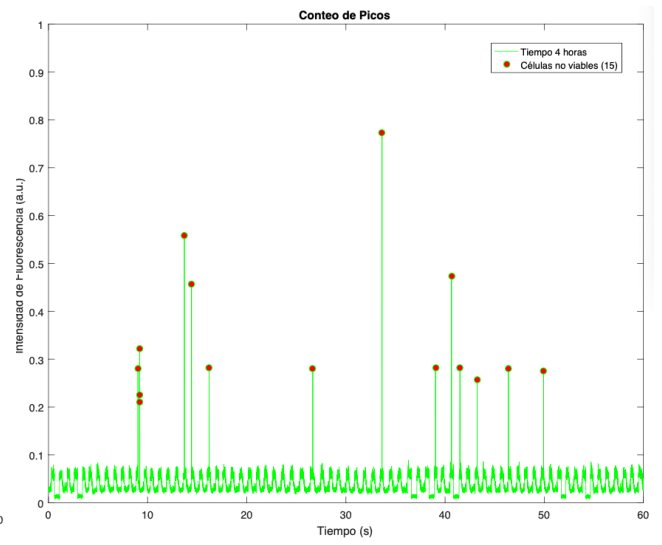
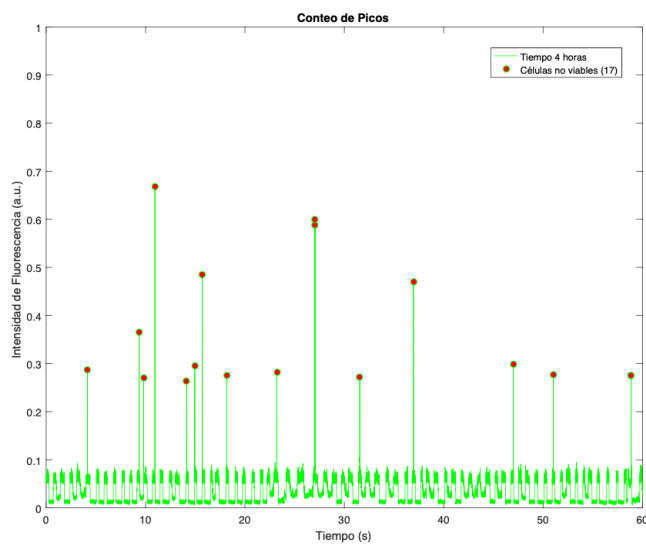
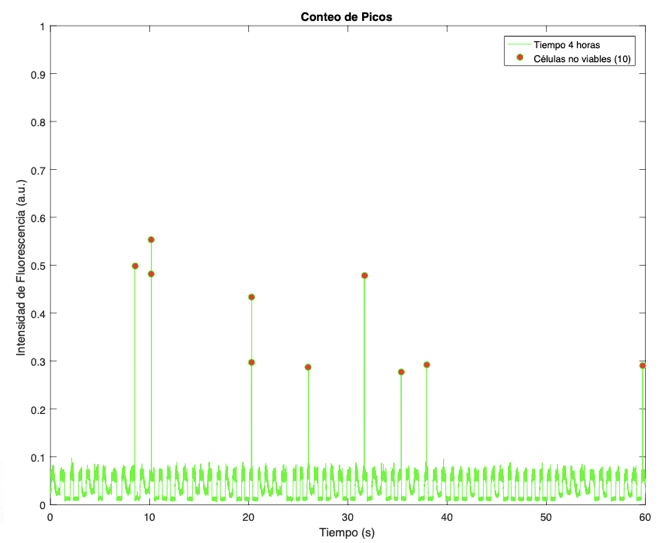
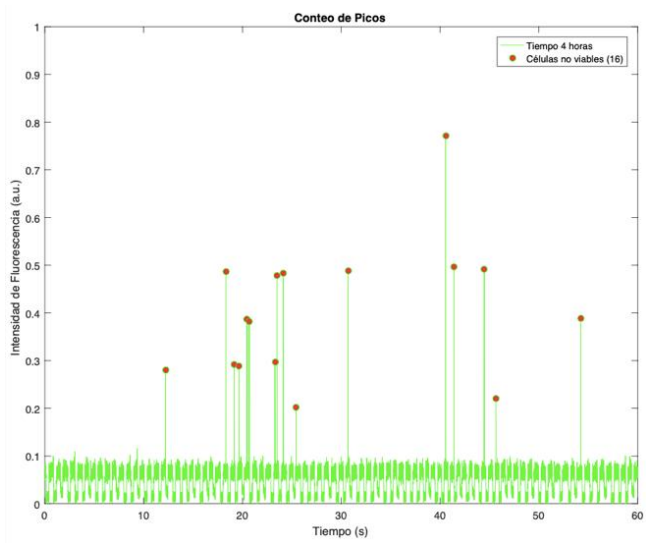
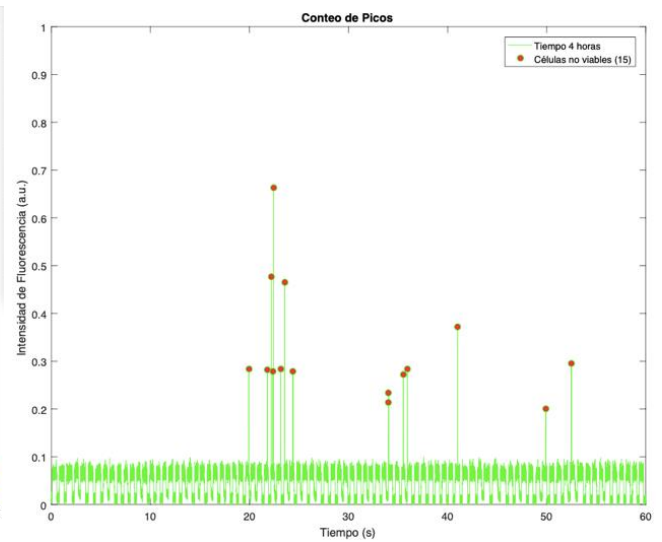
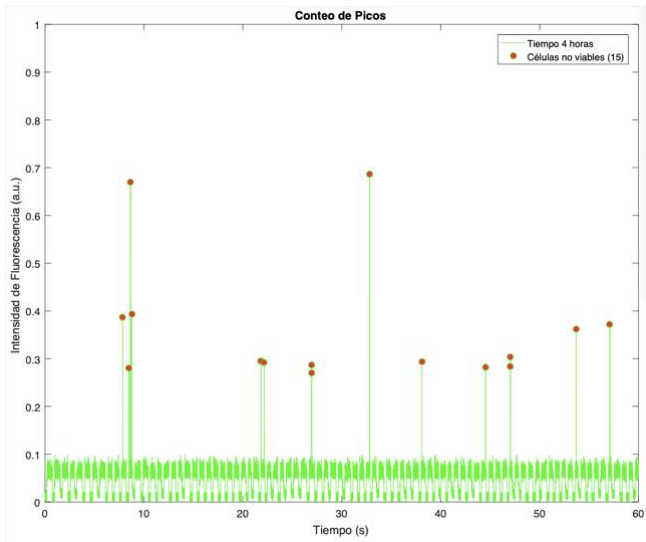


Figura 84-93. Conteo de picos en tiempo dos (Ensayo 2).





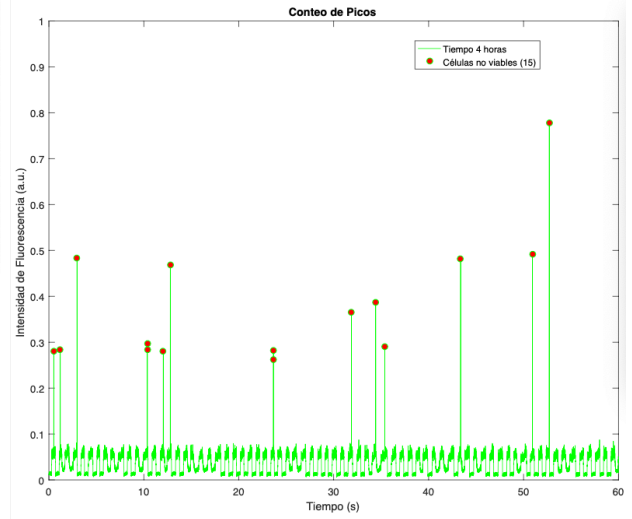
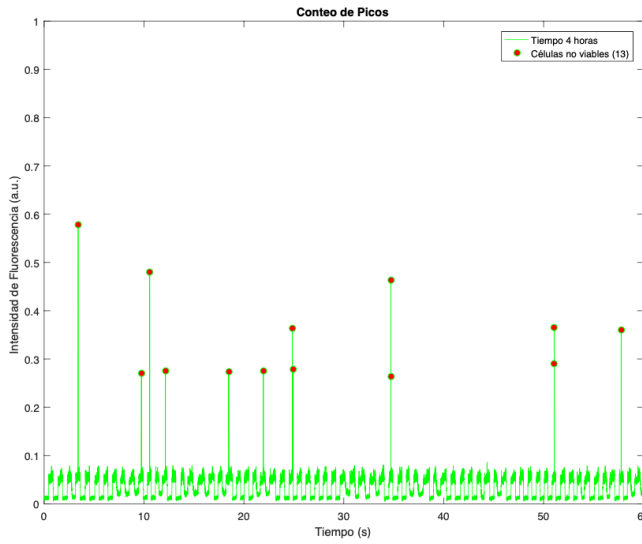
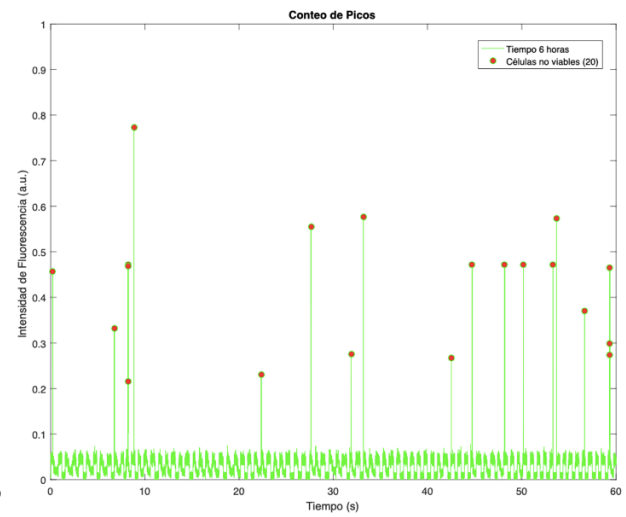
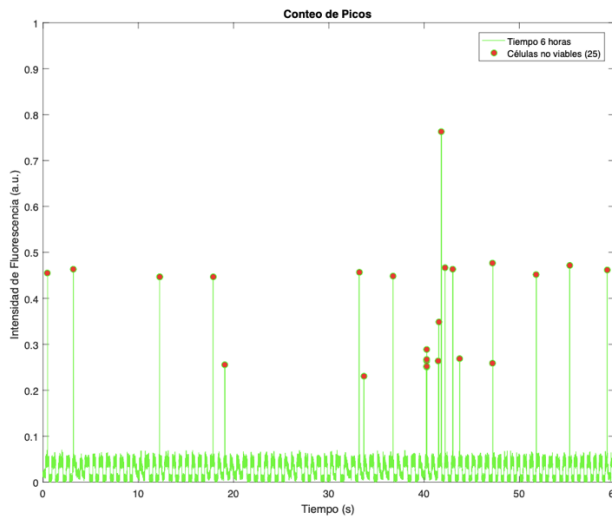
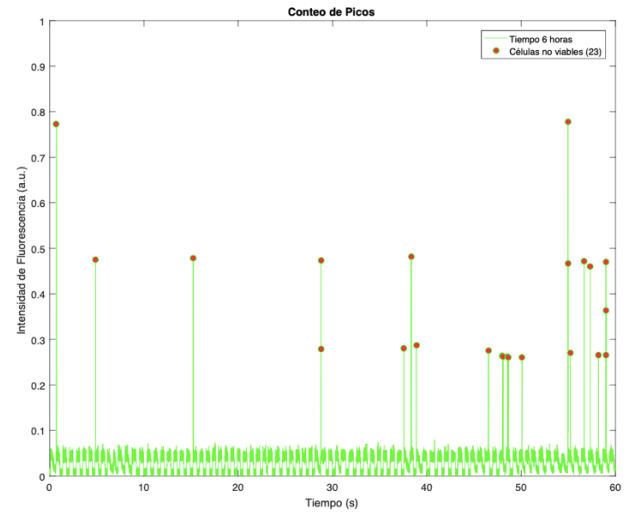
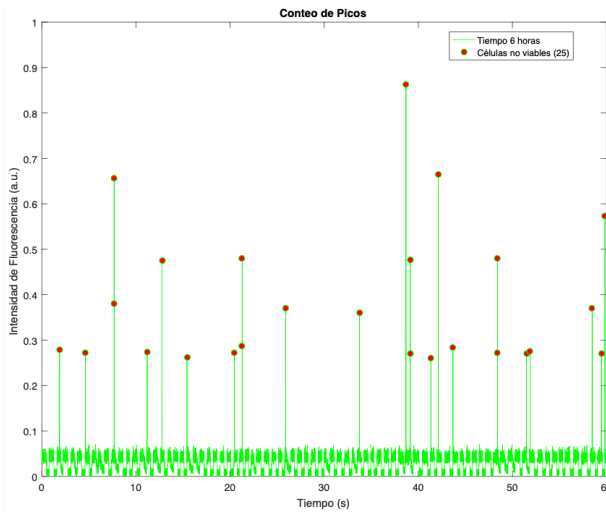


Figura 94-103. Conteo de picos en tiempo cuatro (Ensayo 2).



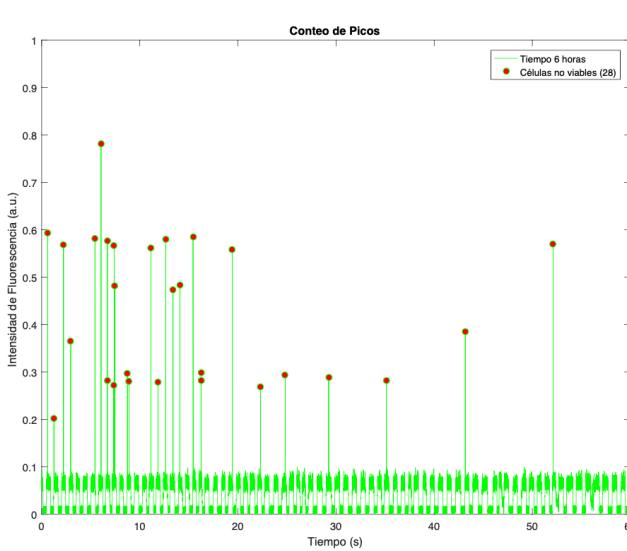
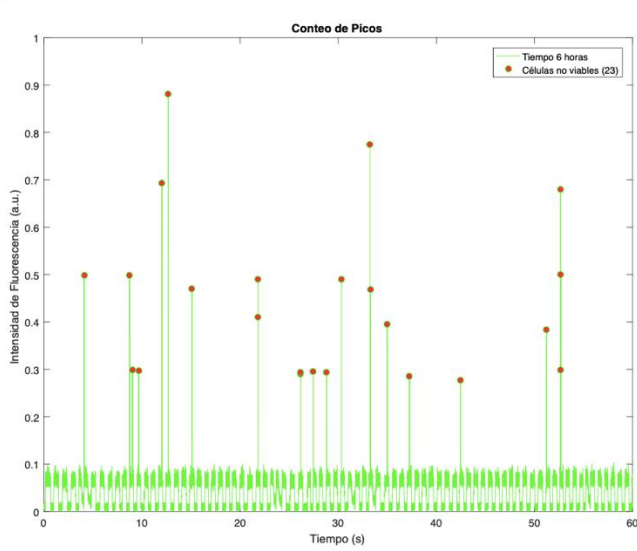
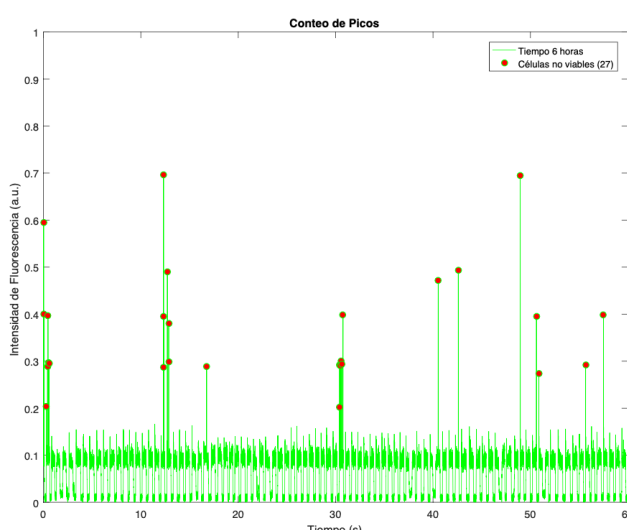
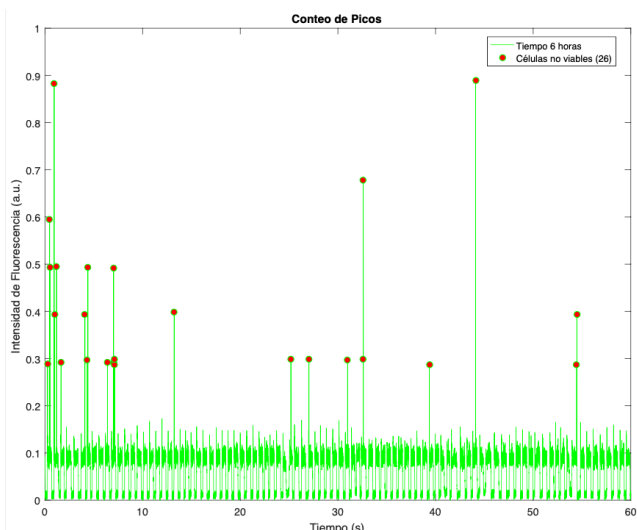
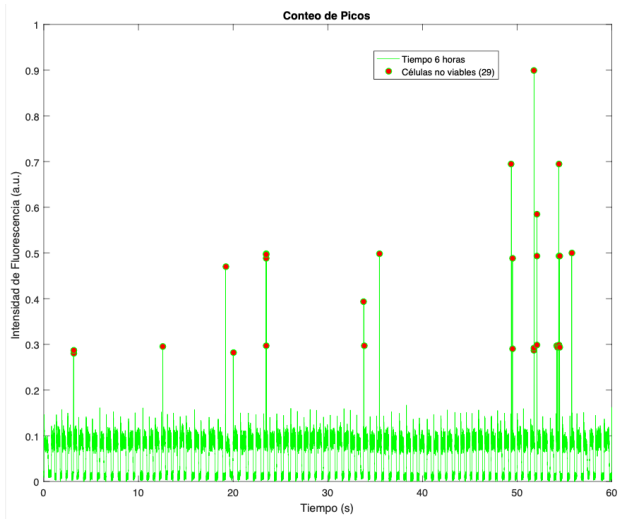
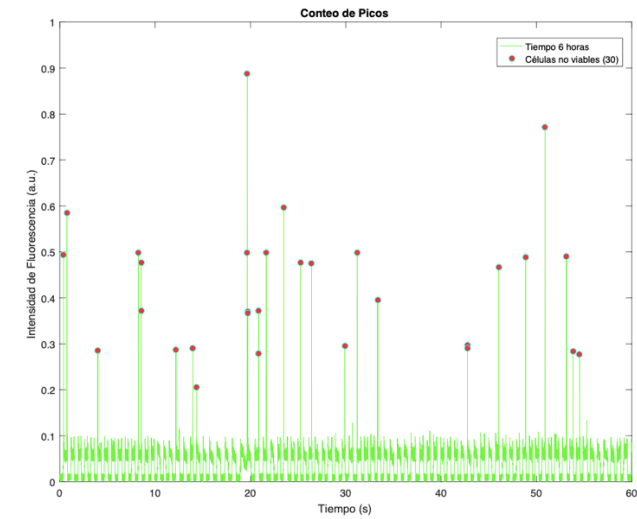
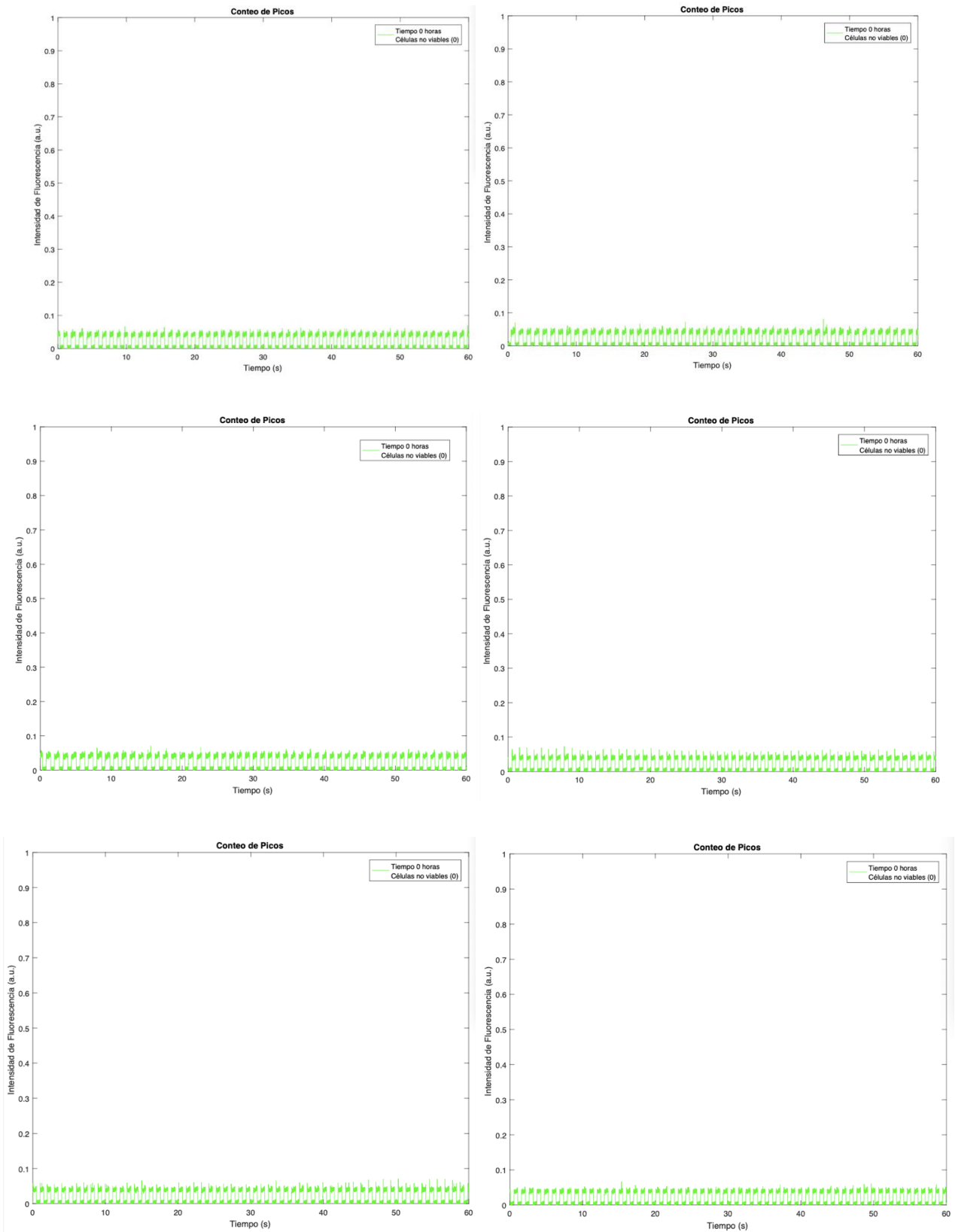


Gráfico 104- 113. Conteo de picos en tiempo seis (Ensayo 2).

ANEXO IX

SEÑALES DE CÉLULAS NO VIABLES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (ENSAYO 3)



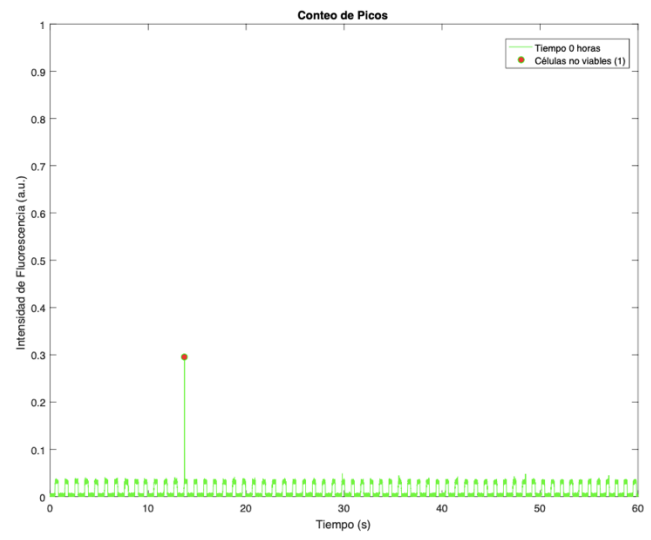
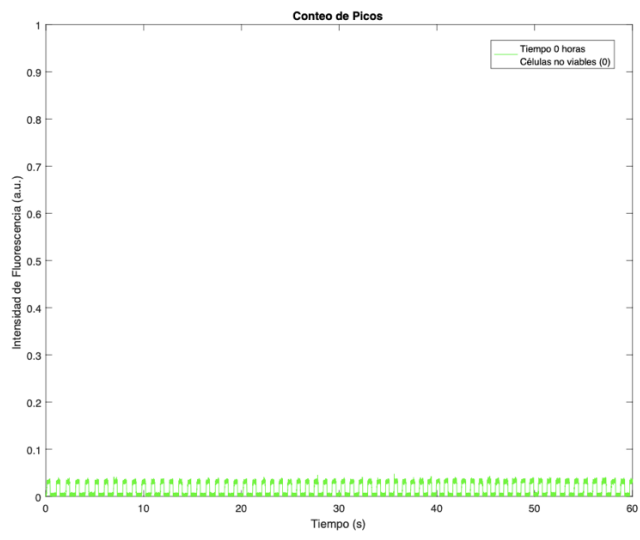
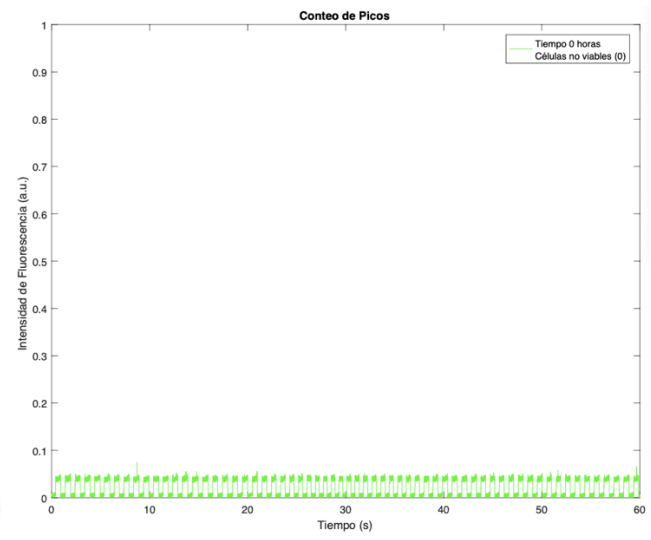
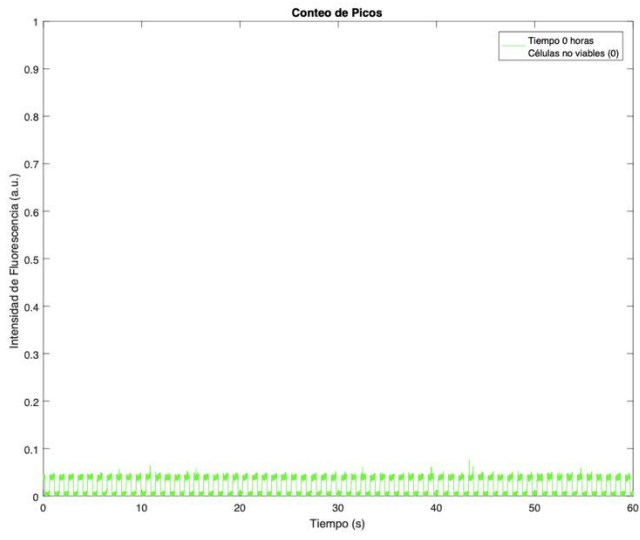
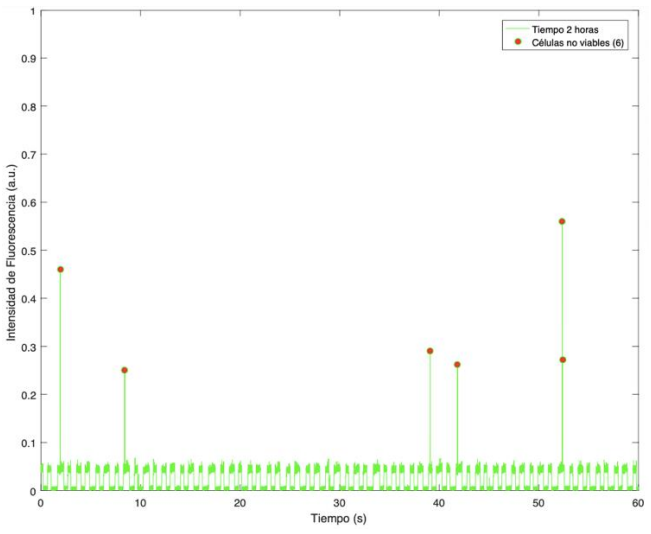
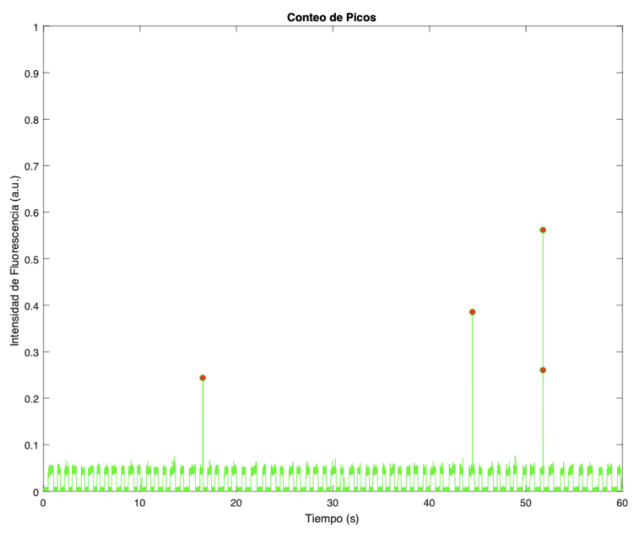
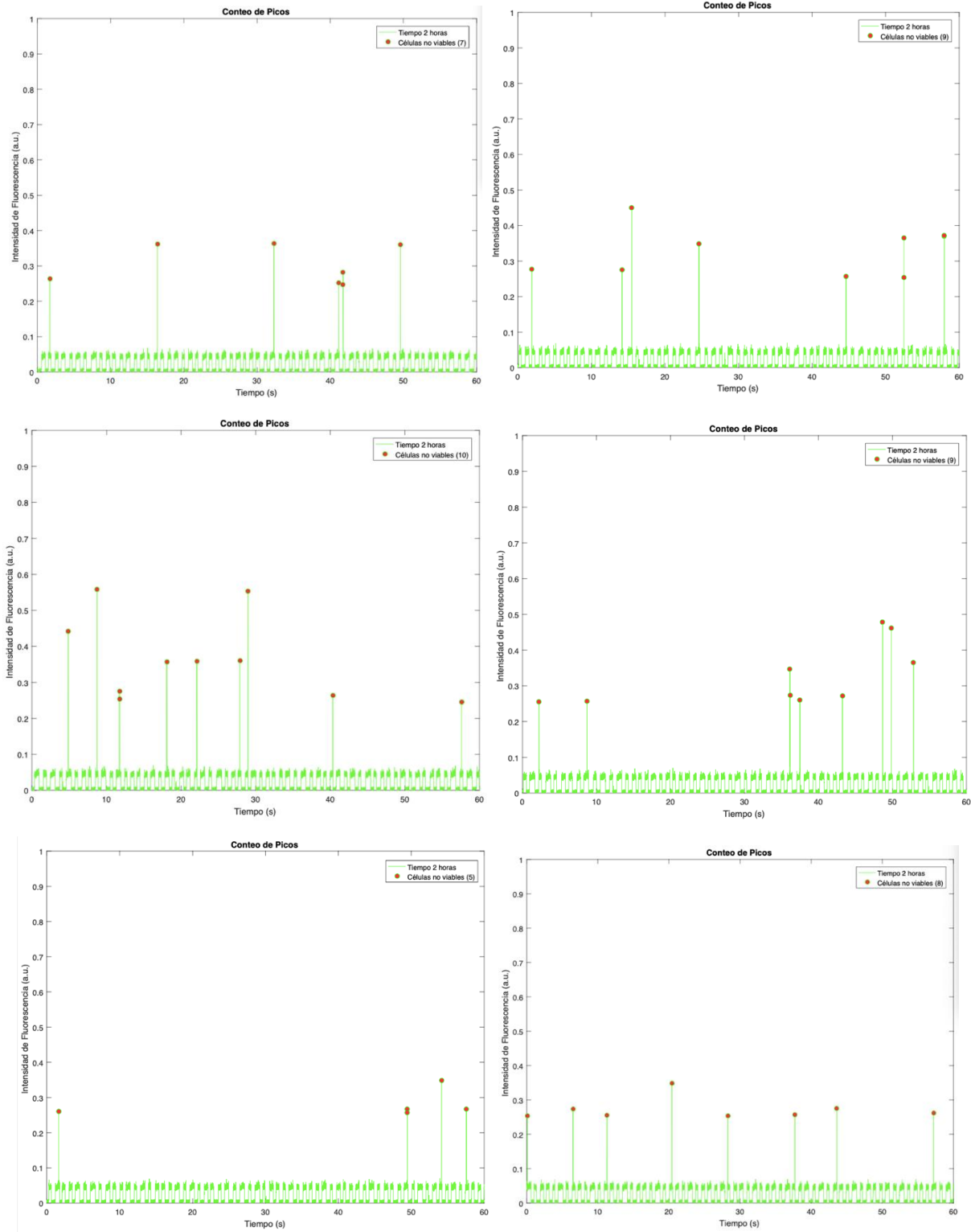


Figura 114-123. Conteo de picos en tiempo cero (Ensayo 3).





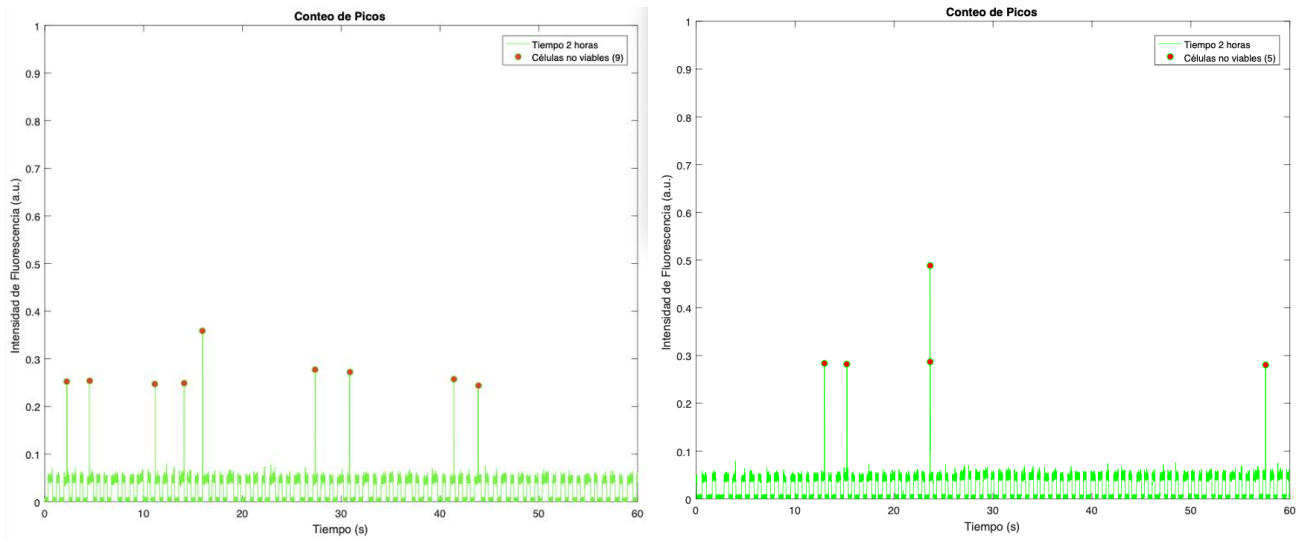
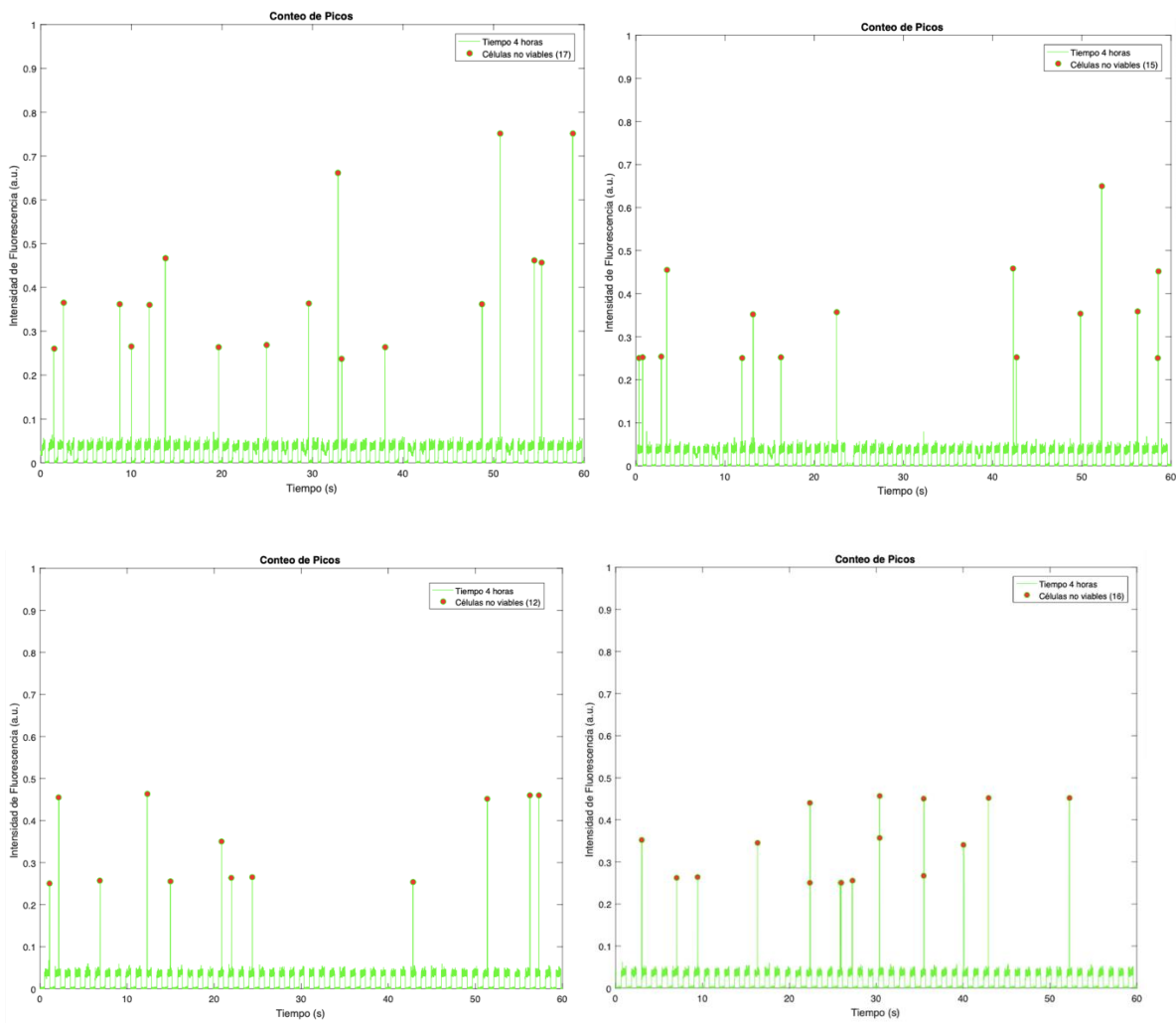


Figura 124- 133. Conteo de picos en tiempo dos (Ensayo 3).



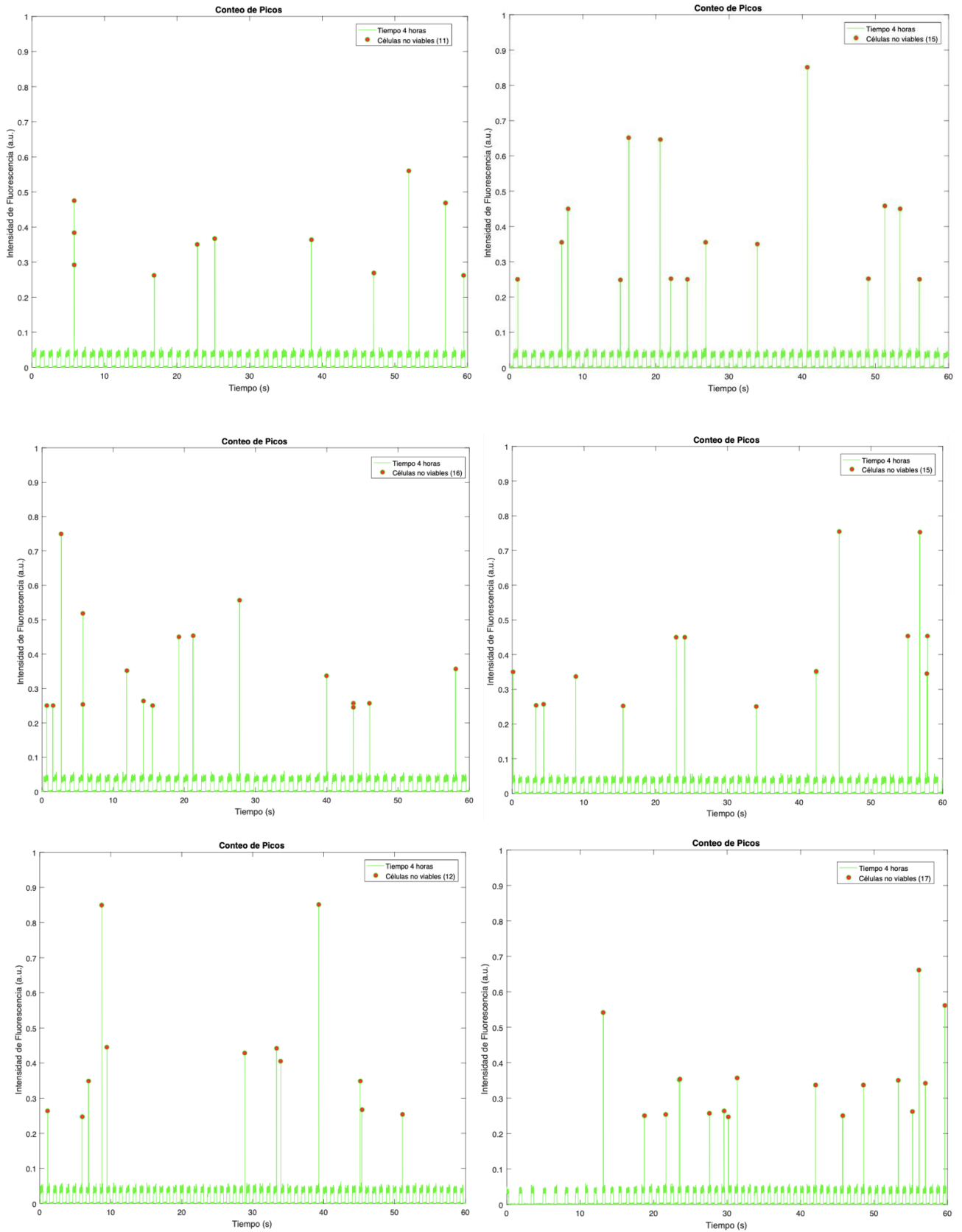
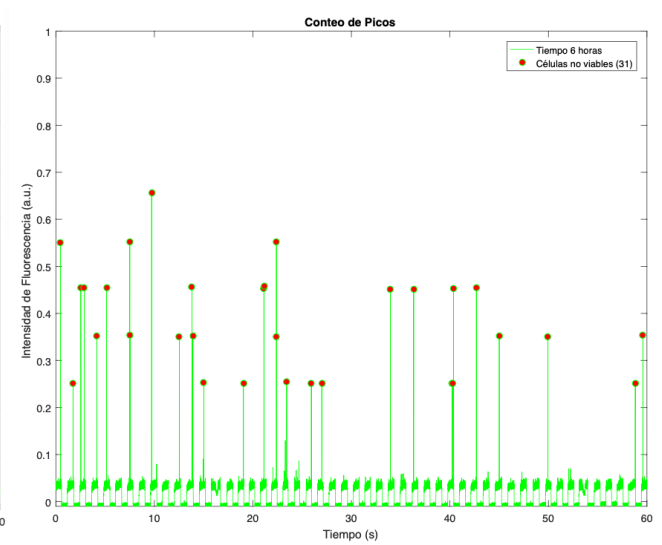
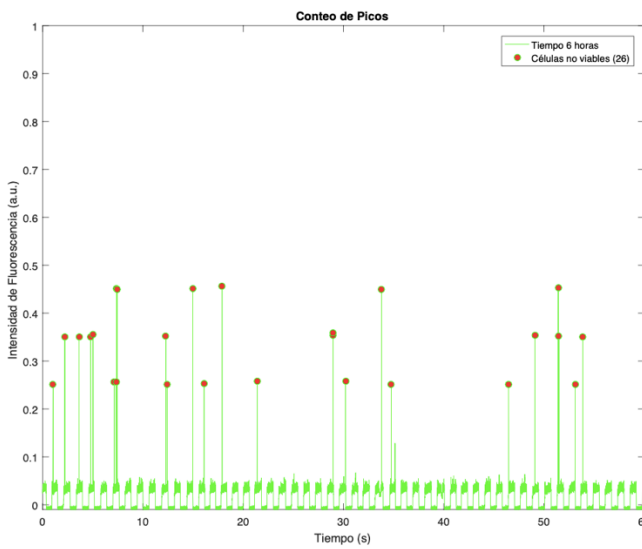
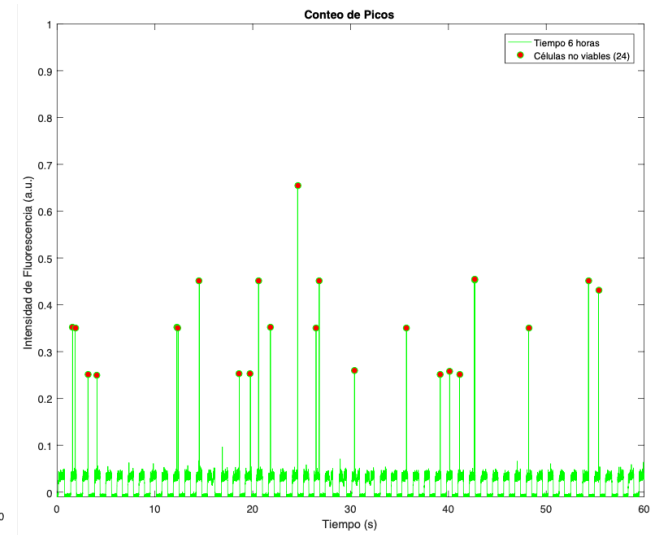
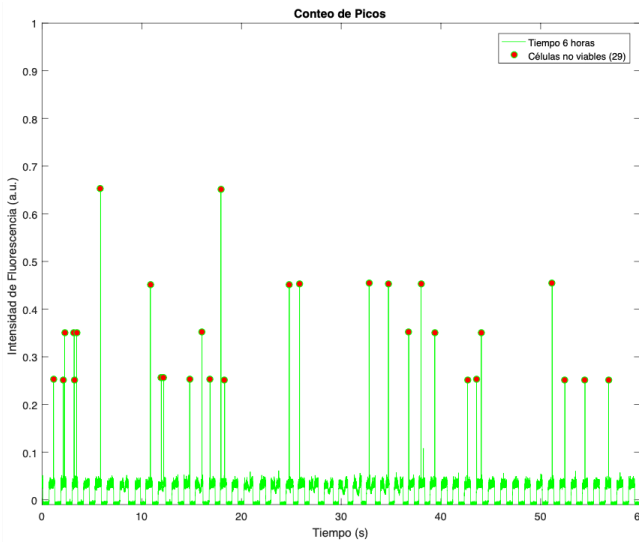
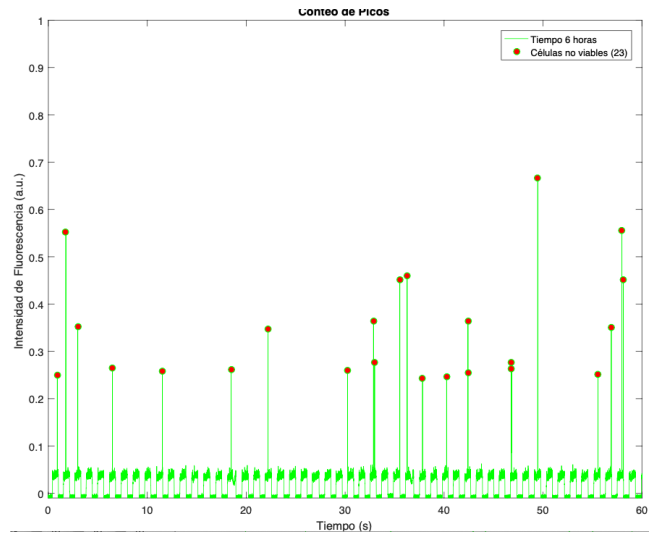
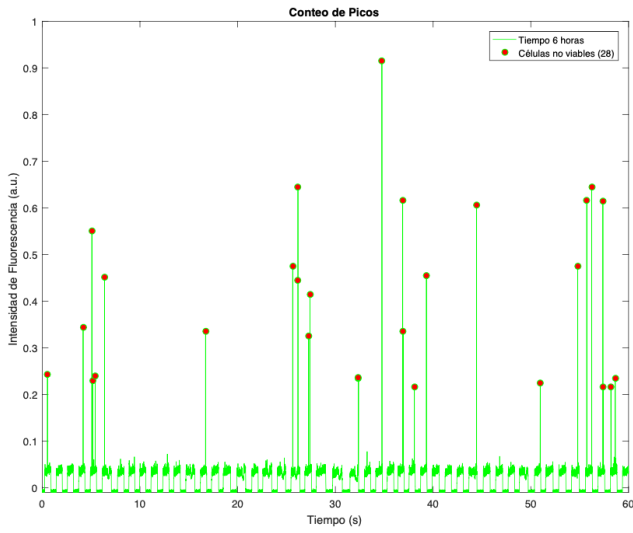


Figura 134- 143. Conteo de picos en tiempo cuatro (Ensayo 3).



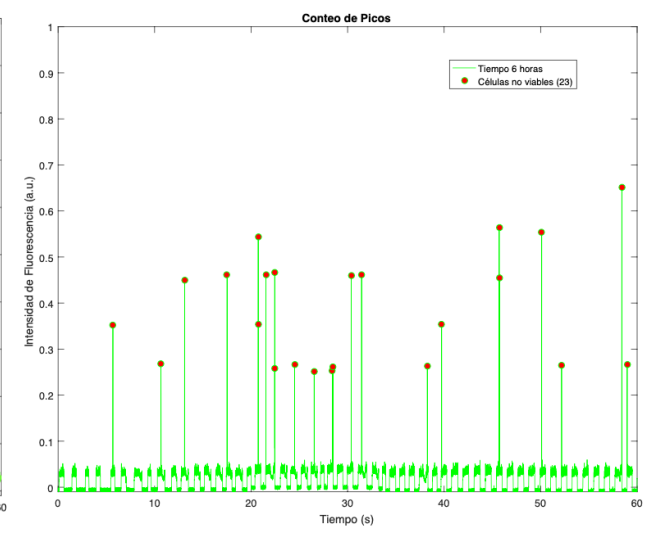
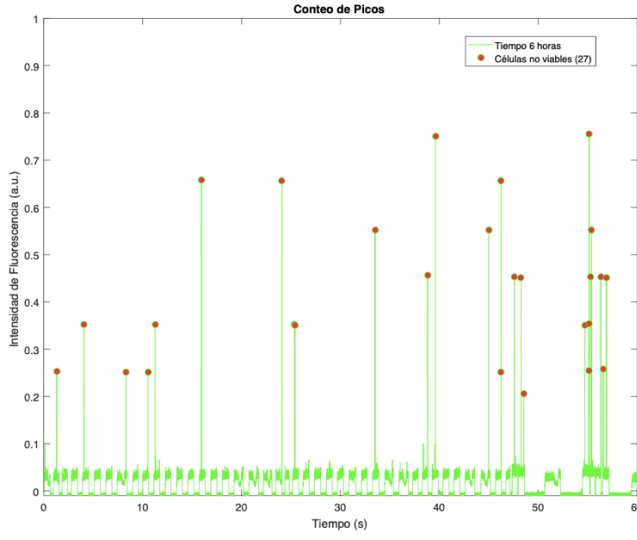
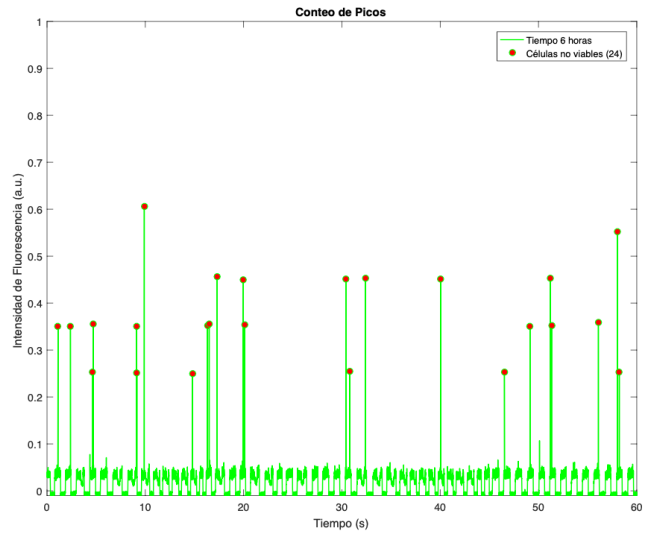
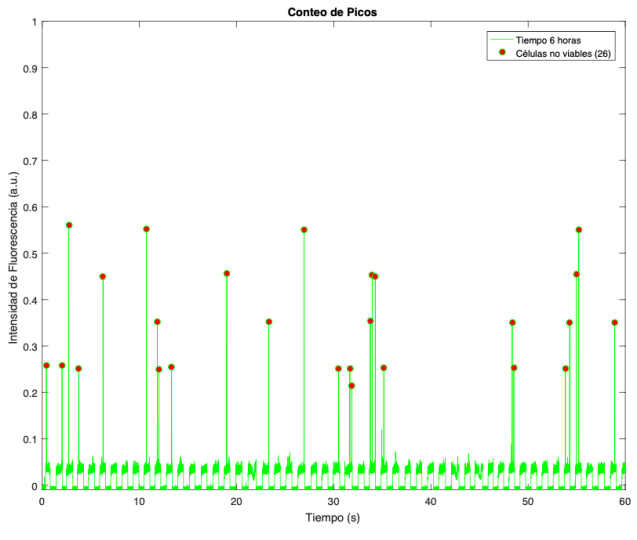


Gráfico 144- 153. Conteo de picos en tiempo seis (Ensayo 3).