

Uso de nanopartículas magnéticas y un biosensor para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades infecciosas emergentes, re-emergentes y tropicales desatendidas

Anaximandro Gómez-Velasco^{1,2}, Jorge L. León-Cortés³, Cristina Gordillo-Marroquín^{1,2}, Héctor Javier Sánchez-Pérez^{1,2}, Evangelyn C. Alocilja⁴, Sergio G. Muñoz-Jiménez⁵, A. Bencomo-Alerm^{3,5}, Natán Enríquez-Ríos⁶, Letisia Jonapá-Gómez⁷, Adriana Gómez-Bustamante⁷

¹Departamento de Salud. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). San Cristóbal de Las Casas. Chiapas. ²Red GRAAL (Grupos de Investigación para América y África Latinas). ³Departamento de Conservación de la Biodiversidad. ECOSUR. San Cristóbal de Las Casas. Chiapas. ⁴Laboratorio de Biosensores, Universidad Estatal de Michigan. EE.UU. ⁵Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis de la región Altos de Chiapas. Secretaría de Salud del Estado de Chiapas. ⁶Departamento de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles y no Transmisibles. Secretaría de Salud del Estado de Chiapas. ⁷Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Chiapas.

Resumen

Las enfermedades infecciosas (EIs) emergentes, re-emergentes y las tropicales desatendidas pueden ser localizadas en áreas geográficas específicas, pero fenómenos como el cambio climático, la globalización, las condiciones socioeconómicas y la migración, entre otros, pueden facilitar su rápida transmisión hacia otras regiones. Brotes recientes de Zika, Chikungunya, y Ébola han puesto en alerta la salud pública mundial. Otras enfermedades infecciosas aún persisten y representan severos problemas de salud pública, tales como la tuberculosis, el VIH-sida, la leishmaniasis, el dengue, la malaria y la enfermedad de Chagas, entre otras. Para el diagnóstico, prevención y disminución en la propagación de las EIs, es necesario implementar métodos de diagnóstico precisos, rápidos y accesibles que permitan su atención médica de manera oportuna. Describimos el uso de la nanotecnología, específicamente de "Alocilja Nanopartículas Magnéticas (AMNs)" acopladas a un biosensor, como un nuevo método de diagnóstico de las EIs. Ilustramos su uso potencial para el diagnóstico de la tuberculosis.

Palabras clave:

Enfermedades infecciosas.
Diagnóstico de tuberculosis.
Nanopartículas magnéticas.
Biosensor. Tuberculosis.
Salud pública.

Use of magnetic nanoparticles and a biosensor for the diagnosis and monitoring of emergent, re-emergent and neglected tropical infectious diseases

Summary

Emerging, re-emerging and neglected tropical infectious diseases (IDs) can be restricted to specific geographic zones, but climate change, globalization, social conditions, and migration, among other factors, can trigger their dissemination worldwide. Outbreaks of Zika, Chikungunya and Ebola have threatened public health worldwide. The rapid transmission of these viral diseases exemplifies the potential quick spread of an infectious disease. Yet several infectious diseases that are of major concern for public health, namely tuberculosis, VIH-sida, Leishmaniasis, dengue, malaria, Chagas, among others. To detect and combat the spread of these IDs, we urge, rapid, and accessible diagnostic tests are needed to identify specific pathogens in order to provide early medical care. In this paper, we review the use of nanotechnology, specifically the Alocilja functionalized magnetic nanoparticles (AMNs) coupled to a biosensor, as a new and quick diagnostic test to detect IDs, and exemplify their potential use in the diagnosis of tuberculosis.

Key words:

Infectious diseases. Diagnosis of tuberculosis. Magnetic nanoparticles. Biosensor. Tuberculosis. Public health.

Enfermedades infecciosas emergentes, re-emergentes y tropicales desatendidas

Las enfermedades infecciosas (EIs) son aquellas causadas por microorganismos patógenos, tales como bacterias, virus, parásitos, y hongos¹. Pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra, o alojarse en diferentes hospederos o reservorios¹.

Las EIs son las principales causas de morbilidad y mortalidad entre la población de países en vías de desarrollo². En el año 2016, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las EIs representaron alrededor del 20,1% de las causas de mortalidad² y del 12,6% de morbilidad³ en todo el mundo. El impacto de las EIs es muy alta en países de ingreso bajo y de ingreso mediano bajo, representando un factor de riesgo importante, principalmente debido a la convergencia de factores de riesgo, tales como: la alta densidad poblacional, la falta de infraestructura, la carencia de capacidad de mano de obra calificada para enfrentar los brotes de enfermedades, la gran proporción de personas con inmunidad comprometida, el cambio climático, la alteración en los ecosistemas y la pobreza, entre otros⁴.

Recientemente se ha puesto énfasis en la aparición de nuevas enfermedades infecciosas (por ejemplo: Ébola, Zika y Chikungunya) debido a su rápida transmisión e impacto global¹. La OMS define una enfermedad infecciosa emergente (EIE) como aquella que ha aparecido en una población por primera vez⁵⁻⁷. Por otra parte, una enfermedad infecciosa re-emergente es aquella que de haber sido registrada anteriormente y después de un aparente control y de eliminación epidemiológica aumenta rápidamente su incidencia o alcance geográfico, o el patógeno presenta nuevas formas, o reaparece⁵⁻⁷. Sin embargo, existen otras enfermedades infecciosas que han persistido en regiones endémicas, y se han considerado enfermedades tropicales desatendidas (ETDs)⁸. Las ETDs son un grupo diverso de enfermedades transmisibles que prevalecen en condiciones tropicales y subtropicales de 149 países, y afectan a más de mil millones de personas. En su conjunto representan para las economías en desarrollo miles de millones de dólares cada año⁸. Las poblaciones que viven en la pobreza, sin saneamiento adecuado y en estrecho contacto con vectores infecciosos y animales domésticos y ganado, son las más afectadas⁸. Sin embargo, algunas ETDs han logrado superar las barreras geográficas y han sido registradas en regiones donde nunca antes se habían reportado. En la Tabla 1 se muestran los datos más recientes sobre morbilidad y mortalidad a nivel mundial debido a EIs.

La prevalencia y distribución de las EIs pueden estar restringidas a regiones geográficas determinadas, y asociadas a diversos factores ambientales, ecológicos, biomédicos, demográficos, socio-económicos, geográficos, culturales, políticos, y de evolución microbiana, entre otros⁵. Por ejemplo, un análisis de la emergencia de EIs en el mundo para el periodo de 1940-2004, reportó alrededor de un total de 335 de ellas²⁷. La mayoría de las enfermedades (60,3%) se asoció a un origen animal (zoonosis), principalmente de vida silvestre; algunos ejemplos son: el virus Nipah (Familia *Paramyxoviridae*, Género *Henipavirus*) aislado de murciélagos, y el virus del síndrome respiratorio agudo grave (mejor conocido por SARS, por sus siglas en Inglés) aislado de civetas y murciélagos²⁷. Así mismo, este análisis determinó la aparición de cepas nuevas de patógenos, por ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniácida y rifampicina; y, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquinas²⁷. El virus del Zika, se diseminó en un lapso de tres años en varias regiones del mundo²⁸, afectando a por lo menos 84 países¹¹. La emergencia y re-emergencia de las EIs reafirma la necesidad de disponer de métodos que permitan su detección y eventual control.

Métodos de diagnóstico de las enfermedades infecciosas

Las EIs tienen una capacidad de diseminación que puede conllevar un gran impacto en la salud pública global²⁹. Sin embargo, los recursos necesarios (humanos, de infraestructura y económicos) para prevenir y controlar las EIs no se encuentran en las regiones donde son más indispensables.

La identificación de nuevos patógenos humanos depende fundamentalmente de la capacidad de diagnóstico. En este sentido, puede preverse que la prevalencia de las EIs se ha subestimado debido al acceso limitado a métodos de diagnóstico más eficientes, a la heterogeneidad de las enfermedades y a la frecuente ausencia de signos y síntomas⁴. Frecuentemente, los pacientes son diagnosticados cuando la enfermedad está en un estadio avanzado. Por lo tanto, el diagnóstico temprano de las enfermedades y su pronóstico preciso son importantes para su prevención y control.

Las técnicas convencionales para el diagnóstico de las EIs aún constituyen la base fundamental de detección, i.e. la microscopía, los cultivos bacteriológicos y de tejidos, los inmuno-ensayos, así como los métodos moleculares basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)⁴. En general, estos últimos tienen las siguientes desventajas: (i) son costosos debido a que requieren infraestructura, equipo y personal calificado; (ii) tienen una capacidad limitada para diferenciar entre múltiples patógenos; (iii) se

requiere de mucho tiempo para obtener resultados –en algunos casos hasta meses; y, (iv) demandan un alto costo de reactivos e insumos, así como un tiempo reducido de almacenamiento⁴. Para combatir de una manera más efectiva la propagación de Els, es necesario el desarrollo de métodos más precisos, rápidos, y accesibles para la población. La identificación oportuna de un patógeno es esencial para disponer de un diagnóstico preciso de la enfermedad y ofrecer un tratamiento adecuado⁴. En este contexto, la nanotecnología y el desarrollo de biosensores son alternativas viables para el diagnóstico y monitoreo de Els. En la Tabla 1 se describen los métodos de diagnóstico recomendados, así como sus requerimientos para la detección de algunas Els. Los métodos de diagnóstico de las Els se basan principalmente en la búsqueda del agente etiológico en el huésped. Sin embargo, para el caso de algunas enfermedades no se considera el monitoreo de sus vectores y/o reservorios debido al costo, escasez de personal e infraestructura.

Nanopartículas magnéticas, biosensor y diagnóstico de enfermedades infecciosas

Las nanopartículas (NPs) son materiales microscópicos que tienen dimensiones en el rango de 1×10^{-9} a 1×10^{-7} metros³⁰. Existen varios ejemplos para ilustrar el tamaño de las NPs; es decir,

si tomamos como referencia la dimensión de un cabello humano que mide alrededor de 80.000 nanómetros (nm) de longitud, o el virus del VIH que puede medir 60 nm. Las propiedades de las NPs relativas al tamaño, forma, superficie, estructura y composición química, así como de conductividad eléctrica, magnética y óptica, entre otras, las hacen versátiles y de gran aplicación en áreas biomédicas, ambientales y energéticas³⁰.

Las NPs pueden clasificarse de acuerdo al material con la cual se fabrican: (i) de base de carbón; (ii) de base metálica (oro, plata, o de puntos cuánticos); (iii) dendrímeros; y (iv) composites o resinas compuestas^{30,31}. Las superficies de las NPs pueden ser modificadas con grupos funcionales que mejoran sus características fisicoquímicas e incrementan sus aplicaciones biológicas. Estas modificaciones permiten a las NPs una mayor actividad biológica en el reconocimiento de moléculas como ADN, ARN, proteínas y lípidos, lo que en términos técnicos se denomina “biofuncionalización”, propiedad que les confiere cierta especificidad molecular (Figura 1A). Las características morfológicas de los patógenos pueden ser empleadas para desarrollar NPs específicas. Por ejemplo, la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* contiene diversas familias de lípidos, como los dimicoserosatos de tiocerol, que pueden ser usadas para el desarrollo de anticuerpos específicos para este patógeno (Figura 1B) y ser acopladas a las NPs. Esta propiedad permite a las NPs percibir y transmitir información biológica, actuando como sensores biológicos o biosensores³⁰, al funcionar como dispositivos analíticos que integran un elemento

Figura 1. Fundamento de captura, aislamiento, concentración y detección de patógenos mediante el uso de AMNs y biosensor.

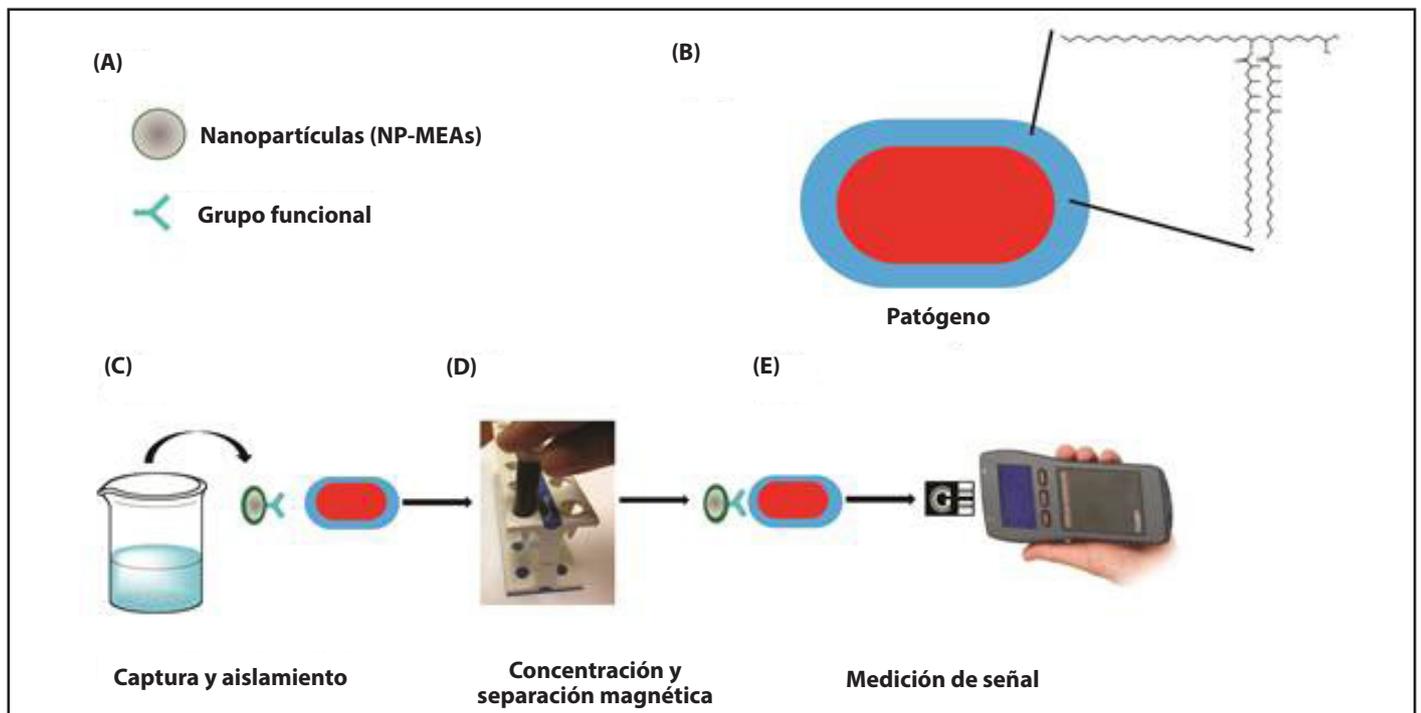


Tabla 1. Ejemplos de enfermedades emergentes, re-emergentes y tropicales desatendidas.

Enfermedad	Grupo Taxonómico	Mortalidad	Morbilidad	Métodos de diagnóstico recomendado por la OMS
Emergentes				
Ébola	Familia Filoviridae, Género: <i>Ebolavirus</i> . Se han identificado 5 especies: Zaire, Bundibugyo, Sudan, Reston y Taï Forest ¹²	Para el 2016 se reportaron 11.310 muertes ⁹	Para el 2016, se reportaron 28.616 casos confirmados. ⁹	Métodos moleculares a partir de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, PCR-TR (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real y/o serología. Requiere personal e infraestructura especializada (Bioseguridad Nivel II-IV). El equipo utilizado requiere energía eléctrica constante, calibración y mantenimiento. Se traduce en altos costos ¹⁰ .
Enfermedad por el virus de Zika (EVZ)	Familia: Flaviridae Género: Flavivirus ¹¹	El número de muertes asociados a EVZ es bajo. Sin embargo, la infección del EVZ durante el embarazo puede causar microcefalia y otras malformaciones congénitas que constituyen el síndrome congénito por el virus de Zika. La infección también se asocia a otras complicaciones del embarazo, como la ocurrencia de parto prematuro y aborto espontáneo. La infección se asocia en niños y adultos a un aumento del riesgo de complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, neuropatía y mielitis ¹¹	En la región de las Américas se reportaron al menos 171.553 casos confirmados. Alrededor de 84 países han confirmado la transmisión del virus ¹²	Métodos moleculares basado en PCR-TR. Se requiere diagnóstico diferencial debido a que los signos y síntomas son similares al dengue y CHIKV. Se recomienda realizar la prueba en un ambiente de bioseguridad nivel II ¹³
Chikungunya (CHIKV)	Familia: Togaviridae ¹⁴	Se reportaron 252 muertes a finales de agosto de 2015 ¹⁵	El virus Chikungunya (CHIKV) emergió en las Américas en diciembre de 2013, cuando la transmisión autóctona de el genotipo asiático CHIKV fue identificado en St Martin. Desde entonces, el CHIKV se ha extendido a 33 países y territorios en el Caribe, Sur, Centro y Norte América con ~ 1.7 millones de casos identificados (de los cuales alrededor del 2% fueron confirmados por laboratorio) ¹⁵	Las pruebas serológicas, como los ensayos inmuno-absorbentes ligados a enzimas (ELISA), pueden confirmar la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-CHIKV. Los niveles de anticuerpos IgM son más altos 3-5 semanas después del inicio de la enfermedad y persisten alrededor de 2 meses. Las muestras recolectadas durante la primera semana después del inicio de los síntomas deben analizarse mediante métodos serológicos y virológicos (RT-PCR) ¹⁴
Re-emergentes				
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ¹⁶	Para el 2016, se reportaron 1.7 millones de muertes ¹⁶ . Es la primera causa de muerte a nivel global por un solo agente infeccioso. La re-emergencia de TB se ha atribuido a su co-infección con VIH, diabetes, y a la aparición de cepas multi-fármaco resistentes ¹⁶	Para el 2016, se confirmaron 10.4 millones de casos nuevos en el ámbito mundial ¹⁶ . Se ha estimado que la infección latente afecta hasta un 25-30% de la población global ¹⁶	En la mayoría de los países, la baciloscopía es el método principal de diagnóstico de la forma pulmonar (TBP). Sin embargo, su sensibilidad es relativamente baja. Países con una alta prevalencia de TB, MDR-TB, TB-VIH, han optado por el uso de 'Xpert MTB/RIF' como prueba de diagnóstico inicial para todas las personas con signos y síntomas de TBP. El costo de mantenimiento es el principal problema al adoptar este método ¹⁶

(Continúa)

(continuación)

Paludismo	Parásitos del género <i>Plasmodium</i> ¹⁷	Para el 2016, se reportaron 445.000 muertes ¹⁸	Para el 2016, se han estimado 216 millones de casos a nivel mundial. El 90% de los casos ocurrieron en África ¹⁸	La OMS recomienda la confirmación parasitológica rápida del diagnóstico, bien sea mediante pruebas de microscopía o mediante pruebas de diagnóstico rápido antes de administrar el tratamiento al paciente presuntamente infectado. Se requiere personal e infraestructura adecuados ¹⁸
Tosferina	<i>Bordetella pertussis</i> ¹⁹	En el 2016, se confirmaron 139.000 casos ¹⁹ La re-emergencia se ha atribuido al cambio de vacunas de células completas a vacunas acelulares ²⁰	En el 2016, se estimó a nivel mundial, la aparición de 6.170.800 casos ²¹	El método recomendado es la PCR en tiempo real, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, requiere personal e infraestructura especializados ²²
Tropicales desatendidas				
Leishmaniasis	Parásitos del género <i>Leishmania</i> . Se conocen alrededor de 20 especies. El parásito es transmitido por flebótomos infectados ²³	Se estima que cada año se producen entre 20.000 y 30.000 defunciones ²³	Se estima que cada año se producen entre 700.000 y un millón de nuevos casos ²³	El diagnóstico de la leishmaniasis visceral se realiza mediante la combinación de un examen clínico con pruebas parasitológicas o serológicas (pruebas de diagnóstico rápido y otras). Las pruebas serológicas tienen un valor limitado en el diagnóstico ²³
Enfermedad de Chagas (trpanosomiasis americana)	El Parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> es transmitido principalmente por medio de vectores, insectos de la subfamilia <i>Triatominae</i> (chinchés) ²⁴	Se han estimado alrededor de 8 millones de personas infectadas por el parásito ²⁴	Se estima que 10.000 personas mueren anualmente ²⁴	La microscopía sigue siendo la prueba de referencia para diagnosticar la enfermedad de Chagas aguda y congénita. Las herramientas moleculares (por ejemplo, PCR) también se aplican en algunos países, pero su complejidad imposibilita su uso en todas las áreas endémicas. En la fase crónica, el número de parásitos en la sangre es bajo y el diagnóstico directo es más difícil. Actualmente, la OMS recomienda el uso combinado de dos métodos serológicos para confirmar la enfermedad de Chagas crónica, ya que ninguna de las pruebas disponibles es lo suficientemente sensible para emplearse exclusivamente ²⁴
Dengue	El virus del dengue (DEN) comprende cuatro serotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) que pertenecen al género <i>Flavivirus</i> , familia <i>Flaviviridae</i> ²⁵ . El virus del dengue se transmite por mosquitos hembra principalmente de la especie <i>Aedes aegypti</i> y, en menor grado, de <i>A. albopictus</i> ²⁵	Para el 2016 se reportaron 40.392 muertes por Dengue	El Dengue ocurre en más de 128 países y causan alrededor de 300 millones de casos anualmente a nivel mundial ²⁵	La reciente introducción de dos nuevas enfermedades arbovirales (CHIKV a fines de 2013 y EVZ en 2014) ha creado un nuevo desafío para la salud pública en las Américas. Las tres enfermedades arbovirales (dengue, CHIKV y EVZ) pueden producir síntomas clínicos muy similares, principalmente durante la fase aguda (los primeros días de la enfermedad), dificultando el diagnóstico clínico por parte de los trabajadores de salud, creando problemas para el manejo adecuado del caso y, en ocasiones, desencadenando eventos fatales. El diagnóstico serológico ha presentado dificultades adicionales, debido a la reacción cruzada entre los anticuerpos IgM/IgG del dengue y el EVZ, lo que complica la confirmación del laboratorio y compromete la vigilancia epidemiológica ²⁶

biológico y que está en contacto con un transductor de señal que convierte y cuantifica la respuesta biológica en una señal eléctrica medible (Figura 1 C-E).

Nuestro grupo de investigación está evaluando las "Alocilja nano-partículas magnéticas biofuncionalizadas (AMNs)", que han sido diseñadas para aprovechar sus propiedades magnéticas y biológicas³². Las AMNs están recubiertas con biopolímeros, lo que les proporciona actividades biológicas, y un núcleo fabricado con hierro- lo que les confiere propiedades magnéticas- que permite que puedan ser manipuladas a través de un campo magnético externo³² (Figura 1C-D). Las AMNs biofuncionalizadas permiten capturar, concentrar y separar magnéticamente células de diferentes muestras, y al mismo tiempo –dadas sus propiedades eléctricas– emitir una señal de transducción en un biosensor³² (Figura 1E). Tal protocolo ha sido empleado para detectar diversos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7^{33,34}, *Shigella boydii*³⁵, *Mycobacterium avium*³⁶, ADN de *Mycobacterium tuberculosis*³⁷, *Salmonella entérica*³⁸, virus de la influenza humana³⁹, esporas de *Bacillus cereus*³², y dengue⁴⁰.

La versatilidad de reconocimiento de las NPs las identifica como "herramientas poderosas" para la detección precisa de una variedad de moléculas de interés biomédico. A continuación brindamos un ejemplo de la aplicación de esta técnica en la detección de una enfermedad de prominente interés en salud pública: la tuberculosis.

Pruebas piloto para el diagnóstico de tuberculosis (TB)

La tuberculosis (TB) continúa siendo un gran desafío para la salud pública global¹⁶. La emergencia de cepas multi-fármaco resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, la co-infección con el VIH-SIDA y la comorbilidad con diabetes, hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para su prevención y control. Debido a su sencilla aplicación y bajo costo, el principal método para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar (TBP) es la baciloscopia, debido a su sencilla aplicación y bajo costo⁴¹. Sin embargo, su capacidad diagnóstica varía enormemente (20-70%), ya que está en función de la calidad y cantidad de la muestra, así como de la concentración de bacilos (5.000-10.000 por mililitro)⁴². Por ejemplo, en Chiapas, México se ha documentado que solo el 50% de los casos en zonas marginadas es diagnosticado⁴³.

Una de las limitantes para el diagnóstico de la TBP, es que las muestras de esputo necesariamente deben cumplir una serie de condiciones de calidad de las que depende la eficiencia de los resultados de la baciloscopia⁴¹. La muestra de esputo tiene una alta viscosidad debido a que está formada de una matriz

Figura 2. Captura, aislamiento y concentración de células de *Mycobacterium tuberculosis* de muestras clínicas.



orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como de una gran variedad de microorganismos, factores que dificultan e impiden el aislamiento de *M. tuberculosis* para el análisis a través de la baciloscopia y en medios de cultivo⁴². Las muestras provenientes de niños (biopsias, jugo gástrico, entre otras) y de personas con sistema inmunológico deficiente tienen la característica de ser paucibacilares, es decir con un bajo número de células de *M. tuberculosis*, lo que representa un gran desafío para el diagnóstico de TB.

A partir del análisis de muestras clínicas de esputo, hemos demostrado el uso potencial de las AMNs para la detección de *M. tuberculosis*⁴⁴. En pruebas de laboratorio utilizando esputo artificial y *Mycobacterium smegmatis* como bacteria modelo, se ha determinado que las AMNs pueden detectar hasta 10 células por mililitro, lo cual es significativo si consideramos que para tener una baciloscopia positiva se necesitan por lo menos 5.000 células por mililitro⁴⁵. Los resultados preliminares han demostrado que las AMNs aíslan y concentran de manera significativa células de *M. tuberculosis*⁴⁴. Estos resultados son promisorios, ya que las AMNs podrían mejorar la sensibilidad de la baciloscopia convencional (Figura 2), además de generar información preliminar para el desarrollo e implementación de un biosensor portátil.

Posibles aplicaciones de las AMNs y el biosensor para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades transmitidas por vectores

La enfermedad por el virus del Ébola (EVE), por el virus Zika (EVZ) y la infección por el virus de chikungunya (CHIKV) son

enfermedades emergentes de las que ningún país estaba preparado para su prevención y control. Desde su descubrimiento en 1976, la mayoría de los casos y brotes de EVE se han producido en África⁴⁶. El brote de EVE en el periodo de 2014-2016 en África occidental comenzó en un entorno rural del sudeste de Guinea, extendiéndose a las zonas urbanas y a través de las fronteras, en cuestión de semanas, hasta ser catalogada como una epidemia mundial⁴⁶. El diagnóstico de EVE es complicado debido a que los primeros síntomas, como la presencia de dolor de cabeza, fiebre, y debilidad, no son específicos, y a menudo se observan en pacientes con otras enfermedades más comunes en estas regiones, como el paludismo y la fiebre tifoidea.

La infección por EVZ causó alarma debido a su asociación con el síndrome de Guillain-Barré y microcefalia congénita⁴⁷⁻⁵⁰. El diagnóstico clínico de EVZ es complicado debido a que presenta cuadros clínicos similares a CHIKV y dengue, especialmente en regiones donde ambas enfermedades son endémicas, además de que muchas veces es asintomático^{28,51}. Se ha reportado que una persona puede estar co-infectada de forma simultánea por los tres virus^{28,51}. Las co-infecciones tienen un impacto directo en las pruebas serológicas, y por lo tanto en la precisión de disponer de un diagnóstico diferenciado, debido a las reacciones cruzadas con otros flavivirus y a la posible reactividad no específica, por lo que es posible que los resultados sean difíciles de interpretar^{28,51}. Por lo tanto, es necesario realizar otras pruebas, como la reducción en placas (PRNT, *plaque reduction neutralization test*, por sus siglas en inglés). Para el diagnóstico diferencial también se ha recurrido a la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR, por sus siglas en inglés)^{28,51}. Sin embargo, ambas técnicas tienen desventajas importantes, como el requerimiento de personal, materiales, equipo e infraestructura especializados lo que las hacen de alto costo, además de la necesidad obtener muestras de buena calidad y cantidad.

EVZ, dengue y CHIKV pueden ser transmitidos por los mismos vectores. En el continente americano se ha reportado que *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los principales vectores transmisores del EVZ²⁸. Se ha descrito que el EVZ puede ocupar como hospederos a diferentes animales silvestres y domésticos²⁸. Esta gran capacidad de transmisión del EVZ implica reconocer la complejidad de su ciclo ecológico, i.e. un ciclo endozoótico, que involucra a los vectores y diversos primates, y otro ciclo en el que el humano y animales domésticos están involucrados. En los humanos, el virus se puede transmitir verticalmente y a través de varios fluidos (semen, saliva, sangre y orina)²⁸.

La vigilancia entomológica, es decir el monitoreo de los vectores, representa una de las estrategias de intervención más importantes en la prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores^{52,53}. La detección temprana de un posible

brote junto con un programa exitoso de prevención, representa una alternativa de menor costo que los programas de erradicación o control establecidos después de un brote. Sin embargo, los métodos de diagnóstico convencionales no permiten el monitoreo en tiempo real debido a que las muestras requieren ser transportadas a un laboratorio especializado para ser analizadas, aunado a la variación natural de las poblaciones, lo que implica la necesidad de establecer protocolos de observación continuos, lo que involucra una mayor inversión de recursos y retrasos en el diagnóstico^{52,53}.

Un biosensor portátil basado en AMNs y biofuncionalizadas específicamente para detectar a un determinado patógeno, permitiría no solo diagnosticar y monitorear una enfermedad, sino que su bajo costo podría ser accesible el manejo *in situ* (i.e. comunidades situadas en regiones donde no existen servicios de salud, o con poca capacidad diagnóstica). Un ejemplo de la aplicación del biosensor portátil acoplado con AMNs se evalúa experimentalmente para la detección de ADN del dengue serotipo 2⁴⁰. La sensibilidad del biosensor en términos moleculares, ha sido determinada para detectar 10 ng/μl de ADN en tan sólo una hora. Aunque es un prototipo, el plan es desarrollar una herramienta diagnóstica de este tipo (portátil, de fácil uso e interpretación, y barato) para el monitoreo de poblaciones naturales de mosquitos (*Aedes spp.*) *in situ*, incluyendo áreas urbanas, previo a la aparición de un brote de dengue.

Sin embargo, como cualquier campo emergente, el diseño de un biosensor se enfrenta a muchos desafíos. Las biomoléculas poseen estructuras y funciones especiales, y determinan el diseño, fabricación, y uso de las NPs que serán acopladas al biosensor⁵⁴. El procesamiento, la caracterización, los problemas de interfaz, la disponibilidad de NPs de alta calidad, la adaptación de nanomateriales y los mecanismos que gobiernan el comportamiento de estos compuestos a nano-escala, también representan grandes desafíos para el diseño de un biosensor⁵⁴. Por lo tanto, los mecanismos de interacción entre las biomoléculas y las NPs tampoco han sido dilucidados, con lo que la detección de un patógeno a partir de muestras complejas (conformada por diversas moléculas, y otros microorganismos) actualmente se hace más complicada⁵⁵. Otra limitación del biosensor es que probablemente no sea capaz de distinguir entre células viables y no viables⁵⁵. Aunque esto no se ha confirmado experimentalmente, es bien sabido que las células no viables (a menos que se destruyan sus membranas celulares) a menudo retienen los antígenos a los que se unirán los anticuerpos, por lo que la mayoría de los ensayos basados en anticuerpos detectarían las células viables y no viables de forma indiscriminada⁵⁵. Por lo tanto, la optimización y validación de un biosensor son pasos previos esenciales para su uso en escenarios reales.

Los biosensores basados en nanomateriales muestran –en un futuro cercano– grandes perspectivas atractivas, que se aplicarán ampliamente en el diagnóstico clínico, el análisis de alimentos, el control de procesos y el monitoreo ambiental en un futuro cercano. Basta imaginar su empleo en una comunidad rural o aislada, en donde a partir del uso del teléfono celular o satelital se podría diagnosticar la presencia de una EI. Es claro que nuestra capacidad de reacción ante infecciones emergentes se incrementaría de manera significativa.

En suma, un biosensor acoplado con nanopartículas AMNs representa una herramienta de diagnóstico y análisis expedito, de bajo costo y con alto potencial para el monitoreo y atención de EIs de importancia en salud pública para países con escasez de recursos para la salud. La relevancia práctica de las NPs cobra particular relevancia ante un cuadro social de alta marginación (como es el caso de numerosas regiones de México, América Latina y África), donde idealmente requerimos disponer de herramientas diagnósticas prácticas y eficientes.

Agradecimientos

A la Fundación W.K. Kellogg y a la SEPAR - Programa de Investigación Integrado de Tuberculosis PII-TB-SEPAR (058-2015) por los recursos aportados.

Bibliografía

- World Health Organization. Infectious diseases. 2018. Disponible en: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/. (Accessed: 12th September 2018)
- World Health Organization. Global Health Estimates 2016. Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. 2018. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/. (Accessed: 12th September 2018)
- GBD 2016 DALYs, HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond. Engl.* 2017;390: 1260-344.
- Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013;57 Suppl 3:S139-170.
- Fauci AS, Morens DM. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. *N. Engl. J. Med.* 2012;366:454-61.
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* 2004;430:242-9.
- Morens DM, Fauci AS. Emerging Infectious Diseases in 2012: 20 Years after the Institute of Medicine Report. *mBio.* 2012;3:e00494-12.
- World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. 2018. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. (Accessed: 12th September 2018)
- Centers for Disease Control and Prevention. Ebola: Number of cases and deaths in Guinea, Liberia, and Sierra Leone during the 2014-2016 West Africa Ebola Outbreak. 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/case-counts.html>. (Accessed: 13th September 2018)
- World Health Organization. Laboratory diagnosis of Ebola virus disease. Interim guideline 2014;6.
- World Health Organization. Zika Virus Disease. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/diseases/zika/en/>. (Accessed: 12th September 2018)
- Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J. Neuroimmunol.* 2017;308:50-64.
- World Health Organization. Laboratory testing for Zika virus infection. Interim guidance 2016;4.
- World Health Organization. Chikungunya. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/diseases/chikungunya/en/> (Accessed: 13th September 2018)
- Cibrelus, L, Barney SG, Ramon-Pardo P, Repik P, Yactayo S, The Chikungunya Expert Group. Chikungunya disease: gaps and opportunities in public health and research in the Americas. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90:571-6.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018.
- World Health Organization. Malaria. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/en/>. (Accessed: 13th September 2018).
- World Health Organization. World Malaria Report 2017. 2018.
- World Health Organization. Pertussis. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/>. (Accessed: 13th September 2018).
- Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:449-86.
- Naghavi M, Abajorbir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet.* 2017;390:1151-210.
- World Health Organization. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. 2018. Disponible en: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis_standards/en/ (Accessed: 13th September 2018)
- World Health Organization. Leishmaniasis. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Accessed: 13th September 2018).
- World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018. Disponible en: <http://www.who.int/chagas/en/> (Accessed: 13th September 2018).
- World Health Organization. Dengue. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/denguecontrol/en/> (Accessed: 13th September 2018).

26. Pan American Health Organization, World Health Organization. Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. 2017.
27. Jones, KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451: 990-3.
28. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016;29:487-524.
29. Gebreyes WA, Dupouy-Camet J, Newport MJ, Oliveira CJ, Schlesinger LS, Saif YM, *et al.* The global one health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. *PLoS Negl Trop. Dis.* 2014;8:e3257.
30. Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Anal Chem.* 2014;2:63.
31. Kaittani C, Santra S, Perez JM. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:408-23.
32. Pal S, Alocilja EC. Electrically active polyaniline coated magnetic (EAPM) nanoparticle as novel transducer in biosensor for detection of *Bacillus anthracis* spores in food samples. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:1437-44.
33. Cloutier BC, Cloutier AK, Trinidad L, Alocilja EC. Culture Age on Evaluation of Electrically Active Magnetic Nanoparticles as Accurate and Efficient Microbial Extraction Tools. *Open J Appl Biosens.* 2015;03:19.
34. Wang Y, Alocilja EC. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens. *J Biol Eng.* 2015;9:16.
35. Settingington EB, Cloutier BC, Ochoa JM, Cloutier AK, Patel PJ, Alocilja EC. Rapid, sensitive, and specific immunomagnetic separation of foodborne pathogens. *Int J Food Saf Nutr Public Health.* 2011;4:83-100.
36. Okafor C, Grooms D, Alocilja E, Bolin S. Comparison between a conductometric biosensor and ELISA in the evaluation of John's disease. *Sensors.* 2014;14:19128-37.
37. Torres-Chavolla E, Alocilja EC. Nanoparticle based DNA biosensor for tuberculosis detection using thermophilic helicase-dependent isothermal amplification. *Biosens Bioelectron.* 2011;26:4614-8.
38. Vetrone SA, Huarng MC, Alocilja EC. Detection of non-PCR amplified *S. enteritidis* genomic DNA from food matrices using a gold-nanoparticle DNA biosensor: a proof-of-concept study. *Sensors* 2012;12:10487-99.
39. Kamikawa TL, Mikolajczyk MG, Kennedy M, Zhang P, Wang W, Scott DE, *et al.* Nanoparticle-based biosensor for the detection of emerging pandemic influenza strains. *Biosens Bioelectron.* 2010;26:1346-52.
40. Fernando L, Vasher M, Alocilja EC. A DNA-Based nanobiosensor for the rapid detection of the dengue virus in mosquito. 2015;9:818-21.
41. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, *et al.* Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6:664-74.
42. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1376-95.
43. Sánchez-Pérez HJ, Hernán MA, Hernández-Díaz S, Jansá JM, Halperin D, Ascherio A. Detection of pulmonary tuberculosis in Chiapas, Mexico. *Ann Epidemiol.* 2002;12:166-72.
44. Gordillo-Marroquín C, Gómez-Velasco A, Sánchez-Pérez HJ, Pryg K, Shinnors J, Murray N, *et al.* Magnetic Nanoparticle-Based Biosensing Assay Quantitatively Enhances Acid-Fast Bacilli Count in Paucibacillary Pulmonary Tuberculosis. *Biosensors.* 2018;8:128.
45. Alocilja E, Gómez-Velasco A, Sánchez-Pérez HJ, Srivastava S, Pryg K, Vasher M, *et al.* Development and validation of a biosensor for rapid TB detection. Advancing Biology Inspired Engineering Meeting. March 5-7, St. Louis, MO, USA. 2015. Disponible en: http://www.ibe.org/_resources/documents/events/Nanotechnology%20and%20Biosensors.pdf.
46. Center for Disease Control and Prevention. History of Ebola Virus Disease. 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/summaries.html>. (Accessed: 13th September 2018)
47. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, Filippis I, Fabri A, *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:653-60.
48. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimaraes KP, *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534:267-71.
49. Mlakar, J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374:951-8.
50. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro-Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2016. doi:10.1056/NEJMoa1602412
51. Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, Bi Q, Grant K, Salje H, *et al.* Assessing the global threat from Zika virus. *Science.* 2016;353:aaf8160.
52. Ogden NH, AbdelMalik P, Pulliam J. Emerging infectious diseases: prediction and detection. *Can Commun Dis Rep Relev Mal Transm Au Can.* 2017;43:206-11.
53. Brookes VJ, Hernández-Jover M, Black PF, Ward MP. Preparedness for emerging infectious diseases: pathways from anticipation to action. *Epidemiol Infect.* 2015;143:2043-58.
54. Zhang X, Guo Q, Cui D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors.* 2009;9:1033-53.
55. Cloutier BC, Cloutier AK, Alocilja EC. Optimization of electrically active magnetic nanoparticles as accurate and efficient microbial extraction tools. *Biosensors.* 2015;5: 69-84.