

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



Evaluación de anticuerpos contra el virus de Zika para su incorporación en sistemas de diagnóstico

TESIS

Para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica

Presenta

IBT Marissa Reyes Galeana

Director: Dr. Darwin Eduardo Elizondo Quiroga

Codirector: Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas

> Asesores: Dr. Abel Gutiérrez Ortega

Dr. José Esteban Muñoz Medina

Guadalajara, Jalisco. Agosto 2021





Guadalajara, Jalisco a 9 de agosto de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C. PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Marissa Reyes Galeana** una vez leída y revisada la Tesis titulada "EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE ZIKA PARA SU INCORPORACIÓN EN SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica en la opción terminal en Biotecnología Médica y Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día nueve del mes de agosto del año dos mil veintiuno.

inde

Dr. Darwin E. Elizondo Quiroga Director de tesis

Dr. Abel Gutiérrez Ortega Asesor

Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas Co-director de tesis

Dr. José Esteban Muñoz Medina Asesor



Guadalajara, Jalisco, a 20 de agosto de 2021 CP/1027/2021

MARISSA REYES GALEANA

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MF6431 PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "Evaluación de anticuerpos contra el virus de zika para su incorporación en sistemas de diagnóstico" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Darwin Eduardo Elizondo Quiroga. Director de tesis Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas Co-directora de tesis Dr. Abel Gutiérrez Ortega. Asesor de tesis Dr. José Esteban Muñoz Medina. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

1.96

Mtra. Étima Gabriela Ordóñez de la Cruz Coordinadora de Posgrados



Av. Normalistas No. 800, Colinas de La Normal, CP. 44270, Guadalajara, Jal., México. Tel: (33) 3345 5200 informes@ciatej.mx www.ciatej.mx



Dedicado a mis padres,

por síempre apoyarme y motívarme a cumplír mís objetívos. Por enseñarme a dar lo mejor de mí y disfrutar cada momento.

Agradecímíentos

Al Dr. Darwin por todo el apoyo y por guiarme en este proceso. Gracias por confiar en mis capacidades y darme la oportunidad de formar parte de uno de sus proyectos.

A la Dra. Tanya por integrarme en su grupo de trabajo, por el apoyo, las atenciones y las enseñanzas.

Al Dr. Abel por sus consejos y su ayuda durante el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Esteban por su perspectiva y orientación. Al Dr. Pavel por su ayuda y sus enseñanzas.

A mi familia y amigos por siempre apoyarme, por su ánimos y motivación. Sin importar la distancia, siempre los siento cerca.

A mis nuevas amigas y compañeras Lore, Wendy, Nayeli, Mirna y Elia. Por su apoyo y su ayuda en el laboratorio, por los momentos que compartimos y en especial por su amistad. A Elda, Andrea, Iliany y Yeranny por los momentos de estudio, de distracción, las risas y las nuevas amistades.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Índice de contenido

Índice de tablas y figuras	IX
Abreviaturas	XI
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	3
3.1 Flavivirus	3
3.1.1 Virus de Zika	3
3.1.2 Proteína de Envoltura de ZIKV	4
3.2 Epidemiología	5
3.3 Transmisión y síntomas de la infección por ZIKV	5
3.4 Complicaciones asociadas a la infección por ZIKV	6
3.5 Métodos de diagnóstico	7
3.5.1 Método molecular de RT-qPCR	8
3.5.2 Pruebas serológicas	8
3.5.3 Pruebas rápidas en el punto de atención (POC)	9
4. Planteamiento del problema	11
5. Justificación	12
6. Hipótesis y objetivos	13
6.1 Hipótesis	13
6.2 Objetivo general	13
6.3 Objetivos específicos	13
7. Metodología	14
7.1 Validación de anticuerpos comerciales	14
7.1.1 Detección de pE de ZIKV	14
7.1.2 Evaluación de reactividad cruzada con proteínas de DENV y CHIKV	15
7.1.3 Detección de ZIKV de cultivo celular y en muestras de suero	15
7.2 Evaluación de proteínas E de ZIKV recombinantes	16
7.3 Evaluación de anticuerpos anti-ZIKV_E seleccionados	17
7.3.1 Rango de detección de pE de ZIKV y determinación de la concentración de de los anticuerpos en ELISA	trabajo 17
7.3.2 Rango de detección de pE de ZIKV y determinación de la concentración de de los anticuerpos en Dot Blot	trabajo 18
7.4 Diseño y evaluación de sistemas en sándwich para la detección de ZIKV	

7.4.1 Evaluación del desempeño de los diseños de sistemas en sándwich para la detec de ZIKV mediante ELISA empleando diferentes esquemas de interacción	ción 19
7.4.2 Evaluación de diseños de sistemas sándwich sin anticuerpos secundarios	22
7.4.3 Evaluación del desempeño de los sistemas en sándwich para la detección de ZIE sobre membrana de nitrocelulosa	KV 22
7.5 Diseño y evaluación de sistemas sencillos para la detección de ZIKV sobre membras de nitrocelulosa	na 24
7.5.1 Sistema de detección con anticuerpos primarios conjugados a nanopartículas de	oro 24
7.5.2 Sistemas de detección utilizando anticuerpos secundarios conjugados con HRP.	24
7.6 Diseño del prototipo de inmunoensayo	25
7.6.1 Condiciones de impresión de membrana de nitrocelulosa	26
7.7 Estandarización del ensayo con el prototipo de inmunoensayo	26
7.7.1 Determinación de la concentración de anticuerpos	27
7.7.2 Determinación de tiempos de incubación con anticuerpos	27
7.7.3 Determinación del tiempo de revelado	27
7.8 Caracterización del prototipo de inmunoensayo	28
7.8.1 Repetibilidad	28
7.8.2 Evaluación del efecto de la matriz (suero)	28
7.8.3 Determinación del límite de detección de proteína en suero	29
7.8.4 Evaluación del desempeño del ensayo con muestras de sueros	29
7.8.5 Evaluación corta de la estabilidad de la proteína impresa en membrana de nitrocelulosa	29
7.9 Integración del prototipo al cartucho de microfluídica	30
7.9.1 Adaptaciones al cartucho de microfluídica para la integración de la membrana d microfluídica	e 30
7.9.2 Integración de soluciones y reactivos al cartucho de microfluídica	31
7.9.3 Programación del software para correr el ensayo	32
7.10 Análisis estadísticos	32
8. Resultados y discusiones	33
8.1 Validación de anticuerpos comerciales	33
8.1.1 Reconocimiento de pE de ZIKV, ZIKV en cultivo celular y en muestras de suer	o .33
8.1.2 Evaluación de reactividad cruzada con DENV y CHIKV	35
8.2 Evaluación de proteínas E de ZIKV recombinantes	36
8.3 Selección de anticuerpos y su evaluación en ELISA y Dot Blot	38
8.3.1 Determinación de concentraciones de trabajo y rangos de detección en ELISA	38

8.3.2 Determinación de concentraciones de trabajo y rangos de detección en Dot Blot.	40
8.4 Evaluación de sistemas en sándwich para la detección de ZIKV	41
8.4.1 Metodología de premezcla de anticuerpos	41
8.4.2 Premezcla de muestras y anticuerpos	42
8.4.3 Interacción simultánea de muestras y anticuerpos	44
8.4.4 Sistemas en sándwich sin anticuerpo secundario	46
8.4.5 Sistemas en sándwich en membrana de nitrocelulosa	47
8.5 Evaluación de sistemas sencillos en membrana de nitrocelulosa	49
8.5.1 Sistemas con anticuerpos conjugados a AuNPs	49
8.5.2 Sistemas con anticuerpos secundarios conjugados con HRP	51
8.6 Evaluación del prototipo y estandarización del ensayo	53
8.6.1 Evaluación de condiciones iniciales	53
8.6.2 Estandarización de concentraciones, tiempos de incubación y revelado	54
8.7 Caracterización del prototipo de inmunoensayo	57
8.7.1 Repetibilidad	57
8.7.2 Efecto matriz	58
8.7.3 Límite de detección	59
8.7.4 Desempeño con muestras de suero	60
8.7.5 Estabilidad de proteína impresa	62
8.8 Integración al dispositivo de microfluídica	63
8.8.1 Validación de adaptaciones al hardware	63
8.8.2 Integración de reactivos en el cartucho y configuración de las condiciones de cor en el software	rida 64
9. Conclusiones	70
10. Perspectivas	72
11. Referencias	73
ANEXOS	82
Anexo 1. Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro	82
Anexo 2. Determinación de pH óptimo para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro	82

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Estructura del virus de Zika y la proteína de Envoltura	4
Figura 2. Diagramas de los diseños de sistema en sándwich evaluados mediante ELISA	19
Figura 3. Metodologías para la evaluación de sistemas en sándwich.	20
Figura 4. Sistemas en sándwich evaluados en membrana de nitrocelulosa.vb	23
Figura 5. Características generales del cartucho de microfluídica y las adaptaciones	31
Figura 6. Diagrama de integración de los componentes adaptados al cartucho de microfluíd	lica.
	31
Figura 7. Reconocimiento de pE de ZIKV por anticuerpos comerciales anti-ZIKV_E	en en
diferentes muestras.	34
Figura 8. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos comerciales anti-ZIKV_E	36
Figura 9. Reconocimiento de epítopos en las proteínas E de ZIKV recombinantes	37
Figura 10. Rangos de detección de las proteínas E recombinantes con mAbs anti-ZIKV_	_E a
diferentes concentraciones	39
Figura 11. Detección de proteínas E sobre membrana de nitrocelulosa	40
Figura 12. Evaluación de sistemas en sándwich siguiendo la metodología de premezcla	a de
anticuerpos de detección	42
Figura 13. Evaluación de sistemas en sándwich con la metodología de mezcla de muestra	con
los anticuerpos de detección	43
Figura 14. Evaluación de sistemas en sándwich mediante la interacción simultánea de la mue	estra
y los anticuerpos de detección con los mAbs de captura	45
Figura 15. Evaluación de sistemas en sándwich utilizando el mAb anti-flavivirus 4G2 conjug	gado
con HRP como elemento de detección	47
Figura 16. Evaluación de sistemas en sándwich sobre membrana de nitrocelulosa	48
Figura 17. Detección de ZIKV en muestras de suero con anticuerpos conjugados con Au	NPs .
	50
Figura 18. Detección de ZIKV en muestras de suero sobre membrana de nitrocelulosa utiliza	ndo
un anticuerpo secundario conjugado con HRP	51
Figura 19. Prueba de concepto de retención de proteínas por flujo a través de membrana	a de
nitrocelulosa	52
Figura 20. Evaluación del prototipo de inmunoensayo	54
Figura 21. Determinación de la dilución de la mezcla de anticuerpos de detección	55
Figura 22. Optimización del tiempo de incubación con anticuerpos	56
Figura 23. Estandarización del tiempo de revelado	57

Figura 24. Determinación de la repetibilidad del inmunoensayo57
Figura 25. Evaluación del efecto de la matriz en el desempeño del ensayo
Figura 26. Determinación del límite de detección de pZE en suero59
Figura 27. Evaluación del desempeño del prototipo de inmunoensayo con muestras de suero
Figura 28. Evaluación de la estabilidad de la proteína impresa en la línea control62
Figura 29. Evaluación del flujo de líquido a través del canal de reacción con las adaptaciones
para incorporar la membrana de nitrocelulosa
Figura 30. Cartucho de microfluídica con reservorios numerados
Figura 31. Primera configuración para la activación de las bombas del cartucho de
microfluídica
Figura 32. Primer ensayo incorporando la membrana de nitrocelulosa al cartucho de
microfluídica
Figura 33. Configuración del software para la activación de las bombas del cartucho de
microfluídica, incluyendo los tiempos de incubación67
Figura 34. Ensayo de detección de proteína ZE en membrana de nitrocelulosa en cartucho de
microfluídica ajustando los tiempos de incubación y utilizando la distribución inicial de los
reservorios
Figura 35. Configuración de la activación de las bombas considerando el reacomodo de los
reactivos en los reservorios
Figura 36. Detección de proteína ZE en membrana de nitrocelulosa incorporada al sistema de
microfluídica

Abreviaturas

Acrónimo	Significado
AuNPs	Nanopartículas de oro
BSA	Albúmina de suero bovino
С	Proteína de la Cápside
CHIKV	Virus de Chikungunya
DENV	Virus de Dengue
E o pE	Proteína de Envoltura
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
HRP	Peroxidasa de rábano
IFA	Ensayo de Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
JEV	Virus de Encefalitis Japonesa
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LFA	Ensayo de Flujo Lateral
M o pM	Proteína de Membrana
mAb	Anticuerpo monoclonal
NAAT	Prueba de amplificación de ácidos nucleicos
NS o pNS	Proteína no estructural
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Buffer de fosfatos salino
PFU	Unidad formadora de placas
POC	Punto de Atención o Point of Care
prM	Proteína de Pre-membrana
PRNT	Prueba de neutralización en placa
pZE	Proteína E de ZIKV parcial
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

RT-qPCR	RT-PCR en tiempo real
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ТМ	Dominio transmembranal de la proteína E
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
WNV	Virus del Oeste del Nilo
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla
ZIKV	Virus de Zika

1. Resumen

El virus del Zika (ZIKV) pertenece al género *Flavivirus*. Su estructura consta de una cápside icosaédrica que contiene al material genético y está cubierta por una envoltura lipídica. El ZIKV es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*, pero también puede transmitirse de persona a persona por contacto sexual y transfusiones sanguíneas; además de transmitirse verticalmente de madre a feto.

En años recientes se presentó una rápida propagación del ZIKV a nivel mundial, principalmente en países de América. La infección por este virus suele ser asintomática, pero puede presentar síntomas similares a infecciones causadas por los virus de Dengue y Chikungunya, lo que dificulta el diagnóstico clínico. La importancia de la detección temprana de ZIKV radica en prevenir posibles complicaciones, ya que se ha asociado a problemas neurológicos como síndrome de Guillain-Barré (SGB) y microcefalia fetal. Debido a la rápida propagación y al incremento de casos de SGB en adultos y microcefalia en recién nacidos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una emergencia internacional por ZIKV en 2016.

El diagnóstico de ZIKV se realiza mediante la detección de componentes virales o pruebas serológicas. Entre las técnicas más empleadas están RT-PCR y ELISA. Sin embargo, los métodos empleados presentan diversas desventajas como el requerimiento de equipo especial, personal capacitado, disponibilidad limitada, baja especificidad, entre otros. Por ello la relevancia del desarrollo de pruebas de diagnóstico sencillas y fáciles de usar, que sean sensibles y específicas. De tal forma que sean un apoyo para una atención adecuada al paciente y así prevenir las posibles complicaciones y la transmisión del virus.

La propuesta de esta tesis es evaluar el uso de anticuerpos monoclonales contra ZIKV, mediante diversas técnicas para la detección del virus en etapas tempranas de la infección, lo cual ayudará a obtener un diagnóstico rápido y preciso. Con ello, se busca establecer las bases para el desarrollo de diferentes plataformas de diagnóstico diferencial, además de dar una perspectiva para el desarrollo de pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POC).

2. Introducción

En 2016 la OMS declaró al ZIKV como una emergencia internacional, ya que se detectó una rápida propagación a nivel mundial. El diagnóstico clínico es complicado, ya que la infección comúnmente es asintomática o presenta síntomas leves similares a infecciones causadas por otros virus transmitidos por vectores como Dengue y Chikungunya.

La importancia del diagnóstico temprano de ZIKV radica en prevenir las complicaciones a las que se ha asociado, principalmente problemas neurológicos como síndrome de Guillain-Barré y microcefalia fetal. Además, la detección del virus en pacientes o en el vector (mosquito *Aedes*), ayuda a la vigilancia y control epidemiológico. El diagnóstico de ZIKV se realiza mediante pruebas moleculares, pruebas serológicas o mediante la detección de antígenos. Entre las técnicas más empleadas están la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), sin embargo, estos métodos para la detección de ZIKV sólo se realizan en laboratorios autorizados, lo cual limita la disponibilidad en zonas afectadas. Por lo tanto, toma importancia el desarrollo de sistemas de detección más sencillos, fáciles de usar, que sean sensibles y específicos, y que permitan hacer un tamizaje previo a la confirmación con las metodologías avaladas para la vigilancia epidemiológica.

Las técnicas empleadas en los ensayos serológicos suelen ser más sencillas y accesibles, por lo que nos dan una perspectiva para establecer un sistema para la detección de ZIKV. Por lo tanto, se pretende evaluar el uso de anticuerpos comerciales para la detección de ZIKV mediante las técnicas moleculares de ELISA y Dot Blot, esto con la finalidad de desarrollar un prototipo de prueba rápida para la detección de ZIKV, que pueda ser integrado a diversas plataformas. Lo anterior establecerá las bases para adaptar el uso tanto de anticuerpos como de péptidos producidos en CIATEJ, a un inmunoensayo para el diagnóstico diferencial de infecciones por virus transmitidos por vectores.

3. Marco Teórico

3.1 Flavivirus

Los virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, poseen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, de aproximadamente 11 Kb. Éste codifica para un solo marco de lectura abierto (ORF), el cual expresa una poliproteína que es escindida post-traduccionalmente para generar tres proteínas estructurales, denominadas cápside (C), precursora de membrana (prM) o membrana (M) y envoltura (E), así como siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Blitvich y Firth, 2015). La función de las proteínas estructurales es encapsular y proteger el material genético formando la partícula viral, además de intervenir en el proceso de infección celular. Mientras que las proteínas no estructurales ayudan en la replicación del RNA, ensamblaje de la partícula viral y ayudan a inhibir la respuesta inmune del hospedero (Barrows et al., 2018; Nicholls et al., 2020).

Dentro de este género se incluyen alrededor de 50 virus transmitidos por vectores. Algunos de mayor significancia como patógenos en humanos son el virus de Fiebre Amarilla (YFV), Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Encefalitis Japonesa (JEV) y Nilo Occidental (WNV) (Barrows et al., 2018; Blitvich y Firth, 2015).

3.1.1 Virus de Zika

La estructura de ZIKV es similar a la de otros flavivirus. Es un virus con envoltura lipídica y cápside icosaédrica con un diámetro aproximado de 50 nm. Su RNA está contenido en la nucleocápside, y las proteínas M y E están ancladas a la membrana lipídica mediante sus regiones transmembranales (Figura 1). Esta envoltura lipídica contiene un aproximado de 180 copias de las proteínas M y E, cuya organización espacial deja a las proteínas E más expuestas en la superficie, mientras que las proteínas M quedan debajo de esta capa de proteínas E (Heinz y Stiasny, 2017; Kostyuchenko et al., 2016; Sirohi y Kuhn, 2017). Análisis de diferentes cepas de ZIKV han mostrado tres linajes genéticos principales, el de África oriental, África occidental y el asiático. En el linaje asiático se incluyen las cepas que circulan en América (Lanciotti et al., 2016).

A pesar de las similitudes estructurales entre ZIKV y otros virus del mismo género, ZIKV posee ciertas diferencias que le proveen características poco comunes en otros flavivirus, como su patrón de transmisión, tropismo tisular, estabilidad, infectividad, antigenicidad. Estas

características están asociadas a su superficie compacta y al sitio de glicosilación de la proteína E (Kostyuchenko et al., 2016; Sirohi et al., 2016).



Figura 1. Estructura del virus de Zika y la proteína de Envoltura. A) Representación de la estructura general de la partícula viral de ZIKV (Imagen creada en Biorender.com). B) Vista superior del diagrama del dímero de proteína E y la organización de los dominios DI (rojo), DII (amarillo) y DIII (azul). C) Vista lateral de las proteínas E y M (rosa), se muestran los tres dominios de E así como el dominio transmembranal (E-TM) (gris). Las imágenes se crearon con los datos reportados bajo el número de acceso 7JYI de PBD (DiNunno et al., 2020).

3.1.2 Proteína de Envoltura de ZIKV

La proteína E es una glicoproteína de ~495 aa, la cual forma dímeros que se organizan de forma antiparalela en la superficie de la partícula viral. Esta es la proteína responsable de la entrada del virus a la célula, ya que está involucrada en la endocitosis mediada por receptores. Cada monómero de la proteína E está compuesto por cuatro dominios, DI, DII, DIII y el dominio transmembranal (TM) (Figura 1B-C) (Dai et al., 2016; L. Wang et al., 2019). DI se encuentra en la parte central de la estructura, estabilizando la orientación de la proteína y contiene el sitio de glicosilación (Asn154). DII permite la dimerización de la proteína y contiene el loop de fusión, una región altamente conservada en los flavivirus, que como su nombre indica interviene en la fusión con la membrana del endosoma. DIII tiene una estructura similar a las inmunoglobulinas, es el dominio más expuesto y está relacionado a la unión con receptores, ayudando al ingreso del virus a la célula (Gong et al., 2018; Hasan et al., 2018; X. Zhang et al., 2017).

Debido a su función, la estructura de la proteína E es altamente conservada en los flavivirus, aunque su secuencia de aminoácidos puede llegar a diferir hasta en 60% entre los virus de este género. Entre las diferentes cepas de ZIKV se ha observado una baja variación en la proteína E, con diferencias en las secuencias aminoacídicas de hasta 6% entre los linajes. Asimismo, se puede decir que ZIKV está más relacionado a DENV que a otros flavivirus, ya que la secuencia de aminoácidos de las proteínas E de estos virus difiere en aproximadamente 45% (Heinz y Stiasny, 2017; X. Zhang et al., 2017).

3.2 Epidemiología

ZIKV fue descubierto en 1947 en Uganda, donde fue aislado de un mono *Rhesus spp.* en el bosque Zika y posteriormente se aisló del mosquito *Aedes africanus*. Fue hasta 1952 que se detectaron casos de infecciones en humanos y en décadas posteriores (1960-1970) se registraron casos esporádicos en regiones de África y Asia (Higuera y Ramírez, 2019). En 2007 se detectaron casos en Micronesia y en 2013 el virus se expandió a las islas del Pacífico, en este brote se reportaron alrededor de 28,000 casos. En 2015 se comenzó a detectar el ZIKV en América del Sur, los primeros casos reportados en Brasil (Noor y Ahmed, 2018). Desde entonces el número de casos incrementó drásticamente, se estima que hubo hasta 1.3 millones de casos sospechosos durante el 2015 solamente en Brasil. Para enero de 2016 se reportaba la circulación autóctona de ZIKV en alrededor de 20 países de América (Musso y Gubler, 2016; Talero-Gutiérrez et al., 2018).

Hasta 2020 se reportaron un total de 878,369 casos de ZIKV en 52 países y territorios de América, de los cuales solo el 28.7% fueron casos confirmados (Organización Panamericana de la Salud, 2021). En México se han confirmado 12,956 casos en el periodo de 2015 a 2020, de los cuales 7,138 son casos confirmados en mujeres embarazadas (Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles, 2021).

3.3 Transmisión y síntomas de la infección por ZIKV

El ZIKV es un virus transmitido por vector, principalmente por mosquitos del género *Aedes*. Casi todos los brotes de ZIKV en zonas urbanas se han relacionado a la especie *Ae. Aegypti*. Sin embargo, a diferencia de otros flavivirus, ZIKV puede transmitirse de persona a persona por contacto sexual y mediante transfusiones sanguíneas, además de transmitirse verticalmente de madre a feto (Gregory et al., 2017; A. Sharma y Lal, 2017).

Generalmente la infección por ZIKV es asintomática, 80% de personas infectadas no presentan síntomas. Sin embargo, la enfermedad sintomática suele ser leve y se caracteriza por presencia de fiebre aguda, sarpullido, dolor de cabeza, conjuntivitis, dolor muscular y de articulaciones; estos síntomas son similares a los presentados por infecciones por Dengue y Chikungunya. Los síntomas se presentan después del periodo de incubación, que va de 3 a 12 días, y duran entre 2 y 7 días (Patterson et al., 2016; V. Sharma et al., 2020). El periodo de viremia es muy corto, la presencia del virus puede detectarse en suero durante 7 días desde del inicio de los síntomas, aunque se han reportado casos de detección de ZIKV hasta 10 días después (Musso et al., 2017) y casos de viremia prolongada (>14 días) en mujeres embarazadas (St George et al., 2017). En general la carga viral en suero suele ser muy baja, pero se ha reportado que en muestras de orina la carga viral es mayor y se puede detectar hasta 15 días después del inicio de los síntomas (Gourinat et al., 2015; Musso et al., 2017; St George et al., 2017). Por otro lado, la producción de anticuerpos IgM inicia de 4 a 6 días después del inicio de la infección y permanecen hasta por 12 semanas (Landry y St. George, 2017).

En general, pueden diferenciarse dos fases de la enfermedad por ZIKV, la fase aguda o temprana que va desde 0 a 5 días desde el inicio de los síntomas, y la fase de convalecencia que va desde los 6 hasta los 30 días después del inicio de los síntomas (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2021).

3.4 Complicaciones asociadas a la infección por ZIKV

La infección por ZIKV no presenta síntomas graves, sin embargo, se ha relacionado con complicaciones neurológicas. Se tienen datos clínicos y epidemiológicos que relacionan el aumento de la incidencia de microcefalia fetal y síndrome de Guillain-Barré con la epidemia de ZIKV en América (Higuera y Ramírez, 2019; V. Sharma et al., 2020).

Se ha encontrado una correlación entre infección por ZIKV en mujeres embarazadas y el nacimiento de infantes con microcefalia u otros defectos como lesiones oftálmicas, neuropatías ópticas, malformaciones cerebrales y esqueléticas, ahora denominado síndrome congénito por virus del Zika (Freitas et al., 2020). En 2015 se reportó un incremento en los casos de

microcefalia en Brasil y en la Polinesia Francesa, periodo en el cual hubo un brote de ZIKV en estas regiones. Se estableció esta relación por la detección de RNA de ZIKV en muestras de tejido nervioso, placenta y líquido amniótico de niños que nacieron con microcefalia (Beltrán-Silva et al., 2016).

Asimismo, durante la epidemia de ZIKV en 2015 y 2016, se reportó un incremento en los casos de SGB en varios países de América como Brasil, Colombia, Venezuela y El Salvador, además de la Polinesia Francesa. La relación se estableció debido a que los pacientes con SGB habían sufrido una infección viral consistente con ZIKV previo a presentar el síndrome neurológico (Kazmi et al., 2020).

3.5 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de ZIKV se realiza mediante la detección de componentes virales como RNA, proteínas o aislamiento del virus y mediante pruebas serológicas. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, recomienda el uso de métodos moleculares y serológicos para el diagnóstico de ZIKV, específicamente aquellos que se han autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos. Entre ellos se encuentran diversas pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) principalmente basadas en RT-PCR, así como pruebas serológicas para la detección de inmunoglobulinas M (IgM) mediante ELISA (Centros de Control y Prevención de Enfermedades, 2019; U.S. Food and Drug Administration, 2021).

En México se emplea RT-qPCR para la confirmación de casos de enfermedad por Zika durante la fase aguda. Específicamente se utiliza la RT-qPCR TRIOPLEX que permite la detección simultánea de DENV, ZIKV y CHIKV. En caso de no tomar una muestra en la fase aguda, se emplea la prueba ELISA de captura de anticuerpos IgM, pero ésta sólo está indicada para mujeres embarazadas y neonatos (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2021).

Actualmente se trabaja en el desarrollo de pruebas portables y rápidas, de alta sensibilidad y especificidad. Estas pruebas se enfocan principalmente en la detección de RNA viral, antígenos virales o anticuerpos contra ZIKV. Entre los ensayos moleculares que se han desarrollado para el diagnóstico de Zika se encuentran biosensores, ensayos de flujo lateral (LFA) y diversos

NAAT, de estos últimos se destaca la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Singh et al., 2017). De acuerdo con la OMS las pruebas rápidas están diseñadas para obtener resultados preliminares y ser útiles en países de recursos limitados. En el ámbito comercial, las pruebas rápidas que están disponibles son LFA para la detección de la proteína NS1 o anticuerpos IgM/IgG. El resto de las pruebas reportadas sólo se usan para propósitos de investigación (Castillo-León et al., 2021).

A continuación, se describen los métodos antes mencionados, así como las tecnologías que se están desarrollando actualmente, con enfoque especial en pruebas rápidas en el punto de atención (POC, por sus siglas en inglés Point Of Care).

3.5.1 Método molecular de RT-qPCR

La técnica estándar para la detección de ZIKV es RT-qPCR debido a su alta sensibilidad y especificidad. Este método permite detectar RNA viral en muestras de suero, saliva, orina, líquido cerebroespinal y amniótico (Yang y Narayan, 2017). Se han desarrollado varios ensayos basados en este método, ya sea solo para la detección de ZIKV o para la detección múltiple de ZIKV, DENV y CHIKV. Algunas de las desventajas de este método es que requiere el procesamiento previo de la muestra para extraer el RNA viral, también necesita equipo especializado y personal capacitado para realizar el ensayo, por lo que no puede ser llevado a todas las regiones y zonas afectadas (Theel y Hata, 2018).

3.5.2 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se basan en la interacción entre anticuerpos y antígenos. Entre las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de ZIKV están ELISA, la prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) y ensayos de inmunofluorescencia (IFA). Estos ensayos están diseñados para detectar anticuerpos IgM e IgG contra ZIKV en muestras de suero, principalmente anticuerpos contra la proteína E o la proteína NS1 (Theel y Hata, 2018; Yang y Narayan, 2017). Una de las ventajas que poseen estas pruebas es que pueden ser empleadas en periodos más amplios, ya que los anticuerpos producidos contra el virus pueden ser detectados por meses (IgM) o años (IgG). No obstante, los ensayos de ELISA para la detección de IgM poseen una baja especificidad por la reactividad cruzada con anticuerpos contra otros flavivirus, especialmente contra DENV. Es por esto que los resultados de los ensayos de ELISA requieren

confirmarse mediante PRNT, lo cual implica más trabajo y consumo de tiempo (W. T. Lee et al., 2018; A. Sharma y Lal, 2017).

3.5.3 Pruebas rápidas en el punto de atención (POC)

Existe la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico rápidas y específicas, que permitan la detección de ZIKV en etapas tempranas de la infección. Para esto se requiere que puedan ser empleadas en clínicas o donde se encuentre el paciente. Asimismo, hay mayor interés en estrategias para la detección RNA o antígenos, ya que los anticuerpos IgM suelen presentar reactividad cruzada con otros flavivirus.

3.5.3.1 POCs basados en detección de RNA

Respecto a la detección de RNA, se han desarrollado diversos NAAT que han demostrado niveles de sensibilidad mayores al 80%. Algunos de estos son amplificación por polimerasa recombinante (RPA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación basada en invasión de cadenas (SIBA) y LAMP. Este último es el método más reportado, ya que es una técnica rápida, con alta sensibilidad y que no requiere equipos sofisticados (Peters y Stevenson, 2019). Sin embargo, estas técnicas requieren de un sistema para interpretar los resultados, generalmente se utilizan sondas fluorescentes que requieren equipos especiales para detectar la señal, por lo que se buscan alternativas como reacciones colorimétricas para una interpretación visual. Por ejemplo, para confirmar la amplificación de ácidos nucleicos en RT-LAMP se han utilizado indicadores de pH que cambian de color rosa a amarillo (Calvert et al., 2017), el colorante leuco cristal violeta que cambia de una forma incolora a violeta en presencia del amplicón (Song et al., 2016), también se ha combinado con LFA acoplando los productos de la amplificación a nanopartículas de oro para obtener una señal colorimétrica (D. Lee et al., 2016). También se ha reportado la técnica de NASBA junto con biosensores de papel cuyo principio se basa en un cambio de color a morado en presencia del RNA amplificado o amarillo en ausencia (Pardee et al., 2016).

3.5.3.2 POCs basados en detección de antígenos

Los métodos de detección de antígenos tienen la ventaja de no requerir la extracción de RNA. Estos métodos se enfocan en la detección de las proteínas E y NS1. La selección de la proteína E como blanco se debe a que es la proteína más expuesta en la superficie estructural del virus (X. Zhang et al., 2017). Por otro lado, la proteína NS1 se encuentra en abundancia en suero durante la etapa temprana de infección, ya que es una proteína soluble que es expulsada de las células infectadas (Bosch et al., 2017; Cecchetto et al., 2017).

En los métodos reportados generalmente se utilizan anticuerpos monoclonales (mAbs) y policionales (pAbs) adaptados a diferentes plataformas. Por ejemplo, para la detección de la proteína NS1 de ZIKV se han desarrollado diversas pruebas como ELISA tipo sándwich (L. Zhang et al., 2018), un biosensor de grafeno funcionalizado con mAbs (Afsahi et al., 2018), un dispositivo de microfluídica en papel para detección diferencial de ZIKV y DENV (Bedin et al., 2017), un LFA acoplado a espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS) (Sánchez-Purrà et al., 2017), una prueba rápida de inmunocromatografía (Bosch et al., 2017). Por otro lado, respecto al uso de anticuerpos contra la proteína E, se desarrolló un ensayo de quimioluminiscencia utilizando esferas de poliestireno con rubreno y esferas magnéticas, ambos tipos de esferas conjugadas con mAbs para la captura de partículas virales (Acharya et al., 2016). También se reportó el uso de esferas magnéticas conjugadas con mAbs para la captura de partículas virales en muestras, que posteriormente se detectan mediante cambios de impedancia en un microchip de papel-plástico (Draz et al., 2018). Otro acercamiento es el inmunosensor electroquímico, el cual es un microelectrodo de oro funcionalizado con anticuerpos que detecta la captura de proteína E mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (Kaushik et al., 2018).

Una alternativa al uso de anticuerpos es el diseño de péptidos de unión, que sean afines y específicos a los antígenos. Se han desarrollado algunos ensayos con este enfoque como el ensayo de inmunoadsorción ligado a fluorescencia (FLISA) tipo sándwich que utiliza péptidos afines a la proteína E (Kim et al., 2018) y también el ensayo de aglutinación-emulsión, en el cual se funcionalizaron gotas de una mezcla de hidrocarburos y polímeros con un péptido de unión a la proteína NS1 (Q. Zhang et al., 2019).

4. Planteamiento del problema

A nivel mundial se ha presentado una rápida propagación de enfermedades transmitidas por vectores, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Por el aumento de casos de ZIKV en América, en 2016 la OMS declaró una emergencia internacional y actualmente continúa siendo uno de los patógenos que representan un mayor riesgo a la salud pública.

Debido a que la enfermedad causada por ZIKV presenta síntomas similares a otras enfermedades transmitidas por vectores, su diagnóstico clínico es difícil. Para la confirmación de los casos son necesarias las pruebas moleculares, siendo RT-PCR la prueba estándar por su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, sólo se realiza en laboratorios que cuenten con el equipo necesario y cumplan los estándares de calidad.

Actualmente, no existe una vacuna para la prevención de la infección o un tratamiento específico para ZIKV. Mientras esto siga siendo cierto, la detección oportuna del virus es la mejor manera de controlar la propagación del virus, evitar el aumento de casos, apoyar a la vigilancia epidemiológica y mejorar las estrategias para el control de vectores.

La mayoría de los países afectados por ZIKV son países de recursos limitados y la disponibilidad de pruebas rápidas para la detección de ZIKV es baja. Por lo que es necesario el desarrollo de este tipo de pruebas, que sean más sencillas y puedan ser utilizadas en el punto de atención o en campo. Un enfoque para lograr esto son los inmunoensayos basados en el uso de anticuerpos contra antígenos de ZIKV. Los anticuerpos monoclonales suponen ser específicos contra su antígeno, sin embargo, en el caso de anticuerpos contra ZIKV pueden presentar reactividad cruzada hacia otros virus relacionados como el DENV, por lo que es importante evaluar las características de los anticuerpos monoclonales comerciales y su potencial para ser empleados en inmunoensayos.

5. Justificación

Desde el año 2000 se han presentado brotes de diversos virus transmitidos por vectores, entre ellos el virus de Zika. Este virus se ha propagado con rapidez y actualmente tiene presencia en alrededor de 52 países de América, además de África y Asia. Además, la OMS lo ha catalogado como uno de los patógenos con prioridad para hacer investigación y desarrollo, por su potencial epidémico y/o porque las contramedidas son insuficientes.

Las infecciones por ZIKV suelen ser asintomáticas o con síntomas leves y similares a infecciones por DENV o CHIKV. Sin embargo, se ha asociado la infección por ZIKV con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré en adultos y el síndrome congénito por ZIKV en neonatos. Por esto último, se da mayor importancia a identificar casos en mujeres embarazadas. Sólo en América se han reportado aproximadamente 878,000 casos de ZIKV, de los cuales menos de una tercera parte se han confirmado. En México más de la mitad de los casos confirmados son en mujeres embarazadas.

Por la dificultad de diferenciar las infecciones causadas por arbovirus, además que circulan diversos virus simultáneamente y las consecuencias que puede provocar la infección por ZIKV, surge la necesidad de diseñar pruebas confiables para la detección de este virus. A pesar de que algunas técnicas empleadas actualmente dan resultados precisos, éstas sólo se realizan en laboratorios que cuenten con el equipo y materiales necesarios. Por esto se busca desarrollar métodos fáciles de usar que puedan ser empleados en las zonas afectadas, que sirvan como pruebas de tamizaje para dar un resultado preliminar que ayude a proporcionar una atención adecuada. De tal forma que puedan tomarse medidas preventivas y de control.

Un enfoque para lograr esto es el uso de anticuerpos contra antígenos de ZIKV. Por lo tanto, en este proyecto de tesis se propuso evaluar anticuerpos comerciales en inmunoensayos ELISA y Dot Blot. De tal forma, que se seleccionaron anticuerpos adecuados para diseñar un sistema que permitió la detección específica de ZIKV en muestras biológicas y, además, se obtuvo un prototipo de inmunoensayo que puede ser escalado a una prueba rápida.

6. Hipótesis y objetivos

6.1 Hipótesis

La configuración de los componentes en el prototipo de inmunoensayo permitirá la detección del virus de Zika en muestras biológicas.

6.2 Objetivo general

Validar anticuerpos comerciales contra el virus de Zika y emplearlos para diseñar un prototipo de inmunoensayo para la detección del virus de Zika.

6.3 Objetivos específicos

- Validar los anticuerpos comerciales mediante la técnica de ELISA.
- Seleccionar y evaluar los componentes del inmunoensayo mediante las técnicas de ELISA y Dot Blot.
- Diseñar el orden de los componentes del inmunoensayo.
- Estandarizar y caracterizar el prototipo de inmunoensayo.
- Incorporar el prototipo de inmunoensayo a un dispositivo de microfluídica.

7. Metodología

Para el desarrollo de este proyecto se distinguen tres etapas, la primera fue la selección de los componentes que formarían el inmunoensayo mediante la validación y evaluación de los anticuerpos comerciales contra ZIKV y las proteínas recombinantes de la envoltura de ZIKV. La segunda etapa fue el diseño y evaluación de diferentes sistemas para la detección de ZIKV mediante los anticuerpos previamente seleccionados. La tercera y última etapa fue el diseño, estandarización y caracterización del prototipo de inmunoensayo. Los procedimientos y condiciones de cada uno de los ensayos experimentales se describen a continuación.

7.1 Validación de anticuerpos comerciales

Se seleccionaron tres anticuerpos comerciales contra la pE de ZIKV, dos anticuerpos monoclonales: anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource), y uno policlonal: anti-ZIKV_E MBS5400291 (My Biosource). Dichos anticuerpos cumplieron con los criterios de especificar su uso en inmunoensayos (ELISA y Western Blot), ser específicos a ZIKV, no presentar reacción cruzada con otros virus relacionados y que la dilución de trabajo sugerida fuera al menos de 1:200. La validación consistió en confirmar mediante ELISA que los anticuerpos detectaran a la proteína E de ZIKV, al virus completo en cultivo y en muestras de suero, además de no presentar reactividad cruzada con las proteínas E de DENV y CHIKV.

7.1.1 Detección de pE de ZIKV

Cada uno de los anticuerpos seleccionados se retó contra la pE de ZIKV recombinante (30-1935, Fitzgerald) para determinar si los anticuerpos reconocían a la proteína. Se realizó un ensayo ELISA por triplicado, en el cual se sensibilizó una microplaca con 250 ng de proteína recombinante diluida en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) y PBS-BSA al 3% como control negativo, incubando a 4 °C durante 18 horas. Posteriormente, se bloqueó con 200 μ L de PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se agregaron 50 μ L de los anticuerpos primarios anti-ZIKV_E (10-2714, MBS5304716, MBS5400291) a 1 μ g/mL, diluidos en PBS-BSA al 1% y se incubó a 37 °C por 1 hora. Después, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, agregando 200 μ L de lanticuerpo secundario correspondiente; para los anticuerpos

monoclonales se agregó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 μ g/mL en PBS-BSA 1%, y para el anticuerpo policional se agregó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (170-6515, Bio Rad) dilución 1:2000 en PBS-BSA 1%. Se incubó a 37 °C por 1 hora. Después, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.5 M y se hizo la lectura de absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.1.2 Evaluación de reactividad cruzada con proteínas de DENV y CHIKV

Se determinó la especificidad de los anticuerpos anti-ZIKV_E (10-2714, MBS5304716 y MBS5400291) al retarlos contra las proteínas E de DENV (MBS596102, My Biosource) y CHIKV (30-1940, Fitzgerald) en un ensayo ELISA. El procedimiento fue igual al descrito anteriormente (sección 7.1.1), pero se sensibilizó la microplaca con 50 μ L de pE de DENV y pE de CHIKV a 2 μ g/mL en PBS 1X. Como control positivo se utilizó pE de ZIKV recombinante (30-1935, Fitzgerald) a 2 μ g/mL en PBS 1X y como control negativo BSA.

7.1.3 Detección de ZIKV de cultivo celular y en muestras de suero

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de reconocer a la proteína E nativa en la estructura viral de ZIKV, se realizó un ELISA utilizando como muestras el sobrenadante de células Vero infectadas con ZIKV con un título viral de 4.8 x 10⁴ PFU/mL, así como sueros positivos a ZIKV, previamente caracterizados mediante RT-qPCR por el Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS. Como control positivo se empleó pE de ZIKV recombinante (30-1935, Fitzgerald) y como controles negativos BSA y suero negativo a ZIKV.

Por triplicado se sensibilizó una microplaca con 50 μ L por pozo de las muestras, cultivo viral diluido 1:1000 en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) para una concentración de 48 PFU/mL, suero positivo a ZIKV a dilución 1:400 en PBS 1X, pE ZIKV a 2 μ g/mL en PBS 1X como control positivo y los controles negativos PBS-BSA al 3% y suero negativo a ZIKV diluido 1:400 en PBS 1X. La microplaca se incubó a 4 °C por toda la noche. Posteriormente, se bloqueó cada pozo con 200 μ L de PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C por 1 hora. Después, se agregaron 50 μ L de los anticuerpos anti-ZIKV_E (10-2714, MBS5304716, MBS5400291) a 1 μ g/mL en PBS-

BSA al 1% y se incubó a 37 °C por 1 hora. En seguida, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, agregando 200 μ L a cada pozo y agitando a 600 rpm por 2 minutos en cada lavado. A continuación, se agregaron 50 μ L del anticuerpo secundario correspondiente; para los anticuerpos monoclonales se utilizó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (ab97023, Abcam) dilución 1:10000 en PBS-BSA 1%, y para el anticuerpo policional se usó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (170-6515, Bio Rad) dilución 1:2000 en PBS-BSA 1%. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Finalmente, se agregaron 50 μ L de sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó a 37 °C por 10 minutos. Se detuvo la reacción con 50 μ L de H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.2 Evaluación de proteínas E de ZIKV recombinantes

Inicialmente sólo se contaba con la proteína E de ZIKV comercial (30-1935, Fitzgerald), la cual es la secuencia completa de aminoácidos de pE de ZIKV. Posteriormente, en el laboratorio se produjo una proteína parcial de la envoltura de ZIKV (pZE), la cual contiene parte del dominio II y dominio III de pE de ZIKV. Se evaluó el reconocimiento de cada una de las proteínas por diferentes anticuerpos monoclonales mediante ELISA. Estos anticuerpos reconocen diferentes epítopos, lo cual no permitió tener una idea de la estructura de las proteínas recombinantes. Se usaron los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y MBS5304716 (My Biosource) para el reconocimiento de epítopos lineales. Y para epítopos estructurales se emplearon los anticuerpos anti-ZIKV_E ZV-54 (MABF2046, Millipore) y anti-flavivirus 4G2 (NBP2-52709, Novus Biologicals).

Se sensibilizó una microplaca agregando 50 μ L de las proteínas pZE a 5 μ g/mL y pE ZIKV (30-1935, Fitzgerald) a 5 μ g/mL en PBS 1X, así como PBS-BSA al 3% como control negativo. Se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después, se bloquearon los pozos con 200 μ L de PBS-BSA al 3% e incubando a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos primarios anti-ZIKV_E (MBS5304716, 10-2714 y ZV-54) a 1 μ g/mL en PBS-BSA al 1% y el anticuerpo antiflavivirus 4G2 a 10 μ g/mL en PBS-BSA al 1%; y se incubó a 4 °C toda la noche (16 horas). Después, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, agregando 200 μ L y agitando a 600 rpm por 2 minutos en cada lavado. A continuación, se agregaron 50 μ L del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 μ g/mL en PBS-BSA al 1% y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se procedió con el revelado. Para ello, se agregó 50 μ L de sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Se detuvo la reacción con 50 μ L de H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.3 Evaluación de anticuerpos anti-ZIKV_E seleccionados

De los tres anticuerpos comerciales validados, se seleccionaron los mAbs anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y MBS5304716 (My Biosource), los cuales cumplieron con las características deseadas para su uso en la detección de ZIKV. Estos anticuerpos fueron evaluados para poder diseñar el sistema de detección de ZIKV, es decir, plantear el orden en que se emplearon estos elementos para permitir la detección de ZIKV en muestras biológicas.

Con estos ensayos se determinaron los límites mínimo y máximo de cantidad de pE de ZIKV que detectan los anticuerpos anti-ZIKV_E, así como las concentraciones a las cuales se pueden emplear los anticuerpos. El anticuerpo anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) solo se probó contra pE ZIKV comercial (30-1935, Fitzgerald), mientras que el anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) se probó contra pE ZIKV comercial y pZE.

7.3.1 Rango de detección de pE de ZIKV y determinación de la concentración de trabajo de los anticuerpos en ELISA

Para el ensayo se prepararon diluciones seriadas 1:1 en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) de las proteínas pE ZIKV comercial y pZE desde 5 μ g/mL hasta 0.078 μ g/mL. Se sensibilizó una microplaca con 50 μ L de cada una de las diluciones de las proteínas de ZIKV (5 μ g/mL a 0 μ g/mL) por triplicado para cada anticuerpo, y se incubó la microplaca a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se bloqueó con 200 μ L de solución de PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después se agregaron 50 μ L de los anticuerpos anti-ZIKV_E, 10-2714 o MBS5304716, a 0.25 μ g/mL, 0.5 μ g/mL y 1 μ g/mL en PBS-BSA 1% y se incubó durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se realizaron tres lavados con 200 μ L de PBS-Tween 20 al 0.05%, agitando a 600 rpm por 2 minutos en cada lavado. Se agregaron 50 μ L del anticuerpo anti-IgG de ratón

conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 μ g/mL en PBS-BSA 1% y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05 %. Se reveló agregando 50 μ L de sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos protegido de la luz. Se detuvo la reacción con 50 μ L de H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.3.2 Rango de detección de pE de ZIKV y determinación de la concentración de trabajo de los anticuerpos en Dot Blot

Este ensayo es similar al anterior, pero la inmovilización y reconocimiento de las proteínas fue sobre membrana de nitrocelulosa. Primero se prepararon diluciones seriadas 1:1 en PBS 1X de las proteínas pE ZIKV comercial y pZE desde 2.5 µg/mL hasta 0.039 µg/mL. En el equipo Bio-Dot Apparatus (170-6545, Bio Rad) se colocó la membrana de nitrocelulosa (1620112, Bio Rad) previamente humedecida en PBS 1X. Para preparar la membrana se colocó en cada pozo 100 µL de PBS 1X y se pasaron a través de la membrana mediante vacío. Posteriormente, se colocaron 100 μ L por pozo de cada dilución de las proteínas, desde 2.5 μ g/mL hasta 0 μ g/mL, y se inmovilizaron en la membrana mediante vacío. Después, se bloqueó la membrana con una solución de PBS-BSA al 3% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación a 350 rpm. A continuación, se agregó el mAb anti-ZIKV_E, 10-2714 o MBS5304716, a 0.5 µg/mL o 1 µg/mL en PBS-BSA al 1% y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación a 350 rpm. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 µg/mL en PBS-BSA 1% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se agregó el sustrato 4-cloro-1-naftol (4CN) (170-6534, Bio Rad). Se incubó protegido de la luz durante 15 minutos a temperatura ambiente agitando a 350 rpm. Finalmente se lavó la membrana con agua destilada.

7.4 Diseño y evaluación de sistemas en sándwich para la detección de ZIKV

De los anticuerpos validados y caracterizados anteriormente, se seleccionaron aquellos con mejores resultados para diseñar diversos sistemas tipo sándwich para la detección de ZIKV. Los anticuerpos utilizados fueron tres anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E: 10-2714 (Fitzgerald), MBS5304716 (My Biosource) y ZV-54 (MABF2046, Millipore), y el anticuerpo

monoclonal anti-flavivirus 4G2 (NBP2-52709, Novus Biologicals). En total, se diseñaron 8 sistemas en sándwich, en los cuales se forman diferentes parejas de anticuerpos y se alterna su uso como captura o detección (Figura 2). Estos diseños se evaluaron mediante ELISA y se seleccionaron algunos para evaluarlos sobre membrana de nitrocelulosa.



Figura 2. Diagramas de los diseños de sistema en sándwich evaluados mediante ELISA. A) Sistema 1, mAb de captura anti-ZIKV_E 10-2714 y mAb de detección anti-ZIKV_E MBS5304716. B) Sistema 2, mAb de captura anti-ZIKV_E MBS5304716 y mAb de detección anti-ZIKV_E 10-2714. C) Sistema 3, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 como elemento de captura y detección. D) Sistema 4, mAb de captura anti-flavivirus 4G2 y mAb de detección anti-ZIKV_E 10-2714. E) Sistema 5, mAb de captura anti-ZIKV_E 10-2714 y mAb de detección anti-flavivirus 4G2. F) Sistema 6, mAb de captura anti-ZIKV_E MBS5304716 y mAb de detección anti-flavivirus 4G2. G) Sistema 7, mAb de captura anti-ZIKV_E MBS5304716 y mAb de detección anti-flavivirus 4G2 con HRP. H) Sistema 8, mAb de captura anti-ZIKV_E ZV-54 y mAb de detección anti-flavivirus 4G2 con HRP.

7.4.1 Evaluación del desempeño de los diseños de sistemas en sándwich para la detección de ZIKV mediante ELISA empleando diferentes esquemas de interacción.

Debido a que todos los anticuerpos utilizados en los sistemas 1 al 6 son monoclonales de ratón (Figura 2A-F), se siguieron diferentes metodologías para la interacción de las muestras con los anticuerpos de captura y detección, así como para evitar en lo posible la interacción del anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) con el anticuerpo de captura. La Figura 3 es un resumen gráfico de estas metodologías, las cuales se describen más adelante. En el caso se los sistemas 7 y 8 (Figura 2G-H), no se utilizó un anticuerpo secundario ya que el anticuerpo de

detección estaba conjugado con HRP, por lo que el procedimiento es como cualquier ELISA tipo sándwich.



Figura 3. Metodologías para la evaluación de sistemas en sándwich. A) Premezcla de anticuerpos de detección. B) Premezcla de muestra con anticuerpos de detección. C) Interacción simultánea de la muestra y los anticuerpos de detección con los anticuerpos de captura. Imagen creada en biorender.com

7.4.1.1 Premezcla de anticuerpos de detección

El procedimiento seguido fue sensibilizar la microplaca con el anticuerpo de captura correspondiente a 0.5 µg/mL en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) incubando a 4 °C toda la noche. Después, se bloqueó con PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se agregaron las muestras, cultivo de ZIKV a 480 PFU/mL, pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald) a 2 µg/mL o PBS-BSA al 1%; y se incubó a 37 °C por 1 hora. Durante esta incubación se mezcló el anticuerpo de detección a 2 µg/mL con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.2 µg/mL en PBS-BSA al 1% y se incubó a 37 °C por 1 hora en agitación a 300 rpm (Incu-Shaker mini, Benchmark Scientific). Después de incubar las muestras, se lavó la microplaca tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Seguido, se agregó la mezcla de anticuerpo de detección con anticuerpo secundario (Figura 3A) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%. Finalmente, se agregó el sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific), después de 10 minutos se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.4.1.2 Premezcla de muestra con anticuerpos de detección

Para esta metodología, primero se sensibilizó la microplaca con el anticuerpo de captura correspondiente a 0.5 µg/mL en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) incubando a 4 °C toda la noche. Después, se bloqueó con PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C por 1.5 horas. Durante el bloqueo, se mezclaron las muestras con el anticuerpo de detección a 2 µg/mL en PBS-BSA al 1% y se incubaron a 37 °C por 1 hora en agitación a 300 rpm en incubadora (Incu-Shaker mini, Benchmark Scientific). Después, a cada mezcla se le agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HPR (Ab97023, Abcam) a 0.2 µg/mL en PBS-BSA al 1% y se incubaron 30 minutos a 37 °C en agitación a 300 rpm. Posteriormente, se descartó la solución de bloqueo y se agregaron las mezclas de muestras con anticuerpos de detección (Figura 3B); la microplaca se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se lavó la microplaca tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, agitando por 2 minutos a 600 rpm en cada lavado. Seguido, se agregó el sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó por 10 minutos. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.4.1.3 Interacción simultánea de la muestra y anticuerpos de detección con los anticuerpos de captura

Como en los ensayos anteriores, primero se sensibilizó la microplaca con el anticuerpo de captura correspondiente a 0.5 µg/mL en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) incubando a 4 °C toda la noche. Después, se bloqueó con PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C por 1.5 horas. Durante el bloqueo, en un microtubo se mezcló el anticuerpo de detección a 2 µg/mL en PBS-BSA al 1% y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HPR (Ab97023, Abcam) a 0.2 µg/mL en PBS-BSA al 1%; y se incubó a 37 °C por 1 hora en agitación a 300 rpm en incubadora (Incu-Shaker mini, Benchmark Scientific). Posteriormente, se descartó la solución de bloqueo y en cada pozo se agregó de forma simultánea la muestra correspondiente y la mezcla de anticuerpos de detección (Figura 3C); la microplaca se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se lavó la microplaca tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, agitando por 2 minutos a 600 rpm en cada lavado. Seguido, se agregó el sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó por 10 minutos. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.4.2 Evaluación de diseños de sistemas sándwich sin anticuerpos secundarios

Esta metodología fue utilizada para evaluar los sistemas 7 y 8. Para ello, primero se sensibilizó la microplaca con los anticuerpos de captura anti-ZIKV_E MBS5304716 y ZV-54 a 1 μ g/mL en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4), así como los controles pZE a 5 μ g/mL (control positivo) y PBS-BSA al 3% (control negativo). Se agregaron 50 μ L a cada pozo y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después, se bloqueó con 200 μ L de PBS-BSA al 3%, incubando a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de las muestras pZE a 5 μ g/mL o PBS-BSA al 3% y se incubó a 37 °C por 1 hora. Después, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, agitando a 600 rpm por 2 minutos en cada lavado. A continuación, se agregó el anticuerpo antiflavivirus 4G2 conjugado con HRP (NBP2-52709H, Novus Biologicals) a 20 μ g/mL en PBS-BSA al 1% y se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se continuó con el revelado. Para ello se agregaron 50 μ L de sustrato TMB para ELISA (34028, Thermo Scientific) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ a 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas (xMark, Bio Rad).

7.4.3 Evaluación del desempeño de los sistemas en sándwich para la detección de ZIKV sobre membrana de nitrocelulosa

Algunos de los sistemas evaluados en ELISA, también fueron probados sobre membrana de nitrocelulosa en ensayos de tipo inmunocromatografía. Además, se buscó una alternativa al uso de anticuerpos secundarios conjugados con HRP, por lo cual se optó por conjugar los anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E con nanopartículas de oro (AuNPs) de 40 nm (Anexo 1). En este formato se evaluaron dos sistemas en sándwich diferentes, utilizando los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y MBS5304716 (My Biosource), así como el anticuerpo anti-flavivirus 4G2 (NBP2-52709, Novus Biologicals) (Figura 4).



Figura 4. Sistemas en sándwich evaluados en membrana de nitrocelulosa. A) mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 conjugado a AuNPs para detección. B) mAb anti-flavivirus 4G2 de captura y mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 conjugado a AuNPs para detección.

Para el primer diseño (Figura 4A) se utilizaron tiras de membrana de nitrocelulosa de flujo rápido (FF80HP, GE Healthcare), en las cuales se inmovilizó 75 ng de anticuerpo anti-IgG de ratón (Ab97023, Abcam) como control y diferentes cantidades de anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 (75 o 150 ng) para la captura en la zona de prueba. Las tiras fueron bloqueadas con una solución de PBS-BSA al 1%. incubando 30 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital a 300 rpm. Posteriormente, se lavaron una vez con PBS 1X (0.01 M, pH 7.4) y se secaron a 37 °C por 5 minutos. Como muestras se utilizaron 10 μ L de cultivo de ZIKV con título viral de 4.8 x 10⁴ PFU/mL o 2.4 x 10³ PFU/mL, las cuales migraron por capilaridad y después migraron 10 μ L de los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 conjugados con AuNPs.

Para el segundo diseño (Figura 4B), las tiras de membrana de nitrocelulosa (FF80HP, GE Healthcare) se prepararon de forma similar. Para los puntos de control se inmovilizaron 75 ng de anticuerpo anti-IgG de ratón (Ab97023, Abcam) y para el punto de prueba se colocaron 450 ng de anticuerpo de captura anti-flavivirus 4G2. Como muestra positiva se utilizó la proteína pZE y como muestra negativa se usó BSA. Las muestras se mezclaron con 10 μ L del mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 conjugado con AuNPs y migraron a través de las membranas por capilaridad.

7.5 Diseño y evaluación de sistemas sencillos para la detección de ZIKV sobre membrana de nitrocelulosa

Además de los sistemas en sándwich, también se probaron sistemas sencillos, inmovilizando las muestras sobre la membrana de nitrocelulosa y empleando un anticuerpo primario anti-ZIKV_E para la detección. Se utilizaron dos maneras de generar una señal colorimétrica: usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP o conjugando el anticuerpo primario con AuNPs.

7.5.1 Sistema de detección con anticuerpos primarios conjugados a nanopartículas de oro

Para estos ensayos se conjugaron con AuNPs los anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y MBS5304716 (My Biosource) (Anexo 1). Se prepararon las tiras de membrana de nitrocelulosa (FF80HP, GE Healthcare), colocando puntos de 75 ng de anti-IgG de ratón (Ab97023, Abcam) como control. Después, se bloquearon con una solución de PBS-BSA al 1% incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación orbital a 300 rpm y se secaron a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, en cada membrana se colocó 1 µL de muestra y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se dejó migrar los anticuerpos conjugados con AuNPs por capilaridad. Las muestras utilizadas fueron suero negativo a ZIKV y sueros positivos a ZIKV.

7.5.2 Sistemas de detección utilizando anticuerpos secundarios conjugados con HRP

En este ensayo se prepararon tiras de membrana de nitrocelulosa (FF80HP, GE Healthcare) de 3 mm de ancho, en las cuales se colocó el control positivo de 75 ng de pZE o pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald). Después se bloquearon con una solución de PBS-BSA al 1% y se dejaron secar a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, sobre las membranas se colocaron gotas de 1 μ L de las muestras de suero positivo a ZIKV y suero negativo. Se dejó secar y a continuación se incubaron las tiras con el anticuerpo anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) o MBS5304716 (My Biosource) a 1 μ g/mL durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 μ g/mL durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se reveló con el sustrato
TMB para membrana (T0565, Sigma), incubando 2 minutos. Finalmente, se lavaron con agua destilada.

7.5.2.1 Inmovilización por flujo de la muestra a través de la membrana

Este ensayo es similar al anterior, pero se modificó la preparación de la membrana, para hacer una prueba de concepto del prototipo propuesto para incorporar al cartucho de microfluídica. En este caso se empleó membrana de nitrocelulosa de flujo medio (FF120HP, GE Healthcare). En tiras de 3 mm de ancho se colocaron puntos de 75 ng de pZE o pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald) como control positivo. Después se bloquearon con PBS-BSA al 1%, dejando un área de la membrana sin bloquear (zona de detección), y se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se colocaron las muestras en la base de cada tira y se dejaron migrar por capilaridad. Las muestras fueron 10 μ L de cada proteína (pZE o pE de ZIKV) a 10 μ g/mL. Una vez que migraron las muestras, se hizo un lavado con PBS-BSA al 1% agitando a 300 rpm por 10 minutos. Después, se incubó con el anticuerpo anti-ZIKV_E correspondiente, 10-2714 o MBS5304716, a 1 µg/mL en PBS-BSA al 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). A continuación, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 µg/mL en PBS-BSA 1%. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación suave. Después, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Finalmente, se reveló con el sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma) incubando por 2 minutos y se lavó con agua destilada para detener la reacción.

7.6 Diseño del prototipo de inmunoensayo

Para el diseño del prototipo de inmunoensayo se eligió el sistema sencillo con el anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) junto con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam). Como plataforma se utilizó la membrana de nitrocelulosa de flujo medio (FF120HP, GE Healthcare) y se optó por dejar un espacio sin bloquear para crear la línea de detección, donde se inmoviliza la muestra al migrar a través de la membrana. Para obtener tiras de membrana homogéneas, se utilizó el equipo ZX1010 Dispense Platform (Bio Dot, California, EUA) para imprimir la línea de control y para el bloqueo selectivo de la membrana.

7.6.1 Condiciones de impresión de membrana de nitrocelulosa

Como se mencionó anteriormente, se utilizó la membrana de nitrocelulosa de flujo medio (FF120HP, GE Healthcare) y el equipo ZX1010 Dispense Platform (Bio Dot, California, EUA) para la impresión de la línea control y el bloqueo. Para la línea control se empleó la proteína parcial de ZIKV (pZE) a 150 μ g/mL en PBS 1X. Se hizo una doble impresión de la línea de pZE a un flujo de 1 μ L/cm a 1.5 cm de la base de la membrana de nitrocelulosa, dejando secar a temperatura ambiente después de cada impresión. Para el bloqueo se utilizó una solución de PBS-BSA al 1%, imprimiendo líneas a un flujo de 2 μ L/cm y dejando una línea de ~1 mm de ancho sin bloquear a 0.7 cm de la base de la membrana. La membrana se dejó secar por completo a temperatura ambiente por 20 horas y se guardó en una bolsa resellable a temperatura ambiente en un lugar seco.

7.7 Estandarización del ensayo con el prototipo de inmunoensayo

Para estandarizar el ensayo con el prototipo, se modificó el procedimiento seguido para la prueba de concepto del prototipo, tomando en cuenta minimizar el tiempo total del ensayo y los requerimientos del cartucho de microfluídica. Para ello se probaron diferentes concentraciones de los anticuerpos de detección, tiempos de incubación con los anticuerpos y con el sustrato para revelar. Además de hacer una sola incubación con los anticuerpos de detección.

Primero se hizo una mezcla inicial de los anticuerpos de detección, mezclando en un microtubo 1 μ L de anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) a 1 mg/mL, 1 μ L de anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 mg/mL y 8 μ L de PBS 1X (0.01 M, pH 7.4). Esta mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recortaron tiras de membrana impresa de 3 mm x 25 mm. En la base de cada tira se colocó 10 μ L de la muestra correspondiente, suero negativo a ZIKV o suero negativo enriquecido con 750 ng de pZE, y se dejó migrar por capilaridad. Después, se hizo un lavado con 250 μ L de PBS-BSA al 1%, agitando por 5 minutos. Seguido, se agregaron 250 μ L de la mezcla de anticuerpos anterior, diluidos 1:100 en PBS 1X y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). Después, se hicieron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X y se agregaron 250 μ L de sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma) y se incubó por 3 minutos aproximadamente. Finalmente, se lavó con agua destilada.

7.7.1 Determinación de la concentración de anticuerpos

Siguiendo el procedimiento anterior (Sección 7.7), se probaron tres diluciones de la mezcla inicial de anticuerpos. En la base de cada tira se colocó 10 μ L de la muestra correspondiente, PBS 1X o pZE a 25 μ g/mL en PBS 1X, y se dejó migrar por capilaridad. Después, se lavó con 250 μ L de PBS-BSA al 1%, agitando por 5 minutos. Seguido, se agregaron 250 μ L de la mezcla inicial de anticuerpos, diluidos en PBS 1X a 1:100, 1:500 o 1:1000 y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). Después, se hicieron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X y se agregaron 250 μ L de sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma). Después de 2 minutos se lavó con agua destilada para detener la reacción.

7.7.2 Determinación de tiempos de incubación con anticuerpos

En este ensayo se buscó reducir el tiempo de incubación con los anticuerpos de detección. Para ello se recortaron cuatro tiras de membrana de nitrocelulosa impresa. En la base de cada tira se colocó 10 μ L de pZE a 25 μ g/mL, y se dejó migrar por capilaridad. Después, se lavaron con 250 μ L de PBS-BSA al 1%, agitando por 5 minutos. Seguido, se agregaron 250 μ L de la mezcla inicial de anticuerpos, anti-ZIKV_E MBS5304716 a 100 μ g/mL y anti-IgG de ratón con HRP a 10 μ g/mL en PBS 1X, diluidos 1:500 en PBS 1X y cada tira se incubó durante 5, 10, 15 o 30 minutos, a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). Después, se lavaron tres veces con 500 μ L de PBS 1X para continuar con el revelado. Se agregaron 250 μ L de sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma) y se incubó por 2 minutos. Finalmente, se lavó con agua destilada.

7.7.3 Determinación del tiempo de revelado

Se determinó el tiempo de incubación con el sustrato TMB para obtener una mejor señal colorimétrica con el menor ruido de fondo posible. Por lo que se realizó un ensayo similar a los anteriores. En tres tiras de membrana de nitrocelulosa impresa se colocaron 10 μ L de pZE a 25 μ g/mL, y se dejó migrar por capilaridad. Se lavaron con 250 μ L de PBS-BSA al 1%, agitando por 5 minutos. Seguido, se agregaron 250 μ L de la mezcla inicial de anticuerpos, anti-ZIKV_E MBS5304716 a 100 μ g/mL y anti-IgG de ratón con HRP a 10 μ g/mL en PBS 1X, diluidos 1:500 en PBS 1X y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). Después, se lavaron tres veces con 500 μ L de PBS 1X. A cada tira se le agregó 250 μ L de

sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma) y se incubó por 1, 2 o 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada para detener la reacción.

7.8 Caracterización del prototipo de inmunoensayo

Una vez estandarizado el ensayo con el prototipo, se continuó con la caracterización de éste. Primero se verificó que el ensayo fuera reproducible. Posteriormente, se evaluó el efecto de la matriz de la muestra biológica, que fue una muestra de suero. Asimismo, se determinó el límite de detección de proteína ZE en suero y se hizo una evaluación del desempeño del prototipo con muestras de suero positivas a ZIKV, DENV y CHIKV. Todas las muestras de suero utilizadas en estos ensayos fueron previamente caracterizadas mediante RT-qPCR por el Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS.

7.8.1 Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad del ensayo con el prototipo, éste se puso a prueba realizando el ensayo con las condiciones estandarizadas un día a la semana durante cuatro semanas. Para los ensayos, primero se hizo una mezcla inicial de los anticuerpos de detección, mezclando en un microtubo 1 μ L de anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) a 1 mg/mL, 1 μ L de anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) a 0.1 mg/mL y 8 μ L de PBS 1X (0.01 M, pH 7.4). Esta mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recortaron tiras de 3 mm x 25 mm de la membrana impresa con la línea control y bloqueada. En la base de cada tira se colocó 10 μ L de la muestra correspondiente, PBS 1X o pZE a 25 μ g/mL, y se dejó migrar por capilaridad. Después, se hizo un lavado con 250 μ L de PBS-BSA al 1%, agitando por 5 minutos. Seguido, se agregaron 250 μ L de la mezcla de anticuerpos anterior, diluidos 1:500 en PBS 1X y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (200 rpm). Después, se hicieron tres lavados con PBS 1X y se agregaron 250 μ L de sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma) y se incubó por 2 minutos. Finalmente, se lavó con agua destilada para detener la reacción.

7.8.2 Evaluación del efecto de la matriz (suero)

Este prototipo está pensado para la detección de ZIKV en muestras de suero de pacientes. Por lo que se evaluó el efecto de interferencia que pueden generar los componentes de este tipo de

muestra. Para ello se siguió el procedimiento estandarizado descrito anteriormente (sección 7.8.1). Como muestras se empleó suero negativo a ZIKV sin diluir o diluido en PBS 1X a razón de 1:1, 1:4, 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100; todas las muestras de suero fueron enriquecidas con 250 ng de pZE. Como controles se utilizó PBS 1X (control negativo) y pZE a 25 μ g/mL en PBS 1X (control positivo).

7.8.3 Determinación del límite de detección de proteína en suero

Para determinar el límite de detección de la proteína E de ZIKV en muestras de suero, se prepararon diluciones de suero 1:50 en PBS 1X, las cuales fueron enriquecidas con diferentes concentraciones de pZE: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 μ g/mL. Se siguió el procedimiento estandarizado, descrito anteriormente (sección 7.8.1), utilizando estas diluciones como muestras para migrar a través de la membrana de nitrocelulosa.

7.8.4 Evaluación del desempeño del ensayo con muestras de sueros

Se evaluó la funcionalidad del prototipo para la detección de ZIKV en muestras de suero positivas a ZIKV, así como la especificidad probando el prototipo con muestras de suero positivas a DENV y CHIKV. Se siguió el procedimiento estandarizado, utilizando como muestras los sueros positivos a ZIKV, DENV y CHIKV diluidos 1:50 en PBS 1X. Como control negativo se utilizó suero negativo diluido 1:50 en PBS 1X y como control positivo se usó suero negativo diluido 1:50 enriquecido con 250 ng de pZE.

7.8.5 Evaluación corta de la estabilidad de la proteína impresa en membrana de nitrocelulosa

Se hizo una evaluación preliminar de la estabilidad de la proteína ZE impresa como línea control en la membrana de nitrocelulosa, comparando su conservación a dos temperaturas diferentes. Se preparó membrana de nitrocelulosa de flujo medio (FF120HP, GE Healthcare) de acuerdo con lo descrito anteriormente (sección 7.6.1). Se recortaron dos secciones de 3 cm de la membrana impresa y se guardaron en bolsas resellables con silica gel para proteger de la humedad. Una de las membranas se guardó a temperatura ambiente y otra a 4 °C, durante dos semanas. Transcurrido el tiempo, se evaluó la detección de pZE en la línea control, siguiendo el procedimiento estandarizado. Estas se compararon entre sí y contra una membrana recién impresa.

7.9 Integración del prototipo al cartucho de microfluídica

El prototipo de membrana de nitrocelulosa se incorporó a cartuchos de microfluídica (Flex.flow slide, Bi.Flow Systems GmbH). Por las características de los cartuchos de microfluídica, se hicieron algunas adaptaciones para poder integrar la membrana de nitrocelulosa y poder realizar el ensayo de forma adecuada. Para poder realizar los ensayos en los cartuchos de microfluídica, éstos se conectaron al hardware Bi.Flow (Bi.Flow Systems GmbH), el cual estaba conectado a un equipo de cómputo para poder ser controlado mediante el software Bi.Flow Pumpcontrol (Bi.Flow Systems GmbH). Para hacer uso del hardware y software de Bi.Flow se siguieron las indicaciones de los manuales proporcionados con el equipo.

7.9.1 Adaptaciones al cartucho de microfluídica para la integración de la membrana de microfluídica

Los cartuchos cuentan con dos orificios en la superficie, los cuales se conectan mediante un adhesivo y una lámina de polímero para formar un canal donde se llevan a cabo las reacciones del ensayo (Figura 5A-B). Las dimensiones del canal son de 24 mm de largo, 2 mm de ancho y ~0.15 mm de alto. Para poder colocar la membrana de nitrocelulosa en dicho canal, ésta se recortó de tamaño 1.5 mm de ancho y 18 mm de largo, pero la altura de la membrana es de 0.2 mm. Dada la diferencia en las alturas del canal y la membrana, se colocó otra lámina de polímero de ~0.5 mm de grosor, que fue perforada con la forma del canal (Figura 5C).

Para ensamblar todos los elementos en el cartucho de microfluídica, primero se colocó un adhesivo para crear el canal, sobre éste se colocó la lámina perforada y después se colocó otro adhesivo, alineando estos tres elementos para formar el canal. En seguida, se colocó la membrana de nitrocelulosa al interior del canal y finalmente se selló con la laminilla de polímero (Figura 6).

Para asegurar que no hubiera fugas por las adaptaciones, se llenaron todos los reservorios del cartucho con agua con colorante y se hizo una corrida del software, vaciando todos los reservorios a una velocidad de $0.2 \,\mu$ L/s.



Figura 5. Características generales del cartucho de microfluídica y las adaptaciones. A) Reservorios del cartucho de microfluídica y el canal de reacción. B) Dimensiones del adhesivo para formar el canal de reacción. C) Dimensiones de la laminilla de acetato para ajustar el canal de reacción.



Figura 6. Diagrama de integración de los componentes adaptados al cartucho de microfluídica.

7.9.2 Integración de soluciones y reactivos al cartucho de microfluídica

Los cartuchos de microfluídica cuentan con seis reservorios, cuatro con un volumen de 25 μ L y dos con volumen de 45 μ L. En estos reservorios se colocaron todos los reactivos y soluciones necesarios para el ensayo, así como la muestra. Para la muestra se recomienda suero diluido en PBS 1X; la mezcla de anticuerpos de detección fue anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource)

y anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Ab97023, Abcam) en PBS 1X; para revelar se debe emplear el sustrato TMB para membrana (T0565, Sigma). Para los diferentes lavados se utilizó PBS 1X, PBS-BSA al 1% y agua destilada. Se probaron diferentes acomodos de estas soluciones en los reservorios del cartucho de microfluídica y se evaluó el flujo de cada solución a una velocidad estándar de 0.2 μL/s, hasta tener el acomodo adecuado para el ensayo.

7.9.3 Programación del software para correr el ensayo

Tomando en cuenta el acomodo de las soluciones y reactivos en los reservorios del cartucho de microfluídica, así como la estandarización del ensayo, se configuró el orden en el cual se deben activar las bombas del cartucho de microfluídica. Además de los tiempos y velocidades de flujo de cada bomba. Para ello se utilizó el software Bi.Flow Pumpcontrol (versión 2.4, Bi.Flow Systems GmbH). Cada bomba corresponde a un reservorio y el orden de activación de las bombas corresponde a los pasos del ensayo. En la interfaz de usuario del software se agregaron los intervalos necesarios para cada paso del ensayo, y se estableció la duración de cada uno en segundos. De acuerdo con el volumen del reservorio y el tiempo correspondiente, se ajustó la velocidad del flujo de cada bomba.

7.10 Análisis estadísticos

Los resultados de los ensayos de reconocimiento de pE de ZIKV recombinante, ZIKV en cultivo y muestras de suero, así como de los ELISA sándwich sin anticuerpo secundario se analizaron mediante la prueba t-student de dos colas con α =0.05. Los resultados de los ensayos de reactividad cruzada, evaluación de proteínas y los diferentes ELISA tipo sándwich se analizaron mediante ANOVA de un factor con prueba posterior de Tukey con α =0.05. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism (versión 9.1.2 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA).

8. Resultados y discusiones

8.1 Validación de anticuerpos comerciales

8.1.1 Reconocimiento de pE de ZIKV, ZIKV en cultivo celular y en muestras de suero

Se evaluaron tres anticuerpos comerciales contra la proteína E de ZIKV por su capacidad de reconocer a la proteína E recombinante, así como a la proteína E en la estructura viral de ZIKV en muestras de suero positivas a ZIKV y en el sobrenadante de cultivos celulares infectados. Para considerar un resultado positivo, además del análisis estadístico, la absorbancia de la muestra debió ser al menos el doble que la absorbancia del control negativo.

De los tres anticuerpos evaluados, los dos anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E, 10-2714 y MBS5304716, mostraron reconocimiento de pE de ZIKV recombinante, así como de ZIKV del sobrenadante del cultivo celular y en muestras de suero positivo a ZIKV (Figura 7A-B). Por otro lado, el anticuerpo policlonal anti-ZIKV_E MBS5400291, sí hubo diferencia entre pE de ZIKV recombinante y el control negativo de BSA (p<0.01), así como en la muestra de suero positivo a ZIKV y suero negativo (p<0.05), pero no se encontró diferencia entre la absorbancia de ZIKV de cultivo celular y su control negativo (Figura 7C). A pesar de las diferencias estadísticas en las muestras de proteína recombinante y sueros con el pAb anti-ZIKV_E, las diferencias en los valores de absorbancia no son suficientes para considerarlos un resultado positivo, además que se busca que la señal colorimétrica sea apreciable y diferenciable a simple vista.

La principal diferencia entre los anticuerpos monoclonales y el anticuerpo policlonal es el inmunógeno utilizado para la producción de los anticuerpos. Mientras que los anticuerpos monoclonales fueron producidos con la proteína E de ZIKV completa, el anticuerpo policlonal fue producido con un péptido de la proteína E de ZIKV. De acuerdo con la ficha técnica del anticuerpo MBS5400291, el péptido utilizado como inmunógeno pertenece a la región que une a los dominios DI y DIII de la proteína E. La estructura del dominio DI es de barril- β y se encuentra en la región central de la proteína E (Dai et al., 2016), por lo que posiblemente el epítopo reconocido por el pAb anti-ZIKV_E MBS5400291 no está disponible en la conformación de la proteína nativa. Esto explicaría por qué no reconoció a la proteína E

recombinante ni a la proteína E en la estructura viral en los ensayos, posiblemente se requeriría la desnaturalización de la proteína para observar reconocimiento.



Figura 7. Reconocimiento de pE de ZIKV por anticuerpos comerciales anti-ZIKV_E en diferentes muestras. A) mAb anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald). B) mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource). C) pAb anti-ZIKV_E MBS5400291 (My Biosource).

Los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E concuerdan con lo reportado por Kabir et al (2020). Ellos evaluaron mediante Western Blot un panel de 21 anticuerpos comerciales contra la proteína E de ZIKV y DENV, entre ellos los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS5304716, retándolos contra diferentes cepas de ZIKV. Ambos anticuerpos reconocieron a la proteína E de las diferentes cepas, pero el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 mostró mayor especificidad (Kabir et al., 2020). En otro estudio se reporta el uso del anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 en Western Blot para confirmar la infección de cultivos celulares (Hou et al., 2017). Por dichos resultados se puede decir que ambos anticuerpos reconocen un epítopo lineal, el cual está disponible tanto en la estructura desnaturalizada como en la estructura nativa de la proteína E. Y aunque no se especifica a la región a la cual están dirigidos estos anticuerpos, se puede suponer que detectan un epítopo del dominio DIII de la proteína E, ya que la mayoría de los anticuerpos reportados y disponibles comercialmente están dirigidos al dominio DIII. Además, se han identificado diversos epítopos lineales y conformacionales en este dominio (Heinz y Stiasny, 2017; X. Zhang et al., 2017).

8.1.2 Evaluación de reactividad cruzada con DENV y CHIKV

Los tres anticuerpos anti-ZIKV_E fueron retados contra las proteínas de envoltura de DENV y CHIKV para descartar reactividad cruzada. Para ello se buscó que hubiera una diferencia significativa entre pE de ZIKV y las otras proteínas. Se observó que ninguno de los anticuerpos anti-ZIKV E tiene reactividad cruzada con las proteínas de envoltura de los otros virus (Figura 8). De los tres anticuerpos, los mAbs anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS5304716 declaran en sus fichas técnicas que no tienen reactividad cruzada con DENV y CHIKV, lo cual fue confirmado con este ensayo. Con ambos anticuerpos fue evidente la diferencia entre el reconocimiento de pE de ZIKV y pE de DENV y CHIKV (p<0.0001) (Figura 8A-B). Acorde a este resultado, se ha reportado que tanto el anticuerpo MBS5304716 como el 10-2714 no presentan reactividad cruzada con DENV, al no reconocer la proteína E de DENV de diferentes cepas y serotipos. Aunque en este mismo estudio se mostró que el anticuerpo 10-2714 presenta un reconocimiento inespecífico de otra proteína de mayor peso molecular tanto en los cultivos de ZIKV como de DENV (Kabir et al., 2020). Respecto al pAb anti-ZIKV_E MBS5400291, se observó una diferencia entre las proteínas E de ZIKV y de DENV, así como con el control negativo de BSA (p<0.01), sin embargo, no hubo diferencia con pE de CHIKV (p<0.05) (Figura 8C). A pesar de esto, se puede decir que no hubo reacción cruzada con DENV ni CHIKV, ya que no hubo diferencia entre el control negativo y las proteínas de DENV y CHIKV (p<0.05).

En general se resalta que los anticuerpos no presentaron reactividad cruzada con los otros virus, en especial con DENV ya que este es el más emparentado con ZIKV. Esto puede atribuirse a que los dominios DI y DIII de las proteínas E de ZIKV y DENV tienen menor porcentaje de identidad aminoacídica en común, 35% y 29% respectivamente (Stettler et al., 2016), y los anticuerpos evaluados tienen como blanco estos dominios. La especificidad de los anticuerpos toma importancia porque se ha encontrado que en pruebas rápidas para la detección de antígenos de DENV suele presentarse problemas de falsos positivos en muestras de pacientes infectados con ZIKV u otros flavivirus (Pang et al., 2017).



Figura 8. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos comerciales anti-ZIKV_E. A) mAb anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald). B) mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource). C) pAb anti-ZIKV_E MBS5400291 (My Biosource).

8.2 Evaluación de proteínas E de ZIKV recombinantes

Inicialmente sólo se contaba con la proteína E de ZIKV comercial, la cual es la secuencia completa de aminoácidos de pE de ZIKV. Posteriormente, en el laboratorio se produjo una proteína parcial de la envoltura de ZIKV (pZE), la cual contiene parte de los dominios DII y DIII. Ambas proteínas fueron retadas contra tres anticuerpos anti-ZIKV_E y un mAb anti-flavivirus, para conocer la estructura de cada una de las proteínas y la disponibilidad de epítopos.

Dos de los anticuerpos anti-ZIKV_E, 10-2714 y MBS5304716, no están ampliamente reportados en la literatura, mientras que los otros dos anticuerpos, anti-ZIKV_E ZV-54 y anti-flavivirus 4G2, fueron caracterizados y se ha reportado su uso en diversos ensayos. Los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS5304716 reconocen epítopos lineales, aunque se desconoce cuál región de la proteína reconocen. Sin embargo, con los resultados de este ensayo se determinó que reconocen epítopos diferentes, ya que el mAb 10-2714 sí reconoció a la pE de ZIKV comercial pero no a pZE (Figura 9A), mientras que el mAb MBS5304716 sí reconoció ambas proteínas (Figura 9B). Esto puede deberse a que la proteína parcial ZE no contiene en su secuencia el epítopo reconocido por el anticuerpo 10-2714. Además, el mAb MBS5304716 presentó mayor afinidad por la proteína ZE que por la proteína E de ZIKV comercial (Figura 9B). Era esperado que el mAb 10-2714 reconociera a la pE de ZIKV comercial, ya que ambos son producidos por la misma casa comercial.



Figura 9. Reconocimiento de epítopos en las proteínas E de ZIKV recombinantes. A) Reconocimiento de epítopo lineal con mAb anti-ZIKV_E 10-2714. B) Reconocimiento de epítopo lineal con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716. C) Reconocimiento de epítopo conformacional con mAb anti-ZIKV_E ZV-54. D) Reconocimiento de epítopo conformacional con mAb anti-flavivirus 4G2.

Por otro lado, el anticuerpo anti-ZIKV_E ZV-54 reconoce un epítopo conformacional en el dominio DIII de la proteína E conservado en diferentes cepas de ZIKV, al cual se une con alta afinidad y no presenta reactividad con DENV (Zhao et al., 2016). Este anticuerpo mostró reconocimiento de pZE, pero no de pE de ZIKV comercial (Figura 9C). Respecto al mAb anti-flavivirus 4G2, éste reconoce la estructura del loop de fusión de la proteína E, la cual es una secuencia conservada en diversos de flavivirus por su función en el proceso de infección a la célula (Dussupt et al., 2021; Henchal et al., 1982). Dicho anticuerpo reconoció ambas proteínas, con mayor afinidad a la proteína ZE (Figura 9D). Ambas proteínas son producidas de forma

recombinante en *E. coli*, por lo que existe la posibilidad de que se afecte la estructura y el plegamiento de la proteína, especialmente si no hubo una optimización de codones (Tian et al., 2017; Q. Wang et al., 2012). El reconocimiento por el mAb anti-flavivirus 4G2, nos dice que la estructura del loop de fusión se plegó correctamente tanto en la secuencia completa de la proteína como en una secuencia parcial. Sin embargo, la falta de reconocimiento de pE de ZIKV comercial por el mAb anti-ZIKV_E ZV-54, nos dice que la proteína no está plegada correctamente en su totalidad, lo cual cambia la conformación de la proteína y afecta la disposición espacial de los epítopos. Mientras que pZE, a pesar de ser una proteína parcial, ésta se plegó correctamente manteniendo una conformación similar a la nativa. Además, para la expresión de la proteína ZE se hizo la optimización de codones, pero se desconoce si se realizó este proceso para la proteína comercial.

8.3 Selección de anticuerpos y su evaluación en ELISA y Dot Blot

Por los resultados anteriores, se seleccionaron los anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS5304716 para continuar con su evaluación. Mediante ELISA y Dot Blot se determinaron los rangos de detección de proteína E recombinante, así como las concentraciones de trabajo. Además de establecer cuál proteína puede ser utilizada como control positivo en los siguientes ensayos. Se evaluó la detección de proteína E de ZIKV comercial en un rango de 250 ng a 3.9 ng, utilizando diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) y MBS5304716 (My Biosource). En el caso del mAb anti-ZIKV_E MBS5304716, también se evaluó el rango de detección de pZE recombinante producida en casa.

8.3.1 Determinación de concentraciones de trabajo y rangos de detección en ELISA

En el ELISA del anticuerpo anti-ZIKV_E 10-2714 se observó una tendencia lineal en las absorbancias desde 0 hasta 31.2 ng de pE de ZIKV y alrededor de los 62.5 ng se estabiliza la absorbancia, alcanzándose un punto de saturación (Figura 10A). Este comportamiento se observó con las tres concentraciones de anticuerpo, $0.25 \ \mu g/mL$, $0.5 \ \mu g/mL$ y $1.0 \ \mu g/mL$, sin diferencias entre ellas. Por otro lado, con el anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 se mantuvo la tendencia lineal hasta los 250 ng de pE de ZIKV comercial, sin alcanzar la saturación (Figura 10B). Con este anticuerpo sí se observó diferencia entre las concentraciones utilizadas. Sin embargo, este mismo anticuerpo mostró un comportamiento diferente con la proteína ZE. En este caso, con las tres concentraciones de anticuerpo, se observó una tendencia lineal en las



absorbancias desde 0 hasta 31.2 ng de pZE, estabilizándose la señal a partir de los 62.5 ng (Figura 10C).

Figura 10. Rangos de detección de las proteínas E recombinantes con mAbs anti-ZIKV_E a diferentes concentraciones. A) pE ZIKV comercial vs mAb anti-ZIKV_E 10-2714. B) pE ZIKV comercial vs mAb anti-ZIKV_E MBS5304716. C) pZE producida en casa vs mAb anti-ZIKV_E MBS5304716. D) Comparación de la detección de proteínas E con el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 a 1 µg/mL.

Al comparar el reconocimiento de pE de ZIKV comercial con ambos anticuerpos, se observó que el anti-ZIKV_E 10-2714 tiene mayor afinidad a la proteína que el anticuerpo MBS5304716, ya que utilizando la misma concentración de ambos anticuerpos, la interacción entre pE de ZIKV y anti-ZIKV_E 10-2714 da una mayor absorbancia que la interacción con anti-ZIKV_E MBS5304716 (Figura 10A-B). En contraste, al comparar el reconocimiento de pE de ZIKV comercial y pZE con el anticuerpo MBS5304716, se observó que este anticuerpo tiene mayor afinidad por la proteína ZE que por la proteína E comercial (Figura 10D). Además, la interacción entre el anti-ZIKV_E MBS5304716 con pZE es similar a la observada entre el anticuerpo 10-

2714 y pE de ZIKV comercial. Por lo que se emparejó cada anticuerpo a una proteína para utilizar como control positivo. Además, con ambos anticuerpos se estableció utilizar concentraciones de 0.5 y 1 μ g/mL en los ensayos posteriores.

8.3.2 Determinación de concentraciones de trabajo y rangos de detección en Dot Blot

De forma similar al ELISA, las interacciones entre proteínas y anticuerpos fueron evaluadas sobre membrana de nitrocelulosa. Para el anticuerpo anti-ZIKV_E 10-2714 se observó señal colorimétrica desde 3.9 ng de pE de ZIKV, pero fue más clara a partir de 7.8 ng, esto con las dos concentraciones de anticuerpo (Figura 11A-B). Con el anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716, a 1.0 μ g/mL, la señal colorimétrica es más clara a partir de 15.6 ng de pE de ZIKV (Figura 11C), mientras que a una concentración de 0.5 μ g/mL de anticuerpo la señal es más clara a partir de 31.2 ng (Figura 11D). Al realizar el Dot Blot con la proteína ZE no se observó reconocimiento de la proteína por el anticuerpo MBS5304716 (Figura 11E-F), pues la inmovilización mediante vacío no es adecuada para esta proteína. Por lo tanto, se inmovilizó la proteína ZE de forma manual sobre la membrana de nitrocelulosa y se comparó con la proteína E de ZIKV comercial. En este ensayo se observó claramente que el anticuerpo MBS5304716 (Figura 11G).



Figura 11. Detección de proteínas E sobre membrana de nitrocelulosa. A-B) Detección de pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald) con mAb anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald) a 1 μ g/mL (A) y 0.5 μ g/mL (B). C-D) Detección de pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald) con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) a 1 μ g/mL (C) y 0.5 μ g/mL (D). E-F) Detección de proteína ZE con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) a 1 μ g/mL (C) y 0.5 μ g/mL. G) Comparación de detección de 100 ng pE de ZIKV (30-1935, Fitzgerald) y pZE con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 a 1 μ g/mL.

8.4 Evaluación de sistemas en sándwich para la detección de ZIKV

Se evaluó el desempeño de los sistemas en sándwich propuestos (Figura 2) mediante ELISA, siguiendo tres metodologías para la interacción de los anticuerpos con las muestras (Figura 3) para determinar el efecto del orden de interacción de los componentes del sándwich. Asimismo, estos ensayos se planearon como una modificación de un ELISA competitivo, ya que el anticuerpo secundario conjugado con HRP podría unirse tanto al anticuerpo de captura como al anticuerpo primario de detección por ser anticuerpos en la cual el anticuerpo de detección bloqueara la unión del anticuerpo secundario al anticuerpo de captura. Aunque lo ideal sería que el anticuerpo de detección fuera producido en otro organismo o estuviera conjugado con HRP.

En general, con las diferentes metodologías se obtuvieron resultados similares, no se observó diferencias entre las muestras de ZIKV de cultivo, la proteína E de ZIKV recombinante y BSA. Este comportamiento fue constante en todos los sistemas, con algunas ligeras diferencias. De acuerdo con estos resultados, se propusieron otros sistemas con un anticuerpo de detección conjugado con HRP. También se conjugaron algunos anticuerpos con nanopartículas de oro para evaluar los sistemas sobre membrana de nitrocelulosa.

8.4.1 Metodología de premezcla de anticuerpos

Con esta metodología se siguió el procedimiento estándar de un ELISA, primero incubando la muestra con los anticuerpos de captura y posteriormente con los anticuerpos de detección. Sólo los sistemas 1 y 2 fueron evaluados con esta metodología. En ambos casos se utilizaron como muestras cultivo de ZIKV a una concentración de 480 PFU/mL, pE de ZIKV y BSA. El análisis estadístico determinó que en el sistema 1 hubo una diferencia entre las absorbancias de la muestra de cultivo de ZIKV y el resto de las muestras, pE de ZIKV (p<0.01) y BSA (p<0.05) (Figura 12A). Mientras que con el sistema 2 no hubo deferencias entre las muestras (Figura 12B). Sin embargo, en el caso del sistema 1, aunque hay una diferencia entre la muestra de cultivo de ZIKV y BSA, no se puede considerar que hubo reconocimiento de ZIKV en la muestra positiva, ya que el valor de la absorbancia debe ser al menos el doble la absorbancia de la muestra negativa a ZIKV (Ochoa Azze, 2012). Además, la señal colorimétrica de la muestra negativa debió ser mínima, de tal forma que pudiera diferenciarse a simple vista pues es lo preferible para un ensayo cualitativo. Además, se busca un sistema que pueda ser migrado a una

plataforma en membrana de nitrocelulosa, por lo que una señal colorimétrica en muestras negativas disminuiría la sensibilidad y especificidad del ensayo.



Figura 12. Evaluación de sistemas en sándwich siguiendo la metodología de premezcla de anticuerpos de detección. A) Sistema 1, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de detección. B) Sistema 2, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección.

Los resultados obtenidos con ambos sistemas indican que el anticuerpo secundario interactuó con el anticuerpo de captura. Aunque dicha interacción se esperaba en baja medida, se generó una señal colorimétrica considerablemente alta. Por lo tanto, con los siguientes ensayos se buscó reducir dicha interacción y, en consecuencia, la señal colorimétrica de fondo.

8.4.2 Premezcla de muestras y anticuerpos

Con esta metodología se evaluaron los sistemas 1, 2, 4, 5 y 6 (Figura 2). Las muestras utilizadas fueron cultivo de ZIKV, pE de ZIKV y BSA. Para los sistemas 1 y 2, la muestra de cultivo de ZIKV tenía una concentración de 480 PFU/mL, al igual que los ensayos anteriores. Con estos dos sistemas no hubo diferencias entre las muestras, aunque se redujo la señal colorimétrica de fondo en comparación con el ensayo anterior (Figura 13A-B). Para el resto de los sistemas, la concentración del cultivo de ZIKV se aumentó a 1.2×10^4 PFU/mL, esperando una diferencia con la muestra negativa. Sin embargo, con ninguno de los sistemas se observó diferencias entre las muestras positivas y negativa (Figura 13C-E).



Figura 13. Evaluación de sistemas en sándwich con la metodología de mezcla de muestra con los anticuerpos de detección. A) Sistema 1, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de detección. B) Sistema 2, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. C) Sistema 4, mAb anti-flavivirus 4G2 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. D) Sistema 5, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-flavivirus 4G2 de detección. E) Sistema 6, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-flavivirus 4G2 de detección.

La falta de reconocimiento de partículas virales o pE recombinante podría deberse a la incubación previa de las muestras con los anticuerpos de detección. Ya que los anticuerpos al unirse a la superficie de la partícula viral o a la proteína podrían bloquear la unión de otro anticuerpo por impedimento estérico, en especial si reconocen epítopos cercanos. Esto podría explicar los resultados obtenidos con los sistemas 1 y 2, que están formados por anticuerpos que reconocen epítopos posiblemente de la misma región, mientras que en los otros sistemas se utilizan anticuerpos que reconocen epítopos de diferentes dominios. Asimismo, el anticuerpo

secundario también contribuye al impedimento estérico, ocupando el espacio alrededor de los anticuerpos primarios unidos al antígeno.

En el caso del sistema 4 se observó que la señal de fondo fue mínima, con valores de absorbancia $(\lambda = 450 \text{ nm})$ menores a 0.1 (Figura 13C), lo cual a simple vista representa una coloración despreciable. Con los sistemas 5 y 6, al ser sistemas en los cuales solo cambia el anticuerpo de captura, se observó un comportamiento similar entre ellos (Figura 13D-E). Aunque se observa una tendencia de mayor absorbancia en las muestras positivas (ZIKV y pE ZIKV) que en la muestra negativa (BSA), las diferencias de absorbancias no son suficientes para distinguir un resultado positivo de uno negativo. Además, no se observó reconocimiento de los controles positivos en estos sistemas. Estos resultados pueden atribuirse a que en estos sistemas se utilizó el anticuerpo anti-flavivirus 4G2 para captura (sistema 4) y detección (sistemas 5 y 6). Este anticuerpo reconoce un epítopo conformacional del loop de fusión, que se encuentra en el dominio DII. En la estructura monomérica de la proteína E, el loop de fusión está accesible, sin embrago, en la partícula viral madura la proteína E se encuentra en dímeros y en este acomodo el loop de fusión se encuentra debajo los dominios DI y DIII, por lo que es inaccesible (Dai et al., 2016). Por este motivo no se observó reconocimiento de la muestra de cultivo de ZIKV con los sistemas 4, 5 y 6. Sin embargo, se ha reportado el uso del mAb anti-flavivirus 4G2 en ELISA como anticuerpo de captura para la detección de ZIKV (Pawley et al., 2019) y partículas virales de Dengue (Durham et al., 2019). En estos casos se utilizó una mayor cantidad de anticuerpo, 100 ng y 300 ng por pozo respectivamente, además que el tiempo de incubación con las muestras fue de al menos 2 horas. Mientras que en este ensayo se utilizaron 25 ng de mAb anti-flavivirus como captura y la incubación con las muestras fue de 1 hora, por lo que es posible que estas condiciones no sean las apropiadas para la interacción del anticuerpo con el antígeno.

8.4.3 Interacción simultánea de muestras y anticuerpos

Al igual que en los ensayos anteriores, las muestras utilizadas fueron cultivo de ZIKV, pE de ZIKV y BSA. Con los sistemas 1, 2 y 3 se utilizó una concentración de cultivo viral de 1.6 x 10⁴ PFU/mL, mientras que para los sistemas 4, 5 y 6 fue de 1.2 x 10⁴ PFU/mL. Con esta metodología se buscó evitar que hubiera un impedimento estérico entre los anticuerpos, como posiblemente ocurrió con la metodología anterior. En general, se obtuvieron resultados similares a los anteriores, con cada uno de los sistemas no se observó diferencia entre las muestras (Figura

14). Solo el sistema 4 mostró una diferencia estadística entre la muestra de cultivo de ZIKV y BSA (p<0.05) (Figura 14D), sin embargo, por los valores de absorbancia no puede considerarse un verdadero reconocimiento de ZIKV pues, como se mencionó antes, se requiere que sea el doble que la absorbancia dada por la muestra negativa. Con esta metodología también se observó una reducción significativa de la señal de fondo en los sistemas 1, 2, 3 y 4, con absorbancias (λ = 450 nm) menores a 0.1 (Figura 14A-D). Mientras que con los sistemas 5 y 6, se observó un comportamiento similar al anterior, con alta señal de fondo y sin detección del control positivo (Figura 14E-F).



Figura 14. Evaluación de sistemas en sándwich mediante la interacción simultánea de la muestra y los anticuerpos de detección con los mAbs de captura. A) Sistema 1, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de detección. B) Sistema 2, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. C) Sistema 3, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 como elemento de captura y detección. D) Sistema 4, mAb anti-flavivirus 4G2 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. E) Sistema 5, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. E) Sistema 5, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de detección. E) Sistema 5, mAb anti-ZIKV_E 10-2714 de captura y mAb anti-flavivirus 4G2 de detección. F) Sistema 6, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura y mAb anti-flavivirus 4G2 de detección.

Con el sistema 3 se esperaba que no hubiera reconocimiento de la proteína E de ZIKV, ya que este sistema utiliza el mismo anticuerpo como elemento de captura y detección, por lo que se compite por el mimo epítopo. Con los sistemas 1 y 2, la falta de reconocimiento de pE puede deberse a impedimentos estéricos que es factible que ocurran en la forma monomérica de la proteína. Sin embargo, con estos tres sistemas se esperaría reconocimiento de la partícula viral en la muestra de cultivo, ya que cada virus posee múltiples copias de pE lo que representa múltiples sitios de unión. Es difícil comparar el título viral de la muestra de cultivo de con otros ensayos por las unidades utilizadas, ya que en la mayoría de los estudios se reportan unidades de copias de RNA por mililitro.

En el caso de los sistemas 4, 5 y 6, que utilizan el mAb anti-flavivirus 4G2, las posibles causas de la falta de reconocimiento de las muestras de ZIKV o pE de ZIKV se comentaron anteriormente. Puede deberse a que el loop de fusión no está disponible o que las condiciones a las que se emplea el anticuerpo no son las adecuadas. Además, se ha reportado que este anticuerpo presenta diferente afinidad entre especies de flavivirus y cambios puntuales en ciertos aminoácidos afecta la unión del anticuerpo con el epítopo. Asimismo, se ha reportado que este anticuerpo tiene baja afinidad hacia viriones (Bohning et al., 2021; Crill y Chang, 2004; Stiasny et al., 2006).

8.4.4 Sistemas en sándwich sin anticuerpo secundario

Debido a los problemas que generó el utilizar un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón en los sistemas anteriores y por la disponibilidad del anticuerpo anti-flavivirus conjugado con HRP (NBP2-52709H, Novus Biologicals) se diseñaron y probaron los sistemas 7 y 8 (Figura 2). Con estos sistemas se aumentó la concentración del anticuerpo de detección y se incubó a 4 °C toda la noche para mejorar la interacción del mAb anti-flavivirus 4G2 con la muestra. Además, se utilizó la proteína ZE en lugar de la proteína E comercial o cultivo viral como muestra positiva.

En ambos sistemas se observó un comportamiento similar, teniendo ligeramente una mayor absorbancia con la muestra positiva (pZE) en comparación con la muestra negativa (BSA) (Figura 15). Al hacer el análisis estadístico, tanto en el sistema 7 como en el sistema 8, se obtuvo una diferencia entre las muestras de pZE y BSA (p < 0.05). Sin embargo, al igual que en los ensayos anteriores, para considerar un resultado verdaderamente positivo la absorbancia de la muestra de pZE debió ser la menos el doble que la muestra de BSA. Además, que las

absorbancias obtenidas con la muestra negativa fueron relativamente altas, en especial en el sistema 8 (Figura 15B), lo cual indica una baja especificidad del mAb anti-flavivirus 4G2. A pesar de que las condiciones de incubación con el anticuerpo de detección fueron favorables, lo cual se ve reflejado en el control positivo, la señal obtenida en el sistema en sándwich podría deberse a una baja cantidad de pZE capturada o que la orientación de pZE no favorece la unión del mAb anti-flavivirus. Sin embargo, con los resultados observados en todos los ELISA y la información acerca de la especificidad y afinidad del mAb anti-flavivirus 4G2 se puede decir que no es el mejor candidato para el desarrollo de pruebas de detección.



Figura 15. Evaluación de sistemas en sándwich utilizando el mAb anti-flavivirus 4G2 conjugado con HRP como elemento de detección. A) Sistema 7, mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 de captura. B) Sistema 8, mAb anti-ZIKV_E ZV-54 de captura.

8.4.5 Sistemas en sándwich en membrana de nitrocelulosa

Con los resultados obtenidos de los sistemas en sándwich en ELISA y las características de los anticuerpos, se propusieron dos diseños utilizando nanopartículas de oro conjugadas a anticuerpos monoclonales anti-ZIKV_E (Figura 4), eliminando de esta forma el uso de un anticuerpo secundario.

Al evaluar el primer sistema (Figura 4A), las muestras migraron primero para ser retenidas por el anticuerpo de captura y posteriormente migraron los conjugados de anti-ZIKV_E 10-2714 con AuNPs. Como resultado sólo se observó la señal colorimétrica en el punto de control positivo de todas las tiras. Inicialmente se utilizaron 75 ng de anticuerpo de captura anti-

ZIKV_E MBS5304716 y con ambas concentraciones de cultivo viral se obtuvo el mismo resultado (Figura 16A-B). Pensado en que el anticuerpo de captura no fue suficiente, se duplicó la cantidad de anticuerpo, sin embargo, tampoco no se observó señal colorimétrica en el punto de prueba (Figura 16C-D). Por lo tanto, la falta de reconocimiento podría atribuirse a una baja cantidad de partículas virales en la muestra. Las concentraciones de cultivo de ZIKV utilizadas, 4.8×10^4 PFU/mL y 2.4 x 10³ PFU/mL, pueden considerarse bajas, ya que en otro ensayo en el cual desarrollan un LFA para la detección de ZIKV utilizando anticuerpos conjugados a AuNPs reportan la detección de ZIKV en una muestra de sobrenadante de cultivo a 6.3 x 10⁶ PFU/mL (Li et al., 2021), mientras que en otro ensayo utilizaron una concentración de 4.0 x 10⁷ PFU/mL (Suzuki et al., 2019).



Figura 16. Evaluación de sistemas en sándwich sobre membrana de nitrocelulosa. A-D) Sistema con anti-ZIKV_E MBS5304716 para captura y conjugados de anti-ZIKV_E 10-2714 con AuNPs para detección. A) 75 ng mAb de captura, muestra cultivo de ZIKV a 4.8 x 10⁴ PFU/mL. B) 75 ng mAb de captura, muestra ZIKV a 2.4 x 10³ PFU/mL. C) 150 ng mAb de captura, muestra ZIKV a 4.8 x 10⁴ PFU/mL. D) 150 ng anticuerpo de captura, muestra ZIKV a 2.4 x 10³ PFU/mL. E-F) Sistema con mAb anti-flavivirus 4G2 para captura y conjugados de mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 con AuNPs para detección, con muestra de pZE a 100 µg/mL (E) o BSA (F). C+: punto de control con pAb anti-IgG de ratón. T: punto de prueba con mAb de captura.

Para el segundo sistema se utilizó el anticuerpo anti-flavivirus 4G2 como elemento de captura y el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 conjugado a AuNPs para la detección. Como muestra positiva se utilizó la proteína ZE y como muestra negativa BSA. En este caso, las muestras se mezclaron con los anticuerpos conjugados a las AuNPs y después migraron por la membrana. Con este sistema tampoco se observó señal colorimétrica en el punto de prueba, sólo se

observaron los puntos de control (Figura 16E-F). Este sistema es similar al sistema 7 evaluado en ELISA, en este caso se utilizó el mAb anti-flavivirus 4G2 para captura. En la membrana se inmovilizaron 450 ng de anticuerpo de captura, una cantidad mayor a la reportada en ELISA para este anticuerpo (Durham et al., 2019; Pawley et al., 2019). Asimismo, la muestra contenía un exceso de pZE (50 μ g/mL) para asegurar la disponibilidad del antígeno. Esta concentración es cercana al máximo reportado en un ensayo para la detección de pE de ZIKV en LFA, en el cual utilizaron concentraciones de 7 μ g/mL hasta 33 μ g/mL (Li et al., 2021). Por lo tanto, la falta de reconocimiento en el punto de prueba puede deberse principalmente a las características del anticuerpo de captura, como se mencionó anteriormente, el mAb anti-flavivirus 4G2 requiere tiempos prolongados de exposición a la muestra para una mejor interacción, posiblemente debido a la baja afinidad que presenta este anticuerpo a su antígeno (Stiasny et al., 2006). En un ensayo de inmunocromatografía, la interacción del anticuerpo y el antígeno se da por algunos minutos, por lo que las características del mAb anti-flavivirus 4G2 no lo hace apto para este tipo de ensayos.

8.5 Evaluación de sistemas sencillos en membrana de nitrocelulosa

8.5.1 Sistemas con anticuerpos conjugados a AuNPs

En estos ensayos se utilizaron los mismos anticuerpos anti-ZIKV_E, 10-2714 y MBS5304716, conjugados con AuNPs. En estos sistemas se eliminó el uso de un anticuerpo de captura y se inmovilizó la muestra colocándola directamente en la membrana de nitrocelulosa. Como muestras se utilizaron sueros negativos y positivos a ZIKV, así como las proteínas ZE y E recombinantes como muestras control.

Utilizando el mAb anti-ZIKV_E 10-2714 conjugado a AuNPs, en todas las tiras se observó el punto de control (Figura 17). Respecto a las muestras, en la tira con pE de ZIKV se observó el punto de prueba de color rojizo indicando la detección de la proteína (Figura 17A), mientras que en la tira con suero negativo no se observó color en el punto de prueba (Figura 17B). Sin embargo, en las tiras con suero positivo a ZIKV no se observó señal colorimétrica en los puntos de prueba (Figura 17C-D). Es posible que 1 μ L de muestra no sea suficiente para tener una buena cantidad de antígeno, además que se desconoce el título viral de las muestras. En un ensayo de Dot Blot se reportó el uso de 10 μ L de muestra de suero inmovilizado en membrana

de nitrocelulosa para la detección de pNS1 de DENV (Falconar y Romero-Vivas, 2013). En otro utilizan 3 μ L de muestra de virus purificado o partículas tipo virus (VLPs) a una concentración de 0.2 μ g/mL de pE (Boigard et al., 2017). Incluso se ha recurrido a la concentración de muestras de suero positivo a ZIKV para su uso en inmunocromatografía (Bosch et al., 2017).

Respecto al mAb anti-ZIKV_E MBS304716 conjugado a AuNPs, se obtuvieron resultados similares. En las tiras se observó el punto de control y en la tira con pZE se observa el punto de prueba (Figura 17E). En la tira con suero negativo no se observó color en el punto de prueba como era esperado (Figura 17F), pero tampoco se observó señal colorimétrica en los puntos de prueba de las tiras con suero positivo a ZIKV (Figura 17G-H). Como ya se mencionó el volumen de muestra es pequeño y se desconoce el título viral de los sueros, por lo que no se puede asegurar que se tenga una cantidad de antígeno detectable. Además, el uso de AuNPs requiere que una alta cantidad de pruebas que utilizan AuNPs. Es por ello que se han buscado estrategias para mejorar la señal y por lo tanto aumentar los límites de detección, una de las principales estrategias es la excitación láser de nanomateriales plasmónicos como las AuNPs (Khlebtsov y Khlebtsov, 2020; Sánchez-Purrà et al., 2017; Ye et al., 2020). Otra estrategia es el uso de enzimas para amplificar la señal, ya sea en conjunto con nanopartículas o sustituyéndolas (Calabria et al., 2021).



Figura 17. Detección de ZIKV en muestras de suero con anticuerpos conjugados con AuNPs. A-D) Detección con mAb anti-ZIKV_E 10-2714 conjugado con AuNPs en muestras de pE de ZIKV a 75 µg/mL (A), suero negativo a ZIKV (B), sueros positivos a ZIKV (C-D). E-H) Detección con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 conjugado con AuNPs en muestras de pZE a 75 µg/mL (E), suero negativo a ZIKV (F), sueros positivos a ZIKV (G-H).

8.5.2 Sistemas con anticuerpos secundarios conjugados con HRP

Por los resultados obtenidos con los anticuerpos conjugados a AuNPs y la baja sensibilidad que se obtiene con las nanopartículas, se optó por utilizar un anticuerpo secundario conjugado a HRP para generar la señal colorimétrica. Al igual que en los ensayos anteriores, como muestra se emplearon sueros negativos y positivos a ZIKV, colocando 1 µL de los sueros en la membrana de nitrocelulosa. Para la detección se utilizaron los mAbs anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS304716 junto con el anticuerpo secundario. Como control positivo se utilizaron las proteínas E recombinantes; para el mAb 10-2714 se utilizó pE de ZIKV comercial y para el mAb MBS5304716 se utilizó pZE. Con ambos anticuerpos se observó reconocimiento de las muestras de suero positivas a ZIKV y no se observó señal colorimétrica de los sueros negativos (Figura 18).



Figura 18. Detección de ZIKV en muestras de suero sobre membrana de nitrocelulosa utilizando un anticuerpo secundario conjugado con HRP. A-C) Detección con mAb anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald). B-D) Detección con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource). C+: control positivo de 75 ng pE de ZIKV o pZE. Z: sueros positivos a ZIKV. N: suero negativo a ZIKV.

Claramente se observó un aumento de la sensibilidad del ensayo al utilizar el anticuerpo conjugado con HRP en lugar de las AuNPs. Este resultado concuerda con lo reportado en el desarrollo de un LFA para la detección de pNS1 de DENV, en este LFA utilizan nanopartículas magnéticas para obtener una señal colorimétrica, pero recurren a un paso adicional para amplificar la señal con HRP en caso de muestras con una baja concentración de antígeno (Tran et al., 2019). Hagström y colaboradores compararon la detección de norovirus en LFA empleando anticuerpos conjugados con AuNPs contra anticuerpos conjugados con HRP, reportando un menor límite de detección con los conjugados con enzimas (Hagström et al.,

2015). El uso de conjugados con enzimas en LFA permite una amplificación de la señal y en consecuencia un aumento de la sensibilidad. Específicamente utilizando la enzima HRP se han reportado mejoras de 5 hasta 100 veces en el límite de detección. Otra ventaja que ofrece el uso de HRP es su capacidad de reaccionar con diferentes sustratos que generan productos colorimétricos (Calabria et al., 2021).

Estos resultados muestran que estos sistemas sencillos pueden proponerse para ser utilizados para la detección de ZIKV. Sin embargo, pensando en que debe ser incorporado al dispositivo de microfluídica, se ideó otra forma de inmovilizar la muestra en la membrana de nitrocelulosa. Para este nuevo modelo se dejó un área de la membrana sin bloquear, para que al migrar la muestra a través de la membrana ésta fuera retenida en ese sitio. Para esta prueba de concepto se utilizaron las proteínas recombinantes pZE y pE de ZIKV comercial como muestras. Al realizar el ensayo, se observó que las proteínas solo se retuvieron en los sitios sin bloquear, sin mostrar manchas inespecíficas en el resto de la membrana (Figura 19), especialmente con el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 se observó la membrana limpia (Figura 19B). Con esta prueba se determinó que era posible retener la muestra en un sitio específico de la membrana al hacerla migrar a través de ella. Por lo que se obtuvo un diseño de inmunoensayo que puede ser adaptado a los requerimientos del dispositivo de microfluídica.



Figura 19. Prueba de concepto de retención de proteínas por flujo a través de membrana de nitrocelulosa. A) Detección con mAb anti-ZIKV_E 10-2714 (Fitzgerald). B) Detección con mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource). C+: control positivo de 75 ng pE de ZIKV o pZE. T: zona sin bloquear para la retención de la muestra.

8.6 Evaluación del prototipo y estandarización del ensayo

8.6.1 Evaluación de condiciones iniciales

De acuerdo con los resultados de la prueba de concepto, se diseñó el prototipo de la prueba y se estableció el procedimiento general del ensayo, tomando en cuenta los requerimientos del cartucho de microfluídica. Para ello se simplificó el procedimiento del ensayo reduciendo el número de pasos. Asimismo, se decidió utilizar el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 (My Biosource) como anticuerpo primario para la detección y la proteína ZE como control por sus características, su alta afinidad con el anticuerpo y la disponibilidad por ser producida en casa.

El cambio principal en el procedimiento fue eliminar uno de los pasos de incubación con anticuerpos. En lugar de incubar los anticuerpos primario y secundario por separado, se decidió hacer una mezcla del anticuerpo de detección anti-ZIKV_E MBS5304716 con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP, similar a las pruebas de sistemas sándwich en ELISA. En dichos ensayos se observó que la formación de estos complejos de anticuerpos no afectó la capacidad del anticuerpo primario de detectar al antígeno. Por lo tanto, para favorecer la interacción de ambos anticuerpos se hizo la mezcla en un volumen reducido (10 μ L) y se utilizaron altas concentraciones de los anticuerpos, el primario a 1 mg/mL y el secundario a 0.1 mg/mL. Asimismo, para tener membranas con la línea de control y línea de detección uniformes, se utilizó un equipo para dispensar la proteína en la línea control y bloquear la membrana dejando una línea sin bloquear.

Para evaluar la impresión del prototipo y la interacción de los anticuerpos, se hizo un ensayo diluyendo la mezcla de anticuerpos 1:100 en PBS 1X, para una concentración final de 1 μ g/mL del mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 y 0.1 μ g/mL del pAb anti-IgG de ratón conjugado con HRP, dado que estas concentraciones fueron empleadas en los ensayos anteriores. Como muestras se utilizó suero negativo a ZIKV y suero negativo enriquecido con 750 ng de pZE. En la Figura 20 se observa que usar el equipo de impresión permite obtener una línea control y el sitio de detección uniforme. Se probó que el suero fluye adecuadamente a través de la membrana y se retiene en el sitio de detección. Además, se confirmó que es posible eliminar un paso de incubación haciendo la mezcla de anticuerpos de detección.



Figura 20. Evaluación del prototipo de inmunoensayo. A) muestra negativa de suero negativo a ZIKV. B) muestra positiva de suero enriquecido con pZE. C+: línea control. T: línea de detección.

8.6.2 Estandarización de concentraciones, tiempos de incubación y revelado

Una vez que se estableció el procedimiento general, se buscó reducir el tiempo total del ensayo y posteriormente su estandarización. Se inició con la determinación de la dilución final de anticuerpos de detección, para ello se probaron tres diluciones de la mezcla de anticuerpos, 1:100, 1:500 y 1:1000. Se eligió aquella dilución que permitiera observar las líneas control y prueba, además de presentar bajo ruido de fondo. La dilución 1:500 cumplió con las características deseadas (Figura 21B), por lo que se eligió esta dilución para los ensayos posteriores. La dilución 1:100, aunque también se observaron las líneas control y prueba, el ruido de fondo fue mayor (Figura 21A). Por otro lado, con la dilución 1:1000 no se observó ninguna de las líneas (Figura 21C).

La dilución 1:500 corresponde a una concentración final de 0.2 μ g/mL del anticuerpo anti-ZIKV_E MBS5304716 y de 0.02 μ g/mL del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Por el volumen utilizado para cada tira (250 μ L) durante la incubación con la mezcla de anticuerpos, la cantidad de cada uno de los anticuerpos coincide con la cantidad utilizada en cada pozo de un ELISA, 50 ng y 5 ng respectivamente. Estas cantidades concuerdan con lo utilizado en diversos inmunoensayos como LFA o ELISA, en los cuales se reportó el uso de 50 ng a 150 ng de anticuerpos primarios y 3 ng a 20 ng para anticuerpos conjugados con HRP, ya sea por pozo o por tira de membrana de nitrocelulosa (Axelrod et al., 2020; Hagström et al., 2015; Lai et al., 2019; Pawley et al., 2019; L. Zhang et al., 2018).



Figura 21. Determinación de la dilución de la mezcla de anticuerpos de detección. A) Dilución 1:100. B) Dilución 1:500. C) Dilución 1:1000. C: Línea control. T: Línea de detección. En cada par de tiras se usó una muestra negativa de PBS (izquierda) y una muestra positiva con 250 ng de pZE (derecha).

Posteriormente, se determinó el tiempo de incubación con la mezcla de anticuerpos de detección. Inicialmente la incubación se hizo por 30 minutos, por lo que se probó reducir el tiempo incubando por 5, 10 y 15 minutos. Para determinar el tiempo mínimo de incubación, la señal colorimétrica debió ser lo más cercano a la señal dada por la incubación de 30 minutos. La incubación por 5 minutos dio una señal colorimétrica tenue (Figura 22A), mientras que a los 10 minutos la señal se intensifica, especialmente en la línea de detección (Figura 22B). Sin embargo, a los 15 minutos la señal es más nítida y similar al color obtenido con la incubación por 30 minutos (Figura 22C-D). Por lo tanto, se determinó que 15 minutos era el tiempo óptimo de incubación con los anticuerpos de detección.

Comparando con ensayos de inmunocromatografía utilizando conjugados de anticuerpos con AuNPs, se obtuvo un tiempo similar a lo reportando. En LFA se reportan tiempos de 10 a 15 minutos para la obtención de una señal colorimétrica (Kumar et al., 2018; Li et al., 2021; Suzuki et al., 2019), es decir, el tiempo en que se da la interacción del antígeno con el anticuerpo. Hay quienes reportan tiempos de corrida de 15 minutos hasta 1 hora (Bosch et al., 2017).



Figura 22. Optimización del tiempo de incubación con anticuerpos. Los tiempos de incubación fueron: A) 5 minutos, B) 10 minutos, C) 15 minutos y D) 30 minutos. Se utilizó la dilución 1:500 de la mezcla de anticuerpos y como muestra 250 ng de pZE en PBS 1X. C: línea control. T: línea de detección.

Como último paso de la estandarización se determinó el tiempo de revelado, es decir, el tiempo de incubación con el sustrato TMB. Por la experiencia previa se evaluaron tres tiempos, 1, 2 y 5 minutos. Se buscó que el tiempo de revelado permitiera la visualización de las líneas de control y de detección con el contraste adecuado. Con la incubación por 1 minuto sólo se observó la línea de detección (Figura 23A), mientras que con la incubación por 2 minutos se observaron ambas líneas (Figura 23B). La incubación por 5 minutos también mostró ambas líneas, sin embargo, hubo mayor ruido de fondo ya que la membrana también tomó el color del sustrato (Figura 23C). Por lo tanto, se eligió la incubación con el sustrato por 2 minutos como el tiempo óptimo de revelado. En LFA que emplean anticuerpos conjugados con HRP para obtener una señal colorimétrica, reportan tiempos de incubación con el sustrato de 2 a 5 minutos (Dos Santos et al., 2018; Kawde et al., 2010; Samsonova et al., 2015), tiempos similares a lo obtenido en este ensayo. Aquellos con incubaciones por 5 minutos, disminuyen el ruido de fondo al hacer lavados con buffer que contenga algún surfactante como Tween 20 previo al revelado. Posiblemente en este ensayo se pudo haber mejorado la señal colorimétrica haciendo un lavado similar, sin embargo, las características y especificaciones del cartucho de microfluídica no permitieron el uso de un detergente en los lavados.



Figura 23. Estandarización del tiempo de revelado. Las membranas se incubaron con el sustrato TMB por 1 minuto (A), 2 minutos (B) y 5 minutos (C). C: Línea control. T: Línea de detección

8.7 Caracterización del prototipo de inmunoensayo

8.7.1 Repetibilidad

Se realizaron cuatro ensayos en diferentes días y se compararon los resultados obtenidos. En todos los casos se utilizó una muestra negativa y otra positiva. En cada pareja de tiras se observó una tira con la línea control marcada y otra con dos líneas marcadas, indicando un resultado negativo y otro positivo respectivamente (Figura 24). Es decir, en todos los ensayos se obtuvo el mismo resultado, indicando que el procedimiento es repetible. Además, el uso de un equipo dispensador para obtener las líneas de control y detección, ayudan tener menos variabilidad y homogeneizar los resultados.



Figura 24. Determinación de la repetibilidad del inmunoensayo. En cada par de tiras se usó PBS como muestra negativa (derecha) y 250 ng de pZE como muestra positiva (izquierda). C: Línea control. T: Línea de detección.

8.7.2 Efecto matriz

Al utilizar muestras de suero se observó una disminución en la intensidad de la señal colorimétrica, específicamente en la línea control. Esto se debe a que las diversas proteínas presentes naturalmente en el suero pueden interferir en la interacción de los anticuerpos con su antígeno. Por lo tanto, se probaron diferentes diluciones de suero para disminuir este efecto. Las diluciones de suero se enriquecieron con 250 ng de pZE y se compararon con el control de pZE en PBS 1X (Figura 25). A partir de la dilución 1:1 se observó una mejoría en la señal colorimétrica, pues se comenzaron a distinguir las líneas control (Figura 25C). Pero con las diluciones 1:50 y 1:100, se observaron claramente las líneas de control y de detección (Figura 25G-H), asemejándose al control. Por lo tanto, se determinó que la dilución 1:50 es la adecuada para disminuir el efecto de la matriz y mantener una concentración adecuada del antígeno en la muestra. Diversos inmunoensayos para la detección de ZIKV o DENV reportan la necesidad de diluir las muestras de suero a razón 1:1, 1:3, 1:10 hasta 1:100, ya que al usar suero sin diluir se observó una disminución de la sensibilidad del ensayo en comparación con la detección de proteínas o virus en buffer (Axelrod et al., 2020; Bosch et al., 2017; Falconar y Romero-Vivas, 2013; Mascini et al., 2019; Pawley et al., 2019; Young et al., 2000).



Figura 25. Evaluación del efecto de la matriz en el desempeño del ensayo. A) Control, muestra en PBS 1X. B) Suero sin diluir. C) Suero dilución 1:1. D) Suero dilución 1:4. E) Suero dilución 1:10. F) Suero dilución 1:20. G) Suero dilución 1:50. H) Suero dilución 1:100. C: línea control. T: línea de detección.

8.7.3 Límite de detección

Se determinó el límite de detección (LOD), utilizando suero diluido 1:50 enriquecido con diferentes concentraciones de proteína ZE. Como muestra la Figura 26, a la concentración de 1 μ g/mL se comenzó a observar la señal colorimétrica en la línea de detección, pero fue más clara a partir de 2.5 μ g/mL. Para obtener un límite de detección más objetivo se necesitaría hacer un análisis de imagen. Sin embargo, estas imágenes no fueron tomadas bajo condiciones estandarizadas, lo cual no permite establecer una señal de fondo uniforme en todas las tiras. En el caso de algunos LFA para la detección de pNS1 de DENV y ZIKV, se ha recurrido al escaneo de las tiras para tener imágenes adecuadas para el análisis de las bandas (Axelrod et al., 2020; Kumar et al., 2018; Sánchez-Purrà et al., 2017). De esta forma se podrían transformar los pixeles a valores de intensidad para ser fácilmente analizados. Aun así, este ensayo nos permitió determinar la concentración mínima que pude ser detectada a simple vista.



Figura 26. Determinación del límite de detección de pZE en suero. C: Línea control. T: Línea de detección.

La mayoría de las pruebas de detección de antígenos de ZIKV están dirigidos a la proteína NS1 y utilizan anticuerpos en sistemas sándwich. Estos inmunoensayos que utilizan enzimas o nanopartículas de oro reportan límites de detección de 10 ng/mL hasta 120 ng/mL de pNS1 de ZIKV (Bedin et al., 2017; Bosch et al., 2017; Sánchez-Purrà et al., 2017; L. Zhang et al., 2018). Por otro lado, los ensayos que utilizan anticuerpos o péptidos dirigidos a pE reportan límites de

detección en diferentes unidades, lo que hace difícil compararlos entre ellos. Por ejemplo, un ensayo de inmunofluorescencia en sándwich que emplea péptidos para la detección de ZIKV reporta un LOD de 1 x 10^4 TCID₅₀/mL (Kim et al., 2018), mientras que un ensayo ELISA que también emplea péptidos reporta un LOD de 10^6 copias RNA/mL (Mascini et al., 2019).

Comparando el límite de detección de este ensayo con las pruebas de detección de pNS1, el LOD es mayor que lo reportado, de 20 a 250 veces más. Esto puede deberse a que el uso de un anticuerpo de captura permite retener sólo el antígeno de interés, mientras que, en el formato de este ensayo, en el sitio de detección se retienen otras moléculas además de la proteína de interés. Asimismo, al no tener un anticuerpo de captura, la proteína puede quedar atrapada en los poros de la membrana de nitrocelulosa, dificultando la interacción con el anticuerpo de detección. Por otro lado, también podrían mejorarse algunos pasos del procedimiento, específicamente los lavados. En el ensayo los lavados sólo se realizaron con buffer, no se utilizó algún tipo de detergente. La adición de un tensoactivo en la solución de lavado ayudaría a retirar compuestos que pueden causar interferencias o ruido de fondo, permitiendo una mejor visualización del resultado y por lo tanto aumentando la sensibilidad del ensayo.

8.7.4 Desempeño con muestras de suero

Se hizo una prueba para ver el desempeño del prototipo con un panel de 25 muestras de suero de pacientes, 15 positivas a ZIKV, 10 positivas a DENV y 2 positivas a CHIKV. Con esto se tuvo idea de la factibilidad de la aplicación clínica del inmunoensayo. En este ensayo los resultados se leyeron a simple vista como se haría en campo. En la Figura 27A se muestran las tiras con sueros positivos a ZIKV, de las cuales sólo en cuatro se observó señal colorimétrica en la línea de detección. Respecto a las muestras positivas a DENV y CHIKV, no se obtuvieron falsos positivos, reafirmando que el anticuerpo no presenta reactividad cruzada (Figura 27B).

En general, los resultados indicarían una baja sensibilidad del ensayo, pero una alta especificidad. Sin embargo, estos resultados no pueden considerarse como definitivos puesto que el tamaño de muestra no es representativo. De acuerdo con lo reportado para diversas pruebas para la detección de ZIKV o DENV, han utilizado paneles de más de 100 muestras de sueros con los que obtienen los valores de sensibilidad y especificidad (Bosch et al., 2017; Suzuki et al., 2019; Tran et al., 2019). Además, estos resultados pueden verse afectados por la calidad y almacenamiento de las muestras. En caso de muestras de suero se recomienda su
almacenamiento a -80 °C para conservarlas por periodos prolongados (años), o -20 °C para periodos cortos (meses). Asimismo, se recomienda evitar numerosos ciclos de congelamiento y descongelamiento (Cuhadar et al., 2013). En este caso, las muestras fueron conservadas a -20 °C, pero por un periodo prolongado y algunas de las muestras ya habían sido descongeladas un par de veces, por lo que se compromete la estabilidad de las proteínas de interés. Se ha reportado la estabilidad de ciertas moléculas en suero conservado a -20 °C durante 3 meses, después de este tiempo se observó una disminución en la concentración de estos componentes, especialmente el cambio en la concentración de proteínas fue el más significativo (Cuhadar et al., 2013; Pawlik-Sobecka et al., 2020). Asimismo, se desconoce el título viral de las muestras y el momento exacto en que se tomó la muestra. Se han reportado títulos virales en suero alrededor de $3.7 - 30 \times 10^6$ copias RNA/mL (Musso et al., 2017; Pawley et al., 2019), los cuales disminuyen significativamente después de 3 días de presentar síntomas (Peters y Stevenson, 2019). También se ha detectado que la viremia es baja en comparación con otros virus como DENV, lo cual dificulta la detección de ZIKV en suero (Bosch et al., 2017; Musso et al., 2017).



Figura 27. Evaluación del desempeño del prototipo de inmunoensayo con muestras de suero. A) Sueros positivos a ZIKV. Las flechas señalan las muestras que dieron un resultado positivo. B) Sueros positivos a DENV, el número que acompaña la letra indica el serotipo, y sueros positivos a CHIKV (CH). C: Línea control. T: línea de detección.

8.7.5 Estabilidad de proteína impresa

Se compararon dos condiciones para conservar la membrana con proteína ZE impresa. Las membranas impresas se guardaron a la temperatura correspondiente durante 2 semanas y posteriormente se hizo el ensayo de incubación con los anticuerpos de detección. Como control se hizo un ensayo con la membrana recién impresa (Figura 28A), con la cual se compararon cada una de las condiciones. Se observó que a 4 °C se conservó mejor la proteína impresa, ya que las líneas control son similares a las líneas de la membrana control (Figura 28C). En cambio, la membrana conservada a temperatura ambiente mostró deterioro de la señal colorimétrica (Figura 28B).

Se eligieron estas dos temperaturas ya que las pruebas rápidas o tiras reactivas de membrana de nitrocelulosa comerciales recomiendan su almacenamiento a temperatura ambiente o en refrigeración (2 °C – 30 °C). Se busca que sean estables a temperatura ambiente, para poder utilizarlas en campo y que no se requiera una cadena de frío para su transporte. En el desarrollo de LFA hay quienes reportan la conservación de la membrana de nitrocelulosa con los elementos de captura a 4 °C hasta su uso (Kawde et al., 2010; Kumar et al., 2018; Tran et al., 2019) y en otros casos se menciona que la membrana se conservó a temperatura ambiente con desecante (Bosch et al., 2017; Hagström et al., 2015; J. Zhang et al., 2019). Sin embargo, no se reporta cuántos días se conservó a las temperaturas indicadas.



Figura 28. Evaluación de la estabilidad de la proteína impresa en la línea control. A) Membrana control, evaluada el día de la impresión. B) Membrana conservada a temperatura ambiente. C) Membrana conservada a 4 °C.

Lo observado con este prototipo es lo esperado para una prueba de flujo lateral, es preferible almacenarlo en refrigeración para prolongar su estabilidad y viabilidad. Aunque, por los diversos ensayos realizados, se observó que es estable a temperatura ambiente por periodos cortos, aproximadamente 1 semana. Además, es importante considerar las condiciones a las que se encuentra la proteína antes de ser dispensada en la membrana. Por otro lado, el almacenamiento a 4 °C es compatible con las condiciones de almacenamiento del cartucho de microfluídica y las soluciones necesarias para el ensayo.

8.8 Integración al dispositivo de microfluídica

Se continuó con la incorporación del prototipo de membrana de nitrocelulosa a los cartuchos de microfluídica (Flex.flow slide, BiFlow Systems GmbH). Por las características de los cartuchos de microfluídica, se hicieron algunas adaptaciones para poder integrar la membrana de nitrocelulosa y poder realizar el ensayo de forma adecuada. Posteriormente, se configuró el software para adaptar el procedimiento del ensayo.

8.8.1 Validación de adaptaciones al hardware

En la metodología se describen las adaptaciones y elementos que se agregaron al cartucho de microfluídica para poder integrar la membrana de nitrocelulosa. Para determinar que los elementos se colocaron adecuadamente, se utilizó colorante para visualizar el flujo del líquido y poder detectar fugas o bloqueos (Figura 29). Durante la prueba se observó cómo el líquido fluía desde cada reservorio hasta el canal de reacción. La membrana de nitrocelulosa no bloqueó el flujo del líquido y permitió que éste continuara hasta el reservorio de desechos (Figura 29B). Con esto se comprobó que el aumento del volumen del canal de reacción mediante la adición de una laminilla perforada se realizó de forma exitosa.



Figura 29. Evaluación del flujo de líquido a través del canal de reacción con las adaptaciones para incorporar la membrana de nitrocelulosa. A) Cartucho de microfluídica con membrana de nitrocelulosa adaptada al canal de reacción y reservorios cargados con colorante. B) Cartucho de microfluídica después del flujo de colorante, se observa el líquido en el canal de reacción y en el reservorio de desechos.

8.8.2 Integración de reactivos en el cartucho y configuración de las condiciones de corrida en el software

Cada cartucho de microfluídica cuenta con seis reservorios, cuatro con volumen de 25 μ L y dos con volumen de 45 μ L (Figura 30). Inicialmente, estos reservorios se llenaron con los reactivos y soluciones necesarios para el ensayo como se muestra en la tabla 1. Dado que los volúmenes son menores a los usados en los ensayos anteriores, la mezcla de anticuerpos de detección se diluyó 1:40 para conservar la misma cantidad de anticuerpos considerando un volumen útil de 20 μ L. Por lo tanto, las concentraciones finales de cada anticuerpo fueron anti-ZIKV_E MBS5304716 a 2.5 μ g/mL y anti-IgG de ratón conjugado con HRP a 0.25 μ g/mL. Como muestra se utilizó suero negativo a ZIKV enriquecido con 1 μ g de proteína ZE y diluido 1:1 con PBS 1X (0.01M pH 7.4).

Tabla 1. Distribución inicial de reactivos en los reservorios del cartucho de microfluídica.

RESERVORIO	VOLUMEN	REACTIVO/SOLUCIÓN
1	25 µL	PBS-BSA al 1%
2	25 µL	Mezcla de anticuerpos
3	45 µL	Muestra
4	45 µL	PBS 1X
5	25 μL	Sustrato TMB
6	25 µL	H ₂ O



Figura 30. Cartucho de microfluídica con reservorios numerados. Reservorios 3 y 4 poseen un volumen de 45 μ L. El volumen del resto de los reservorios es de 25 μ L. Imagen tomada de la interfaz del software Bi.Flow Pumpcontrol (Bi.Flow Systems GmbH).

Para vaciar los reservorios se deben activar las bombas del cartucho de microfluídica mediante el software Bi.Flow Pumpcontrol (versión 2.4, Bi.Flow Systems GmbH). Cada bomba corresponde a un reservorio y el orden de activación de las bombas concuerda con el procedimiento del ensayo. En este ensayo inicial se utilizó una velocidad de flujo constante de $0.2 \ \mu$ L/s, ya que el manual de usuario indica que es una velocidad baja recomendada. Además, se esperaba que una velocidad baja permitiera la interacción adecuada de todos los elementos del ensayo. Como se observa en la Figura 31 primero se activó la bomba 3 para el flujo de la muestra, después se activó la bomba 1 para el lavado con PBS-BSA al 1%. A continuación, se activó la bomba 2 para el flujo de los anticuerpos. Posteriormente, se hizo el lavado con PBS activando la bomba 4. En seguida, se activó la bomba 5 para revelar con el sustrato TMB y finalmente se hizo un lavado con H₂O activando la bomba 6.

Name	Max.	Status	Validated	0	1	2	3	4	5	6
Interval [s]				190	90	90	190	90	90	
Pump1	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl		0.2					
Pump2	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl			0.2				
Pump3	40.0 µl	40.00 µl	2.0 µl	0.2						
Pump4	40.0 µl	40.00 µl	2.0 µl				0.2			
Pump5	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl					0.2		
Pump6	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl						0.2	

Figura 31. Primera configuración para la activación de las bombas del cartucho de microfluídica. En la fila superior se enumeran los intervalos, indicando el orden de activación (del 0 en adelante). La siguiente fila indica la duración del intervalo en segundos. Las filas posteriores indican la velocidad de bombeo en $\mu L/s$.

Como resultado de este ensayo no se observó alguna señal colorimétrica en la membrana de nitrocelulosa, ni en la línea control ni en la línea de detección (Figura 32). Comparando con los ensayos anteriores, notamos una reducción significativa en los tiempos de incubación. Los tiempos observados en la tabla del software (Figura 31), fueron establecidos de acuerdo con la velocidad y el volumen del reservorio, pues es el tiempo necesario para vaciar el reservorio.



Figura 32. Primer ensayo incorporando la membrana de nitrocelulosa al cartucho de microfluídica. C+: Línea de control positivo. T: Línea de detección.

Por lo tanto, la nueva configuración se basó en los tiempos de incubación y a partir de éstos se establecieron las velocidades de flujo. Además, por las características del software, se agregaron nuevos intervalos para permitir la incubación con los anticuerpos y con el sustrato de revelado (Figura 33). La distribución de las soluciones en los reservorios se mantuvo igual que antes (Tabla 1). Con estos cambios, al correr el ensayo en el cartucho de microfluídica se observó desarrollo de color en la línea de detección, pero no se distinguió la línea control, pues se acumuló el sustrato al final del canal de reacción (Figura 34). Esto debido a que el volumen de 20 μ L no fue suficiente para cubrir por completo la membrana de nitrocelulosa, por lo que el último lavado con agua sólo desplazó el sustrato TMB, ocupando aproximadamente la mitad del volumen del canal de reacción. Entonces, considerando que el volumen de anticuerpos y sustrato también fue de 20 μ L, podemos explicar que al incubar con ambas soluciones no se dio la interacción con la línea control, ya que el volumen no cubrió esa área.

Name	Max.	Status	Validated	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Interval [s]				60	60	90	600	90	90	120	60	
Pump1	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl		0.3							
Pump2	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl			0.2						
Pump3	40.0 µl	40.00 µl	4.0 µl	0.6								
Pump4	40.0 µl	40.00 µl	4.0 µl					0.4				
Pump5	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl						0.2			
Pump6	20.0 µl	20.00 µl	2.0 µl								0.3	

Figura 33. Configuración del software para la activación de las bombas del cartucho de microfluídica, incluyendo los tiempos de incubación.



Figura 34. Ensayo de detección de proteína ZE en membrana de nitrocelulosa en cartucho de microfluídica ajustando los tiempos de incubación y utilizando la distribución inicial de los reservorios. C+: Línea de control positivo. T: Línea de detección.

En consecuencia, se modificó la distribución de las soluciones en los reservorios del cartucho (Tabla 2), para asegurar que la membrana se cubriera por completo con la mezcla de anticuerpos y el sustrato TMB. Debido a este cambio, se ajustaron las concentraciones de los anticuerpos en la mezcla, quedando el anti-ZIKV_E MBS5304716 a 1.25 μ g/mL y el anti-IgG de ratón con HRP a 0.125 μ g/mL. Asimismo, se modificó la configuración del software adecuado al nuevo orden de los reservorios (Figura 35).

RESERVORIO	VOLUMEN	REACTIVO/SOLUCIÓN
1	25 µL	PBS-BSA al 1%
2	25 µL	Muestra
3	45 µL	Mezcla de anticuerpos
4	45 µL	Sustrato TMB
5	25 µL	PBS 1X
6	25 µL	H ₂ O

Tabla 2. Distribución final de reactivos y soluciones en los reservorios del cartucho de microfluídica.

Name	Max.	Status	Validated	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Interval [s]				60	60	90	600	90	90	120	60	
Pump1	20.0 µl	20.00 µl	0.2 µl		0.33							
Pump2	20.0 µl	20.00 µl	0.2 µl	0.33								
Pump3	40.0 µl	40.00 µl	1.3 µl			0.43						
Pump4	40.0 µl	40.00 µl	1.3 µl						0.43			
Pump5	20.0 µl	20.00 µl	0.2 µl					0.22				
Pump6	20.0 µl	20.00 µl	0.2 µl								0.33	

Figura 35. Configuración de la activación de las bombas considerando el reacomodo de los reactivos en los reservorios.

El manual de usuario recomienda que el primer reservorio en vaciarse sea de mayor volumen para asegurar el llenado de los canales del cartucho. Sin embargo, el cambio a un reservorio de menor volumen no afectó al ensayo, ya que sólo requiere que la muestra entre en contacto con la base de la membrana de nitrocelulosa para fluir a través de ella.

Con estos cambios finales se logró realizar el ensayo de detección utilizando el sistema de microfluídica. Considerando los tiempos de flujo y de incubación, el tiempo total del ensayo en el sistema de microfluídica fue de 19 minutos y 30 segundos. Un tiempo un poco mayor al estándar de 10 a 15 minutos reportado para LFA con conjugados a AuNPs (Bosch et al., 2017; Kumar et al., 2018; Suzuki et al., 2019), pero dentro de los tiempos reportados en LFA que utilizan enzimas de 8 a 90 minutos (Bedin et al., 2017; Tran et al., 2019; J. Zhang et al., 2019). Además, es un tiempo total del ensayo considerablemente bajo en comparación con un ELISA que toma de 2 a 3 horas.

Al concluir el ensayo, se observaron las líneas de detección y de control en la membrana de nitrocelulosa (Figura 36). Sin embargo, se pierde un poco la señal de la línea control por el ruido de fondo, debido a que el volumen del lavado final no es suficiente para desplazar por completo la solución de revelado, por lo que se acumula al final del canal de reacción. Para solucionar este problema se tendrían que realizar cambios al cartucho de microfluídica.



Figura 36. Detección de proteína ZE en membrana de nitrocelulosa incorporada al sistema de microfluídica. C+: Línea de control positivo. T: Línea de detección.

9. Conclusiones

De los tres anticuerpos comerciales contra ZIKV que fueron validados, dos cumplieron con las características deseadas para ser considerados en el diseño del inmunoensayo. Dichas características fueron el reconocimiento de la proteína E recombinante y del virus en muestras de suero y en el sobrenadante de células infectadas, así como no presentar reactividad cruzada con las proteínas E de DENV y CHIKV.

Los dos anticuerpos seleccionados para el diseño del inmunoensayo fueron los mAbs anti-ZIKV_E 10-2714 y MBS5304716. Con estos dos anticuerpos se propusieron y evaluaron distintos sistemas en sándwich y sistemas sencillos para la detección de ZIKV. Con los anticuerpos disponibles no fue posible establecer un sistema en sándwich que reconociera a ZIKV o a la proteína E. Por lo que se optó por utilizar un sistema sencillo, utilizando sólo un anticuerpo para la detección. El sistema se montó sobre membrana de nitrocelulosa, en la cual se inmovilizó la muestra para la detección de ZIKV. Asimismo, se decidió utilizar un anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP para obtener una señal colorimétrica que pudiera ser leída a simple vista. El sistema sencillo formado por un anticuerpo anti-ZIKV_E y un anticuerpo secundario permitió la detección de la proteína E en buffer y en suero.

Para desarrollar el prototipo de inmunoensayo se seleccionó el mAb anti-ZIKV_E MBS5304716 y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP, además de la proteína ZE como el control positivo para los ensayos. El prototipo del inmunoensayo se hizo en formato de tira reactiva y se compuso por una membrana de nitrocelulosa específica para ensayos de flujo lateral, en la cual se dispensó la proteína ZE para formar la línea de control y para la línea de detección se dejó la zona sin bloquear. El procedimiento del inmunoensayo se estandarizó, de forma breve, en la base de la tira reactiva se colocó la muestra y esta migró por capilaridad para ser retenida en la línea de detección. Después, se hizo un lavado con PBS-BSA al 1% y se agregó la mezcla de anticuerpos de detección, anti-ZIKV_E MBS5304716 a 0.2 μ g/mL y anti-IgG de ratón con HRP a 0.02 μ g/mL. Se incubó por 15 minutos y se lavó con PBS. Finalmente se agregó el sustrato TMB y después de dos minutos se lavó con agua. El tiempo total que toma el ensayo es de aproximadamente 25 minutos, un tiempo aceptable en comparación con las pruebas estándar de RT-PCR y ELISA.

Al caracterizar el prototipo, se mostró que puede emplearse para la detección de pE y ZIKV en muestras de suero, recomendando una dilución de 1:50. Además, no se observó reacción cruzada con muestras de suero positivas a DENV y CHIKV. Asimismo, se obtuvo un límite de detección de pZE en suero de 2.5 µg/mL y se mostró que el ensayo es reproducible. Sin embargo, sería adecuado evaluar el prototipo con un mayor panel de muestras de suero para determinar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo.

Finalmente, se logró adaptar el prototipo de tira reactiva al cartucho de microfluídica y se probó que es posible realizar el ensayo con el sistema de microfluídica en un tiempo de casi 20 minutos. Sin embargo, la visualización del resultado no fue completamente adecuada, por lo que aún puede mejorarse el ensayo de detección en el dispositivo de microfluídica.

En general, se logró obtener un prototipo de inmunoensayo en formato de tira reactiva para la detección de ZIKV utilizando anticuerpos comerciales contra ZIKV, el cual funciona tanto de forma independiente o en un sistema de microfluídica.

10. Perspectivas

Al tratarse de un prototipo, aún es necesario realizar una validación de la prueba, obtener la sensibilidad y especificidad para poder comparar con los métodos estándar o con pruebas rápidas comerciales que sean similares. Asimismo, sólo se probó la detección de proteína E recombinante, por lo que sería adecuado probar la detección de partículas virales. También sería interesante probar el desempeño del inmunoensayo utilizando otro tipo de muestras como orina, saliva o incluso con muestras de mosquitos macerados.

Respecto al ensayo en el dispositivo de microfluídica, se podría fabricar de una forma más adecuada la laminilla adicional necesaria para la integración de la tira reactiva. También es necesario hacer mejoras en el procedimiento general, especialmente en el revelado, para tener una buena visualización del resultado.

Asimismo, aunque se trata de una prueba cualitativa, la lectura del resultado puede ser subjetiva. Por lo que se podría utilizar un software de análisis de imagen para leer el resultado, por lo que se tendría que estandarizar la forma en que se toma la imagen de las tiras y el análisis en el software. Sin embargo, el uso de un software para la obtención del resultado modifica la simplicidad general de la prueba.

Aunque se obtuvo un prototipo funcional, este podría mejorarse. El ensayo se hizo pensando en la adaptación final al cartucho de microfluídica, por lo que se tuvieron ciertas limitaciones en los reactivos que se pudieran utilizar. Considerando que el prototipo se puede utilizar fuera del dispositivo de microfluídica, se podrían hacer mejoras al procedimiento como el uso de Tween 20 en los lavados. Asimismo, se podría incluir un pad absorbente en la tira reactiva, lo cual permitiría utilizar un volumen mayor de muestra y ayudar al flujo de las soluciones y reactivos a través de la membrana.

Por otro lado, el diseño de las líneas de control y detección en la membrana de nitrocelulosa permite su adaptación para la detección de diferentes analitos, simplemente cambiando la proteína en la línea control. Incluso podría tenerse una tira reactiva general al utilizar un anticuerpo anti-IgG en la línea control, dando la oportunidad de desarrollar diversos ensayos.

11. Referencias

- Acharya, D., Bastola, P., Le, L., Paul, A. M., Fernandez, E., Diamond, M. S., Miao, W., & Bai, F. (2016). An ultrasensitive electrogenerated chemiluminescence-based immunoassay for specific detection of Zika virus. *Scientific Reports*, 6(1), 32227. https://doi.org/10.1038/srep32227
- Afsahi, S., Lerner, M. B., Goldstein, J. M., Lee, J., Tang, X., Bagarozzi, D. A., Pan, D., Locascio, L., Walker, A., Barron, F., & Goldsmith, B. R. (2018). Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 85–88. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.051
- Axelrod, T., Eltzov, E., & Marks, R. S. (2020). Capture-Layer Lateral Flow Immunoassay: A New Platform Validated in the Detection and Quantification of Dengue NS1. ACS Omega, 5(18), 10433. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C00367
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, *118*(8), 4448–4482. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719
- Bedin, F., Boulet, L., Voilin, E., Theillet, G., Rubens, A., & Rozand, C. (2017). Paper-based point-of-care testing for cost-effective diagnosis of acute flavivirus infections. *Journal* of Medical Virology, 89(9), 1520–1527. https://doi.org/10.1002/jmv.24806
- Beltrán-Silva, S. L., Chacón-Hernández, S. S., Moreno-Palacios, E., & Pereyra-Molina, J. Á. (2016). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3), 146–153. https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011
- Blitvich, B. J., & Firth, A. E. (2015). Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*, 7(4), 1927–1959. https://doi.org/10.3390/v7041927
- Bohning, K., Sonnberg, S., Chen, H.-L., Zahralban-Steele, M., Powell, T., Hather, G., Patel, H. K., & Dean, H. J. (2021). A high throughput reporter virus particle microneutralization assay for quantitation of Zika virus neutralizing antibodies in multiple species. *PLoS ONE*, *16*(4). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0250516
- Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P., & Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005608
- Bosch, I., Puig, H. De, Hiley, M., Carré-Camps, M., Perdomo-Celis, F., Narváez, C. F., Salgado, D. M., Senthoor, D., Grady, M. O., Phillips, E., Durbin, A., Fandos, D., Miyazaki, H., Yen, C. W., Gélvez-Ramírez, M., Warke, R. V., Ribeiro, L. S., Teixeira, M. M., Almeida, R. P., ... Gehrke, L. (2017). Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and zika virus in patient serum. *Science Translational Medicine*, 9(409), eaan1589. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan1589

- Calabria, D., Calabretta, M. M., Zangheri, M., Marchegiani, E., Trozzi, I., Guardigli, M., Michelini, E., Nardo, F. Di, Anfossi, L., Baggiani, C., & Mirasoli, M. (2021). Recent Advancements in Enzyme-Based Lateral Flow Immunoassays. *Sensors*, 21(10). https://doi.org/10.3390/S21103358
- Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M., & Lanciotti, R. S. (2017). Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, 12(9), e0185340. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185340
- Castillo-León, J., Trebbien, R., Castillo, J. J., & Svendsen, W. E. (2021). Commercially available rapid diagnostic tests for the detection of high priority pathogens: Status and challenges. *Analyst*, *146*(12), 3750–3776. https://doi.org/10.1039/d0an02286a
- Cecchetto, J., Fernandes, F. C. B., Lopes, R., & Bueno, P. R. (2017). The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 949–956. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.097
- Centros de Control y Prevención de Enfermedades, (CDC). (2019). Testing for Zika Virus Infections. CDC Zika Virus. https://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.html
- Crill, W. D., & Chang, G.-J. J. (2004). Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes. *Journal of Virology*, 78(24), 13975. https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13975-13986.2004
- Cuhadar, S., Koseoglu, M., Atay, A., & Dirican, A. (2013). The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochemia Medica*, 23(1), 70–77. https://doi.org/10.11613/BM.2013.009
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q. Q., Musyoki, A. M. M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., Xiao, H., Yan, J., Shi, Y., Qin, C.-F. F., Qi, J., & Gao, G. F. F. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host and Microbe, 19*(5), 696–704. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013
- DiNunno, N. M., Goetschius, D. J., Narayanan, A., Majowicz, S. A., Moustafa, I., Bator, C. M., Hafenstein, S. L., & Jose, J. (2020). Identification of a pocket factor that is critical to Zika virus assembly. *Nature Communications*, 11(1). https://doi.org/10.1038/S41467-020-18747-4
- Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles. (2021). Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa. https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-viruszika-2021
- Dos Santos, G. P., Corrêa, C. C., & Kubota, L. T. (2018). A simple, sensitive and reduced cost paper-based device with low quantity of chemicals for the early diagnosis of Plasmodium falciparum malaria using an enzyme-based colorimetric assay. *Sensors and Actuators, B: Chemical, 255, 2113–2120.* https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.005

- Draz, M. S., Venkataramani, M., Lakshminarayanan, H., Saygili, E., Moazeni, M., Vasan, A., Li, Y., Sun, X., Hua, S., Yu, X. G., & Shafiee, H. (2018). Nanoparticle-enhanced electrical detection of Zika virus on paper microchips. *Nanoscale*, 10(25), 11841–11849. https://doi.org/10.1039/C8NR01646A
- Durham, N., Agrawal, A., Waltari, E., Croote, D., Zanini, F., Davidson, E., Fouch, M., Smith, O., Carabajal, E., Pak, J., Doranz, B., Robinson, M., Sanz, A., Albornoz, L., Rosso, F., Einav, S., Quake, S., McCutcheon, K., & Goo, L. (2019). Functional characterization and lineage analysis of broadly neutralizing human antibodies against dengue virus identified by single B cell transcriptomics. *bioRxiv*, 790642. https://doi.org/10.1101/790642
- Dussupt, V., Modjarrad, K., & Krebs, S. J. (2021). Landscape of Monoclonal Antibodies Targeting Zika and Dengue: Therapeutic Solutions and Critical Insights for Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 11, 621043. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.621043
- Falconar, A. K. I. K., & Romero-Vivas, C. M. M. E. (2013). A simple, inexpensive, robust and sensitive dot-blot assay for equal detection of the nonstructural-1 glycoprotein of all dengue virus serotypes. *Virology Journal*, 10(1), 126. https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-126
- Freitas, D. A., Souza-Santos, R., A Carvalho, L. M., Barros, W. B., Neves, L. M., Brasil, P., & Wakimoto, M. D. (2020). Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS ONE*, 15(12), e0242367. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367
- Gong, D., Zhang, T. H., Zhao, D., Du, Y., Chapa, T. J., Shi, Y., Wang, L., Contreras, D., Zeng, G., Shi, P. Y., Wu, T. T., Arumugaswami, V., & Sun, R. (2018). High-Throughput Fitness Profiling of Zika Virus E Protein Reveals Different Roles for Glycosylation during Infection of Mammalian and Mosquito Cells. *iScience*, 1, 97–111. https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.02.005
- Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging infectious diseases*, 21(1), 84–86. https://doi.org/10.3201/eid2101.140894
- Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K. W., Hills, S., Kuehnert, M. J., Mead, P., Meaney-Delman, D., Rabe, I., Staples, E., & Petersen, L. R. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. *Journal of Infectious Diseases, 216*(S10), S875–S883. https://doi.org/10.1093/infdis/jix396
- Hagström, A. E. V., Garvey, G., Paterson, A. S., Dhamane, S., Adhikari, M., Estes, M. K., Strych, U., Kourentzi, K., Atmar, R. L., & Willson, R. C. (2015). Sensitive Detection of Norovirus Using Phage Nanoparticle Reporters in Lateral-Flow Assay. *PLoS ONE*, 10(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0126571
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(1), 13–20. https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8

- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology* and Molecular Biology Reviews, 81(1), 1–27. https://doi.org/10.1128/mmbr.00055-16
- Henchal, E. A., Gentry, M. K., McCown, J. M., & Brandt, W. E. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(4), 830– 836. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.830
- Higuera, A., & Ramírez, J. D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Tropica*, 190, 99–111. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010
- Hou, S., Kumar, A., Xu, Z., Airo, A. M., Stryapunina, I., Wong, C. P., Branton, W., Tchesnokov, E., Götte, M., Power, C., & Hobman, T. C. (2017). Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *Journal of Virology*, *91*(16). https://doi.org/10.1128/jvi.00474-17
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). (2021). Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras Arbovirosis. En México: Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/629265/Lineamientos_Dengue_Arb_V1-2021.pdf
- Kabir, M. A., Soto-Acosta, R., Sharma, S., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., Caputi, M., & Asghar, W. (2020). An antibody panel for highly specific detection and differentiation of Zika virus. *Scientific Reports*, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-68635-6
- Kaushik, A., Yndart, A., Kumar, S., Jayant, R. D., Vashist, A., Brown, A. N., Li, C.-Z., & Nair, M. (2018). A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zikavirus protein. *Scientific Reports*, 8(1), 9700. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28035-3
- Kawde, A.-N., Mao, X., Xu, H., Zeng, Q., He, Y., & Liu, G. (2010). Moving Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay to the Point-of-Care Dry-Reagent Strip Biosensors. *American Journal of Biomedical Sciences*, 2(1), 23–32. https://doi.org/10.5099/aj100100023
- Kazmi, S. S., Ali, W., Bibi, N., & Nouroz, F. (2020). A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of Biological Research* (*Thessalon*), 27(5). https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4
- Khlebtsov, B., & Khlebtsov, N. (2020). Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Lateral-Flow Immunoassay. *Nanomaterials*, *10*(11), 1–16. https://doi.org/10.3390/NANO10112228
- Kim, D. T. H., Bao, D. T., Park, H., Ngoc, N. M., & Yeo, S. J. (2018). Development of a novel peptide aptamer-based immunoassay to detect Zika virus in serum and urine. *Theranostics*, 8(13), 3629–3642. https://doi.org/10.7150/thno.25955

- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S. G., Shi, J., & Lok, S. M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533, 425–428. https://doi.org/10.1038/nature17994
- Kumar, S., Bhushan, P., Krishna, V., & Bhattacharya, S. (2018). Tapered lateral flow immunoassay based point-of-care diagnostic device for ultrasensitive colorimetric detection of dengue NS1. *Biomicrofluidics*, 12(3). https://doi.org/10.1063/1.5035113
- Lai, S. C., Huang, Y. Y., Shu, P. Y., Chang, S. F., Hsieh, P. S., Wey, J. J., Tsai, M. H., Ben, R. J., Hsu, Y. M., Fang, Y. C., Hsiao, M. L., & Lin, C. C. (2019). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of dengue virus (DENV) NS1 and differentiation of DENV serotypes during early infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(7), 221–240. https://doi.org/10.1128/JCM.00221-19
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & del Carmen Castillo Signor, L. (2016). Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 933–935. https://doi.org/10.3201/eid2205.160065
- Landry, M. L., & St. George, K. (2017). Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 141(1), 60–67. https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA
- Lee, D., Shin, Y., Chung, S., Hwang, K. S., Yoon, D. S., & Lee, J. H. (2016). Simple and highly sensitive molecular diagnosis of Zika virus by lateral flow assays. *Analytical Chemistry*, 88(24), 12272–12278. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03460
- Lee, W. T., Wong, S. J., Kulas, K. E., Dupuis, A. P., Payne, A. F., Kramer, L. D., Dean, A. B., St George, K., White, J. L., Sommer, J. N., Ledizet, M., & Limberger, R. J. (2018). Development of Zika Virus Serological Testing Strategies in New York State. *Journal* of clinical microbiology, 56(3), e01591-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01591-17
- Li, C.-J., Huang, P.-H., Chen, H.-W., & Chang, S.-C. (2021). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies targeting to distinct epitopes of Zika virus envelope protein for specific detection of Zika virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 1. https://doi.org/10.1007/S00253-021-11364-1
- Mascini, M., Dikici, E., Robles Mañueco, M., Perez-Erviti, J. A., Deo, S. K., Compagnone, D., Wang, J., Pingarrón, J. M., Daunert, S., & Macdonald, J. T. (2019). Computationally Designed Peptides for Zika Virus Detection: An Incremental Construction Approach. *Biomolecules*, 9, 498. https://doi.org/10.3390/biom9090498
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487–524. https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15
- Musso, D., Rouault, E., Teissier, A., Lanteri, M. C., Zisou, K., Broult, J., Grange, E., Nhan, T.-X., & Aubry, M. (2017). Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. *Journal of medical virology*, 89(9), 1505–1510. https://doi.org/10.1002/jmv.24735

- Nicholls, C. M. R., Sevvana, M., & Kuhn, R. J. (2020). Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in Virus Research*, 108, 33– 83. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.08.003
- Noor, R., & Ahmed, T. (2018). Zika virus: Epidemiological study and its association with public health risk. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(5), 611–616. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.007
- Ochoa Azze, R. F. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. https://www.paho.org/cub/dmdocuments/PubFINLAY-LIBROTecInmunoParaEClinVacunas2012.pdf
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2021). Zika, reporte de casos acumulados. https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-zika.html
- Pang, J., Chia, P. Y., Lye, D. C., & Leo, Y. S. (2017). Progress and Challenges towards Pointof-Care Diagnostic Development for Dengue. *Journal of clinical microbiology*, 55(12), 3339–3349. https://doi.org/10.1128/JCM.00707-17
- Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059
- Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. Western Journal of Emergency Medicine, 17(6), 671– 679. https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904
- Pawley, D. C., Ricciardi, M. J., Dikici, E., Deo, S. K., Daunert, S., & Macdonald, J. T. (2019). Highly Sensitive and Selective Direct Detection of Zika Virus Particles in Human Bodily Fluids for Accurate Early Diagnosis of Infection. ACS Omega, 4(4), 6808–6818. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00374
- Pawlik-Sobecka, L., Sołkiewicz, K., Kokot, I., Kiraga, A., Płaczkowska, S., Schlichtinger, A. M., & Kratz, E. M. (2020). The Influence of Serum Sample Storage Conditions on Selected Laboratory Parameters Related to Oxidative Stress: A Preliminary Study. *Diagnostics*, 10(1). https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10010051
- Peters, R., & Stevenson, M. (2019). Zika virus diagnosis: challenges and solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(2), 142–146. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.002
- Samsonova, J. V, Safronova, V. A., & Osipov, A. P. (2015). Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk. *Talanta*, *132*, 685–689. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.043
- Sánchez-Purrà, M., Carré-Camps, M., De Puig, H., Bosch, I., Gehrke, L., & Hamad-Schifferli, K. (2017). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Sandwich Immunoassays for Multiplexed Detection of Zika and Dengue Viral Biomarkers. ACS Infectious Diseases, 3(10), 767–776. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00110

- Sharma, A., & Lal, S. K. (2017). Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Frontiers in microbiology*, *8*, 110. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110
- Sharma, V., Sharma, M., Dhull, D., Sharma, Y., Kaushik, S., & Kaushik, S. (2020). Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(2), 87–98. https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0331
- Singh, R. K., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Iqbal, H. M. N. N., Malik, Y. S., & Bueno-Marí, R. (2017). Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update. *Frontiers in microbiology*, 8, 2677. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02677
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, *352*(6284), 467–470. https://doi.org/10.1126/science.aaf5316
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *Journal of Infectious Diseases*, 216(S10), S935–S944. https://doi.org/10.1093/infdis/jix515
- Song, J., Mauk, M. G., Hackett, B. A., Cherry, S., Bau, H. H., & Liu, C. (2016). Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Analytical Chemistry*, 88(14), 7289–7294. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01632
- St George, K., Sohi, I. S., Dufort, E. M., Dean, A. B., White, J. L., Limberger, R., Sommer, J. N., Ostrowski, S., Wong, S. J., Backenson, P. B., Kuhles, D., Blog, D., Taylor, J., Hutton, B., & Zucker, H. A. (2017). Zika Virus Testing Considerations: Lessons Learned from the First 80 Real-Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State. *Journal of clinical microbiology*, 55(2), 535–544. https://doi.org/10.1128/JCM.01232-16
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Jaconi, S., Mele, F., Foglierini, M., Pedotti, M., Simonelli, L., Dowall, S., Atkinson, B., Percivalle, E., Simmons, C. P., Varani, L., Blum, J., ... Corti, D. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, *353*(6301), 823–826. https://doi.org/10.1126/science.aaf8505
- Stiasny, K., Kiermayr, S., Holzmann, H., & Heinz, F. X. (2006). Cryptic Properties of a Cluster of Dominant Flavivirus Cross-Reactive Antigenic Sites. *Journal of Virology*, 80(19), 9557. https://doi.org/10.1128/JVI.00080-06
- Suzuki, K., Nakayama, E. E., Saito, A., Egawa, A., Sato, T., Phadungsombat, J., Rahim, R., Hasan, A., Iwamoto, H., Rahman, M., & Shioda, T. (2019). Evaluation of novel rapid detection kits for dengue virus NS1 antigen in Dhaka, Bangladesh, in 2017. *Virology Journal*, 16(1). https://doi.org/10.1186/S12985-019-1204-Y
- Talero-Gutiérrez, C., Rivera-Molina, A., Pérez-Pavajeau, C., Ossa-Ospina, I., Santos-García, C., Rojas-Anaya, M. C., & De-la-Torre, A. (2018). Zika virus epidemiology: from Uganda to world pandemic, an update. *Epidemiology and Infection*, 146(6), 673–679. https://doi.org/10.1017/S0950268818000419

- Theel, E. S., & Hata, D. J. (2018). Diagnostic testing for Zika virus: A postoutbreak update. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4). https://doi.org/10.1128/JCM.01972-17
- Tian, J., Yan, Y., Yue, Q., Liu, X., Chu, X., Wu, N., & Fan, Y. (2017). Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in E. coli. *Scientific Reports*, 7(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-10546-0
- Tran, T. V., Nguyen, B. V., Nguyen, T. T. P., Tran, T. T., Pham, K. G., Le, Q. B., Do, B. N., Pham, H. N., Nguyen, C. V., Dinh, D. P. H., Ha, V. T., Doan, T. H. T., & Le, H. Q. (2019). Development of a highly sensitive magneto-enzyme lateral flow immunoassay for dengue NS1 detection. *PeerJ*, 7, e7779. https://doi.org/10.7717/peerj.7779
- U.S. Food and Drug Administration, (FDA). (2021). Zika Virus Response Updates from FDA. Emergency Use Authorization. https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda#zikadiagnostics
- Wang, L., Wang, R., Wang, L., Ben, H., Yu, L., Gao, F., Shi, X., Yin, C., Zhang, F., Xiang, Y., & Zhang, L. (2019). Structural Basis for Neutralization and Protection by a Zika Virus-Specific Human Antibody. *Cell Reports*, 26(12), 3360-3368. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.062
- Wang, Q., Mei, C., Zhen, H., & Zhu, J. (2012). Codon preference optimization increases prokaryotic cystatin c expression. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. 732017. https://doi.org/10.1155/2012/732017
- Yang, K. H., & Narayan, R. J. (2017). Analytical methods for detection of Zika virus. MRS Communications, 7(2), 121–130. https://doi.org/10.1557/mrc.2017.20
- Ye, H., Liu, Y., Zhan, L., Liu, Y., & Qin, Z. (2020). Signal amplification and quantification on lateral flow assays by laser excitation of plasmonic nanomaterials. *Theranostics*, 10(10), 4359–4373. https://doi.org/10.7150/thno.44298
- Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., & Halloran, W. (2000). An antigen capture enzymelinked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1053–1057. https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1053-1057.2000
- Zhang, J., Gui, X., Zheng, Q., Chen, Y., Ge, S., Zhang, J., & Xia, N. (2019). An HRP-labeled lateral flow immunoassay for rapid simultaneous detection and differentiation of influenza A and B viruses. *Journal of Medical Virology*, 91(3), 503–507. https://doi.org/10.1002/jmv.25322
- Zhang, L., Du, X., Chen, C., Chen, Z., Zhang, L., Han, Q., Xia, X., Song, Y., & Zhang, J. (2018). Development and Characterization of Double-Antibody Sandwich ELISA for Detection of Zika Virus Infection. *Viruses*, 10(11), 634. https://doi.org/10.3390/v10110634
- Zhang, Q., Zeininger, L., Sung, K.-J., Miller, E. A., Yoshinaga, K., Sikes, H. D., & Swager, T. M. (2019). Emulsion Agglutination Assay for the Detection of Protein–Protein Interactions: An Optical Sensor for Zika Virus. ACS Sensors, 4(1), 180–184. https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01202

- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses*, 9(11). 338. https://doi.org/10.3390/v9110338
- Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K. A., Speer, S. D., Platt, D. J., Gorman, M. J., Govero, J., Nelson, C. A., Pierson, T. C., Diamond, M. S., Fremont, D. H., Fremont, D. H., contributed equally, E., & generated the mAbs, D. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*, 166(4), 1016–1027. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.020

ANEXOS

Anexo 1. Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

Ajustar las AuNPs (40 nm) a 1 DO con agua-milliQ, de ser necesario. Para 300 μ L de AuNPs (40 nm, 1 DO), ajustar el pH con 12 μ L de buffer de fosfatos (H₂PO₄) 0.1 M al pH adecuado (ver Anexo 2 para determinar el pH óptimo para la conjugación). Después, agregar 6 μ L del anticuerpo a 1 mg/mL diluido en agua-milliQ. Mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente por 1 hora en agitación orbital (600 rpm). Posteriormente, centrifugar a 3000 xg por 30 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante cuidadosamente y resuspender el pellet con 100 μ L de PBS-BSA al 0.1%. Si es necesario, sonicar los conjugados en baño ultrasónico en intervalos de 5 a 10 segundos. Conservar los conjugados a 4 °C.

Anexo 2. Determinación de pH óptimo para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

En pozos de microplaca se agregar 100 μ L de AuNPs a 1 DO. A cada pozo agregar 4 μ L del buffer de fosfatos (H₂PO₄) 0.1 M al pH correspondiente (pH 6.2, 6.6, 7.0, 7.4 o 7.8). A los pozos control agregar 4 μ L de H₂O. A continuación, a los pozos a los que se les ajustó el pH agregar 2 μ L del anticuerpo monoclonal a 4 mg/mL. Mezclar cada pozo con micropipeta e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital a 350 rpm. Después, agregar 100 μ L de solución de NaCl al 10% a cada pozo, excepto a uno de los pozos control, a este agregar 100 μ L H₂O. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital en agitación orbital a 350 rpm. Posteriormente, observar los colores de las AuNPs a los diferentes pH, comparando con el control de AuNPs (sin mAb y sin NaCl). El pozo con el color más cercano al control indica el pH ideal para realizar la conjugación, ya que permite una mejor interacción entre las AuNPs y los anticuerpos, evitando la aglomeración y precipitación de las nanopartículas.