



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Análisis Instrumental



**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO
PARA LA DETECCIÓN DE *Brucella* spp EN SOLUCIONES ACUOSAS
CONTAMINADAS *in vitro***

Autora:

Emily Nathaly Pacheco Pimentel

CI: 20.767.968

Tutor:

Prof. Dr. Pedro J. Navarro D.

Mérida, Junio de 2019



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Análisis Instrumental



**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO
PARA LA DETECCIÓN DE *Brucella* spp EN SOLUCIONES ACUOSAS
CONTAMINADAS *in vitro***

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciada en Bioanálisis

Autora:

Emily Nathaly Pacheco Pimentel

CI: 20.767.968

Tutor:

Prof. Dr. Pedro J. Navarro D.

Mérida, Junio de 2019

Dedicatoria

Fuiste el mejor regalo que me ofreció Dios, desde niña me sentí bendecida por ser tu nieta; tus consejos aún están grabados en mi mente y tu amor plasmado e intacto en mi alma y corazón, que bendición y admiración fue tenerte y que bendición es ahora que seas *MI ÁNGEL*. Me diste lo mejor de ti, me cuidaste, me regalaste tu tiempo, y más que eso me entregaste ese tesoro tan puro e incondicional como lo fue tu amor, ese mismo que me llevó a tener la mejor educación, a perder mis miedos y romper muchos paradigmas. Siempre estarás presente en mis sueños, triunfos y metas, porque tú forjaste muchas de ellas, y gracias a ti soy la persona que soy, siempre confiaste en mí incluso días antes de tu partida, todos los días pido a Dios ser tan grande y sabia como tú, tu mejor herencia fue enseñarme desde niña el significado de la bondad, humildad, generosidad, el respeto y la paciencia, sin duda alguna tu mayor virtud fue entregarme tu cariño. *Infinitas gracias mi reina, MI MAMAÍTA, mi amiga y compañera fiel.*

A mi Papaíto por siempre estar presente en mi educación, por entregarme el amor de abuelo y también el de un verdadero Padre, *DIOS ME PREMIO CONTIGO.*

A mi Mamá por ser mi motor, la gran motivadora de mis sueños, mi mejor ejemplo de superación, por siempre anhelar y querer lo mejor para mí, por acompañarme y cuidarme siempre en cada momento, por sus palabras que me han guiado y alentado.

A mis hermanos Sergio, Suleika y Andrea, por ser mis compañeros de sueños, de risa, por estar presente en mis metas, por ese amor de hermanos que nos caracteriza y nos han mantenido unidos y también por sus palabras tan poderosas y motivadoras de un *¡SI SE PUEDE!*

A mis tías Rosa, Julia y Olivar por su amor y siempre estar al pendiente de mi educación, pero sobretodo quiero expresar mi gratificación a mis segundos Padres, mi tía Xiomara y mi tío José, por ayudarme y acompañarme en esta meta tan especial, por guiarme y ser un gran ejemplo para mí.

A mis sobrinitos y primitos por recordarme que la alegría florece desde la niñez, sus risas son mi alegría, y sus travesuras aunque me llenen de canas verdes me hacen ver que lo más importante que nos llevamos es aquello que vivimos, sé que en el futuro serán grandes personas de mente y corazón.

A mis amigas incondicionales Luixys y Miraimy, a mis compañeros de estudio por ser parte de mis risas, trasnochos, llanto, por soportar mi carácter, se y entiendo que no soy fácil de sobrellevar, pero esta dedicatoria también va para ustedes.

Agradecimientos

Quiero expresar en primer lugar mi gratitud a Dios y a la Virgen de la Rosa Mística por siempre guiarme, acompañarme y regalarme su bendición en esta experiencia tan gratificante y enriquecedora, que dejan sin duda alguna huellas durante mi vida personal y profesional.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de adquirir y enriquecerme en conocimientos, también a los docentes que forman parte de ella, gracias por siempre dar lo mejor de ustedes en cada clase brindada, entregarnos sus conocimientos y herramientas para hacer de cada estudiante un profesional de gran élite.

Al Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, por brindarme sus instalaciones, suministro de reactivos y equipos para llevar a cabo la realización de esta investigación.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental, su secretaria y demás personal, por permitirme el uso de sus instalaciones, por su grata atención y colaboración.

A mi tutor profesor Pedro Navarro por aceptar ser mi tutor, por su orientación y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto investigativo.

A mi cotutor profesor Pedro Matheus, por su confianza, conocimientos, enseñanzas, paciencia, orientación e inducirme a tener su mismo espíritu de investigador que lo caracteriza, gracias por su decisivo apoyo en este proyecto de investigación. *¡DIOS LO BENDIGA!*

A la profesora Ángela Lugo, por su colaboración y donación de los reactivos para poder llevar a cabo esta investigación, que Dios se lo multiplique, y gracias por sus acertadas opiniones en todos los aspectos relacionados con la ejecución de la tesis.

A la profesora Zulay Labrador, por su disposición, colaboración y certeras opiniones en todos los aspectos relacionados con la ejecución de la tesis.

¡INFINITAS GRACIAS!

Índice de Contenido

	Pág.
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xiii
Resumen	xiv
Introducción	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación e importancia de la investigación	9
Objetivos de la investigación	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	10
Alcances y limitaciones de la investigación	11
Alcances de la investigación	11
Limitaciones de la investigación	11
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	12
Trabajos previos	12
Antecedentes históricos	17
Bases teóricas	20
<i>Brucella</i> spp	20
Estructura de <i>Brucella</i> spp	20
Características bioquímicas de <i>Brucella</i> spp	22
Hábitat de <i>Brucella</i> spp	22
Estructura antigénica de <i>Brucella</i> spp	25
Estructura externa	25
Estructura interna	27
Cepas de <i>Brucella</i> spp	27
Métodos utilizados para la determinación de <i>Brucella</i> spp	30

Métodos directos	30
Cultivo	31
Exámen microscópico	31
Subcultivo y aspecto colonial	32
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
Métodos indirectos	33
Agglutinación lenta estándar (MICROMÉTODO)	33
Prueba de aglutinación con y sin 2mercaptoetanol	34
Reacción de huddleson	34
Prueba Rosa de Bengala (Antígeno Brucelar Amortiguado)	34
Antígeno tamponado en placa (BPA)	35
Prueba de coombs	35
Fijación de complemento	35
Inmunofluorescencia indirecta	36
Elisa	36
Elisa indirecto (ELISA-I)	36
Elisa competitivo (ELISA-C)	36
Polarización de fluorescencia (FPA)	37
Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG)	37
Biosensores	37
Características de los Biosensores	40
Clasificación de los Biosensores	41
Tipos de interacción de los Biosensores	42
Interacción con sensores biocatalíticos	42
Interacción con sensores de bioafinidad	42
Detección de la interacción	43
Elemento de reconocimiento	43
Enzimas	43
Orgánulo, tejido o célula completa	43
Anticuerpos	44

PIM, PNA, Aptámero	44
Sistema de transducción	45
Técnicas electroquímicas	45
Voltametría cíclica	46
Técnicas de inmovilización	48
Inmovilización de enzimas	49
Inmovilización de microorganismos	49
Inmovilización de inmunoagentes	49
Anticuerpos	50
Antígenos	50
Compuestos con bioafinidad	50
Inmovilización de tejidos y organelas	50
Inmovilización de quimiorreceptores	50
Inmunosensores	50
Enfermedades microbianas de transmisión alimentaria	52
Operacionalización del evento	53
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	54
Tipo de investigación	54
Diseño de la investigación	54
Población y muestra	55
Unidad de investigación	55
Selección del tamaño de la muestra	55
Procedimientos de la investigación	56
Diseño y preparación del Biosensor para la detección de <i>Brucella</i> spp	56
Selección y preparación del transductor	56
Preparación de los electrodos de oro	57
Selección del biorreceptor inmunológico	57
Inmovilización del biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor	57
Formación de monocapa de tioles (SAMs)	58
Inmovilización de los anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp	59

Transducción del evento de bioeconomiento	60
Materiales	62
Celda electroquímica	62
Electrodos	62
Reactivos	62
Tiourea 5mM	62
Antígeno y anticuerpo contra <i>Brucella</i> spp	62
Soluciones electrolíticas	63
Cloruro de potasio (KCl) 0,1 M	63
Cloruro de potasio (KCl) 0,01 M	63
Cloruro de potasio (KCl) 0,001 M	63
Otras soluciones	63
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 0,5 M	63
Hidróxido de potasio (KOH) 0,5 M	63
Otros materiales	64
Material volumétrico	64
Equipos y aparatos	64
Diseño de análisis	64
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
Preparación y caracterización electroquímica de los electrodos de oro	65
Formación de monocapa de tioles (SAMs) y la estabilidad de unión Au/TOU	66
Optimización del pH	68
Optimización de la velocidad de barrido en electrodos de oro modificados con tiourea e incubados posteriormente en anticuerpo positivo (Ac ⁺) contra <i>Brucella</i> spp en KCl 0,001 M	69
Optimización del tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados con tiourea en el anticuerpo positivo (Ac ⁺) contra <i>Brucella</i> spp	71
Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de oro desnudo, oro/tiourea y oro/tiourea/Ac ⁺	74
Inmovilización del Ac ⁺ contra <i>Brucella</i> spp y posterior adición del Antígeno Rosa de Bengala a diferentes volúmenes en solución de KCl 0,001 M	76

Inmovilización del Antígeno Rosa de Bengala (Ag-RB) y la adición posterior del Ac+ contra <i>Brucella</i> spp	78
Inmovilización del anticuerpo negativo (Ac-) a diferentes velocidades de barrido	79
Afinidad de los electrodos de oro desnudo por el Ac+ con posterior adición de antígeno Brucelar Amortiguado (Rosa de Bengala)	80
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
Conclusiones	83
Recomendaciones	85
Bibliohemerografía	86

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura de la célula bacteriana.	21
Figura 2. Ingreso de <i>Brucella</i> spp en el organismo y la activación de los mecanismos de defensa.	24
Figura 3. Membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i> spp.	25
Figura 4. Estructura esquemática del LPS de <i>Brucella</i> spp.	26
Figura 5. Función triangular potencial-tiempo.	46
Figura 6. Respuesta de la voltametría cíclica.	47
Figura 7. Diseño de un inmunosensor y detección de microorganismos.	51
Figura 8. Formación de una monocapa de tiourea (SAM/TOU).	59
Figura 9. Inmovilización de los anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp.	59
Figura 10. Diseño metodológico para la fabricación de un inmunosensor para la detección de <i>Brucella</i> spp en soluciones acuosas contaminadas <i>in vitro</i> .	61
Figura 11. Voltametría cíclica en H ₂ SO ₄ 0,5 M de un electrodo de hilo de oro.	65
Figura 12. Voltametrías cíclicas de desorción en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea (Au/TOU).	67
Figura 13. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/Ac (+) a pH 3,65, 6,42, 7,00 y 9,40.	68
Figura 14. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) vs pH en electrodo de Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac+.	69
Figura 15. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/Ac (+) a diferentes velocidades de barrido.	70
Figura 16. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) vs velocidades de barrido mV/s en electrodos de oro modificados con TOU incubados durante 30 minutos en Ac+ a pH 6,42.	71
Figura 17. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/Ac+ a diferentes tiempos de incubación.	72

Figura 18. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) en función de los diferentes tiempos de incubación (minutos) en Ac^+ para un electrodo Au/TOU a pH 6,42.	73
Figura 19. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de Au desnudo, electrodo Au/TOU y electrodo Au/TOU/Ac (+).	74
Figura 20. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU e incubado durante 30 minutos en Ac^+ a diferentes volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala.	76
Figura 21. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) en función de los diferentes volúmenes (μL) del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica de KCl 0,001 M, en electrodo de Au/TOU/Ac+.	77
Figura 22. Voltametrías cíclicas en KCL 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/ Ag-RB a diferentes concentraciones del Ac (+).	79
Figura 23. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU e incubado durante 30 minutos en Ac^- a diferentes velocidades de barrido.	80
Figura 24. Voltametrías cíclicas de un electrodo de hilo de oro modificado con Ac (+) en KCl 0,001 con 100 y 500 μl de Antígeno Rosa de Bengala.	81

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Supervivencia de <i>Brucella</i> spp en diferentes muestras.	23
Tabla 2. Operacionalización del evento.	53
Tabla 3. Valores de Epa, Ipa, Epc e Ipc para los electrodos Au/TOU y Au/TOU/Ac+.	75
Tabla 4. Valores de Epa, Ipa, Epc e Ipc para los diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica de KCl 0,001 M.	77

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DETECCIÓN DE *Brucella* spp



DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO
PARA LA DETECCIÓN DE *Brucella* spp EN SOLUCIONES ACUOSAS
CONTAMINADAS *in vitro*
Trabajo de Grado

Autora:

Emily Nathaly Pacheco Pimentel
CI: 20.767.968

Tutor:

Prof. Dr. Pedro J. Navarro D.

RESUMEN

Brucella spp es un género de bacterias Gram negativas conocido principalmente por ser productor de la enfermedad brucelosis, una zoonosis que ocasiona importantes problemas de salud. Las bacterias son transmitidas usualmente por vía digestiva, respiratoria, cutánea y conjuntival. Existen distintos métodos directos e indirectos para la identificación de esta bacteria patógena, aunque pocos son electroquímicos, por tanto es fundamental, el desarrollo de un biosensor específico para su diagnóstico. El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento, transformando la respuesta del mismo en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito. El **objetivo** de esta investigación fue diseñar y preparar un inmunosensor electroquímico para la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*. **Metodología:** fue una investigación proyectiva con diseño de laboratorio, contemporáneo y longitudinal. Se usó un electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de tiourea, posteriormente se inmovilizó el Ac(+), Ac(-) y el Ag-RB al electrodo modificado, para identificar la formación del inmunocomplejo. **Resultados:** se realizó la preparación y caracterización electroquímica de los electrodos de oro en H₂SO₄ 0,5 M, además se realizaron VC en KOH 0,5 M para comprobar la estabilidad de la unión Au/TOU. Se optimizaron parámetros como pH, velocidad de barrido, tiempo de incubación y el volumen mínimo necesaria del Ag en solución. Se realizaron VC para comprobar la afinidad del electrodo de oro desnudo por el Ac+, y por último se estudió la adsorción del inmunocomplejo Ag-Ac(+). **Conclusiones:** se encontró estabilidad en la inmovilización de la monocapa de tiourea, además el tiempo de incubación fue de 30 minutos, velocidad de barrido de 100mV/s., y pH 6,42, logrando el reconocimiento de *Brucella* spp inmovilizada y en solución. **Palabras claves:** *Brucella* spp, monocapa de tioles, inmunocomplejo, inmunosensor, inmovilización, voltametría.

Introducción

Los microorganismos se encuentran presentes inevitablemente en el ambiente y en todo tipo de alimentos y materiales biológicos. Por ello, su detección temprana, es importante para la prevención y control de las enfermedades. Son diversos los agentes patógenos para el ser humano que pueden encontrarse en alimentos, tales como en la leche o en los productos lácteos, tanto químicos como biológicos. Como en la mayoría de los alimentos, los más frecuentes son los agentes biológicos, bacterias principalmente. Tal es el caso de la brucelosis que es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos (Prescott, Harley y Klein, 2002; Cloeckert et al., 2001).

Esta enfermedad es de importancia para la salud pública debido a los costos generados por la incapacidad física que produce en el enfermo y a las pérdidas secundarias ocasionadas por la afectación del ganado. Es causada por microorganismos del género *Brucella* spp que son un grupo de bacterias intracelulares, inmóviles y de crecimiento lento. Se reconocen distintas especies, algunas de ellas son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti* (Tan, 2011; Bricker y Halling, 2003).

Se considera que la aplicación de tratamientos térmicos, como la pasteurización, suele ser una forma eficaz de control de estos peligros cuando provienen de la leche empleada como materia prima. No obstante, unas malas prácticas de fabricación, principalmente en productos cuyo proceso de elaboración incluye etapas de manipulación o de procesado posteriores al tratamiento térmico (por ejemplo el queso o la leche en polvo), pueden facilitar una contaminación cruzada o la incorporación de patógenos de origen ambiental (Tan, 2011; Bricker y Halling, 2003).

A finales de los noventa, el desarrollo de micro y nanoestructuras para la detección de cantidades casi imperceptibles de microorganismos patógenos, ha sido una alternativa importante; ya que ofrecen características multifuncionales, además de ser altamente sensibles y de permitir detección biológica con un alto grado de especificidad;

como parte de los crecientes esfuerzos para desarrollar nuevos procedimientos que permitan minimizar el tiempo del diagnóstico microbiológico, se han investigado gran número de sensores y biosensores que utilizan diversos mecanismos de transducción (Matheus, Hernández, Navarro y Pacheco, 2017; Hernández, 2014; Gonzáles, García y Ruiz, 2005).

En particular, el uso de las técnicas electroquímicas en sensores y biosensores ha sido prominente en la literatura y ha constituido la base de los biosensores con más éxito comercial para la detección de diversos analitos. La mayoría de estos dispositivos utilizan electrodos modificados, material biológico inmovilizado e incluso, muchos se combinan con técnicas de reconocimiento molecular. Lógicamente, el éxito de las técnicas electroquímicas depende en gran medida de las características de los electrodos empleados. El desarrollo de la tecnología de la microelectrónica se extendió a la fabricación de sensores electroquímicos e hizo posible la construcción de electrodos de muy pequeño tamaño, así como el perfeccionamiento de los equipos de medición (Zacco, 2006).

El Trabajo Final de Grado expresa que se va a investigar, cómo, cuándo y con qué se investigará. Con base a esto la investigación está compuesta por cinco capítulos. El Capítulo I titulado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico consta de: Trabajos previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas y Operacionalización del Evento. El Capítulo III, denominado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV que lleva por nombre Resultados y Discusiones; donde se presentan las gráficas con sus respectivas discusiones; y El Capítulo V titulado Conclusiones y Recomendaciones.

Se planteó entonces el principio de detección de un biosensor el cual se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismos de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produjo la variación de una o varias propiedades fisicoquímicas (transferencia de electrones, calor, cambio de

potencial, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detectó el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito o microorganismos, la cual es proporcional a la concentración de éste en la muestra (Zacco, 2006; Matheus, 2003).

Dentro de este orden de ideas se desarrolló y estudió la aplicación de un inmunosensor electroquímico. Es por ello que se puede considerar la posible detección de *Brucella* spp en la medida que se aplica el biosensor en muestras contaminadas *in vitro* de una forma más rápida, precisa y con mayor sensibilidad, para así lograr el objetivo principal de esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Sattarahmady, Tondro, Gholchin y Heli (2015), desarrollaron un trabajo titulado: “Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. Genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections”. Estos autores utilizaron una sonda de oligonucleótidos específicos de IS711 región del gen funcionalizado con AuNPs (AuNP-sonda). Entonces, AuNP-sonda se expuso al objetivo (complementario) y no diana (no complementario) de ADN para la hibridación. Además, analizaron las condiciones de hibridación en presencia de ADN genómico *Brucella* y se extrajo ADN de muestras clínicas. Después de la adición de ácido, se observó un color rojo para las muestras que contienen ADN complementario, mientras que en las muestras sin ADN complementario, AuNP-sonda se volvió azul-púrpura. Los resultados se investigaron visualmente, también por mediciones espectroscópicas UV-VIS. Este método detectó hasta $1,09 \text{ pg}/\mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico sin amplificación de *Brucella*. Las muestras clínicas fueron amplificadas por PCR, y se llevaron a cabo detecciones colorimétricas. Los resultados mostraron una alta sensibilidad y selectividad para las muestras clínicas amplificadas. Éste es el primer ensayo que se puede utilizar con un bajo costo, y como método de detección rápido, directa y visual de *Brucella*, quedando propuesto para trabajos futuros.

Ajay (2014), realizó un trabajo titulado: “Amperometric immunosensor of *Brucella abortus* CE-protein antigen shows post-zone phenomena”. Los electrodos fueron caracterizados electroquímicamente con 1-naftol y se usaron en un sistema de ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas en sándwich para detectar el antígeno proteico (CE-

proteína). El rango lineal fue desde 1,56 µg/mL hasta 100 µg/mL con una ecuación de regresión de $I \text{ (nA)} = 43,12 + 1,235 [\text{antígeno (}\mu\text{g/mL)}]$ ($R^2=0,991$), y la desviación estándar relativa se encontró en 5,5%. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando muestras sospechosas de suero en pacientes humanos y los resultados se compararon con la prueba de ELISA y la prueba de Rosa de Bengala en placa (RBPT), encontrando que el inmunosensor era altamente sensible en comparación con ELISA y RBPT. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos a partir de técnicas electroquímicas (técnica amperométrica) de que fuera positivo, negativo o falso positivo, se diluyeron adicionalmente las muestras de suero de los pacientes y luego se midieron, encontrando incluso que después de la dilución de los pacientes, los resultados de muestra de sueros obtenidos fueron los mismos que antes de la dilución de muestras. Se concluye que la técnica electroquímica no da resultado falso. Por lo tanto, los inmunosensores electroquímicos se pueden utilizar para el diagnóstico de la brucelosis en la muestra de suero del paciente.

Román, Lomillo, Domínguez y Martínez (2013), desarrollaron un biosensor para detectar de forma sencilla y en poco tiempo algunos compuestos tóxicos de interés en la industria agroalimentaria, como la del vino, o en la farmacéutica; estos sensores tienen la posibilidad de modificarse con un material biológico, de forma que adquieren más selectividad hacia el analito. Los sensores desarrollados en esta investigación se basaron en la tecnología serigráfica, que consiste en la deposición de tintas conductoras sobre un soporte inerte. Concretamente, se construyeron cuatro sensores para detectar compuestos tóxicos de diferente naturaleza como son: la ocratoxina A y el ácido glucónico, donde se obtuvieron buenos parámetros de calidad y se determinó satisfactoriamente la concentración en muestras de cerveza y de vino.

Cano, Rodríguez y Fernández (2008), presentaron una investigación titulada: “A new method based on the Butler-Volmer formalism to evaluate voltammetric cation and anion sensors”. Estos autores desarrollaron el primer biosensor de tercera generación para la determinación amperométrica de glucosa, basado en el mediador redox TTF-TCNQ. Este biosensor puede emplearse tanto en sistemas en continuo (FIA) como en discontinuo (Batch). El biosensor se preparó fácilmente, sin necesidad

de añadir alguna otra sustancia adicional para asegurar su conductividad, mostrando una alta reproducibilidad, largo tiempo de estabilidad y bajo costo. Debido al bajo potencial de trabajo empleado, la única interferencia pudo ser la presencia de ácido ascórbico. Sin embargo, mediante un sencillo procedimiento se pudo determinar, simultáneamente, las concentraciones de glucosa y ácido ascórbico presentes en la muestra. El rango lineal y los límites de detección obtenidos para la determinación de glucosa, hizo factible el uso de este biosensor en aplicaciones biomédicas.

Zhi, Gong y Shen (2002), presentaron una investigación titulada: “Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay”. El inmunosensor modificado para la detección de la bacteria, se construyó mediante el uso de un biocompuesto formado mediante la dispersión de polvo de grafito en una mezcla de *Brucella melitensis* y gel de polímero de silicato. El anticuerpo marcado con la enzima pudo difundirse fácilmente hacia el antígeno encapsulado (*Brucella melitensis*), que conserva sus propiedades de unión, y la reacción de asociación se detectó fácilmente en la superficie expuesta a la solución. El uso de un sustrato de o-aminofenol (o-AP) y la detección amperométrica a -150 mV vs SCE, dio como resultado un límite de detección relativamente bajo de 3,5 ng/mL y un rango de detección lineal desde 3,5 ng/mL hasta 200 ng/mL. Basado en los parámetros optimizados, se utilizó el sensor para detectar el anticuerpo *Brucella melitensis* en muestras de suero, utilizando un ensayo de unión competitiva. Los resultados demostraron la viabilidad de emplear el inmunosensor propuesto para la detección de anticuerpos para *Brucella melitensis* en un análisis clínico.

Es importante mencionar que el género *Brucella* spp es muy virulento, dentro de las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia Occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos, México, Brasil, Colombia y Argentina). Países como Perú, Argentina y México, tienen la incidencia más alta de brucelosis caprina. En otros países como: Brasil, Chile, y Venezuela, la presencia de brucelosis está confirmada, pero sin datos concretos. *B. melitensis* no está presente en EEUU, Canadá, Norte de Europa, Australia, Sudeste y parte Central de Asia, en áreas del Mediterráneo, en países alrededor del Golfo Árabe y África. La

actual presencia de la enfermedad en Malta y Omán (casos humanos) indica la dificultad de la erradicación de la infección. Las condiciones precarias en las que se desarrolla la explotación del ganado caprino, la falta de higiene, la alimentación deficiente, la cohabitación con otras especies, el hacinamiento, el nomadismo o trashumancia, acompañado de propietarios que carecen de una instrucción sanitaria adecuada, constituyen los factores más importantes para el mantenimiento y difusión de la infección en Latinoamérica (Koppel, Knopf, Ryser, Miserez y Thur, 2007; Kahler, 2000).

La Organización Mundial de Sanidad Animal ha considerado que *Brucella* spp es altamente patógena para los humanos y animales, siendo una de las especies que más se indica (*Brucella melitensis* y *Brucella abortus*) como causante de la enfermedad de Brucelosis. Se observan casos de exposición ocupacional en empleados de laboratorio, productores, médicos veterinarios y otras personas que entran en contacto con tejidos o animales infectados. La brucelosis es una de las infecciones más fáciles de contraer en un laboratorio. Las personas que no trabajan con animales o tejidos se suelen infectar al ingerir productos lácteos no pasteurizados. La vacuna con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* también es patógena para los humanos y debe ser manipulada con precaución para evitar la inoculación accidental o la contaminación de las membranas mucosas o de la piel con abrasiones (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2012; Koppel, Knopf, Ryser, Miserez y Thur, 2007).

Todas las estrategias destinadas al control o erradicación de la brucelosis deben partir del establecimiento del contexto epidemiológico concreto y propio de cada país, región o comarca y disponer del apoyo y de la colaboración de los ganaderos, aunque su eficacia dependerá sobre todo de la calidad de los servicios veterinarios y de las organizaciones administrativas involucradas, puesto que las herramientas diagnosticadas y profilácticas ya están suficientemente validadas y estandarizadas. De igual forma, como estrategia epidemiológica, es de gran importancia la detección de estas bacterias en diversos alimentos, mediante la implementación de técnicas rápidas, sensibles y específicas (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2012; Koppel, Knopf, Ryser, Miserez y Thur, 2007).

Otras técnicas utilizadas para la determinación de *Brucella* spp, y el estudio de su crecimiento microbiano son los métodos directos: Cultivo, Exámen Microscópico, Subcultivo y Aspecto Colonial, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Métodos Indirectos: Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT), Prueba de Aglutinación con y sin 2-mercaptoetanol (2-ME), Reacción de Huddleson, Prueba de Rosa de Bengala, Antígeno Tamponado en Placa (BPA), Prueba de Coombs, Fijación de Complemento, Inmunofluorescencia Indirecta, ELISA: ELISA Indirecto (ELISA-I) y ELISA Competitivo (ELISA-C), Polarización de Fluorescencia (FPA), Prueba de Inmunodifusión en Agar (IDAG) y las técnicas electroquímicas, las cuales se basan en principios fisicoquímicos (Vázquez, 2007; Gonzáles, García y Ruiz, 2005; Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Morata et al., 2003; Velikovsky, Cassataro, Giambartolomei, Goldbaum y Estein, 2002; Teixeira y Cloeckert, 2000; Dajer et al., 1999; Ruelas y Rosadio, 1999; Costa, Guillow y Gari, 1996).

Cabe destacar que el uso de biosensores ha sido poco enfocado en la detección de *Brucella* spp, en este sentido, se pretende desarrollar la aplicación de un biosensor en soluciones acuosas contaminadas *in vitro* y así mismo poder identificar la presencia de *Brucella* spp de forma más rápida, precisa y directa. Por otra parte, existen amplias variedades de inmunosensores y no todos poseen las siguientes características: alta sensibilidad, selectividad, fiabilidad, tiempo de vida largo, bajo costo de producción, tiempo de análisis corto, pretratamiento innecesario de la muestra que supone un ahorro de tiempo, material y reactivo, el manejo sencillo, tiempo real, automatizables, miniaturizables, su capacidad de multi-análisis, sin embargo la combinación de varias de ellas podría situar a muchos de estos dispositivos en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales.

Basados en estos criterios, surge la siguiente interrogante: ¿Qué tan efectivo es el uso de un biosensor en la detección de *Brucella* spp al ser aplicado en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*?

Justificación e importancia de la investigación

Debido a la gran competencia de la resistencia bacteriana, se tiene la necesidad de implementar una estrategia que detecte la presencia de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro* con técnicas más sensibles y rápidas. Es interesante saber si las evidencias halladas en otros países sobre los factores de riesgo de *Brucella* spp explican también la patogenia de nuestro medio; los resultados hallados favorecerían la adopción de prácticas preventivas.

El interés científico de la presente investigación, se basa en la importancia del diagnóstico cuando se usa el biosensor para la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*, que por tratarse de consumo en seres humanos (productos lácteos no pasteurizados), se consideran más susceptibles a sufrir o padecer los problemas causados por este microorganismo como es la brucelosis. Es importante mencionar que el uso de un biosensor mejora la sensibilidad y la selectividad del método electroquímico frente a otras técnicas utilizadas (Prescott, Harley, y Klein, 2002; Jay, 1994; Schultz, 1991).

Es por ello, que a través de este estudio, el interés investigativo, el esfuerzo humano, ético y profesional de indagar y proponer soluciones sobre la problemática planteada, son alternativas viables debido a que la brucelosis constituye uno de los problemas más importante de la salud pública, causando también grandes pérdidas económicas a la ganadería de todo el mundo.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Diseñar y preparar un inmunosensor electroquímico para la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Comprobar la estabilidad de la unión Au/TOU como modificación apropiada de una superficie, para ser utilizada en la fase inicial de inmovilización de anticuerpos.
2. Optimizar los diferentes parámetros de trabajo tanto físicos como químicos, tales como pH, solución electrolítica, tiempo de incubación del anticuerpo positivo, concentración mínima de antígeno en solución, velocidad de barrido, entre otros.
3. Estudiar la afinidad de las biomoléculas (antígeno: Rosa de Bengala y anticuerpo: *Brucella* spp) sobre la superficie de electrodos de oro limpio (Au) y oro modificado (Au/TOU).
4. Preparar voltametrías cíclicas con inmovilización del anticuerpo positivo y adición posterior del antígeno Rosa de Bengala para el estudio de la formación de un inmunocomplejo antígeno-anticuerpo, demostrando que el biosensor preparado es selectivo a la presencia del antígeno.
5. Realizar voltametrías cíclicas con inmovilización del antígeno Brucelar amortiguado y adición posterior del anticuerpo positivo para verificar el reconocimiento del mismo y la unión antígeno-anticuerpo en el electrodo.
6. Analizar la sensibilidad del método y comparar con resultados obtenidos por otros estudios reportados en la bibliografía.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

Los alcances de un estudio están representados por la amplitud del conocimiento que se quiere saber. Esta amplitud puede ser superficial o con un nivel de complejidad mayor, marcado por una acción verbal que implica logro. El alcance del estudio depende de la estrategia de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Por lo cual esta investigación tiene un nivel de profundidad que va desde explorar, describir, hasta analizar el evento de estudio.

Limitaciones de la investigación

Las limitaciones en el proceso de investigación determinan los alcances hacia el cual se orientan los resultados del estudio. Es uno de los componentes fundamentales para la viabilidad de la investigación (Landeau, 2007). En esta investigación se consideró como limitantes para el estudio: al factor tiempo debido a la situación que cruza el país, así como también el difícil acceso a la Facultad de Ciencias por los problemas de transporte y la distancia desde nuestros hogares, los recursos económicos, así mismo la falta de reactivos ya que se contó solamente con dos kits proporcionados muy gentilmente por la profesora Ángela Lugo del Departamento de Bioanálisis Clínico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Las infecciones bacterianas pueden ser potencialmente mortales si no se tratan de forma rápida y adecuada. Sin embargo, las técnicas estándar para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo requieren mucho tiempo. Hubert et al., en el 2018 desarrollaron un método amperométrico de inmunoafinidad para el diagnóstico rápido de infecciones bacterianas en sangre. Aislaron patógenos bacterianos en sangre humana utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos anti-*Escherichia coli*. Las bacterias capturadas las fijaron magnéticamente a un electrodo y midieron la reducción de ciertos indicadores redox por parte de las bacterias vivas. Las bacterias capturadas la mezclaron con diferentes indicadores redox 2, 3, 5-cloruro de trifetil tetrazolio (TTC), 2- (4-yodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (fenil) tetrazolio cloruro (INT), o 5-ciano-2,3-di- (p-tolil) cloruro de tetrazolio (CTC), y posteriormente los estados redox de estos indicadores fueron monitoreados de forma amperométrica usando un potenciostato multiplexado (M-POT), llegando a la conclusión que dicho método proporciona un diagnóstico confiable y en corto tiempo, a diferencia de los métodos utilizados en hospitales o clínicas que tardan días e incluso más tiempo. Los investigadores creen que la tecnología podría permitir la detección temprana de patógenos y la administración rápida de un tratamiento anti infeccioso adecuado.

Matheus, Hernández, Navarro y Pacheco en el 2017 realizaron una investigación relacionada con el diseño y construcción de un inmunosensor para la detección de *Escherichia. coli*. Ejecutaron la incubación de los electrodos de oro modificados con tiourea en disoluciones de anticuerpos contra *E. coli*. El sistema de transducción del inmunosensor diseñado, se basó en técnicas voltamétricas. Las condiciones de trabajo

fueron optimizadas y se realizaron voltametrías cíclicas para comprobar la inmovilización del anti-*E. coli* y la posterior detección de la *Escherichia coli*. Se logró confirmar que las monocapas autoensambladas de tiourea sobre oro muestran ser una excelente herramienta para la inmovilización de anticuerpos anti-*E. coli*, mostrando una buena efectividad para la unión, inmovilización y detección de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos permitieron estudiar un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas.

Hu et al., (2016) prepararon un biosensor para *Escherichia coli* O157:H7 basado en sondas, desarrollando el biosensor mediante la integración de fluoresceína-liberable con una sonda magnética separable. Se sintetizaron nano esferas huecas de sílice, se enriquecieron con fluoresceína y se protegieron superficialmente con capas de macromolécula de poli (ácido acrílico) y poli (cloruro de dimetildialilamonio). Se capturaron las células de *E. coli* O157:H7, se separaron magnéticamente y se cuantificaron, los resultados muestran que el sensor desarrollado tiene una excelente especificidad, buena reproducibilidad y estabilidad, pudiendo ser fácilmente adaptado para la detección de otros patógenos.

Xu, Wang y Li (2016) realizaron una investigación denominada: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation, se estudió un inmunosensor impedimétrico basado en el uso de perlas magnéticas (MBs) para la separación y un micro-electrodo interdigitado impreso por serigrafía (SP-IDME). Los resultados obtenidos mostraron que el inmunosensor era capaz de detectar específicamente *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* dentro del intervalo de 10²-10⁶ ufc ml⁻¹ en las muestras de cultivo puro.

Abdalthai et al., (2015) usaron un genosensor electroquímico para la detección de bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7) aplicado en muestras de carne fresca para mejorar la seguridad alimentaria y control de calidad. Las sondas de captura y señalización fueron modificadas con tiol (SH) y amina (NH₂), respectivamente. La sonda de señalización se conectó utilizando nano-partículas de sulfuro de cadmio (CdSNPs) y el genosensor fue preparado mediante la inmovilización de ADN

complementario sobre la superficie del electrodo de oro, que se hibrida con un gen de fragmento específico de patógeno. Las corrientes de picos de *E. coli* O157:H7 se correlacionaron de una manera lineal con la concentración de tDNA, mostrando una alta sensibilidad y selectividad a las bacterias patógenas de *E. coli* O157:H7, por lo tanto, este método puede tener una aplicación potencial en seguridad alimentaria y campos relacionados.

Haiyun (2013), estudió la detección cuantitativa de *Brucella melitensis* por una etiqueta libre de inmunosensor, basado en nanopartículas de oro depositados sobre carbono. Las etiquetas del inmunosensor fueron fabricadas mediante la inmovilización del anticuerpo de *Brucella melitensis* en la superficie de los electrodos serigrafados de carbono modificado con nanopartículas de oro (PNB-SPCEs). La voltametría cíclica (CV) y el estudio de impacto ambiental se utilizaron para caracterizar el antígeno de *Brucella melitensis* y la interacción en la superficie del PNB-SPCEs con el anticuerpo. Un modelo equivalente electrónico general de una célula electroquímica se introdujo para la interpretación de los componentes de impedancia del sistema. Los resultados mostraron que el cambio en la resistencia de la transferencia electrónica (R_{ct}) fue significativamente diferente debido a la unión del anticuerpo. Una relación lineal entre R_{ct} y el valor logarítmico de la concentración celular se encontraron entre 4×10^4 y 4×10^6 UFC/mL en cultivos puros. La etiqueta libre de inmunosensor fue capaz de detectar un valor tan bajo como 1×10^4 y 4×10^5 UFC/mL de *Brucella melitensis* en muestras de cultivo y de leche pura respectivamente, en menos de 1,5 horas. Por otra parte, una buena selectividad frente a *Escherichia coli* O157: H7 y células de *Staphylococcus aureus*, mostró una buena especificidad para el desarrollo de un inmunosensor hacia la detección de *Brucella melitensis*.

Chanona y Martínez (2012), diseñaron y realizaron un biosensor basado en superficies rígidas modificadas para la detección de microorganismos patógenos. Dicha investigación mostró la simulación de varias microestructuras resonantes, conocidas como *cantilevers* (siendo un instrumento capaz de detectar señales extremadamente pequeñas, teniendo como resultado cambio de masa alrededor de los 10 picogramos). Estos autores utilizaron como herramienta el software *COMSOL*

Multiphysics, empleando el método de elemento infinito para tratamiento numérico, y como referencia principal la microbalanza de cuarzo. Finalmente, se comprobó que los diseños de dimensiones pequeñas muestran una mejor resolución en los cambios de masa ya que pueden detectar cantidades muy pequeñas, además se comprobó que la constante de elasticidad es menor para menores frecuencias y el *cantilevers* con menores dimensiones tiene valores más altos de constante de elasticidad y frecuencia, pero con una mayor resolución.

Liebes (2009), realizó una investigación relacionada con las estrategias de inmovilización de partículas de *Brucella* en fibras ópticas para uso de inmunosensores, usando quimioluminiscencia. Este autor diseñó un inmunosensor quimioluminiscente, cuyo objetivo fue identificar los anticuerpos anti-*Brucella* utilizando fibras ópticas como transductor. Para lograr una modificación química, permitiendo una unión covalente óptima del receptor de la proteína, investigó varias estrategias de limpieza y agentes de acoplamiento de silano. Utilizó un modelo receptor para la cuantificación de anticuerpos anti-*Brucella* IgG en una suspensión, comparando los resultados con colorimetría convencional y ELISA quimioluminiscente. Un derivado de silano benzofenona fue seleccionado como el mejor agente de acoplamiento de silano. El inmunosensor de fibra óptica (OFIS) mostró el límite de detección más bajo a 0,207 g/mL, en comparación con 0,828 g/mL y 0,414 g/mL logrados por colorimetría y ELISA quimioluminiscente, respectivamente. Estos resultados, junto con las ventajas adicionales de rapidez, los volúmenes de reactivos más bajos y las condiciones de operación moderadas, han establecido las bases para un mayor estudio en el diagnóstico *in situ* de marcadores de la enfermedad de brucelosis.

Aparicio (2007), estudió la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* y *Brucella* lisas en sementales ovinos jóvenes, de ocho diferentes estados de México. Se utilizaron 622 muestras de sueros de ovinos machos de diferentes razas, de entre seis y once meses de edad, pertenecientes a 39 diferentes rebaños. Para el diagnóstico de *B. ovis* emplearon la prueba de inmunodifusión doble en agar usando un extracto salino como antígeno. Las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos contra *Brucella* lisas fueron de tarjeta, con dos diferentes concentraciones celulares (cc) del antígeno (3% y 8%) y la

de fijación del complemento. Las reacciones positivas a la prueba de inmunodifusión fueron 15 (2.4%), hubo ocho rebaños con animales positivos, esto correspondió al 20.5 %. Respecto a las *Brucella* lisas el número de reacciones a la prueba de tarjeta al 8% de cc fue de 5 (0.8%). Mientras que con antígeno al 3% de cc el número de reacciones fue de 17 (2.7%). A la prueba de fijación del complemento se presentó una reacción positiva de 3 sueros correspondiente al (0.48%). Once rebaños tuvieron animales positivos a las pruebas con los antígenos lisos de *Brucella* (28.2%). Los resultados obtenidos conforman una base de datos que debe tomarse en consideración por los programas de control de la enfermedad, para colaborar con el mejoramiento de la Sanidad Animal en los diferentes Estados de México.

Gong y Zhong (2007), diseñaron un inmunosensor amperométrico ligado a enzimas, utilizando resveratrol como sustrato de peroxidasa de rábano picante para *Brucella melitensis*. Como producto natural, el resveratrol se evaluó como un sustrato potencial para la peroxidasa de rábano (HRP) y se aplicó a los ensayos ligados a enzimas por inmunosensores amperométricos. Los sensores basados en HRP-IgG se construyeron mediante la dispersión de grafito y cera de parafina a temperatura ambiente. Se investigaron cantidades óptimas de sustrato para HRP resveratrol. Los resultados de los estudios de comparación indican que el resveratrol es más factible para HRP y más estable en el aire que o-fenilendiamina, anilina o-benzofenona, y 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina. En un tampón Britton-Robinson de pH 6,8, HRP-IgG se podría catalizar la reacción de oxidación de resveratrol por H₂O₂, y la corriente reductora del producto de resveratrol a -376 mV aumenta en una cierta concentración de HRP-IgG, en la unión a *Brucella melitensis* del electrodo al antígeno modificado. El intervalo lineal de la determinación de anticuerpos contra *Brucella melitensis* obtenido con los inmunosensores fue de $3,0 \times 10^{-4}$ a $1,65 \times 10^{-2}$ gl⁻¹ con un límite de detección de 1×10^{-4} gl⁻¹. La superficie del inmunosensor podría ser regenerada simplemente puliendo con un papel de alúmina, con una excelente reproducibilidad (desviación estándar relativa = 4,6%). Finalmente, el método propuesto se ha utilizado con éxito para el análisis de muestras de sueros de conejos con resultados satisfactorios.

Antecedentes históricos

Los biosensores, al igual que cualquier otro tipo de instrumento, han evolucionado a lo largo de la historia. Anecdóticamente, podríamos decir que los primeros biosensores fueron los canarios; ya que estas aves se utilizaban antiguamente en las minas de carbón para detectar gases tóxicos. Los canarios se mueren antes que las personas en presencia de monóxido de carbono o metano y como suelen estar cantando la mayoría del tiempo, el hecho de que no lo hicieran, se convertía en una alarma sonora (Hill y Davis, 1999).

Pero, al margen de este hecho anecdótico, se puede decir que el padre de estos dispositivos fue Leland C. Clark Jr., quien finalizó sus trabajos con el electrodo de O_2 , con la idea de ampliar su uso para medir más analitos en el cuerpo humano, proponiendo hacer sensores “más inteligentes”. Lo que él quería decir con esto era que sería una buena idea combinar las enzimas y otros materiales biológicos con los sensores electroquímicos que existían hasta esa época. Con esta idea, se construyó el primer biosensor; este consistió en un electrodo de O_2 con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada. Este biosensor permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. Posteriormente, Guilbault y Montalvo detallaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo a iones amonio (Homme, Hellings y Marvin, 1988).

En la década de los 70 también se intentaron construir inmunosensores inmovilizando anticuerpos y utilizando transductores piezoeléctricos o potenciométricos, aunque fue en la década de los 80 cuando Liedberg los comercializó con éxito. Clemens incorporó un biosensor de glucosa en un páncreas artificial que se comercializó como el Biostator. Actualmente este biosensor ya no está en venta. En este mismo año una empresa Suiza construyó un biosensor que utilizaba lactato deshidrogenasa, el cual fue muy útil para mejorar los análisis en clínica y en deportes. En 1982, basándose en la utilización de mediadores electroquímicos para favorecer la transferencia de electrones desde el centro redox de una enzima a la superficie del

electrodo, se construyó la nueva generación de biosensores electroquímicos. Basándose en esto, se describió la implantación de un biosensor subcutáneo para la determinación de glucosa (Homme, Hellinga y Marvin, 1988).

También en este mismo año Davis se preguntó: ¿por qué no usamos las bacterias como elemento biológico en los biosensores para medir la cantidad de alcohol en una muestra? Esta pregunta causó un gran revuelo en muchas empresas de medio ambiente de Japón y otros lugares que se pusieron en marcha en su investigación y no tardaron mucho tiempo en desarrollar los electrodos microbianos. Un año antes se comenzaron a usar transductores térmicos (thermal enzyme probes) y los termistores enzimáticos (enzyme thermistors). Posteriormente se comenzaron a usar los biosensores basados en fibra óptica, que originaron la aparición de los denominados “optados”. Éstos se usaron en un primer momento para la determinación de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno (O₂) (Homme, Hellinga y Marvin, 1988).

En 1997 mediante la utilización de mediadores electroquímicos inmovilizados en electrodos enzimáticos serigrafiados, se consiguió construir el “bolígrafo” para el seguimiento personal de glucosa en la sangre, comercializado por la compañía MediSense. Actualmente las compañías Abbott Boehringer Mannheim y Bayer dominan las ventas de éste bolígrafo lo que da lugar a unas ventas del orden de varios cientos de millones de dólares, desbancando casi totalmente a los métodos convencionales de medir la glucosa (Hill y Davis, 1999).

Existen multitud de biosensores en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos). Éstos se pueden utilizar en numerosos problemas de la actualidad como el análisis clínico, de alimentos, bebidas, vigilancia del medio ambiente, defensa, seguridad y muchas otras áreas (Hill y Davis, 1999).

Entre las ventajas de los biosensores para el aseguramiento de la calidad fisicoquímica, microbiológica, composicional y la vida útil de los alimentos, se destacan: alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, debido a que las mediciones de nutrientes, micronutrientes, contaminación por residuos, toxinas y

productos metabólicos se encuentran en concentraciones a nivel de trazas; ampliación de la vida media del dispositivo utilizando materiales estables y resistentes; además son de fácil manejo, bajo costo y corto tiempo de análisis, lo que los hace versátiles en el control de procesos; eficientes, ya que disminuyen los tratamientos de las muestras; fáciles de operar y transportar, automatizables, incorporables en sistemas microscópicos, multianálisis, y quizá una de las ventajas más trascendentales para la industria de alimentos, es que permiten obtener resultados en tiempo real (Jiménez y León, 2009).

El descubrimiento de *Brucella* spp se remonta a la guerra de Crimea entre 1854-1856 cuando se observaron numerosos casos de fiebre prolongada, por lo que se sospechó una infección nueva, la cual se extendió a los países del Mediterráneo, en particular a la isla de Malta. Tres años después, el Doctor William Moulton Marston hizo cuidadosos estudios clínicos y autopsias en los individuos con tales síntomas, detalló la enfermedad según apareció en la isla y confirmó la presencia del padecimiento en otras zonas. En 1886, el médico inglés David Bruce aisló e identificó la cepa de *Brucella melitensis* a partir del bazo de un militar, la primera especie conocida del género. También demostró el alto grado de capacidad del microorganismo para producir la enfermedad y su diseminación a los diferentes órganos en un individuo infectado (Castro, González y Prat, 2005; López et al., 1992).

En Portugal aparecieron casos de fiebre ondulante desde 1893, los cuales fueron aumentando en los años siguientes. Se dice que en España, específicamente en Málaga, Cádiz, Murcia y Toledo, ya existía desde el siglo XVI, pero su presencia se confirmó en 1905 por el Doctor Themistocles Zammit, miembro de la comisión Inglesa, quien encontró reacciones positivas en casi la mitad de las cabras de Malta y que un número muy importante de ellas secretaba los organismos infecciosos a través de la leche. Se describía entonces que la enfermedad en el ganado se reflejaba en el aborto, el cual, además de implicar la pérdida de la cría y del período de producción de la leche, limitaba la salud del animal. Este descubrimiento relacionó por primera vez la infección humana con la leche cruda de cabra, por lo que se prohibió su consumo y se redujo por

consiguiendo el número de personas enfermas y el número de muertes (Castro, González y Prat, 2005; López et al., 1992).

Bases teóricas

Brucella spp

Brucella spp es un género de bacterias Gram negativas conocido principalmente por ser productor de la enfermedad brucelosis, una zoonosis que ocasiona importantes problemas de salud. Las bacterias son transmitidas usualmente por vía digestiva (ingestión de productos lácteos no controlados) o vía respiratoria, cutánea y conjuntival (contacto con animales enfermos). Sin embargo no se ha demostrado la transmisión entre personas. La bacteria pasa desde los linfáticos hasta la sangre venosa, donde es transportada principalmente por los neutrófilos y los monocitos hasta el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, aunque puede llegar a cualquier órgano. La enfermedad se puede manifestar en forma subclínica, subaguda, aguda y crónica (Adams, 1990).

Estructura de *Brucella spp*

Todos los serogrupos de *Brucella spp* son bacterias Gram negativas, reconocidas así por no adquirir el colorante cristal violeta de la tinción de Gram y colorearse en un tono rojo o rosado intenso. La coloración que adoptan estas bacterias se debe a características en su morfología. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas poseen estructuras internas similares; en líneas generales, una célula bacteriana internamente está constituida por ADN cromosómico, ARNm, ribosomas, proteínas y metabolitos. En relación a los constituyentes externos de la célula bacteriana, la pared celular es la principal estructura que diferencia a las bacterias Gram positivas de las Gram negativas. Las paredes celulares de las células Gram negativas, como *Brucella spp*, son

estructural y químicamente más complejas que en las células Gram positivas (Universidad Nacional del Nordeste, 2008; Gutiérrez, 2005).

Una pared Gram negativa está constituida por dos capas externas a la membrana citoplasmática. Una primera capa conformada por peptidoglicano (carbohidratos ligados con aminoácidos), y se encuentra inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática dentro de una zona denominada espacio periplásmico (Universidad Nacional del Nordeste, 2008; Gutiérrez, 2005).

Inmediatamente a la capa de peptidoglicano, se encuentra la membrana externa, que es una estructura que le proporciona forma a la célula bacteriana y constituye una barrera impermeable de moléculas de gran tamaño y moléculas hidrófobas. La membrana externa es una conformación asimétrica de bicapas lipídicas, constituida por dos zonas, la zona interna formada por fosfolípidos mientras que la zona externa está conformada en su mayoría por una molécula anfipática denominada lipopolisacárido (LPS) o endotoxina (Murray, 2002). En la figura 1 se observa la estructura de una célula bacteriana.

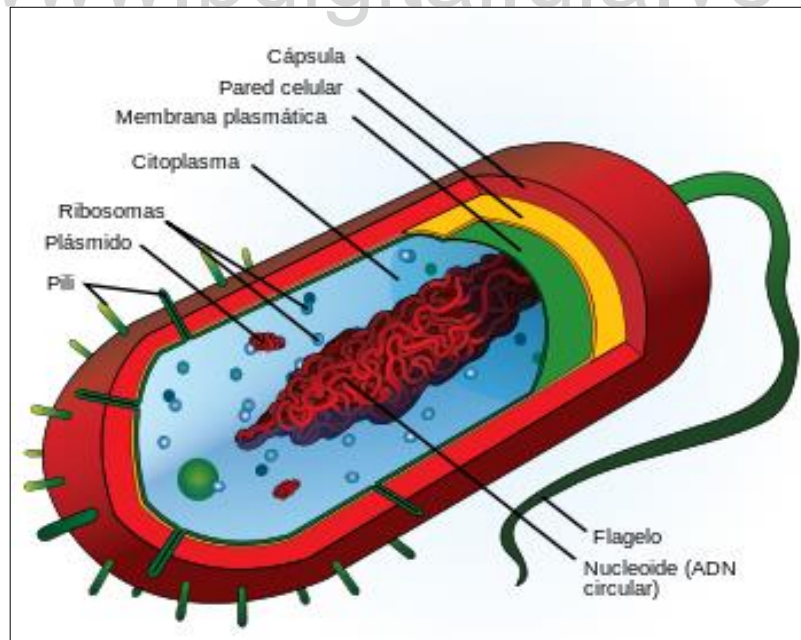


Figura 1. Estructura de la célula bacteriana.

Fuente: Murray, 2002.

Características bioquímicas de *Brucella* spp

Las especies de *Brucella* spp son cocobacilos de 0,5 a 0,7 μm de diámetro por 0,6-1,5 μm de largo, intracelulares facultativos, no son ácido-alcohol resistentes aunque igual se tiñen con Zhiel Neelsen modificado (stamp) de color rojo, que carecen de cápsula, flagelos o plásmidos nativos; tampoco generan esporas. Son ureasa, oxidasa y catalasa positivas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C a un pH de 6,6 a 7,4. Es aeróbica estricta teniendo un transporte de electrones basado en citocromos utilizando el oxígeno o el nitrato como aceptor final de electrones. Son productores de enfermedad en el ser humano y en animales. El DNA de *Brucella* spp contiene un 58-59% de guanina más citosina y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $3,2 \times 10^6$ pares de bases. Ese tamaño es menor que el de *E. coli* ($4,7 \times 10^6$ pares de bases) (Feer, 1996).

Hábitat de *Brucella* spp

El lugar por donde la bacteria penetra en el organismo suele ser: gastrointestinal, respiratorio, cutáneo o neurológico, a través de la ingesta de un producto infectado, principalmente lácteo elaborado con leche cruda, o del contacto con fluidos provenientes de algún animal infectado (sangre, orina, heces, fluidos vaginales). La enfermedad en el humano se manifiesta con un cuadro febril de curso prolongado, incapacitante, con severas complicaciones y que puede progresar hacia una enfermedad crónica. Cuando la bacteria se aloja en el tracto reproductor en las hembras, el aborto, los partos prematuros y la retención de placenta son los únicos signos visibles de padecimiento (Feer, 1996).

Bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y protección contra el sol, *Brucella* spp puede sobrevivir en ambientes diversos por largos períodos aunque no existe evidencia de que los organismos se repliquen significativamente bajo estas condiciones en el suelo, agua o estiércol, sin embargo se destruye rápidamente al ser

sometida a la pasteurización o al exponerla a temperaturas de 60° C por 30 minutos. En los restos de animales congelados, las bacterias sobreviven por muchos años (Heidenreich, 2010). En la tabla 1 se observa el tiempo de supervivencia de *Brucella* spp en diferentes muestras.

Sin embargo, una suspensión densa es más difícil de inactivar y se debe de prolongar el tiempo de exposición al calor o someterla a temperaturas más elevadas. *Brucella* spp es muy sensible a la radiación ionizante y se mueren con rapidez al exponerla a la luz ultravioleta. También son sensibles, a la mayoría de los desinfectantes de uso común, a las concentraciones recomendadas (Heidenreich, 2010).

Tabla 1. Supervivencia de *Brucella* spp en diferentes muestras.

<i>Material</i>	<i>Tiempo de supervivencia</i>
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Flúidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Fuente: Heidenreich, 2010.

El ingreso de *Brucella* spp en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos. La activación de C por las vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias gram negativas (Seco et al., 2003; Cloeckert et al., 2001).

Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* spp de activar la vía alterna del C, sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-

LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana. Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella* spp. La oxonización de las bacterias por los anticuerpos facilita su fagocitosis (proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito). *Brucella* spp es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la eliminación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa (Cloeckert et al., 2001).

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* spp son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce la estimulación de las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune mediada por LTH1, (ver figura 2) (Seco et al., 2003).

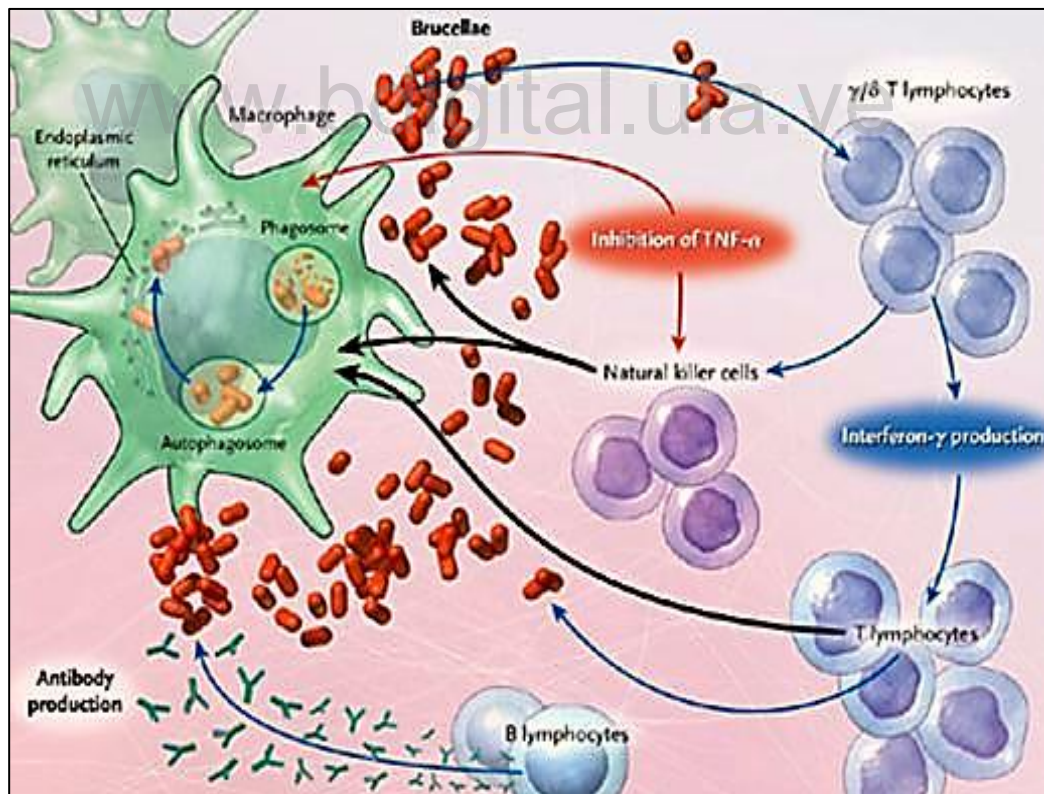


Figura 2. Ingreso de *Brucella* spp en el organismo y la activación de los mecanismos de defensa.

Fuente: Seco et al., 2003.

Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero del mismo modo que ha sido descrito para los neutrófilos, *Brucella* spp es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel preponderante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (Seco et al., 2003).

Estructura antigénica de *Brucella* spp

Estructura externa

La membrana externa de *Brucella* spp es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina. Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O (Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997). En la figura 3 se muestra la membrana externa de la pared celular de *Brucella* spp.

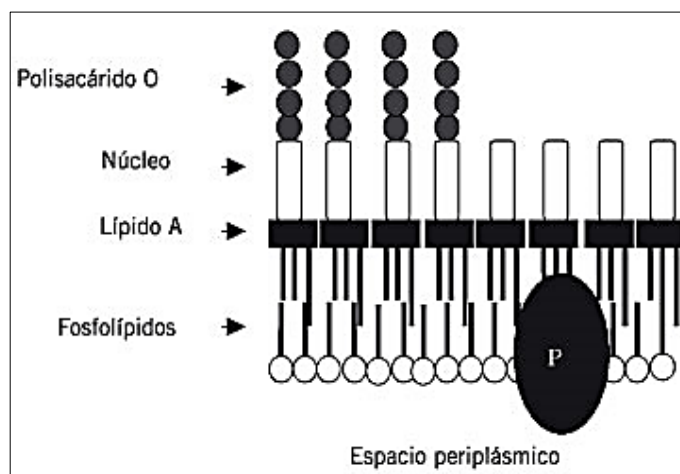


Figura 3. Membrana externa de la pared celular de *Brucella* spp.

Fuente: Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997.

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S pero no en el del LPS-R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido-D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: a 1-2 o a 1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de las biovariedades (ver figura 4) (Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997).

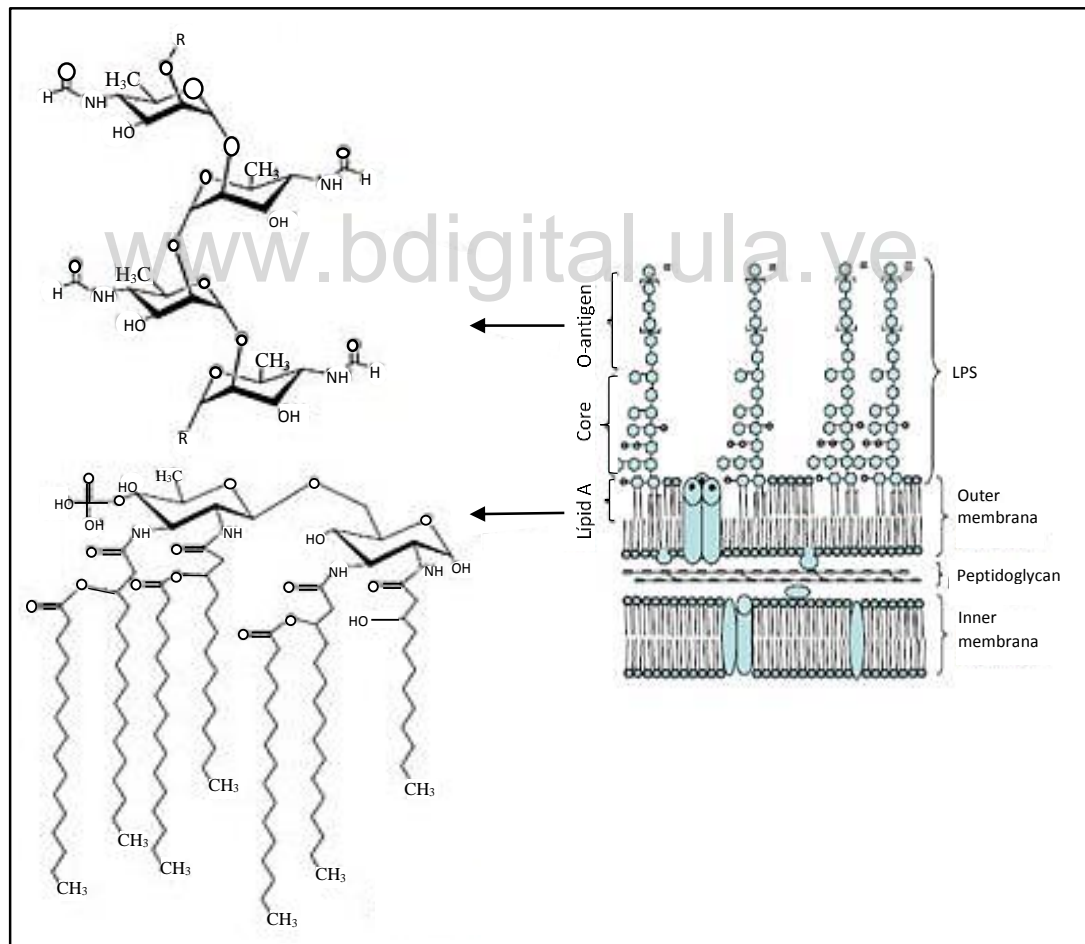


Figura 4. Estructura esquemática del LPS de *Brucella* spp.

Fuente: Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997.

Brucella spp contiene otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo. Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas (Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997).

Estructura interna

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* spp son específicas de ese género y la mayoría son compartidas por todas las especies. Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termorresistente, una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección y la proteína periplásmica BP26. Todas estas proteínas forman parte de un antígeno denominado CP. Los mutantes rugosos carecen de quinovosamina y por tanto, de la cadena O (antígeno) del LPS (Michaux, Bourg, Jumas, Guigue y Allardet, 1997).

Cepas de *Brucella* spp

En relación a las enfermedades producida por bacterias del género *Brucella* spp, se encuentra la brucelosis, siendo una enfermedad infecciosa de distribución mundial, que ataca a varias especies de mamíferos, dentro de los cuales se encuentra el hombre, en el cual produce un cuadro febril inespecífico, llegando a ser una enfermedad que se autolimita o se vuelve crónica. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la

manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso) (Fernández y Gómez, 2009).

La incidencia de la brucelosis puede variar desde valores inferiores a 0,01/100.000 habitantes en los países desarrollados hasta cifras superiores a 200/100.000 habitantes en los países menos desarrollados. La distribución geográfica de la brucelosis humana está en estrecha relación con la distribución de la brucelosis animal. A nivel mundial se han reportado en humanos más de 800 millones de casos y un 2% de la misma cifra mueren al año; en animales se reportan alrededor de 1600 millones de casos de los cuales, un 20% de esta cifra mueren al año (Tan, 2011).

El género *Brucella* spp incluye seis especies diferentes, las cuales se han diferenciado en base a sus características antigénicas y su hospedador animal preferencial clasificándose habitualmente como lisas (S) o rugosas (R), dentro de las primeras se encuentran: *B. melitensis* (oveja, cabra, camello, hombre); *B. abortus* (ternera, búfalo, camello, yak, hombre); *B. suis* (cerdo, liebre, reno, roedor, caribú); *B. neotomae* (roedores) y dentro de las segundas: *B. canis* (perro) y *B. ovis* (ovejas) (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009; Fernández y Gómez, 2009).

Las cepas en fase lisa (S), poseen el S-LPS que está constituido de un lípido A, formado de diferentes ácidos grasos; una región central (núcleo) que contiene el ácido 2-ceto 3-desoxioctulosónico, glucosa, manosa y quinovosamina; y una cadena O, proyectada hacia el exterior de la membrana externa, constituida de un homopolímero de alrededor de 100 unidades de 4-formamido-4,6-didesoximannosa (perosamina). Las cepas con epitopo A dominante (*B. abortus* bv. 1) contienen un polímero de cinco perosaminas unidas por ligadura α -1,2 y con una cierta proporción (dependiendo de la cepa), de unidades ligadas por unión α -1,3; mientras que las cepas que son M dominante (*B. melitensis* bv. 1), presentan unidades repetidas de un pentasacárido constituido de una perosamina unida por ligadura α -1,3 y cuatro unidas por ligadura α -1,2. Las diferentes ligaduras influyen en la forma del epitopo del LPS, así el tipo A

dominante tiene forma de barra mientras que el tipo M dominante es retorcido (rizado) (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009; Fernández y Gómez, 2009).

La semejanza estructural que existe entre las cepas A y M tiene gran importancia práctica, ya que, al inocular una cepa de *B. abortus* en un animal de experimentación, el antisuero obtenido, reaccionará principalmente con cepas A dominante, con A/M y en menor grado con M dominante, lo que significa que, reaccionará en diferente magnitud, con todas las especies de *Brucella* en fase lisa (*B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*), a menos que el antisuero sea absorbido con suspensiones de *B. melitensis* para eliminar los epitopos M y obtener un suero A monoespecífico. En consecuencia, lo mismo sucedería al inocular cualquier cepa de *Brucella*. Hace algunos años se aceptaba la existencia de otros polisacáridos: el hapteno nativo (HN) y el polisacárido B (PB), el primero, aislado de cepas en fase lisa, se deriva del rompimiento hidrolítico del S-LPS, por lo que es estructuralmente indistinguible del polisacárido O. Mientras que el PB, obtenido de la cepa mutante en fase rugosa, *B. melitensis* 115, en una glucana cíclica, serológicamente inactiva a menos que se encuentre asociada a residuos de cadena O. En conclusión los únicos antígenos polisacáridos de importancia serológica en *Brucella* son: los polisacáridos A y M y la forma libre de la cadena O (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009).

Sin embargo se considera que las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Iandau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (ME) (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009).

La especie de *Brucella melitensis* es considerada una de las cepas más importantes en el humano, por consiguiente se dará una breve información sobre esta especie. *Brucella melitensis* presenta un tamaño de (2.100 kpb y 1.150 kpb), kpb equivale a (mil pares de bases y cada par de bases es igual a 3,4 Å). En su mayoría esta especie posee dos cromosomas circulares y presenta biovariedades que puede tener antígeno M (biotipo 1) o antígeno A (biotipo 2) como antígenos dominantes o ambos A y M (biotipo 3) (Tan, 2011).

En su morfología colonial producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidos y coloración ámbar. Son brillantes con luz reflejada, ligeramente opalescentes y de color gris azulado. No llevan a cabo una glicólisis clásica, oxidando parcialmente los azúcares por una vía afín a la de las pentosas, sin embargo, hay diferencias en los perfiles oxidativos de varios pentosas según las especies y biotipos (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009).

Como bien es sabido, el método de diagnóstico más antiguo y aún empleado es la aglutinación, para el cual se emplean suspensiones de células de *B. melitensis* cepa 1119-3 o 99S, en fase lisa, que son las cepas recomendadas por los organismos internacionales de referencia para la elaboración de antígenos, tanto para uso humano como para animales (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009).

La estructura del LPS de cepas rugosas (R-LPS), viene determinada por polisacáridos centrales (Ag R) que aglutinan en pruebas de identificación frente a sueros monoespecíficos anti-R. Su estructura es básicamente similar al S-LPS, excepto por la cadena O, que está ausente o reducida a unos pocos residuos (Tan, 2011; Audic, Lescot, Claverie y Scholz, 2009; Fernández y Gómez, 2009).

Métodos utilizados para la determinación de *Brucella* spp

Se pueden emplear diversas técnicas para la determinación de *Brucella* spp y el estudio de su crecimiento microbiano, mediante los cambios observados en el número total de células, las poblaciones de microorganismos viables o la masa celular. Algunos de estos métodos son:

Métodos directos

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de hemocultivos (Morata et al., 2003; Costa, Guillow y Gari, 1996).

Cultivo

Constituye el método de diagnóstico definitivo, suele obtenerse por hemocultivo o cultivo de médula ósea y, más raramente, por cultivo de líquido cefalorraquídeo, líquido articular, exudado purulento, etc. Cuando aparece crecimiento visible, en la superficie del agar a las 24 h de incubación, se descarta la botella y se toma otro cultivo. *Brucella* spp se desarrolla al cabo de 4-5 días, en algunos casos, es posible observar en la fase sólida pequeñas colonias que se deslizan por el agar en forma que recuerdan las lágrimas de cera resbalando por la vela. Una pequeña proporción de casos presenta el crecimiento entre los 5-15 días, y sólo de forma excepcional, éste se retrasa hasta 6 semanas (Morata et al., 2003).

El género *Brucella* spp, debido a su escasa producción de CO₂, lento crecimiento y baja actividad metabólica, se ha convertido en paradigma para la evaluación de la sensibilidad de estos nuevos sistemas. De ellos se han evaluado de forma conjunta tres: VITAL (bioMerieux), BACTEC (Becton-Dickinson) y BACT/ALERT (Organon Teknika), resultando ser el sistema BACTEC el más eficaz, capaz de detectar la presencia del microorganismo tras 3 a 5 días de incubación (Morata et al., 2003).

Examen microscópico

Una vez observado el crecimiento en el medio difásico o cuando el aparato automático de hemocultivo detecta un posible crecimiento, la simple tinción de Gram permite hacer el diagnóstico presuntivo de la enfermedad. *Brucella* spp presenta unas características tintoriales especiales: aunque no es una bacteria ácido-alcohol resistente, no sufre decoloración con ácidos débiles. Así mismo, también la tinción de gram es peculiar: si el tiempo de exposición al alcohol-acetona es muy breve (simple arrastre por el portal del decolorante, en vez de tiempos de decoloración más prolongados), presenta una decoloración irregular, pudiendo observarse en la misma muestra la coexistencia de pequeños cocobacilos Gram negativos y Gram positivos (Morata et al., 2003).

Subcultivo y aspecto colonial

El subcultivo del medio difásico o del frasco procedente del aparato automático, en medio con agar-sangre o agar-chocolate, muestra el crecimiento, al cabo de 48 horas, de pequeñas colonias brillantes, de diferente tamaño y de color miel claro. Si no se observan cuidadosamente las placas, en casos con crecimiento de escaso número de colonias, se puede falsear erróneamente algún diagnóstico. Tras la tinción de gram de estas colonias para observar su aspecto característico, se realizará la reacción de la oxidasa (positiva) y aglutinación con suero específico frente a *Brucella* spp, suficiente para identificar el aislamiento (Morata et al., 2003; Costa, Guillow y Gari, 1996).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El desarrollo de procesos automatizados ha facilitado la introducción de la técnica de PCR al diagnóstico de laboratorio con aumento creciente de sus aplicaciones, originando así, el desarrollo de numerosos ensayos sensibles y específicos para la detección de patógenos de importancia microbiológica. El control de parámetros químicos como: la concentración de reactivos inorgánicos, de enzimas, de primers y del molde de ADN, o la optimización de parámetros físicos como la temperatura, el número de ciclos, la transferencia de calor entre el termociclador y el tubo de reacción, debe ser correctamente manipulado con el fin de obtener un ensayo diagnóstico eficiente, sensible y específico (Montiel y Lam, 2000).

Debido al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella* spp, se han desarrollado varios métodos que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies y algunos de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación tipo Southern. Se ha desarrollado también una electroforesis en campo pulsante que permite la diferenciación entre varias de estas especies. Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* spp y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la PCR sólo ha tenido una validación limitada para el diagnóstico primario (Bricker y Halling, 2003).

Con el tiempo, se han introducido modificaciones en la prueba denominadas PCR BaSS para mejorar su rendimiento, y se incorporaron más cebadores específicos de cepa para la identificación de las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus*. La PCR AMOS y la PCR BaSS son pruebas PCR múltiples en un sólo tubo. La PCR AMOS diferencia *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, y *B. suis* (solo la biovariedad, aunque el resto de las biovariedades serán detectadas por los cebadores eri) hasta el nivel de especie. La PCR BaSS permite la diferenciación de cepas adicionales, en concreto las vacunales S10 y RB51. Sin embargo, otras especies y biovariedades (tales como las biovariedades de *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*) no pueden detectarse mediante las pruebas PCR AMOS o PCR BaSS (Bricker y Halling, 2003).

Métodos indirectos

Las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* spp a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado. Existen numerosas pruebas que están destinadas a detectar no sólo el mayor número de individuos infectados sino al mismo tiempo diferenciar entre infectados y vacunados, así como detectar las reacciones cruzadas (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003).

Aglutinación lenta estándar (MICROMÉTODO)

Es considerada una de las pruebas cuantitativas más antigua y la más utilizada para la determinación de anticuerpos anti-*Brucella* de la clase IgG e IgA (marcadores de infección activa). El antígeno está constituido por células de *B. abortus* 99S a una concentración de trabajo de aproximadamente 0,2%, ajustado a la dilución 1/650 del suero de referencia internacional que contiene 1000UI (Unidades Internacionales). Al ponerse en contacto con los anticuerpos, estos van uniéndose entre sí a las bacterias suspendidas desarrollando la reacción de aglutinación, de esta manera se depositan en

el fondo formando una malla visible (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptoetanol (2-ME)

Es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM. Se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Reacción de huddleson

Es una reacción de aglutinación rápida en placa. Se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Existe una escala de títulos, establecida por convención, que permite la expresión de resultados. Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 3-10% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Prueba Rosa de Bengala (Antígeno Brucelar Amortiguado)

Es una prueba rápida en placa utilizada para determinar la presencia de anticuerpos específicos en suero. El reactivo identifica las aglutininas producidas como consecuencia de la infección de las diferentes especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, y *B. suis*) (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999). El Kit de la casa comercial MICSA fue el utilizado para llevar a cabo esta investigación.

Antígeno tamponado en placa (BPA)

Es otra de las pruebas tamices que se realiza en placa. Se ponen en contacto 80 μ L de suero con 30 μ L de antígeno y se observa la presencia de aglutinación. Antígeno: suspensión de *B. abortus* o *B. melitensis* al 11% con cristal violeta y verde brillante. Anticuerpos: IgM e IgG1 (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Prueba de coombs

Es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos. Se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero anti-especie (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Teixeira y Cloeckert, 2000; Dajer et al., 1999).

Fijación de complemento

Es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional. En la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis. Antígeno: puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson, o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Teixeira y Cloeckert, 2000; Dajer et al., 1999).

Inmunofluorescencia indirecta

Es una prueba de interacción primaria. Se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella* spp. Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título (Teixeira y Cloeckert, 2000).

ELISA

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil; emplea muy pequeña cantidad de suero y da muy buenos resultados aún en presencia de hemólisis (Velikovsky, Cassataro, Giambartolomei, Goldbaum y Estein, 2002; Ruelas y Rosadio, 1999).

ELISA indirecto (ELISA-I)

El antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas. Antígeno: los antígenos pueden ser partículas o estar en forma solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa (Velikovsky, Cassataro, Giambartolomei, Goldbaum y Estein, 2002).

ELISA competitivo (ELISA-C)

Se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epitope O del LPS-S, que compete con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima.

Antígeno: LPS-S. Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes (Velikovsky, Cassataro, Giambartolomei, Goldbaum y Estein, 2002; Ruelas y Rosadio, 1999).

Polarización de fluorescencia (FPA)

Esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche. Los anticuerpos al unirse al antígeno cambian la velocidad de rotación de la molécula. Si se hace incidir un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Antígeno empleado: PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG)

Es una técnica de doble difusión en geles. Se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad. Antígeno: antígeno soluble HS. Anticuerpos detectados: IgG e IgM (Lucero, Escobar, Ayala, Silva y Nielsen, 2003; Dajer et al., 1999).

Biosensores

La búsqueda de programas de calidad y seguridad alimentaria que recojan la necesidad de implementar sistemas de control encaminados a mejorar los sistemas de trazabilidad, es uno de los objetivos más importantes de las empresas agroalimentarias, colocando como prioridad, el desarrollo de métodos de detección, análisis y diagnóstico que sean rápidos, de alta sensibilidad y bajo costo, que permitan rastreos automatizados para un amplio espectro de agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos. En relación a este aspecto, la tecnología de los biosensores ha experimentado un notable avance en los últimos años, específicamente en las áreas de la biomedicina, medioambiental y agroalimentaria, debido a que representa una

importante herramienta de análisis para la detección de microorganismos y otros analitos (Matheus, 2003).

Los biosensores se definen como dispositivos analíticos en los que se integra un elemento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula) o biométrico (PIMs, aptámeros, PNAs), capaz de reconocer un analito o interactuar específicamente con él. Adicionalmente, se integra un elemento transductor, capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que produce el receptor (interacción analito-sensor) y transformarla en una señal fisicoquímica, procesable, cuantificable y almacenable (Wang, 2008).

El primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962, el cual se denominó “Enzyme Electrode”, pero fue en 1977 cuando se desarrolló el primer dispositivo utilizando microorganismos vivos inmovilizados en la superficie de un electrodo sensible a amonio, utilizando para la detección el aminoácido arginina. Este dispositivo fue denominado sensor bio-selectivo. No obstante, se le denominó posteriormente “biosensor”, término utilizado para designar la unión entre un material biológico y un transductor físico. A partir de ese momento se ha incrementado el diseño y las aplicaciones de los biosensores en distintos campos, principalmente en el campo del diagnóstico clínico (con un gran éxito en los biosensores para la glucosa) y más recientemente en los campos medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico y militar (Matheus, 2003).

En 1975 esto se convirtió en una realidad comercial, poniéndose a la venta el primer analizador de glucosa basado en la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en Ohio. Este fue el primer biosensor a la venta de los muchos que se comercializarían más adelante. No tardaron mucho tiempo en desarrollar los electrodos microbianos, un año antes se comenzó a usar transductores térmicos (*thermal enzyme probes*) y los termistores enzimáticos (*enzyme thermistors*). Posteriormente se comenzó a usar los biosensores basados en fibra óptica, que originaron la aparición de los denominados “optados”. Éstos se usaron en un primer momento para la determinación de CO₂ y O₂ (Matheus, 2003).

En 1982, basándose en la utilización de mediadores electroquímicos para favorecer la transferencia de electrones desde el centro redox de una enzima a la superficie del electrodo, se construyó la nueva generación de biosensores electroquímicos. Basándose en esto, se describió la implantación de un biosensor subcutáneo para la determinación de glucosa (Molina, Villavicencio y Fernández, 2009).

En 1987 mediante la utilización de mediadores electroquímicos inmovilizados en electrodos enzimáticos serigrafados se consiguió construir el “bolígrafo” para el seguimiento personal de glucosa en la sangre comercializado por MediSense. Actualmente las compañías Abbott Boehringer Mannheim y Bayer dominan las ventas de este bolígrafo, lo que da lugar a unas ventas del orden de varios cientos de millones de dólares, y está desbancando casi totalmente a los métodos convencionales de medir la glucosa (Keel y Laiz, 2010).

A partir del año 2000 se han diseñado inmunosensores para la determinación de α -1-fetoproteína (AFP); la importancia de la determinación de este compuesto se debe a su interés en diagnósticos clínicos, ya que es empleado comúnmente como marcador de células tumorales. Se diseñaron nuevas estrategias para la preparación de inmunosensores para la detección del antígeno de la Hepatitis B. Actualmente existen multitud de biosensores en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos). Éstos se pueden utilizar en numerosos problemas de la actualidad como el análisis clínico, de alimentos, bebidas, vigilancia del medio ambiente, defensa, seguridad y otras áreas (Keel y Laiz, 2010).

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades fisicoquímicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial o de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica

indicativa de la presencia del analito, la cual es proporcional a la concentración de este en la muestra (Zacco, 2006; Matheus, 2003).

Se debe tener en cuenta que los biosensores no suponen una tecnología de sustitución de las técnicas analíticas convencionales, sino que representan alternativas interesantes para demandas concretas. Frente al carácter general de tecnologías convencionales, los biosensores son específicamente diseñados para la detección y/o cuantificación de uno o pocos analitos, como respuesta a problemas concretos, combinando así las diferentes tecnologías implicadas en los elementos de reconocimiento, los sistemas de inmovilización y los sistemas de transducción de señal (Matheus, 2003).

Características de los Biosensores

Las principales características de los biosensores son:

Alta sensibilidad: para el análisis de ciertos analitos, existen unidades capaces de detectar cantidades inferiores a los límites exigidos por la ley, por ejemplo, en el caso de residuos de plaguicidas.

Alta selectividad: para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares.

Alta fiabilidad: los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados o lo sean mínimamente por la muestra y no tengan problemas de ruidos.

Tiempo de vida largo: que no obligue al empleo del dispositivo tras un corto período de tiempo desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo, si éste se encuentra integrado en la línea de producción de una industria.

Bajo costo de producción: estos sistemas pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un más que considerable abaratamiento de los costos de producción.

Tiempo de análisis corto: que posibilite una actuación rápida, por ejemplo, la retirada de materias primas o productos contaminados o deteriorados antes de su uso o venta o la intervención para corregir algún parámetro en un proceso industrial.

Pretratamiento innecesario de la muestra: supone un ahorro de tiempo, material y reactivo, lo que evita eliminar interferencias y asegurar la presencia de una cantidad suficiente del analito en el pequeño volumen utilizado.

Manejo sencillo: esta tecnología no requiere personal cualificado.

Tiempo real: esta característica es especialmente interesante en el control de procesos, ya que permite controlar los parámetros deseados de forma inmediata y automática.

Automatizables: esta característica permite rescindir del control manual de estas unidades y facilita su integración dentro de los sistemas que monitorizan los procesos industriales.

Miniaturizables: gracias a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos, así pueden ensamblarse varios de ellos en un mismo sistema que realiza varias tareas a la vez y son aplicables a ensayos donde el tamaño físico del dispositivo, el volumen de la muestra o la localización de la medida son factores limitantes.

Pocos requerimientos operativos y de almacenamiento: esta característica permite facilitar el empleo y que no suponga un costo adicional. Los biosensores que incorporan moléculas biomiméticas suelen presentar estas características, el resto pueden necesitar condiciones controladas (pH, temperatura) debido a su baja estabilidad.

Capacidad de multianálisis: esta característica lleva a cabo la determinación de diferentes analitos de forma simultánea. Existe una amplia variedad de biosensores distintos y no todos poseen cada una de las características citadas anteriormente. La combinación de varias de ellas podría situar a muchos de estos dispositivos en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales (Wang, 2008).

Clasificación de los Biosensores

Los biosensores pueden clasificarse en función del tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, el método utilizado para detectar dicha interacción, la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema

de transducción. Existen múltiples elementos de reconocimiento y sistemas de transducción, sin embargo, la elección del material biológico/biomiméticas (elemento de reconocimiento) depende de las características del compuesto o microorganismos a analizar. De igual forma, la escogencia del sistema transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido y el analito, debido a que éstos determinarán cual será la variación en las propiedades fisicoquímicas que ocurra como consecuencia de su interacción (Matheus, Abad y Fernández, 2007; Matheus, 2003).

Tipos de interacción de los Biosensores

Interacción con sensores biocatalíticos

Los sensores biocatalíticos son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual a partir de uno o varios sustratos, se forman uno o varios productos, sin consumo del biocatalizador, el cual se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Este tipo de dispositivos pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, mediante la detección de la desaparición de algún co-sustrato conocido, distinto de aquel que se quiere detectar (Wang, 2008; Gonzáles, García y Ruiz, 2005; Matheus, 2003).

Interacción con sensores de bioafinidad

Estos dispositivos se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin transformación catalítica. Esta interacción origina un complejo analito-receptor sin originar el consumo de sustratos ni generación de productos, por lo cual suele utilizarse un marcaje del receptor o bien de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor (Gonzáles, García y Ruiz, 2005; Matheus, 2003).

Los sensores de bioafinidad son considerados muy útiles en la detección de material genético de microorganismos patógenos o de cualquier tipo de sustancias que puedan

causar una respuesta inmune, permitiendo el uso de técnicas inmunológicas en la fabricación de los denominados inmunosensores. Entre los distintos tipos de receptores de bioafinidad se pueden encontrar anticuerpos, lectinas, receptores, células completas, ácidos nucleicos, polímeros de impresión molecular (PIMs), aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) (González, García y Ruiz, 2005; Matheus, 2003).

Detección de la interacción

En algunos sensores de bioafinidad se utiliza un sistema de detección indirecta, donde una enzima acoplada origina una reacción biocatalítica complementaria que es la que se detecta por el sistema de transducción. También es posible el uso de un sistema de detección directa, que permita medir la interacción entre el receptor y el analito basándose en los cambios que se producen en la masa de la superficie, en las propiedades de la luz, etc. (Wang, 2008; González, García y Ruiz, 2005; Matheus, 2003).

www.bdigital.ula.ve

Elemento de reconocimiento

Enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. La estabilidad de las enzimas es un factor limitante para el tiempo de vida de un biosensor de tipo enzimático y se utilizan distintas técnicas para mantenerla, como estabilización química y/o inmovilización (González, García y Ruiz, 2005).

Orgánulo, tejido o célula completa

En algunos casos, se utiliza como elemento biológico de reconocimiento una célula completa, que posee múltiples sistemas multienzimáticos en su medio natural. Pueden ser células bacterianas, fúngicas, protozoos o células procedentes de organismos

superiores que pueden ser viables o no viables. De igual forma, se pueden utilizar células modificadas genéticamente que expresen enzimas determinadas que no expresen normalmente o que posean una actividad catalítica mayor (González, García y Ruiz, 2005).

Anticuerpos

Un anticuerpo es una proteína que se une de manera selectiva a una molécula complementaria denominada antígeno (analito). Existen anticuerpos policlonales y monoclonales. Los policlonales son poblaciones diversas y complejas de anticuerpos que reconocen diferentes regiones del antígeno, mientras que los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas que poseen la misma especificidad. Los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor especificidad que los monoclonales, de modo que en función de que característica se quiera potenciar, se elegirán unos u otros. La afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo determina la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de regeneración (González, García y Ruiz, 2005).

PIM, PNA, Aptámero

Los polímeros de impresión molecular o PIM son matrices sintetizadas artificialmente que presentan la capacidad de reconocer e interactuar de forma específica con determinados compuestos. Por otra parte, los ácidos nucleicos peptídicos o PNA (por sus siglas en inglés) son otro tipo de moléculas sintéticas o biomiméticas semejantes al ADN-ARN. Diferenciándose de los ácidos nucleicos, ya que estos no contienen pentosas ni grupos fosfatos (González, García y Ruiz, 2005).

Por último, los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos (ADN o ARN) de cadena sencilla sintetizada artificialmente, capaz de reconocer diversas moléculas diana con una afinidad y especificidad elevadas. Estas moléculas biomiméticas se asemejan a los anticuerpos, debido a que se pliegan en el espacio y adquieren una

conformación con determinadas regiones a las que puede unirse al analito (González, García y Ruiz, 2005).

Sistema de transducción

El sistema de transducción o transductor es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas, que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. En líneas generales los biosensores que han sido diseñados para detectar microorganismos patógenos, están combinados con transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos y nanomecánicos. Sin embargo, la elección del sistema transductor depende de la naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y la especie de interés (González, García y Ruiz, 2005).

Técnicas electroquímicas

En relación a los biosensores, uno de los transductores más utilizados son los electroquímicos. Estos dispositivos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica, que brinda información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica. Existen cuatro tipos de técnicas electroquímicas: conductimétricas, potenciométricas, amperométricas e impedimétricas, estas se diferencian en función de la detección de cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia, respectivamente (González, García y Ruiz, 2005).

Entre las técnicas electroquímicas amperométricas se destacan las voltamétricas; estas técnicas consisten en la aplicación de un potencial eléctrico a un electrodo, denominado electrodo de trabajo, el cual se encuentra sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva (analito). La intensidad eléctrica que circula por este electrodo es medida en función del potencial aplicado y de la concentración de la

especie electroactiva presente. La respuesta en corriente depende del proceso electroquímico, de las condiciones hidrodinámicas y del potencial aplicado (Vásquez, 2007; Gonzáles, García y Ruiz, 2005).

Existen diferentes técnicas voltamétricas que se diferencian básicamente en función del potencial que se le aplica al electrodo de trabajo, entre estas se pueden mencionar:

1. Voltametría de Barrido Lineal
2. Voltametría Cíclica (VC)
3. Voltametría de Pulso Normal
4. Voltametría de Pulso Diferencial
5. Voltametría de Onda Cuadrada

En esta investigación se utilizó la voltametría cíclica, por lo tanto se dará una breve información sobre esta técnica.

Voltametría cíclica (VC)

Se puede definir como una técnica electroquímica caracterizada por la aplicación de un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir realizando lo que se denomina barrido triangular de potencial. Este barrido de potencial se inicia en un valor inicial (E_1) hasta un valor final o de corte (E_2), y al llegar a éste, el sentido del barrido se invierte (Vásquez, 2007). En la figura 5 se muestra la función triangular potencial-tiempo.

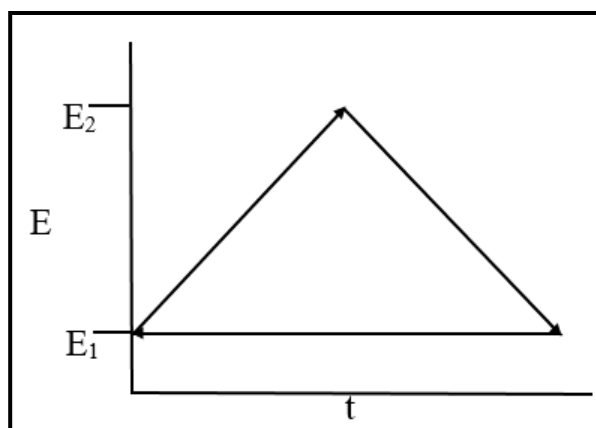


Figura 5. Función triangular potencial-tiempo.

Fuente: Vásquez, 2007.

En los ciclos, el barrido de potencial puede ser iniciado en cualquier sentido (anódico o catódico). Considerando que el barrido se inicia en el sentido anódico (reacción de oxidación), al alcanzar el valor adecuado de potencial para que comience la reacción de oxidación, potencial de pico anódico (E_{pa}), la corriente aumenta notablemente hasta alcanzar un valor máximo, corriente de pico anódico (I_{pa}). Posteriormente, la especie que reacciona es consumida en la superficie del electrodo lo que ocasiona una caída en la corriente de oxidación a medida que se aumenta el potencial (Vázquez, 2007; Pavoni, Cobas, Zayas y Álvarez, 2006).

No obstante, en la VC no siempre se generan picos sino que pueden evidenciarse ondas. Además se puede identificar el potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico ($E_{p/2}$), este parámetro nos permite definir la forma de un pico voltamétrico, como también ayuda a determinar la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso electroquímico entre el pico de corriente anódica y el pico de corriente catódica, así como las zonas de control cinético (Z_c), control mixto (Z_m) y control difusional (Z_d) (Nicholson y Shain, 1964; Randles, 1952; Kolthoff y Tomsicek, 1935). En la Figura 6 se muestra la respuesta de un voltamograma cíclico.

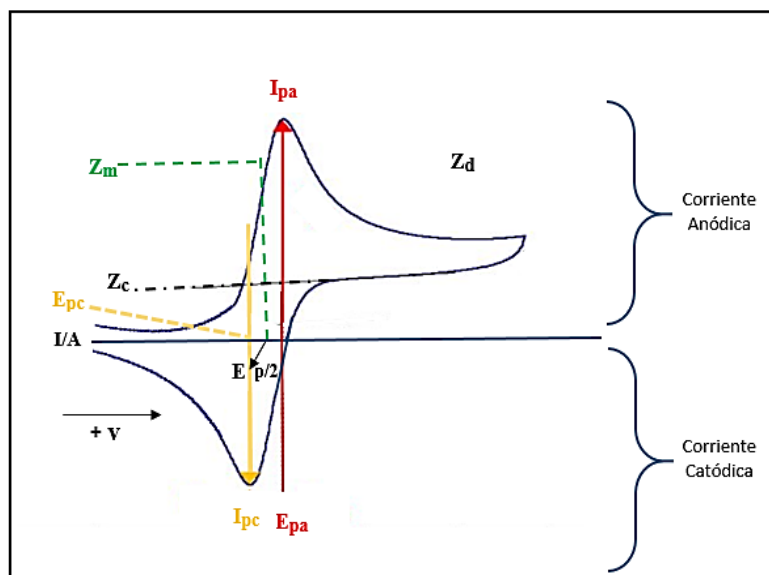


Figura 6. Respuesta de la voltametría cíclica.

Fuente: Nicholson y Shain, 1964; Randles, 1952; Kolthoff y Tomsicek, 1935.

Entre las ventajas que ofrece la VC se encuentra la posibilidad de caracterizar el sistema electroquímico, estimar el potencial redox de dicho sistema, proporcionar información acerca de la velocidad de transferencia electrónica entre el electrodo y el analito, estudiar la estabilidad del analito en sus diferentes estados de oxidación, diagnosticar la presencia del analito de interés presente en una solución electrolítica y resaltar las características del electrodo de trabajo. Se le puede considerar una técnica de diagnóstico, ya que a través de ella se pueden fijar varios parámetros físicos y químicos, necesarios para el estudio con otras técnicas electroquímicas de mayor sensibilidad (Matheus et al., 2009).

Técnicas de inmovilización

Una etapa fundamental en la construcción de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre una membrana o matriz, que a su vez se fija a la superficie del transductor. En este aspecto, se han diseñado una serie de técnicas de inmovilización físicas y químicas con el fin de lograr la inmovilización correcta del componente biológico (elemento de reconocimiento) y a su vez la detección adecuada del analito. Es por ello que la técnica de inmovilización elegida debe ser específica y controlada. La elección de uno u otro procedimiento de inmovilización depende de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor, las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor (Matheus, 2003).

Adicionalmente, un elemento muy importante en el desarrollo de un biosensor es la integración del elemento de reconocimiento al electrodo con el fin de conseguir una comunicación óptima entre ambos componentes. Sin embargo, “un método de inmovilización ideal debería dar lugar a un recubrimiento controlado de biomoléculas unidas específicamente, reversiblemente y en determinadas circunstancias orientadas a voluntad” (Matheus, Abad y Fernández, 2007).

La reversibilidad de la unión del elemento de reconocimiento al transductor permite la sustitución de moléculas inactivas por otras nuevas activas; la especificidad, permite la inmovilización selectiva de una molécula determinada entre las presentes en una

mezcla compleja evitando las purificaciones previas; la inmovilización orientada, elimina los impedimentos estéricos para la accesibilidad del analito, exponiendo el sitio de unión del mismo (Matheus, Abad y Fernández, 2007).

Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y muchas otras aplicaciones. De acuerdo a sus ventajas se destacan: mejora de la estabilidad de la enzima frente al pH, temperatura, disolventes, contaminantes e impurezas; la posible reutilización del derivado; la capacidad de detener rápidamente la reacción mediante la eliminación de la enzima a partir de la solución de reacción o viceversa, y por último, la fácil separación de la enzima a partir del producto (Arroyo, 1998; Bergveld, 1986).

Inmovilización de microorganismos

Los procesos biológicos que involucran el uso de microorganismos como bacterias, hongos o algas con capacidad para degradar y/o atrapar sustancias tóxicas, han sido utilizados para la bioremediación de sitios contaminados debido principalmente a su bajo costo. La aplicación de la inmovilización en estos microorganismos presenta las siguientes ventajas: mayor resistencia a concentraciones altas de compuestos tóxicos, incremento en la actividad catalítica y la formación de microambientes (Arroyo, 1998).

Inmovilización de inmunoagentes

Existen dos tipos de inmunosensores: aquellos que en forma directa explotan una variación de un parámetro como resultado de un acoplamiento inmunológico y aquellos que recurren a una enzima para liberar un producto, o consumir un cosustrato, que es detectable por un transductor. Dentro de estos inmunoagentes se encuentran:

Anticuerpos: el objetivo de inmovilizar un anticuerpo en un transductor es detectar el antígeno correspondiente. Los anticuerpos tienen estructuras proteicas y pueden ser inmovilizados de la misma forma que las enzimas, en forma directa o usando membranas. En esta investigación realizaremos este tipo de inmovilización.

Antígenos: los antígenos no siempre poseen estructuras proteicas como para inmovilizarlos en la misma forma que los anticuerpos o las enzimas, siendo este el motivo por el que se unen a portadores iónicos se unen a portadores iónicos.

Compuestos con bioafinidad: pueden usarse para preparar proteínas complejas por procesos similares al acoplamiento inmunológico. Los compuestos se inmovilizan usando membranas obtenidas por copolimerización de 1,8-diamino-4-amino-metiloctano con triacetato de celulosa (Arroyo, 1998; Bergveld, 1986).

Inmovilización de tejidos y organelas

Se corta un trozo de tejido animal o vegetal que se inserta entre dos membranas semipermeables que luego se adjuntan al transductor. El transductor generalmente es un electrodo de O₂, CO₂ o NH₃ los cuales tienen su propia membrana hidrofóbica permeable a un gas. Los tejidos animales pueden ser de hígado de conejo o bovino, músculo o mucosa intestinal de conejo, entre otros (Bergveld, 1986).

Inmovilización de quimiorreceptores

Los quimiorreceptores se adhieren en su estado natural a un electrodo potenciométrico para crear sensores llamados “receptores”. De esta forma pueden crearse neuroreceptores para medir toxinas y otros agentes químicos (Arroyo, 1998).

Inmunosensores

Los inmunosensores o biosensores inmunológicos son sensores químicos con una especie inmunológica como elemento de reconocimiento. Están compuestos por la combinación de un bioreceptor como componente biológico y un transductor como

método de detección. Estos dispositivos son capaces de dar una señal analítica a partir de la formación del complejo inmunológico (unión antígeno-anticuerpo), por tanto, la especificidad y afinidad de esta interacción determinan la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de su regeneración (ver figura 7). Los inmunosensores tienen un gran potencial en medicina debido a la especificidad de las reacciones inmunológicas. Estos biosensores se usan para medir drogas y para determinar la hormona HCG para el diagnóstico de embarazo, α -fetoproteína para la identificación de cáncer, y el antígeno de superficie de hepatitis B (Zacco, 2006).

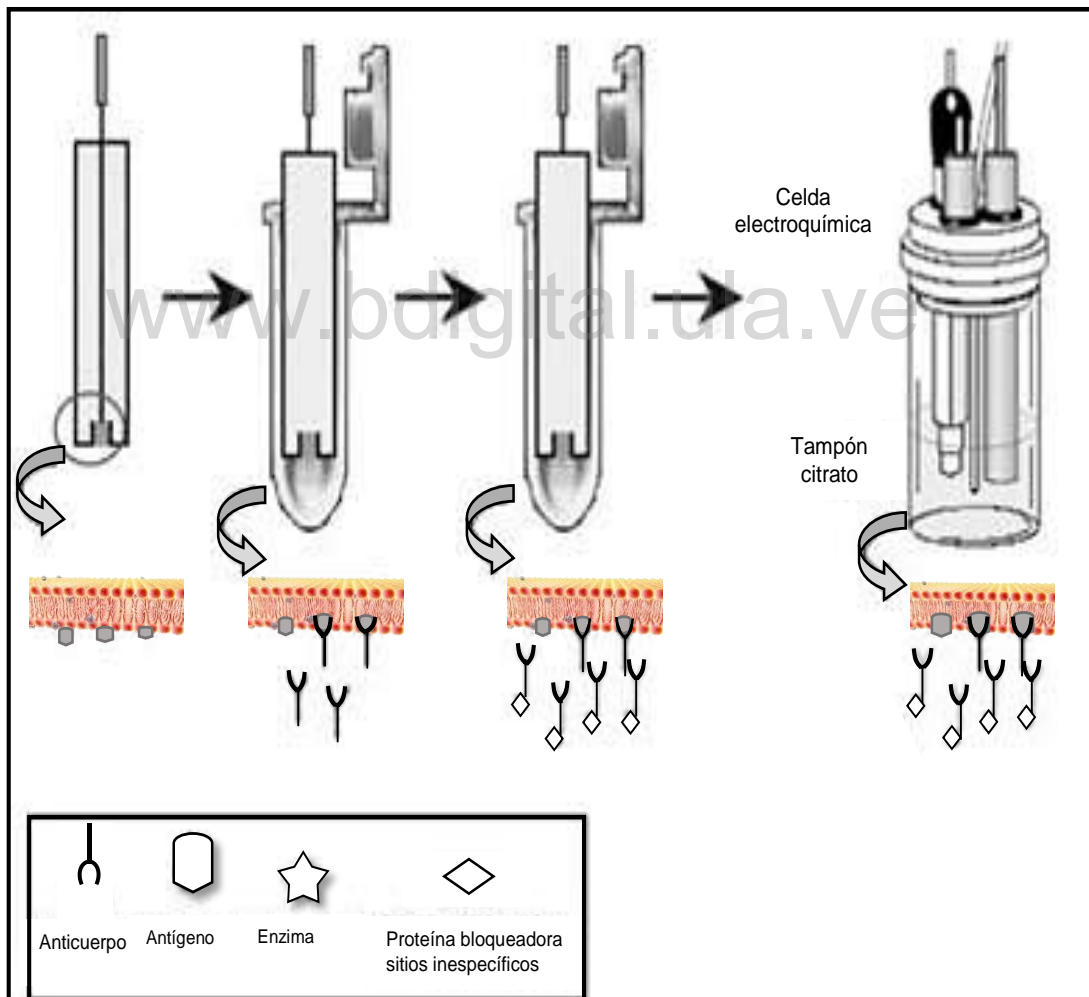


Figura 7. Diseño de un inmunosensor y la detección de microorganismos.

Fuente: Zacco, 2006.

Por otro lado, gran número de inmunosensores no trabajan en condiciones de total reversibilidad, son difíciles de miniaturizar o no presentan la configuración electrónica adecuada para ser utilizados in-situ masivamente. Los distintos inmunosensores pueden ser clasificados en función de la naturaleza física del transductor. De este modo existen inmunosensores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos o magnéticos (Zacco, 2006).

Los componentes del complejo inmunológico, fundamento de los inmunosensores, son el antígeno y el anticuerpo. Los antígenos son agentes externos (virus, bacterias, parásitos, etc.) que generan la activación del sistema inmunológico y consecuentemente la formación de anticuerpos que inhiben o neutralizan la acción del antígeno en el organismo (Zacco, 2006).

Las ventajas que poseen los inmunosensores frente a las técnicas clásicas de diagnóstico y otros biosensores provienen de la proximidad del material biológico y el transductor, lo cual permite obtener una mayor sensibilidad, generar una señal medible en un menor tiempo de reacción, simplificar el proceso de análisis, intervenir en la posible regeneración del inmunosensor, en la posibilidad de su miniaturización y en su uso en trabajos de campo (Zacco, 2006).

Enfermedades microbianas de transmisión alimentaria

Las enfermedades transmitidas por alimentos, mejor conocidas por sus siglas como ETAS, se refieren a cualquier enfermedad causada por la ingestión de un alimento contaminado que provoca efectos nocivos en la salud del consumidor (Calero, Esteban y Rodríguez, 2011).

Las enfermedades microbianas son las más conocidas y son causadas por bacterias o virus que ingresan al organismo a través de los alimentos, causando trastornos metabólicos en el organismo de quien los consume y una inflamación de los tejidos gastrointestinales. El cuadro clínico varía dependiendo del patógeno en específico, sin embargo por lo general se presentan trastornos en síntomas gastrointestinales debido a

la inflamación del tejido que recubre el tracto digestivo; dentro de esta categoría se pueden mencionar:

1. *Salmonella* sp, bacteria causante de la salmonelosis.
2. *Cryptosporidium*, causante de la criptosporidiasis intestinal.
3. *Listeria monocytogenes*, bacteria causante de la listeriosis.
4. ***Brucella* spp**, bacteria causante de la brucelosis.
5. *Cyclospora cayetanensis*, causante de la ciclosporiasis.
6. *Escherichia coli* O157:H7, causante de la colitis hemorrágica.
7. *Clostridium botulinum*, causante del botulismo.
8. *Campylobacter jejuni*, causante de la campilobacteriosis (Calero, Esteban y Rodríguez, 2011).

Operacionalización del evento

Tabla 2: Operacionalización del evento

Evento	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Biosensor electroquímico	Un sensor electroquímico es un dispositivo que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él. Estos dispositivos son capaces de dar una señal analítica a partir de la formación del complejo inmunológico antígeno-anticuerpo, siendo llamado inmunosensor (Jerome, 1991).	Diseño y preparación del biosensor para la detección de <i>Brucella</i> spp	Inmovilización de anticuerpo Voltametrías Cíclicas Especificidad	Tiempo de incubación Potencial vs. Corriente Selectivo a <i>Brucella</i> spp

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber. Pues, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identifica el tipo de investigación, que pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Particularmente, la investigación de tipo proyectiva se lleva a cabo en base a los resultados de un proceso investigativo que consiste en la elaboración de una propuesta, un plan, un programa o un modelo, como solución a un problema o necesidad de tipo práctico, a partir de un diagnóstico preciso de las necesidades del momento y de las tendencias futuras. En tal sentido, esta investigación es proyectiva, ya que se diseñó un inmunosensor electroquímico para la detección de *Brucella spp* en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*.

Diseño de la investigación

El diseño de investigación según lo refiere Hurtado (2010) se define con base al objetivo. Hace referencia a dónde y cuándo se recopila la información, así como la amplitud de la información a recopilar, de modo que se pueda dar respuesta a la pregunta de investigación de la forma más idónea posible. Para el presente trabajo de grado de acuerdo al dónde, el diseño es de laboratorio, pues la parte de preparación y manipulación del biosensor se realizó en el Laboratorio de Electroquímica de la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. De igual forma la bacteria se encontraba en kit en el Departamento de Bioanálisis Clínico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Respecto al tiempo de activación y recolección de la bacteria así como de preparación y optimización de parámetros del biosensor, este estudio fue contemporáneo, ya que se trabajó durante el periodo de desarrollo de la investigación, y longitudinal, pues la muestra de la bacteria se tomó en distintos momentos de la investigación, tomando en cuenta que su tiempo de vida a temperatura ambiente es de aproximadamente 24 horas.

Población y muestra

Unidad de investigación

La población, o también llamada población objetivo, es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes (Arias, 2006). La presente investigación estuvo delimitada por el problema y por el objetivo general de esta investigación. De tal modo, este estudio estuvo representado por la manipulación de la bacteria *Brucella* spp proporcionado por la profesora Ángela Lugo del Departamento de Bioanálisis Clínico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y los experimentos realizados en el Laboratorio de Electroquímica en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes desde el mes de octubre del 2018 hasta el mes de mayo del 2019, con la colaboración de ambos laboratorios para la realización del estudio, tomando en cuenta el cumplimiento de los criterios de inclusión tales como: manipulación de la bacteria *Brucella* spp y la preparación de los electrodos.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra se define como una parte o subconjunto de la población. Va a ser representativa que se extraiga de la población accesible (Balestrini, 2001; Arias, 2006).

Cuando se trata de una muestra no probabilística como en esta investigación, la muestra representa el total de la población.

Procedimientos de la investigación

Diseño y preparación del Biosensor para la detección de *Brucella spp*

En la actualidad, son requeridas técnicas sensibles, rápidas y económicas cuyo resultado sea utilizado como alarma para la detección de algunos microorganismos. La detección inmunológica de bacterias, virus, parásitos y toxinas ha demostrado ser más sensible, específica y reproducible, debido en gran parte a la producción de anticuerpos específicos de manera rápida y económica. En este aspecto, el desarrollo de biosensores, específicamente inmunosensores, ha favorecido la detección de diversos microorganismos en el área alimentaria, bioanalítica y medioambiental (Zacco, 2006).

Por consiguiente, el diseño de los inmunosensores se basó en una serie de pasos que permiten la detección de los microorganismos de interés; estos pasos implican:

1. Selección y Preparación del Transductor.
2. Selección del Bioreceptor Inmunológico (anticuerpo o antígeno).
3. Inmovilización del Bioreceptor Inmunológico en la superficie del Transductor.
4. Transducción del evento de Bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo).

Selección y preparación del transductor

Como principales criterios de selección del transductor electroquímico se consideraron aspectos fundamentales como el comportamiento electroquímico del material y su capacidad para inmovilizar el Bioreceptor (anticuerpo o antígeno) preservando su estructura y su función biológica (Zacco, 2006).

Para esta investigación se seleccionó como material transductor un electrodo de hilo de oro 99,99% de pureza 0,50 mm de diámetro y 15 mm de longitud. Este tipo de material ha sido utilizado ampliamente para inmovilizar inmunocomplejos debido a su

gran capacidad de absorber moléculas que contengan compuestos con azufre, nitrógeno y oxígeno, y posteriormente, sobre este electrodo modificado, se inmoviliza el material biológico. Adicionalmente, se seleccionó como electrodo auxiliar o contra electrodo un hilo de platino con 99.99% de pureza y un electrodo de referencia Ag/AgCl en solución saturada de KCl 3M (Matheus, Sánchez, Navarro, Pacheco y Belandria, 2018; Matheus, Abad y Fernández, 2007; Sánchez, 2007; Jung, B., Jung, S., y Kweon, 2005).

Preparación de los electrodos de oro

Para la preparación de las superficies de oro, se realizaron limpiezas con diferentes lijas (desde la más gruesa hasta la más fina), se pulieron con gamma-alúmina 3 (0,05 micrón) y seguidamente se lavaron con agua bidestilada dejándolas secar al aire. Finalmente se realizó una limpieza electroquímica mediante voltametría cíclica en H₂SO₄ 0,5 M a 100 mV/s y ventana de potencial desde +0,6 V hasta +1,6 V.

Selección del bioreceptor inmunológico

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. En la práctica, la elección del material biológico depende de las características del compuesto a analizar (González, García y Ruiz, 2005).

En este trabajo se planteó la detección de *Brucella* spp mediante el diseño y la preparación de un inmunosensor electroquímico, donde se eligió como elemento de reconocimiento una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos contra *Brucella*.

Inmovilización del bioreceptor inmunológico en la superficie del transductor

En la preparación de los biosensores, existen diversas técnicas de inmovilización de elementos de reconocimiento, sin embargo, en el caso específico de los inmunosensores es necesaria una inmovilización que oriente adecuadamente al

elemento de reconocimiento para realizar su función biológica, lo que garantiza sensibilidad y selectividad en el inmunoensayo y la posterior orientación del antígeno o el anticuerpo, según sea el caso, para lograr la reacción de bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo). Por tanto, la inmovilización debe estar orientada a lograr la mejor interacción específica del tipo ligando-receptor (Matheus, Sánchez, Navarro, Pacheco y Belandria, 2018; Matheus, Abad y Fernández, 2007; Zacco, 2006).

En este trabajo se realizó la inmovilización del bioreceptor inmunológico (anticuerpo específico contra *Brucella* spp) en la superficie del electrodo modificado mediante la formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro. Para formar las monocapas orientadas y ordenadas sobre la superficie del metal, se planteó el uso de compuestos anfifílicos con átomos de azufre en uno de sus extremos y grupos aminos en el otro.

Al unir los átomos de azufre a la superficie de oro, el extremo con los grupos aminos de la molécula anfifílica queda libre para fijar el fragmento constante (Fc) de los anticuerpos conformados por los grupos carboxílicos del anticuerpo. De esta forma, se planteó inmovilizar el elemento de reconocimiento mediante la preparación de monocapas autoensambladas de tioles sobre superficie de oro. Esta metodología permite exponer al medio, ligando con afinidad específica (anticuerpos) por un analito particular (antígeno), proporcionando una estructura molecular ordenada bidimensional que se obtiene tras la quimisorción oxidativa de tioles sobre superficies de oro, la cual permitió la inmovilización de los anticuerpos que interaccionaron con el antígeno (Matheus, Sánchez, Navarro, Pacheco y Belandria, 2018; Matheus, Abad, Belandria, Fernández y Fernández, 2008; Matheus, Abad y Fernández, 2007).

Formación de monocapa de tioles (SAMs)

Para la formación de las monocapas autoensambladas de tioles se utilizó la tiourea (compuesto tiolado con un átomo de azufre). Una vez que los electrodos de oro fueron limpiados, se sumergieron durante 24 horas en una disolución 5 mM de tiourea preparada en etanol-H₂O (2:1) (ver figura 8) (Sánchez, 2007; Matheus, 2003).

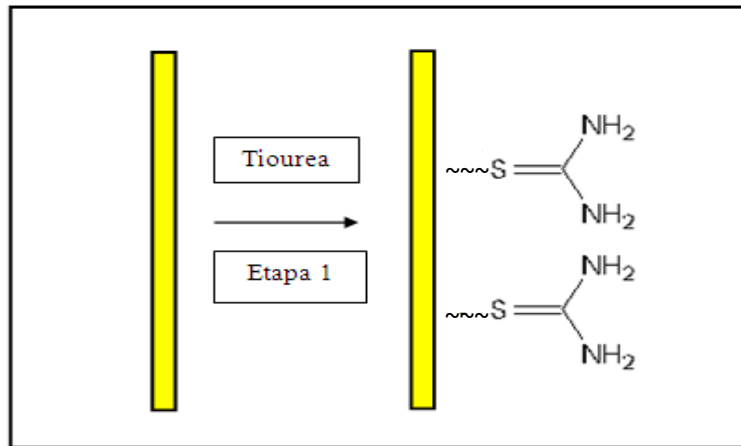


Figura 8. Formación de una monocapa de tiourea (SAM/TOU).

Fuente: Hernández, 2014.

Inmovilización de los anticuerpos contra *Brucella* spp

Para la inmovilización del elemento de bioconocimiento se incubaron los electrodos de oro modificados con tiourea en disoluciones de anticuerpos contra *Brucella* spp (ver figura 9). La inmovilización se manifestó por un aumento en las I_{pa} e I_{pc} , lo cual es indicativo de la presencia de Ac^+ anti-*Brucella* (Hernández, 2014). En nuestro caso trabajamos con 2 kit de la casa comercial MICSA/MÉXICO.

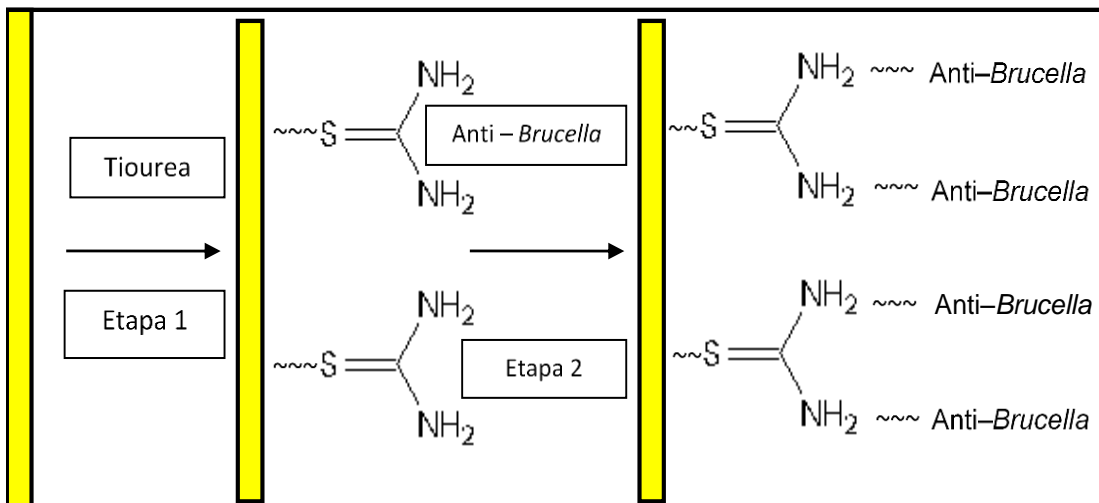


Figura 9. Inmovilización de los anticuerpos contra *Brucella* spp.

Fuente: Hernández, 2014.

Transducción del evento de bioreconocimiento

El sistema de transducción del inmunosensor diseñado para esta investigación, se basó en técnicas amperométricas específicamente las voltamétricas. Una vez que se modificaron los electrodos y antes de medir la respuesta de *Brucella* spp en las soluciones acuosas contaminadas *in vitro*, se revisaron las condiciones de trabajo con respecto a pH, ventana de potencial, velocidad de barrido, utilizando para ello el kit (MICSA S.A DE C.V/MÉXICO).

Luego de la revisión de los parámetros, se realizaron Voltametrías Cíclicas para comprobar la inmovilización del anticuerpo positivo y negativo anti-*Brucella* y la posterior detección del antígeno Brucelar Amortiguado. En la figura 10 se presenta el diseño metodológico utilizado en la fabricación del biosensor para la detección de *Brucella* spp.

www.bdigital.ula.ve

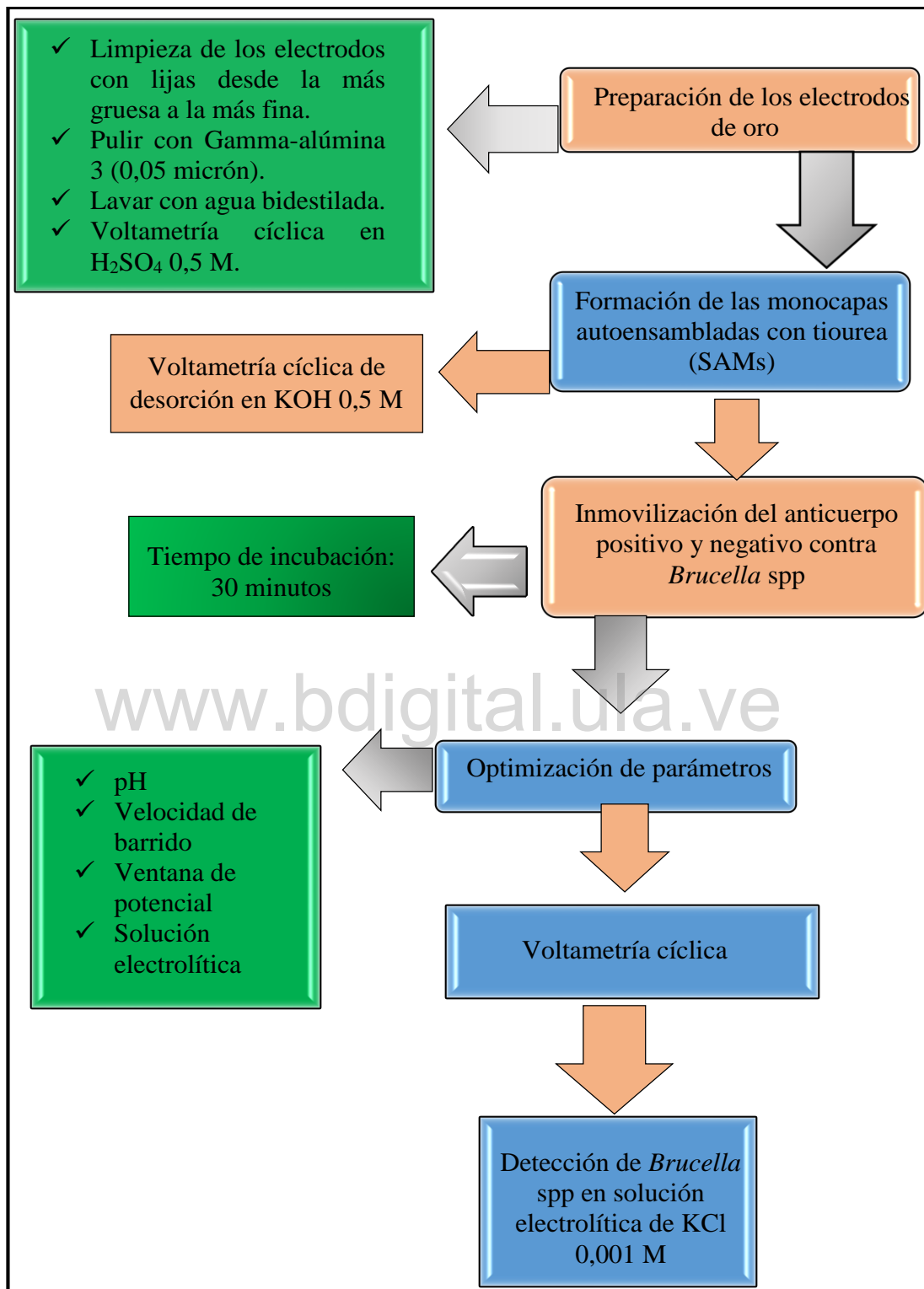


Figura 10. Diseño metodológico para la fabricación de un inmunosensor para la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*.

Materiales

Celda electroquímica

Se utilizó un celda construida en vidrio que consta de un sólo compartimiento, en donde se ubicaron los tres electrodos y la solución electrolítica. Esta celda fue conectada a un potencióstato.

Electrodos

Se utilizaron tres electrodos:

1. Electrodo de trabajo: un hilo de oro con 99,99% de pureza, de 0,50 mm de diámetro y una longitud de 15 mm.
2. Electrodo auxiliar (contraelectrodo): electrodo de platino con 99,99% de pureza.
3. Electrodo de referencia: electrodo Ag/AgCl en solución saturada de KCl 3 M.

Reactivos

Tiourea 5mM

Se preparó a partir del compuesto comercial (Merck, 99% de pureza), disolviendo 0,002 g. en 5mL de solución etanol-agua (2:1).

Antígeno y anticuerpo contra *Brucella* spp

Se utilizó el anticuerpo del kit (MICSA/MÉXICO) como control positivo, diagnóstico de brucelosis como control negativo y el antígeno Rosa de Bengala (antígeno Brucelar Amortiguado).

Soluciones electrolíticas

Cloruro de potasio (KCl) 0,1 M

Se preparó a partir del compuesto comercial (Anala R, 99,8% de pureza), disolviendo 0,75 g. hasta completar 100mL con agua bidestilada.

Cloruro de potasio (KCl) 0,01 M

Se preparó a partir de la solución de KCl 0,1 M tomando de ésta 5mL y llevándolos con agua bidestilada hasta 50mL.

Cloruro de potasio (KCl) 0,001 M

Se preparó a partir de la solución de KCl 0,1 M tomando de ésta 1mL y llevándolos con agua bidestilada hasta 100mL.

Otras soluciones

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M

Se preparó a partir del compuesto comercial (Sigma-Aldrich, 96-98% de pureza) diluyendo 6,9mL hasta completar 250mL de solución con agua bidestilada.

Hidróxido de potasio (KOH) 0,5 M

Se preparó a partir del compuesto comercial (Merck, 85% de pureza), disolviendo 2,81 g. hasta completar 100mL con agua bidestilada.

Otros materiales

1. Gamma alúmina 3 (0,05 micrón)
2. Lijas
3. Espátula de metal
4. Toallín
5. Frascos ámbar de 100 mL
6. Piseta

Material volumétrico

1. Micropipeta HAMILTON de 100µl
2. Pipetas volumétrica de 1, 2 y 5mL

Equipos y aparatos

1. Potenciostato, el cual es un analizador VoltaLab PST050 conectado a un PC.
2. pHmeter de la casa comercial THOMAS SCIENTIFIC TS 6425.
3. Refrigerador frigidex NHD330.
4. Balanza analítica, con una capacidad máxima de 110g y una apreciación de 0,1mg de la casa comercial OHAUS EXPLORER.

Diseño de análisis

Esta investigación tuvo un enfoque cualitativo, ya que se analizaron e interpretaron varios parámetros y situaciones por las que paso el biosensor durante su manipulación para poder detectar la presencia de *Brucella* spp en medio acuoso.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación y caracterización electroquímica de los electrodos de oro

La preparación de los electrodos de oro se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la pág. 57. La VC en H_2SO_4 0,5 M de un electrodo de hilo de oro se presenta en la figura 11, donde se observan los picos anódico y catódico, del óxido. Estos picos se encuentran próximos a +1,32 V y +0,81 V respectivamente, característicos de una superficie de oro policristalina limpia.

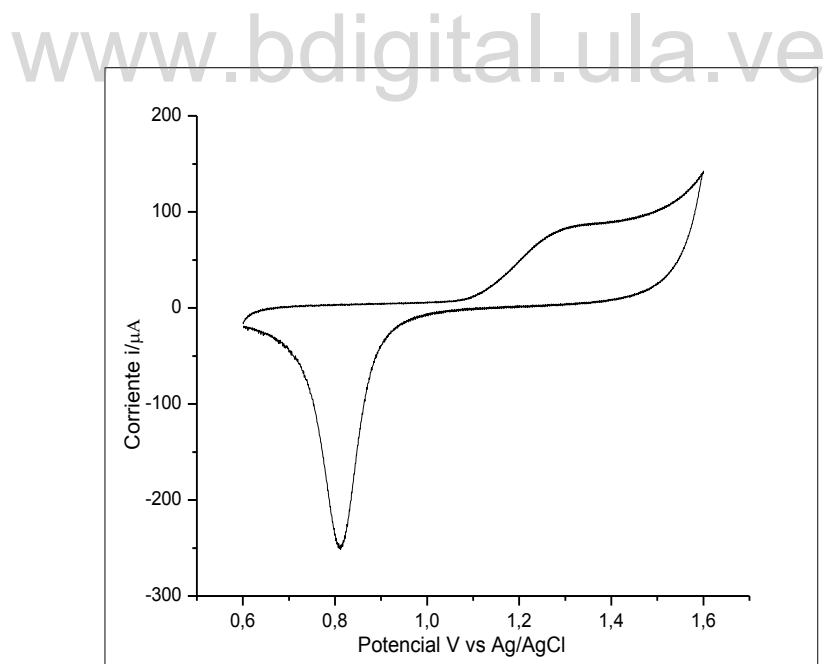


Figura 11. Voltametría cíclica en H_2SO_4 0,5 M de un electrodo de hilo de oro. Ventana de potencial +0,6 a +1,6 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s.

Formación de monocapa de tioles (SAMs) y la estabilidad de unión Au/TOU

Existen problemas de estabilidad que presentan los electrodos modificados químicamente por fisisorción, los cuales pueden resolverse mediante la preparación de monocapas autoensambladas por quimisorción. Las monocapas autoensambladas son entramados moleculares formados espontáneamente por inmersión de una superficie apropiada en una disolución de una molécula anfifílica que se quimisorbe sobre el sustrato (Carrillo y Colina, 2017; Matheus, 2003).

Los átomos de azufre coordinan fuertemente con el oro, debido a un proceso de quimisorción oxidativa en el que tiene lugar la adición del enlace S-H a la superficie del oro, lo cual origina la eliminación reductiva de hidrógeno según la siguiente reacción:



Las monocapas autoensambladas de tioles (SAM) generadas por simple inmersión de oro limpio en una disolución de un tiol adecuado han sido utilizadas para la inmovilización de elementos de reconocimiento biológico. Con esta metodología se han preparado superficies de oro y de otros materiales recubiertas con monocapas que exponen al medio ligandos con afinidad específica, por tal motivo estos sistemas permiten obtener superficies modificadas altamente ordenadas, compactas y estables (Carrillo y Colina, 2017; Matheus et al., 2009; Parra, 2009; Matheus, Abad, Belandria, Fernández y Fernández, 2008; Ataka et al., 2004).

Con el objetivo de mejorar las respuestas electroquímicas obtenidas y verificar la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas *in vitro*, se procedió a modificar la superficie de los electrodos de hilo de oro mediante el pre-tratamiento con tioles, obteniendo la formación de una monocapa (explicado en la pág. 58) y así lograr la posterior inmovilización del anticuerpo.

Con el fin de comprobar la presencia de la monocapa y la estabilidad de la unión Au/TOU, se incubaron los electrodos de oro en tiourea 5mM durante 24 horas. En la

figura 12 observamos las VC en KOH 0,5 M, a una ventana de potencial desde -1,2 hasta +0,2 V vs Ag/AgCl a 100mV/s. En la voltametría (A) se evidencia la desorción reductiva de la monocapa de tiourea a potencial de aproximadamente -0,8 V, observándose una buena definición de la señal, característica del desprendimiento de la monocapa de tiourea sobre el oro. Al realizar cuatro barridos consecutivos (voltametría B) observamos que la señal a -0,8 V, aún permanece bien definida, aunque como es lógico pensar, con menor intensidad que en el primer barrido. En conclusión, las monocapas de tiourea sobre oro presentan una gran estabilidad y se mantienen incluso cuando los electrodos son sometidos a diferentes ensayos electroquímicos (sucesivas voltametrías cíclicas). Cuando se realizó la desorción de la monocapa, 3 meses después de haber modificado el electrodo, aún se aprecia la señal a -0,8 V, confirmando la gran estabilidad que presentan (experimentos no reportados).

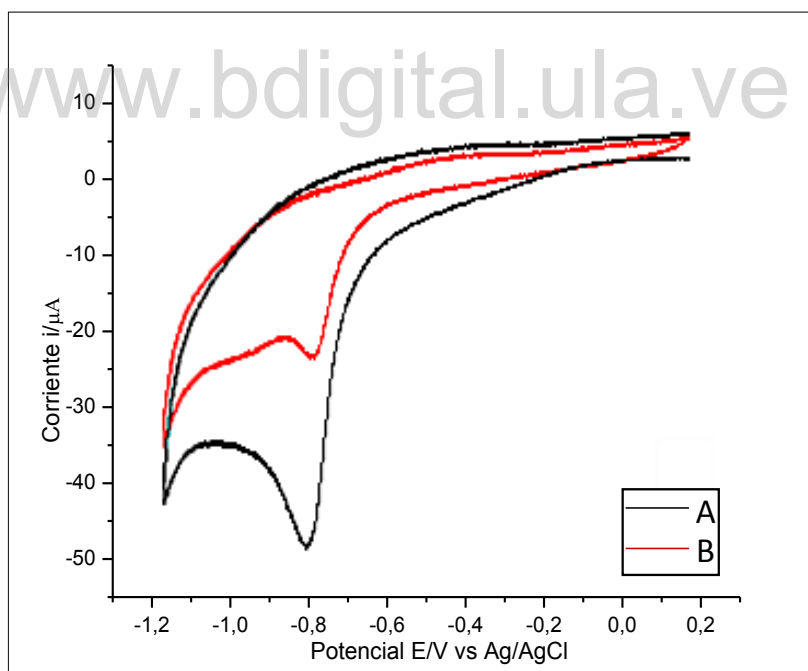


Figura 12. Voltametrías cíclicas de desorción en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea (Au/TOU), con ventana de potencial de -1,2 a + 0,2 V vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100mV/s., donde: (A) primer barrido y (B) cuarto barrido.

Optimización del pH

En la figura 13 observamos las VC para los electrodos de oro modificados con tiourea 5mM en solución de KCl 0,001 M a una ventana de potencial entre 0 y +800 mV vs Ag/AgCl, con velocidad de barrido de 100mV/s., a pH: 3,65 (voltametría A), 6,42 (voltametría B), 7,00 (voltametría C) y 9,40 (voltametría D). El tiempo de incubación para los cuatro electrodos, en 500µl de buffer fosfato con 50µl de Ac⁺ fue de 30 minutos. Podemos decir que a pH 6,42 se observa una señal de oxidación a 645mV correspondiente a la corriente de pico anódica ($I_{pa} = 22,2\mu A$). Así mismo, se aprecia una señal de reducción a 110mV que corresponde a la corriente de pico catódica ($I_{pc} = 13,3\mu A$). A pH 3,65, 7,00 y 9,40 la señal de oxidación y reducción se observa levemente desplazada a potenciales más positivos con una I_{pa} y un I_{pc} de menor intensidad.

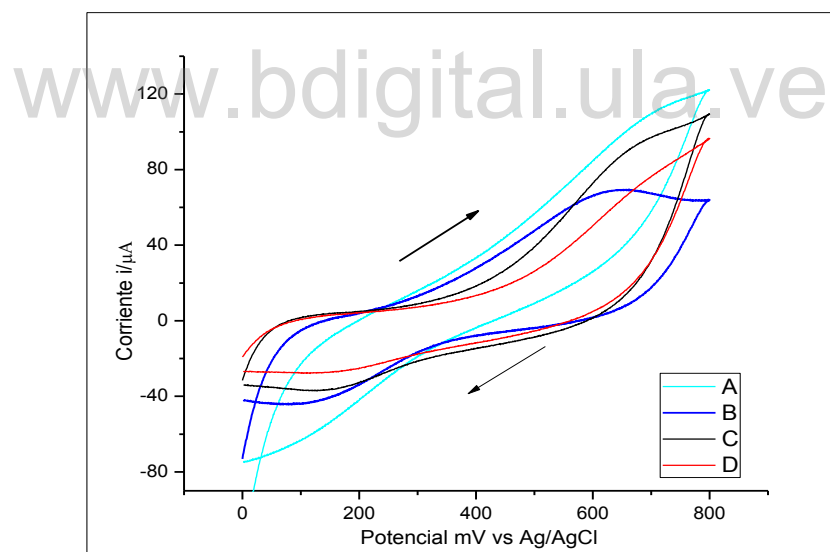


Figura 13. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro a 100 mV/s modificado con TOU/Ac⁺/30 minutos, en una ventana de potencial de 0 a +800 mV vs Ag/AgCl, donde: (A) pH 3,65 (B) pH 6,42 (C) pH 7,00 y (D) pH 9,40.

Al analizar las variaciones de la intensidad de corriente con respecto a los diferentes pH en estudio, podemos concluir que el pH más apropiado para la inmovilización del

Ac⁺ es 6,42, dado que se aprecia una mayor intensidad de corriente (22,2 μ A), indicativo de la inmovilización del Ac⁺. A pH 3,65, 7,00 y 9,40 se aprecian valores de intensidad de corriente más bajos; 8,8, 13,3 y 4,4 μ A, respectivamente (figura 14).

Este resultado coincide con Valdés y Hernández quienes en el 2001 afirman que el pH óptimo para los anticuerpos de la clase IgM de la mayoría de las enterobacterias se reporta entre 6,20 y 6,70 y los anticuerpos de la clase IgG reaccionan mejor a pH bajo. Podríamos decir que a medida que el pH se hace más ácido o más básico, disminuye la posibilidad de unión del Ac⁺ al electrodo modificado.

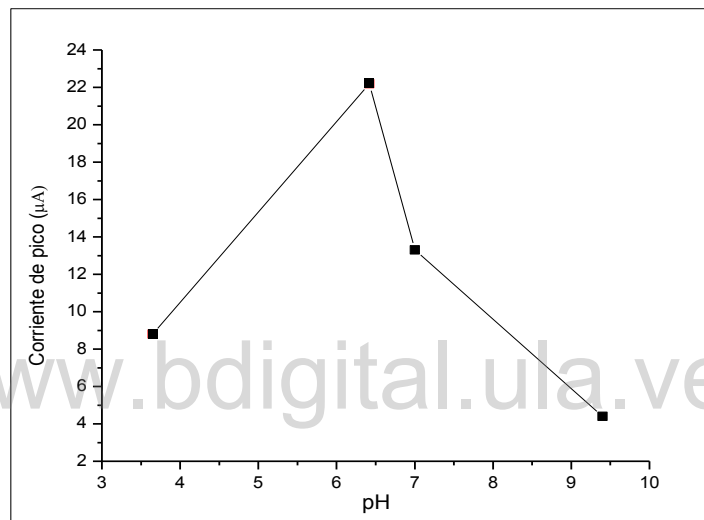


Figura 14. Intensidad de corriente de pico anódica (μ A) vs pH en electrodo de Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac⁺.

Optimización de la velocidad de barrido en electrodos de oro modificados con tiourea e incubados posteriormente en anticuerpo positivo (Ac⁺) contra *Brucella* spp en KCl 0,001 M

Con el fin de seleccionar la velocidad de barrido apropiada para que ocurra la respuesta electroquímica de la unión entre la monocapa de tiourea y Ac⁺ contra *Brucella* spp, se realizaron VC en KCl 0,001 M a los electrodos de oro modificados, siendo éstos incubados en una solución de 500 μ l de buffer fosfato (a pH 6,42)

mezclada con 50 μ l de Ac⁺ durante 30 minutos. Estas voltametrías fueron realizadas a velocidades de: 5, 20, 50 y 100 mV/s (ver figura 15). Las voltametrías obtenidas muestran que a medida que aumenta la velocidad de barrido, se obtienen corrientes de pico, tanto anódica como catódica, con mayor intensidad y mejor definición.

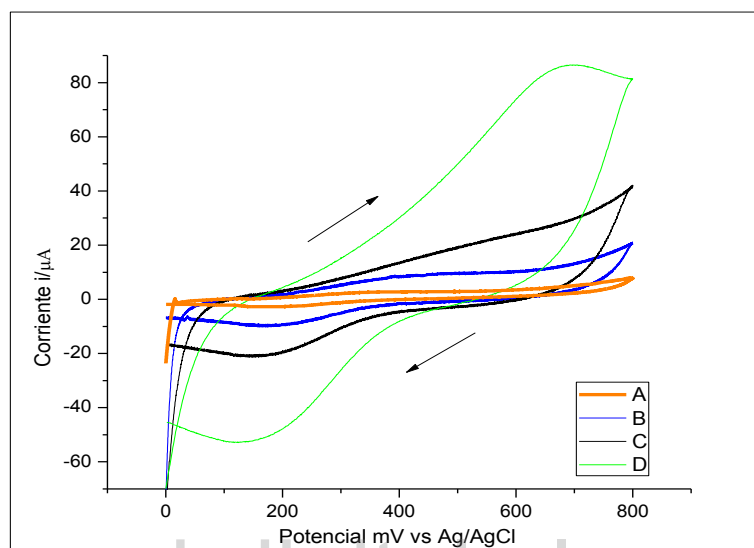


Figura 15. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea y posteriormente incubado con Ac⁺ durante 30 minutos. Dónde: (A) 5 mV/s., (B) 20 mV/s., (C) 50 mV/s. y (D) 100 mV/s. Ventana de potencial desde 0 hasta +800 mV vs Ag/AgCl.

Los resultados mostrados en la figura 16, indican que la velocidad de barrido más apropiada es de 100 mV/s., por ser esta velocidad donde se obtiene la máxima corriente de pico (25,7 μ A), dado que es importante establecer un compromiso entre una buena definición de la señal y un máximo valor de corriente. Por otro lado, una mayor velocidad de barrido indica que las reacciones ocurren más rápidamente, por lo que se pueden hacer mayor cantidad de experimentos en el menor tiempo posible. Cuando se realizaron ensayos a velocidades de barrido superiores a 100 mV/s., no se observaron picos de corriente, lo que indica que probablemente la superficie del electrodo modificado se saturó con el Ac⁺, lo que impidió el transporte de los e⁻ desde el electrodo al analito.

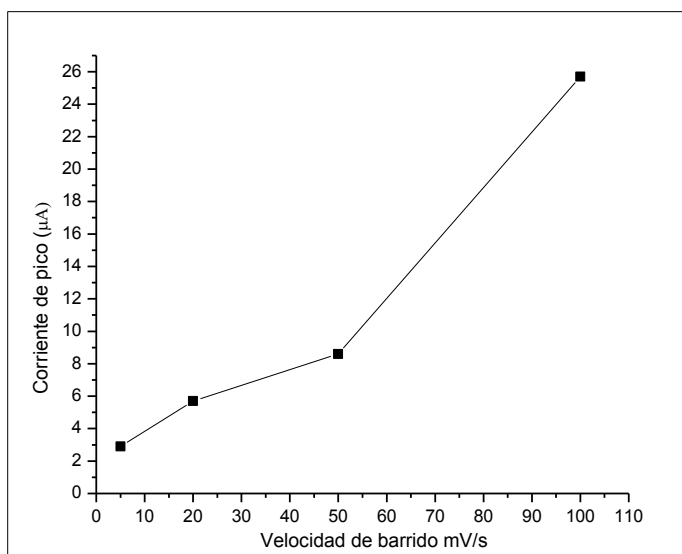


Figura 16. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) vs velocidades de barrido mV/s en electrodos de oro modificados con TOU incubados durante 30 minutos en Ac^+ a pH 6,42.

Optimización del tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados con tiourea en el anticuerpo positivo (Ac^+) contra *Brucella* spp

Posterior a la formación de la monocapa de tiourea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados en el Ac^+ contra *Brucella* spp. Las VC se realizaron en solución de KCl 0,001 M a ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl . En la figura 17 se observan las voltametrías: (A) en electrodo de oro/tiourea (Au/TOU), (B) en electrodo de oro/tiourea incubado en una solución de 500 μl de buffer fosfato (a pH 6,42) mezclada con 50 μl de anticuerpo positivo durante 10 minutos, (C) igual al anterior pero con tiempo de incubación de 30 minutos, (D) igual al anterior pero con tiempo de incubación de 50 minutos, y (E) igual al anterior pero con tiempo de incubación de 1 hora.

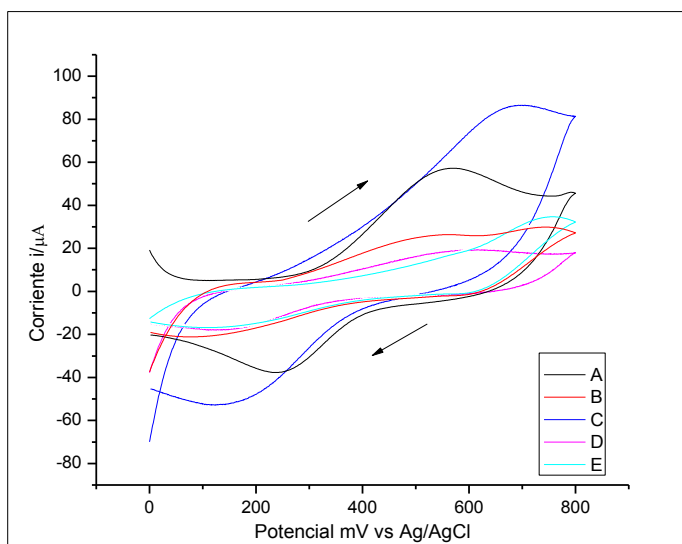


Figura 17. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea con Ac^+ inmovilizado. Donde (A) Au/TOU (B) Au/TOU/ Ac^+ 10 minutos, (C) Au/TOU/ Ac^+ 30 minutos (D) Au/TOU/ Ac^+ 50 minutos y (E) Au/TOU/ Ac^+ 1 hora. Ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s.

Los resultados obtenidos indican que cuando el tiempo de incubación alcanza los 30 minutos (voltametría C), ocurre un aumento bastante significativo en la señal de oxidación a 690 mV correspondiente a la corriente de pico anódica ($I_{pa} = 20 \mu\text{A}$), con respecto al electrodo modificado en ausencia del Ac^+ ; así mismo, se aprecia una señal de reducción a 130 mV que corresponde a la corriente de pico catódica ($I_{pc} = 20 \mu\text{A}$). Al hacer la incubación en el Ac^+ durante 10 minutos, 50 minutos y 1 hora, las corrientes de pico disminuyen.

En resumen, al incubar el electrodo modificado en el Ac^+ durante 30 minutos, ocurre un aumento en la I_{pa} que indica la detección y posible inmovilización del Ac^+ ; al incubar durante 1 hora, parece que se alcanza la saturación del medio y comienza a desprenderse parte del Ac^+ inmovilizado. Al incubar durante 10 y 50 minutos, ambas corrientes de pico tienen menor valor y se aproximan a la voltametría control (voltametría A).

En este sentido, se analizaron los valores de intensidad de corriente de pico anódica a diferentes tiempos de incubación (minutos), concluyendo que 30 minutos es el tiempo de incubación apropiado para la detección y posible inmovilización del Ac^+ , por ser el tiempo mínimo necesario para obtener una buena definición de la señal de corriente de pico con buena intensidad de corriente (figura 18).

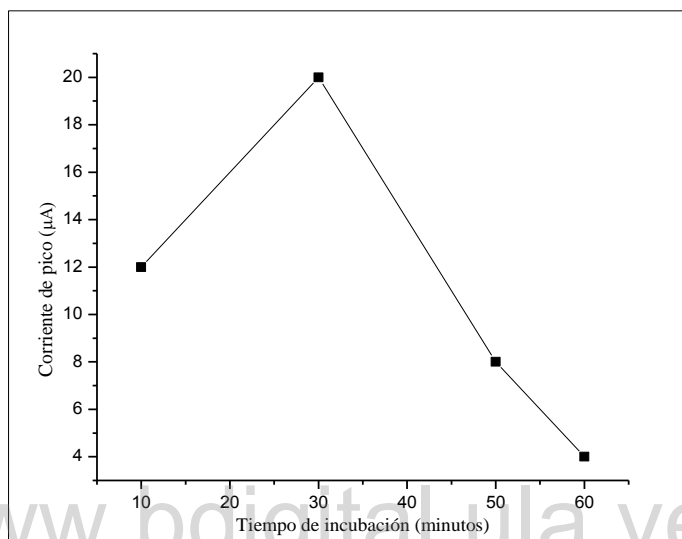


Figura 18. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) en función de los diferentes tiempos de incubación (minutos) en Ac^+ para un electrodo Au/TOU a pH 6,42.

Resultados similares fueron obtenidos por Zuzuarregui en el 2013, en la inmovilización de polimixina B a diferentes tiempos de incubación, donde se concluye que 1 hora no era suficiente tiempo para tamizar toda la superficie de manera uniforme, mientras que a las 4 horas de incubación ocurría la saturación de la unión de las microesferas. A las 2 horas de incubación observaron un aumento de la corriente de pico bastante significativo, siendo este el tiempo seleccionado para que ocurra la unión de las microesferas de polimixina B al electrodo de oro modificado con tiourea.

En el 2001, Valdés y Hernández determinan que los anticuerpos de las enterobacterias tienen diferentes tiempos de incubación para alcanzar el equilibrio, en esto interviene de manera significativa la clase de inmunoglobulina y la forma en que

se une con antígeno específico. Estudios con eritrocitos suspendidos en suero o solución salina han demostrado que del 100% de anticuerpos RhD que se fijan, aproximadamente el 25% lo hacen en los primeros 15 minutos y el 75% restante lo hace durante la primera hora. La adición de varios agentes potenciadores, por ejemplo disminución de la fuerza iónica, puede aumentar la cantidad de anticuerpos fijados durante los primeros 15 minutos, y con esto disminuir el tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio.

Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de oro desnudo, oro/tiourea y oro/tiourea/Ac+

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M y ventana de potencial desde 0 hasta +800mV vs Ag/AgCl a velocidad de barrido de 100mV/s., para comparar los resultados obtenidos en electrodos de oro desnudo, oro/tiourea y oro/tiourea/Ac+ (ver figura 19).

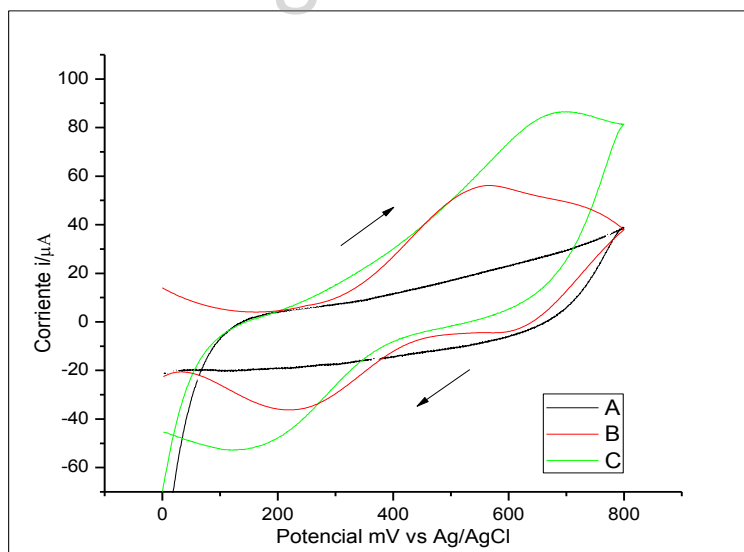


Figura 19. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de oro a 100mV/s. Dónde: (A) Electrodo de oro desnudo, (B) Electrodo Au/TOU y (C) Electrodo Au/TOU/Ac+. Ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl.

La incubación del electrodo modificado con tiourea, se realizó sumergiendo el electrodo durante 30 minutos en una solución de 500µl de buffer fosfato (a pH 6,42) conteniendo 50µl de anticuerpo positivo. En el caso del electrodo incubado con anticuerpo positivo (voltametría C), se aprecian señales tanto de oxidación (I_{pa}) como de reducción (I_{pc}), con valores de corriente de pico bastante aumentados con respecto a las otras voltametrías. En el caso del electrodo modificado con tiourea sin incubar en Ac^+ (voltametría B), también aparecen ambas señales pero con menor intensidad, lo que indica que la presencia del Ac^+ aumenta ambas corrientes de pico (anódica y catódica) y que si aumentáramos la concentración del Ac^+ , se alcanzaría la saturación. Cuando se realiza el barrido de potencial al electrodo de oro desnudo, no se observa señal de oxidación ni de reducción, pudiéndose asociar este barrido con la respuesta para un blanco (voltametría A). Los resultados obtenidos en estas voltametrías aparecen reportados en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de E_{pa} , I_{pa} , E_{pc} e I_{pc} para los electrodos oro desnudo, Au/TOU y Au/TOU/ Ac^+ .

Electrodo	E_{pa} (mV)	I_{pa} (µA)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (µA)
Oro desnudo	---	---	---	---
Au/TOU	+555	33,3	+220	23,3
Au/TOU/ Ac^+	+686	16,6	+131	16,6

Este fenómeno se evidencia en diversas investigaciones donde los autores reportan que los complejos de oro pueden marcar o unirse a cualquier molécula biológica proteica (antígeno o anticuerpo), principalmente si contiene en su secuencia de aminoácidos grupos tiol o puentes disulfuro. Sin embargo, este factor no es excluyente, ya que los complejos de oro se pueden unir a otros aminoácidos como el grupo imidazol de las histidinas y a los grupos amino o carboxilos, aunque presentando una menor afinidad (Carrillo y Colina, 2017; Hernández, 2014).

Inmovilización del Ac⁺ contra *Brucella* spp y posterior adición del Antígeno Rosa de Bengala a diferentes volúmenes en solución de KCl 0,001 M

Para realizar la inmovilización del Ac⁺ en los electrodos de oro modificados con tiourea, estos fueron incubados durante 30 minutos en una solución de 500µl de buffer fosfato (a pH 6,42) conteniendo 200µl de Ac⁺. Seguidamente se agregaron volúmenes del antígeno Brucelar amortiguado proveniente del kit (MISCA S.A DE C.V) a la solución de KCl 0,001 M presente en la celda. Posteriormente se realizaron VC a ventana de potencial de 0 a +850 mV vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100mV/s. En la figura 20 se aprecian las voltametrías obtenidas, donde: (A) con 20µl de antígeno Rosa de Bengala, (B) con 40µl de antígeno Rosa de Bengala, (C) con 80µl de antígeno Rosa de Bengala y (D) con 100µl de antígeno Rosa de Bengala, que muestran que a medida que aumenta la concentración del antígeno, disminuyen ambas corrientes de pico, y ambos potenciales de pico se desplazan a valores menos positivos. En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en dicha figura.

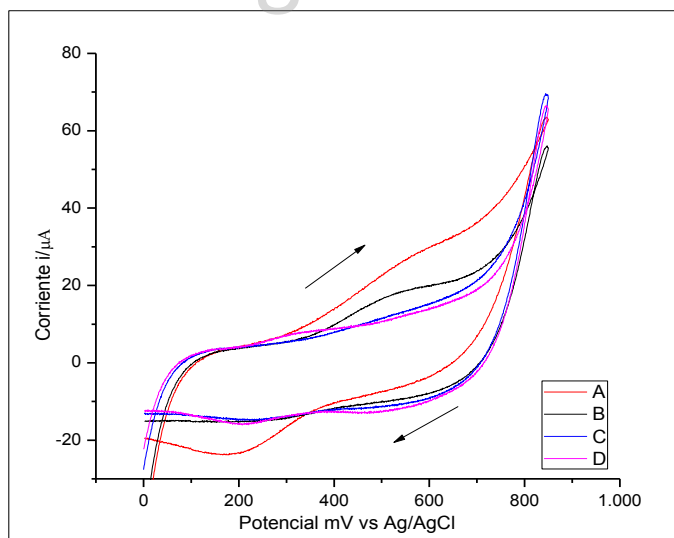


Figura 20. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de oro modificado con TOU e incubado durante 30 minutos en Ac⁺, con ventana de potencial de 0 a +850 mV vs Ag/AgCl, a 100 mV/s y diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala, donde: (A) con 20µl, (B) con 40µl, (C) con 80µl y (D) con 100µl del antígeno Brucelar Amortiguado.

Tabla 4. Valores de E_{pa} , I_{pa} , E_{pc} e I_{pc} para los diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica.

Electrodo	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μA)
A	+583,30	3,63	+165,58	9,09
B	+532,76	1,81	+200,35	1,81
C	+523,09	0,18	+200,35	0,18
D	+326,19	0,18	+200,35	0,18

De igual forma fue analizada la relación entre la intensidad de corriente de pico y los volúmenes del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica (ver figura 21), donde se pudo observar que a medida que se aumentan los volúmenes de ésta, disminuyen los valores de intensidad de corriente hasta llegar a la saturación del electrodo (a partir de los 80 μl).

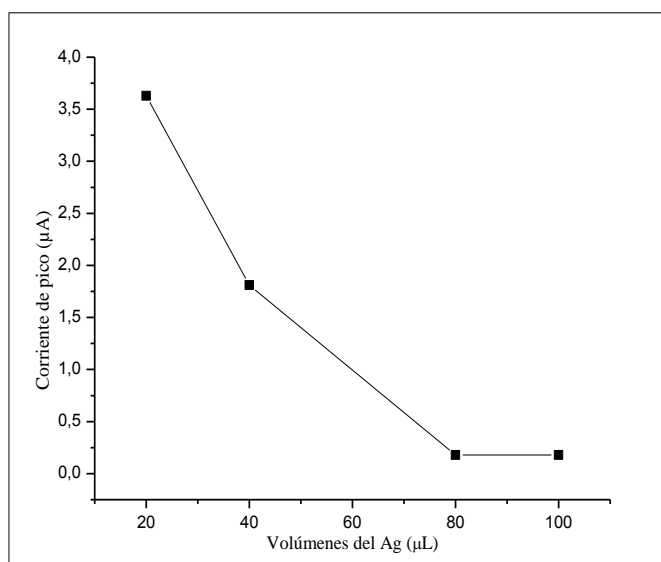


Figura 21. Intensidad de corriente de pico anódica (μA) en función de los diferentes volúmenes (μL) del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica de KCl 0,001 M, en electrodo de Au/TOU/Ac+ incubado durante 30 minutos a pH 6,42.

Además fue seleccionado 20 μL como el volumen mínimo necesario para obtener una buena corriente de pico. Sería interesante medir las corrientes de pico a volúmenes de Rosa de Bengala menores a 20 μL y así poder obtener con exactitud el límite de detección y el límite de cuantificación.

Por tanto, reiteramos que a medida que ocurre la adsorción del inmunocomplejo en el electrodo de trabajo, éste se bloquea impidiendo el flujo de electrones con facilidad y produciendo la disminución de la corriente de pico. El hecho de que ocurra la inmovilización del Ac^+ , favorece la posterior unión antígeno-anticuerpo en la superficie del electrodo, aun con la adición mínima de 20 μl del antígeno.

Inmovilización del Antígeno Rosa de Bengala (Ag-RB) y la adición posterior del Ac^+ contra *Brucella* spp

Con el fin de estudiar la adsorción del inmunocomplejo agregando en primer lugar el Ag-RB y luego el Ac^+ , se realizaron VC en electrodos de oro modificados con tiourea e incubados durante 30 minutos en una solución de 500 μl de buffer fosfato (a pH 6,42) mezclada con 50 μl de Ag-RB para luego agregar volúmenes del Ac^+ , en KCl 0,001 M a una ventana de potencial de 0 a + 800 mV vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s. En la figura 22 se observan las voltametrías: (A) Au/TOU/Ag-RB, (B) Au/TOU/Ag-RB con 120 μl de Ac^+ en solución y (C) Au/TOU/Ag-RB con 200 μl de Ac^+ en solución.

Comparando las voltametrías obtenidas, se puede observar que entre ellas no existen diferencias significativas. Suponemos que un factor condicionante para que el inmunocomplejo se pueda unir a la superficie del electrodo, es que inicialmente se inmovilice el anticuerpo y posteriormente el antígeno se una a éste.

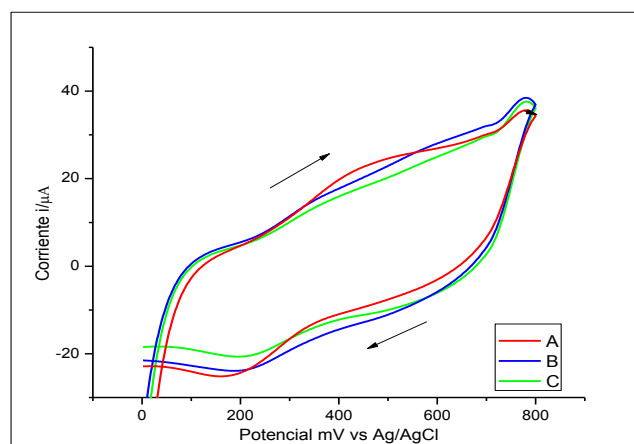


Figura 22. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de oro modificado con TOU/Ag-RB con ventana de potencial de 0 a +800 mV vs Ag/AgCl a 100 mV/s., y diferentes concentraciones de Ac+. Donde (A) Au/TOU/Ag-RB incubado durante 30 minutos, (B) Au/TOU/Ag-RB/120μl de Ac+ en solución y (C) Au/TOU/Ag-RB/200μl de Ac+ en solución.

Inmovilización del anticuerpo negativo (Ac-) a diferentes velocidades de barrido

Se realizaron voltametrías cíclicas en electrodos de oro modificados con tiourea e incubados en una solución de 500μl de buffer fosfato (a pH 6,42) mezclada con 20μl de Ac-, reactivo proveniente del kit (MICSA S.A DE C.V) durante 30 minutos, en KCl 0,001 M a una ventana de potencial de 0 a +850 mV vs Ag/AgCl a diferentes velocidades de barrido. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 23, donde (A) es el electrodo Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac- a 100 mV/s., (B) adicional a lo anterior, se agregaron 20μl de Ac- a la solución de KCl 0,001 M, (C) igual al anterior, pero se disminuyó la velocidad de barrido a 50 mV/s., (D) y (E) a velocidades de barrido de 10 y 5 mV/s., respectivamente. Al comparar las voltametrías (A) y (B) observamos que cuando se agregan a la solución electrolítica 20μl de Ac- existe un desplazamiento de la señal de oxidación, hacia potenciales menos positivos (desde 620 mV hasta 560 mV) y una leve disminución de la corriente de pico anódica (Ipa). Al comparar las voltametrías (B) y (C), las cuales se realizaron a 100 y 50mV/s., respectivamente, observamos que al disminuir la velocidad de barrido la Ipa disminuye levemente y sigue disminuyendo aún más a velocidades de barrido de 10 y 5 mV/s.,

voltametrías (D) y (E), donde incluso tienden a desaparecer. La alta I_{pa} e I_{pc} obtenida a 100 y 50 mV/s., es indicativo de que los procesos de oxidación y reducción son rápidos. Podemos agregar que no ocurre la reducción a velocidades de barrido de 10 y 5 mV/s., y si ocurre, es un proceso muy rápido, dado que no se observan señales en el barrido inverso.

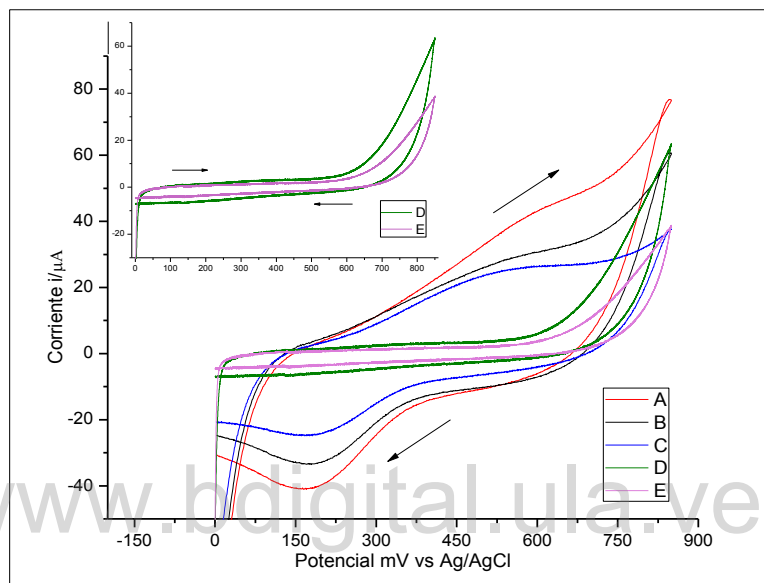


Figura 23. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001 M de un electrodo de oro modificado con TOU con ventana de potencial de 0 a +850 mV vs Ag/AgCl a diferentes velocidades de barrido. Donde (A) Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac- a 100 mV/s., (B) Au/TOU/Ac-/20μl de Ac- en solución a 100 mV/s., (C) Au/TOU/Ac-/20μl de Ac- en solución a 50 mV/s., (D) Au/TOU/Ac-/20μl de Ac- en solución a 10 mV/s., y (E) Au/TOU/Ac-/20μl de Ac- en solución a 5 mV/s.

Afinidad de los electrodos de oro desnudo por el Ac+ con posterior adición de Antígeno Brucelar Amortiguado (Rosa de Bengala)

Los complejos de oro se han utilizado en diversas metodologías para obtener moléculas oro-proteína u oro-ADN, facilitando así la detección y cuantificación de las mismas. Diversos autores realizaron diferentes ensayos de afinidad detectando

antígenos o anticuerpos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno. En conclusión, cualquier molécula biológica que pueda actuar como antígeno o anticuerpo, puede ser utilizada como analito en estudio (Costa, González y Escosura, 2009).

Con el fin de comprobar si es posible la adsorción del anticuerpo a la superficie del electrodo de oro, se realizaron voltametrías cíclicas al electrodo de oro (ver figura 24) en KCl 0,001 M y ventana de potencial desde 0 hasta +800mV vs Ag/AgCl, a velocidad de barrido de 100mV/s., el cual se incubó en una solución de 500 μ l de buffer fosfato (a pH 6,42) conteniendo 50 μ l de anticuerpo positivo durante 30 minutos (voltametría B). En las voltametrías (C) y (D), se aprecian voltametrías cíclicas, en las mismas condiciones, pero la voltametría (C) se obtuvo agregando a la solución electrolítica 100 μ l de Antígeno Rosa de Bengala y la voltametría (D) se obtuvo agregando 500 μ l del mismo Antígeno Brucelar.

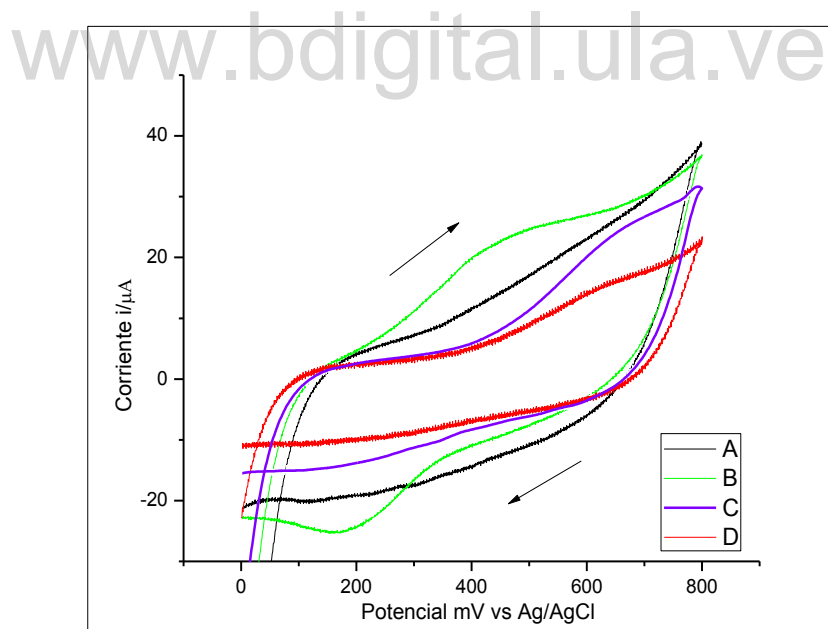


Figura 24. Voltametrías cíclicas en KCl 0,001M de un electrodo de oro a 100mV/s, donde: (A) electrodo de oro desnudo, (B) Au/Ac+ incubado durante 30 minutos, (C) electrodo Au/Ac+ con 100 μ l de Antígeno Rosa de Bengala en solución y (D) electrodo Au/Ac+ con 500 μ l de Antígeno Rosa de Bengala en solución. Ventana de potencial de 0 a +800mV vs Ag/AgCl.

Al comparar estas voltametrías, se puede concluir que para que ocurra la inmovilización del anticuerpo al electrodo de oro desnudo, no es necesaria la modificación de estos electrodos con tiourea, ya que se observan señales de corrientes de oxidación y de reducción (voltametría B), aunque éstas presentan menor intensidad. Sería interesante estudiar la estabilidad de la unión Au-Ac⁺ y compararla con la estabilidad de la unión Au-TOU-Ac⁺. En la voltametría (C) se observa que ocurre una disminución de I_{pa} con respecto a la voltametría (B) y la I_{pc} tiende a desaparecer, lo que podría indicar que ocurre la formación del inmunocomplejo antígeno-anticuerpo, por la adición del antígeno en solución. En la voltametría (D) se observa que al aumentar la concentración del antígeno en solución, hay una pérdida casi total de ambas señales (oxidación y reducción). La voltametría (A), como es de esperar, no presenta ninguna señal de respuesta.

Al agregar diferentes volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala en solución (100µl y 500µl), se produce la unión antígeno-anticuerpo y se adsorbe el inmunocomplejo en la superficie del electrodo, obteniéndose una disminución de la respuesta electroquímica ocasionada por el bloqueo del electrodo, este fenómeno impide el flujo normal de electrones, por lo que las corrientes del pico disminuyen, en comparación al electrodo Au/Ac⁺ voltametrías (C) y (D). Por tanto, el inmunocomplejo inmovilizado en la superficie del electrodo es detectado al agregar el Antígeno Brucelar hasta que el anticuerpo llega a saturarse [voltametría (D)].

Este fenómeno también fue descrito por Keel y Laiz en el 2010 al observar la interacción del antígeno PSPB (Proteína B específica de la preñez) con los anticuerpos co-inmovilizados con una enzima sobre la superficie de un electrodo de oro. Al formar grandes complejos antígeno-anticuerpo, estos limitaban el acceso del sustrato específico al sitio activo de la enzima, provocando por tanto una disminución en la señal eléctrica medida producto de una inhibición de la corriente catódica proporcional al aumento de concentración de la proteína.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

A continuación y a manera de resumen, resaltamos las conclusiones principales obtenidas en esta tesis:

1. Los estudios de tiempo de incubación del Ac+, velocidad de barrido y pH, mostraron que para alcanzar una mayor estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo, se debe utilizar un tiempo mínimo de incubación de 30 minutos, una velocidad de barrido de 100 mV/s y pH 6,42.
2. La inmovilización de los anticuerpos Anti-*Brucella* spp sobre la superficie de los electrodos en oro desnudo mostró una buena efectividad para la unión y detección de *Brucella* spp, aunque con menores respuestas electroquímicas en corriente y probablemente, con menor estabilidad de la unión.
3. Es importante mencionar que todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y sin saturar con N₂ la atmósfera de la celda electroquímica; esto permite que los estudios realizados, sean menos costosos y menos laboriosos.
4. La voltametría cíclica mostró ser una herramienta muy útil para el diagnóstico de *Brucella* spp, ya que se pudo detectar la presencia del Ac+, Ac- y la unión antígeno-anticuerpo tanto inmovilizados como en solución.

5. Las superficies de oro modificados con tiourea al estar en contacto directo con el antígeno Rosa de Bengala y la posterior adición del Ac+ a la solución, no representan una respuesta significativa, ya que puede ocurrir al mismo tiempo la oxidación del oro. Lo contrario sucede cuando se incubaba primero en Ac+ y luego a la solución se le adiciona el antígeno Brucelar Amortiguado, siendo efectivo el reconocimiento de la bacteria, considerándose esto como un factor condicionante para que ocurra la unión antígeno-anticuerpo.
6. El tiempo requerido para el análisis de muestras utilizando el biosensor diseñado en esta investigación (Au/TOU/Ac+), aproximadamente 30 minutos, representa una ventaja frente a las técnicas microbiológicas clásicas, donde son necesarias, aproximadamente 48 horas.
7. Las monocapas de tiourea autoensambladas por quimisorción sobre oro, constituyen una herramienta versátil para la modificación de superficies y continúan siendo un medio ideal para la inmovilización de Ac+. Esta monocapa es estable a pesar de someterse a sucesivos ensayos electroquímicos.

Recomendaciones

En esta investigación quedaron algunas interrogantes, por lo que nos atrevemos a sugerir algunas recomendaciones para futuras investigaciones:

1. Probar el inmunosensor diseñado y preparado en esta investigación a diferentes concentraciones de Ac⁺ y Ag, para así obtener los límites de detección y cuantificación de ambos. Esto podría realizarse utilizando voltametría de pulso diferencial, por ser ésta una técnica de mayor sensibilidad.
2. Realizar los ensayos en muestras reales (suero y/o plasma sanguíneo así como en productos lácteos no pasteurizados) que son blanco de contaminación por *Brucella* spp y ver si en ellos es posible la detección de la misma, sin necesidad de eliminar interferentes, en caso de no ser así, proceder a minimizarlos.
3. La metodología utilizada en esta investigación puede ser recomendada para la elaboración de un biosensor selectivo y específico para *Brucella* spp, sirviendo para reconocer específicamente este patógeno o sus biovariedades, en muestras complejas con múltiples microorganismos.
4. Sería interesante estudiar la estabilidad de la unión Au-Ac⁺ y compararla con la estabilidad de la unión Au-TOU-Ac⁺.
5. Los resultados obtenidos permitieron estudiar un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas. Se recomienda realizar el estudio con otros microorganismos y así lograr resultados alentadores en el desarrollo de biosensores para la detección de patógenos en particular.

Bibliohemerografía

- Abdalahi, M., Fernandes, A., Xia, X., Musa, A., Ji, J., y Sun, X. (2015). Electrochemical Genosensor To Detect Pathogenic Bacteria (*Escherichia coli* O157:H7) As Applied in Real Food Samples (Fresh Beef) To Improve Food Safety and Quality Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(20), 5017–5025.
- Adams, L. (1990). *Advances in brucellosis research*. Texas, Estados Unidos: Texas A&M University Press.
- Ajay, K. (2014). Amperometric immunosensor of *Brucella abortus* CE-protein antigen shows post-zone phenomena. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 717(718), 83-89.
- Aparicio, D. (2007). *Presencia de anticuerpos contra B. ovis y Brucella lisas, en sementales ovinos jóvenes, de ocho diferentes estados de la República Mexicana* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología Científica*. Caracas, Venezuela: Episteme.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2): 23-39.
- Ataka, K., Giess, F., Knoll, W., Naumann, R., Haber, S., Björn, R., y Heberl, J. (2004). Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of His-Tagged Cytochrome *c* Oxidase to a Gold Electrode: In Situ Monitoring by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *American Chemical Society*, 126(49), 16199-16206.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J., y Scholz, H. (2009). *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BioMed Central Genomics*, 4(10), 1186-1352.
- Balestrini, A. (2001). *Como se elabora el proyecto de investigación*. Caracas, Venezuela: BL Consultores Asociados.

- Bergveld, P. (1986). The Development and Application of FET-based Biosensors. *Biosensors*, 2(1), 15- 33.
- Bricker, J., y Halling, S. (2003). Differentiation of *Brucella abortus* Bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis*, Bv. 1 by Pcr. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2660-2666.
- Calero, A., Esteban, M., y Rodríguez, J. (2011). *Enfermedades y hábitos saludables*. Oxford, Inglaterra: Oxford University Press.
- Cano, M., Rodríguez, R., y Fernández, R. (2008). A new method based on the Butler-Volmer formalism to evaluate voltammetric cation and anion sensors. *Journal of physical chemistry B*, 112(49), 15596-15603.
- Carrillo, I., y Colina, G. (2017). *Diseño y preparación de un biosensor para la detección de Escherichia coli 0157:H7 en medio de cultivo BHI* (Tesis de Grado Licenciatura en Bioanálisis). Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Castro, H., González, S., y Prat, M. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(2), 203-216.
- Chanona, J., y Martínez, V. (2012). *Diseño y Caracterización de un Biosensor en modo de Resonancia para la Detección de Microorganismos Patógenos* (Tesis de Postgrado en Ingeniería de Cómputo con opción de Sistemas Digitales). Instituto Politécnico Nacional de México, México, D.F.
- Cloeckaert, A., Verger, J., Grayon, M., Paquet, J., Garin, B., y Foster, G. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes and Infection*, 3(9), 729-738.
- Costa, A., González, M., y Escosura, A. (2009). *Complejos de oro como marca de moléculas* (Tesis de Postgrado). Universidad de Oviedo, Asturias, España.
- Costa, M., Guillow, J., y Gari, B. (1996). Specificity of six gene sequences for the detection of the genes *Brucella* by DNA amplification. *Journal of applied bacteriology*, 81(3), 267-275.
- Dajer, A., Luna, M., Zapata, D., Villegas, S., Gutiérrez, E., y Pena, G. (1999). Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Preventive veterinary medicine*, 40(1), 67-73.

- Feer, E. (1996). *Immunochemical characterisation of Brucella LPS and its relation to virulence* (Thesis Doctoral). Karolinska Institutet, Solna, Suecia.
- Fernández, C., y Gómez, V. (2009). Brucelosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 66(590), 399-404.
- Gong, F., y Zhong, C. (2007). An Amperometric Enzyme-linked Immunosensor Using Resveratrol as the Substrates for Horseradish Peroxidase for *Brucella Melitensis* Antibody Assay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35(12), 1783-1786.
- González, V., García, E., y Ruiz, O. (2005). *Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria*. Madrid, España: Fundación para el conocimiento madri+d CEIM. Recuperado de <https://www.Madrimasd.org/uploads/informacionidi/bibliotecapublicacion/docVT/VT1>.
- Gutiérrez, M. (2005). Comportamiento de la Diarrea Causadas por Virus y Bacterias en Regiones Cercanas a la Zona Ecuatorial. *Colomb Med*, 36(4), 6-14.
- Haiyun, W. (2013). Rapid quantitative detection of *Brucella melitensis* by a label-free impedance immunosensor based on a gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(7), 8551-8563.
- Heidenreich, B. (2010). Detection of *Brucella* in meat with an electrochemical biochip. *Journal of Food Protection*, 73(11), 2025-2033.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación*. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hernández, N. (2014). *Diseño y Preparación de un Inmunosensor para la Detección de Escherichia coli* (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, Postgrado de Biotecnología de Microorganismos (BIOMI), Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Hill, H., y Davis, J. (1999). Biosensors: past, present and future in biochemical society. *Biochemical Society Transactions*, 27(2), 331-335.
- Homme, W., Hellinga, A., y Marvin, J. (1988). Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends in Biotechnology*, 16(4), 183-189.

- Hubert, H., Yingdi, Zhu., Milica, Jovic., Andreas, Lesch., Lysiane, Tissieres., Michel, Prudent., y Horst, Pick. (2018, 23 de octubre). *Electrochemical Detection of Bacterial Infections*. Recuperado de <https://www.chemistryviews.org>.
- Hurtado, J. (2010). *Diseño de Investigación*. En el Proyecto de Investigación, comprensión holística de la Metodología y la Investigación. Caracas, Venezuela: Ediciones Quirón.
- Hu, R., Yin, Z., Zeng, Y., Zhang, J., Liu, H., Shao, Y., Ren, S., y Li, L. (2016). A novel biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 based on fluorescein-releasable biolabels. *Biosensors Bioelectronics*, 15(78), 31-36.
- Jay, J. (1994). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Madrid, España: Editorial Acribia.
- Jerome, S. (1991). Biosensores. *Scientific American*, 181(2), 50-56.
- Jiménez, C., y León, D. (2009) Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*, 16(1), 144-154.
- Jung, B., Jung, S., y Kweon, C. (2005). Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* 0157. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2140-2143.
- Kahler, S. (2000). *Brucella melitensis* infection discovered in cattle for first time, goats also infected. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(5), 648-658.
- Keel, J., y Laiz, J. (2010). Desarrollo de superficies modificadas oro- anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina. *Innotec*, 5,29-33.
- Kolthoff, I., y Tomsicek, W. (1935). Electron Transfer Reactions. *Journal of Physical Chemistry*, 39(7), 945-954.
- Koppel, C., Knopf, L., Ryser, M., Miserez, R., y Thur, B. (2007). Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. *European Journal of Wildlife Research*, 53(3), 212-220.
- Landeau, R. (2007). *Elaboración de trabajos de investigación*. Caracas, Venezuela: ALFA.

- Liebes, Y. (2009). Immobilization strategies of Brucella particles on optical fibers for use in chemiluminescence immunosensors. *Talanta*, 15(1), 338-345.
- López, M., Migranas, O., Pérez, M., Magos, C., Salvatierra, I., y Tapia, C. (1992). Seroepidemiología de la Brucelosis en México. *Salud Pública de México*, 34(2), 230-240.
- Lucero, N., Escobar, G., Ayala, S., Silva, P., y Nielsen, K. (2003). Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*, 52(10), 883-887.
- Matheus, P. (2003). *Diseño y preparación de electrodos enzimáticos basados en interacciones específicas: Desarrollo de estrategias para su estabilización* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental, Madrid, España.
- Matheus, P., Abad, J., Belandria, O., Fernández, L., y Fernández, V. (2008). Influencia del Estado de Oxidación del ion cobalto en la estabilidad de electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA-Coⁿ⁺-HRP-N_{His}*. *Avances en Química*, 3(2), 69-77.
- Matheus, P., Abad, J., y Fernández, V. (2007). Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 30(3), 225-235.
- Matheus, P., Abad, J., Navarro, P., Belandria, O., Hernández, N., y Fernández, V. (2009). Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). *Avances en Química*, 4(1), 37-43.
- Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., y Pacheco, E. (2017). Estudio voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti- *Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 48(1-2), 51-66.

- Matheus, P., Sánchez, J., Navarro, P., Pacheco, E., y Belandria, O. (2018). Modificación de superficies de oro con tiourea como herramienta para la inmovilización y detección de vitamina K₃. *Acta Bioclínica*, 8(16), 102-122.
- Michaux, S., Bourg, G., Jumas, E., Guigue, P., y Allardet, A. (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3244-3249.
- Molina, A., Villavicencio, C., y Fernández, L. (2009). Evaluación de un electrodo de carbón vítreo modificado con Zeolita tipo “A” en la adsorción de 2-clofenol. *Avances en Química*, 4(2), 63-72.
- Montiel, F., y Lam, M. (2000). *Manual de Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Mediterráneo.
- Morata, P., Queipo, M., Reguera, J., García, M., Cardenas, A., y Colmenero, J. (2003). Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiol.* 41(1), 144-148.
- Murray, P. (2002). *Microbiología Médica*. Madrid, España: Editorial Elsevier Science.
- Nicholson, R., y Shain, I. (1964). Theory of stationary electrode. *Analytical Chemistry*, 36(4), 706-723.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2012). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Recuperado de <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>
- Parra, M. (2009). *Síntesis y Caracterización de Ligandos Hidroxilados de Base de Schiff. Aplicación al desarrollo de Sensores y Biosensores* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid, España.
- Pavoni, S., Cobas, H., Zayas, A., y Álvarez, E. (2006). Evaluación de un sensor de capas delgadas para la detección voltamétrica del crecimiento de *Escherichia coli*. *Ciencia y Tecnología*, 10(40), 211-215.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2002). *Microbiology*. Madrid, España: Editorial McGraw Hill.
- Randles, J. (1952). Electrochemistry. *Transactions of Farady Society*, 48(3), 828-832.

- Román, L., Lomillo, M., Domínguez, O., y Martínez, M. (2013). Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensors and actuators B: Chemical*, 176(3), 858-862.
- Ruelas, C., y Rosadio, R. (1999). Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis bovina. *Journal of Food Protection*, 10(2), 43-55.
- Sánchez, J. (2007). *Optimización de un Método Voltamétrico para la Inmovilización y Detección de Vitamina K₃* (Tesis de Grado Licenciatura en Bioanálisis). Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida, Venezuela.
- Sattarahmady, N., Tondro, G., Gholchin, M., y Heli, H. (2015). Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. Genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections. *Journal of Medical Sciences*, 3(1), 1-7.
- Schultz, J. (1991). Biosensors. *Scientific American*, 15(9), 64-69.
- Seco, P., Verger, J., Grayon, M., Cloeckert, A., Marin, C., y Zygmunt, M. (2003). Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4), 647-51.
- Tan, C. (2011). Medicine in Stamps. David Bruce (1855–1931): discoverer of brucellosis. *Singapore Medical Journal Hawaii*, 52(3), 138-141.
- Teixeira, G., y Cloeckert, A. (2000). Characterization of heat, oxidative and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*, 68(5), 2954-2961.
- Universidad Nacional del Nordeste. (2008). *Hipertexto del Área de la Biología*. Recuperado de <http://www.biologia.edu.ar>.
- Valdés, Y., y Hernández, A. (2001). Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. *Hematology Immunology Hemoter*, 17(2), 98-107.
- Vázquez, M. (2007, 04 de abril). *Voltametría Cíclica*. Instituto de Química de la Universidad de Antioquia. Recuperado de <http://aprendeonline.udea.edu.com>.
- Velikovskiy, C., Cassataro, J., Giambartolomei, G., Goldbaum, F., y Estein, S. (2002). ADNA vaccine encoding the lumazine-synthase gene from *Brucella abortus*

- induces protective immunity in Balbc/mice. *Infection and Immunity*, 70(5), 2507-2511.
- Wang, L. (2008). Sensing physical-chemical via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensr. *Analytical Chemistry*, 9(2), 121-131.
- Xu, M., Wang, R., y Li, Y. (2016). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. *Talanta*, 148(1), 200–208.
- Zacco, E. (2006). *Diseño de Nuevos Materiales de Afinidad Universal. Aplicación en Sensores* (Tesis Doctoral). Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Zhi, Z., Gong, C., y Shen, G. (2002). Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. *Analytical Sciences*. 18(4), 625-630.
- Zuzuarregui, A. (2013). *Desarrollo de un Sistema de Detección de Endotoxinas basado en la Optimización e Implementación de un protocolo de Biofuncionalización sobre un Biosensor Electroquímico de diseño específico* (Tesis Doctoral). Universidad de Navarra, España.