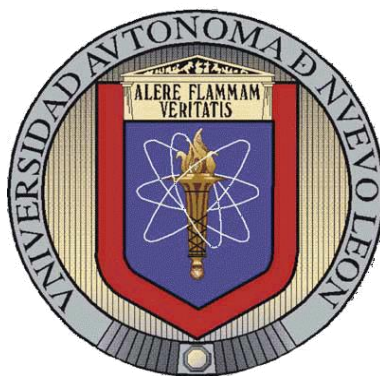


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA CONSTRUIR
INMUNOSENSORES PORTÁTILES BASADA EN NANOESTRUCTURAS
ELECTROACTIVAS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE LA INFLUENZA A

Por:

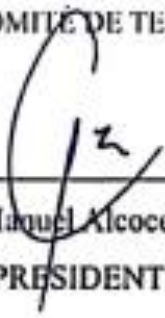
M.C. MÓNICA DENISSE GARZA VILLEGAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2025

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA CONSTRUIR INMUNOSENSORES
PORTÁTILES BASADA EN NANOESTRUCTURAS ELECTROACTIVAS PARA LA
DETECCIÓN DE VIRUS DE LA INFLUENZA A

COMITÉ DE TESIS



Dr. Juan Manuel Alcocer González
PRESIDENTE



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

SECRETARIO

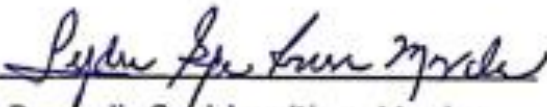


Dra. Cristina Rodríguez Hadilla
VOCAL I



Dr. Pablo Zapata Benavidez

VOCAL 2



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

VOCAL 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño

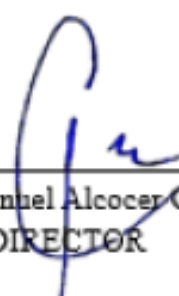
SUBDIRECTORA DE POSGRADO



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA CONSTRUIR INMUNOSENSORES
PORTÁTILES BASADA EN NANOESTRUCTURAS ELECTROACTIVAS PARA LA
DETECCIÓN DE VIRUS DE LA INFLUENZA A

COMITÉ DE TESIS



Dr. Juan Manuel Alcocer González
DIRECTOR



Dr. Juan Manuel Mora Hernández
ASESOR EXTERNO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación de tesis fue elaborado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado hacia mi persona para poder cumplir con la obtención de este grado (CVU: 894634).

Quisiera agradecer al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) por la infraestructura brindada que permitió llevar a cabo este proyecto de tesis.

A mi director de tesis, el Dr. Juan Manuel Alcocer González, muchas gracias por alentarme a continuar con mi formación profesional, por la confianza que puso en mí para poder llevar a cabo y concluir este trabajo de tesis, gracias por guiarme durante este proceso, no solo hablando del doctorado, sino desde que entré a este laboratorio hace aproximadamente 10 años.

A la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz, gracias por los consejos que ayudaron a enriquecer y guiar este proyecto de tesis, gracias por permitirme aprender más allá de lo que involucra el doctorado, le agradezco la confianza brindada y su amistad durante todos estos años.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, gracias por permitirme ser parte del LIV, así como los comentarios valiosos que fueron clave para desarrollar este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Manuel Mora Hernández, gracias por el apoyo y por estar siempre al pendiente de este proyecto, y que, aunque estemos en áreas de investigación distintas se logró complementar ambos temas y fortalecer el desarrollo de esta investigación.

Gracias al Dr. Pablo Zapata y a la Dra. Lydia Rivera por las contribuciones que fueron clave para realizar este proyecto de tesis y por mostrar siempre toda la disposición necesaria cuando se requería de su apoyo.

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a quienes conocí y trabajé durante todo el periodo que comprendió mi doctorado, gracias por el apoyo y los lazos de amistad que se formaron, que sé que seguirán más allá de esta etapa.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres Arturo Garza León y Endora Rebeca Villegas González quienes siempre fueron y serán mi pilar. Son unos padres increíbles, muchas gracias por siempre alentarme y apoyarme en cumplir mis metas, por estar siempre para mí y por creer en todo lo que puedo lograr. Muchas gracias por su amor incondicional, los amo demasiado.

A mi esposo Azael Adrián Cavazos Jaramillo, quién a sido una pieza clave en mi vida y con quien he compartido grandes y hermosos momentos, gracias por alentarme siempre, por creer en que puedo lograr todo lo que me proponga y por impulsarme a seguir con este proyecto de vida. Te amo demasiado.

A mi hija Rebeca Sofía Cavazos Garza, a pesar de que estuviera agotada y cansada siempre me llenabas de energía para seguir adelante y continuar. Te amo Hija, esto es por ti y para ti.

A mi hermana Andrea Abigail Garza Villegas, quién siempre ha estado para escucharme y motivarme en momentos de estrés. Te amo hermana.

A mis abuelos, Álvaro Garza y Ma. del Socorro León quienes siempre ha estado pendiente de mis estudios y logros. Así como a José Ángel Villegas y Rebeca González, que, aunque no están presentes, sé que estarían orgullosos de lo que he logrado y hasta donde he llegado. Los amo.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Infecciones respiratorias agudas (IRAs)	3
2.2 Virus respiratorios con potencial pandémico.....	3
2.2.1 Influenza	4
2.2.2 Estadísticas en México del IAV	6
2.2.3 Virus de la influenza	8
2.2.4 Mecanismo de infección	9
2.3 Métodos convencionales para la detección del virus de la influenza	11
2.4 Sensores	15
2.4.1 Biosensores.....	16
2.4.1.1 Tipos de biosensores	16
2.4.1.2 Basados en el bioreceptor.....	16
2.4.1.3 Basados en el transductor.....	18
2.4.1.3.1 Biosensores electroquímicos.....	18
2.4.1.3.2 Biosensores eléctricos	19
2.4.1.3.3 Biosensores ópticos	20

2.4.1.3.4 Biosensores sensibles a masas	20
2.4.1.3.5 Biosensores termométricos	21
2.5 Aplicaciones de los biosensores	21
2.6 Electrodo serigrafiados (SPEs).....	22
2.6.1 Electrodo de carbono serigrafiado (SPCE)	24
2.6.2 Electrodo de platino serigrafiado (SPPE).....	24
2.7 Materiales electrocatalíticos	25
2.7.1 Nanopartículas de carbono (CNPs)	26
2.7.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)	26
2.7.3 Quantum Dots de Grafeno (GQDs).....	27
2.8 Biosensores para influenza	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVO GENERAL	31
5.1 Objetivos específicos	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1 Diagrama general.....	32
6.2.1 Nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbón ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs).....	32
6.2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)	33
6.2.3 Quantum dots de grafeno (GQDs)	33
6.3 Caracterización de los nanomateriales sintetizados.....	33
6.4 Análisis de las propiedades electrocatalíticas de los electrodos serigrafiados (SPEs)33	
6.5 Síntesis y caracterización de los nanoconjugados (NCs).....	34
6.6 Obtención de inmunosensores electroquímicos portátiles.....	34
6.7 Caracterización de inmunosensores electroquímicos portátiles	34

6.8	Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles..	35
6.9	Validación de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos .	35
6.10	Evaluación de la especificidad de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos.....	35
7.	RESULTADOS	36
7.1	Caracterización de los nanomateriales sintetizados	36
7.1.1	Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$	36
7.1.2	Nanopartículas de oro (AuNPs)	36
7.1.3	Quantum Dots de Grafeno (GQDs).....	38
7.2	Análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPE y nanomaterial	39
7.2.1	Electrodo de Carbono Serigrafiado (SPCE) y nanomateriales.....	39
7.2.1.1	Análisis del SPCE y AuNPs.....	40
7.2.2	Electrodo de Platino Serigrafiado (SPPE) y nanomateriales	45
7.3	Caracterización de los nanoconjugados AuNPs+anticuerpo	45
7.4	Caracterización de los inmunosensores electroquímicos portátiles.....	47
7.5	Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles..	49
7.6	Validación de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos .	51
7.7	Evaluación de la especificidad de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos.....	54
8.	DISCUSIÓN.....	56
9.	CONCLUSIONES	61
10.	PERSPECTIVAS	62
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de letalidad por influenza por temporada, México 2010-2024.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pandemias suscitadas por el virus de la influenza A a través del tiempo (Harrington *et al.*, 2021).

Figura 2. Estructura del virus de la influenza A (Dou *et al.*, 2018).

Figura 3. Mecanismo de infección del virus de influenza A en una célula huésped.

Figura 4. Partes que componen a un sensor.

Figura 5. Esquema general de las biomoléculas utilizadas como bioreceptores y los tipos de transductores empleados en los diferentes biosensores.

Figura 6. Esquema de un electrodo de carbono serigrafiado (Metrohm, 2019).

Figura 7. Diagrama experimental general del proyecto para la obtención de inmunosensores electroquímicos para la detección de los virus de la influenza A H1N1 y H5N1.

Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de Fe₃O₄@C NPs.

Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de AuNPs.

Figura 10. Análisis de la composición química de las AuNPs.

Figura 11. Análisis de UV-Vis de las AuNPs en un rango de 450 a 650 nm.

Figura 12. Caracterización de los GQDs.

Figura 13. Voltamograma cíclico del análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomaterial electroactivo.

Figura 14. Voltamograma cíclico del conjunto SPCE y AuNPs.

Figura 15. Voltamograma cíclico del análisis de repetibilidad del SPCE modificado con AuNPs.

Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del WE del SPCE.

Figura 17. Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE sin modificar.

Figura 18. Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs.

Figura 19. Voltamograma cíclico del análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPPE y nanomaterial electroactivo.

Figura 20. Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs y anti-H1N1.

Figura 21. Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs y anti-H5N1.

Figura 22. Voltamograma cíclico de la caracterización del inmunosensor electroquímico para H1N1.

Figura 23. Voltamograma cíclico de la caracterización del inmunosensor electroquímico para H5N1.

Figura 24. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración de la proteína HA para H1N1.

Figura 25. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración de la proteína HA para H5N1.

Figura 26. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de muestras de sueros suplementados con la proteína H1.

Figura 27. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de muestras de sueros suplementados con la proteína H5.

Figura 28. Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos analizados proteína H1.

Figura 29. Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos analizados proteína H5.

Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de especificidad del inmunosensor para la detección de la proteína H1.

Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de especificidad del inmunosensor para la detección de la proteína H5.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μL	microlitro
μA	microamperios
AuNP	Nanopartículas de oro
Fe₃O₄@C	Nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbono
CV	Voltamperometría cíclica
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
G	gauss
g	gramos
GQD	Quantum dots de grafeno
h	horas
HA	hemaglutinina
I	corriente resultante
M	molaridad
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mVs⁻¹	milivolts por segundo
ng	nanogramos
nm	nanómetros
SPCE	Electrodo de carbono serigrafiado
SPPE	Electrodo de platino serigrafiado
V	volts

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) representan una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, principalmente aquellas ligadas a agentes virales pertenecientes al género de la influenza A. A lo largo de la historia, los virus de la influenza A han causado una serie de pandemias, teniendo registros en los años de 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) y durante el periodo que abarca desde 1968 al 2009 se han reportado epidemias estacionales causadas por el subtipo H3N2, y en el 2009 se registró la pandemia causada por el subtipo H1N1pdm09, donde nuestro país fue epicentro. Por otro lado, se ha demostrado que el subtipo H5N1 el cual presenta una alta mortalidad en aves, puede transferirse a los humanos, siendo considerado como potencial agente pandémico, denotando aún más la importancia de este grupo viral.

Es por lo anterior que es de suma importancia que la detección de agentes virales emergentes y con potencial pandémico pueda realizarse de forma rápida, efectiva y precisa con el fin de optar por las medidas de prevención y contención adecuadas, situación por la cual los métodos de detección actuales tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) no han podido hacer frente a los retos que han supuesto las pandemias más recientes, es en este sentido que los biosensores electroquímicos se posicionan como métodos confiables para la detección de múltiples agentes infecciosos, debido a cualidades como portabilidad, sensibilidad y especificidad otorgadas por los materiales electroactivos y los bioreceptores que conforman las matrices de detección, además de contar con precios de producción competitivos, al ser capaces de emplear materiales de fácil síntesis. Es por ello, que en el presente trabajo se abordará la propuesta de desarrollar un biosensor electroquímico portátil compuesto por materiales electroactivos y su conjugación con anticuerpos para la detección de virus de la influenza A de forma simultánea y de pronta respuesta.

ABSTRACT

Acute respiratory disease (ARD) represent one of the main causes of worldwide mortality, mainly those related to viral agents as influenza A. Throughout history, influenza A viruses have caused a series of pandemics outbreaks as in 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) and during the period from 1968 to 2009, it have been reported seasonal epidemics caused by the H3N2 subtype and in 2009 it was recorded the pandemic caused by the H1N1pdm09 subtype, where our country was the epicenter. On the other hand, it has been shown that the H5N1 subtype, which has high mortality in birds, can be transferred to humans, being considered a potential pandemic agent, denoting the importance of this virus.

For the mentioned reason the detection of emerging viral agents with pandemic potential must be carried out quickly, effectively, and accurately in order to stablish an appropriate prevention and containment measures, a situation for which the current detection methods such as real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are not effectives. In this sense, electrochemical biosensors are positioned as the most reliable methods for the detection of multiple infectious agents, due to qualities such as portability, sensitivity, and specificity granted by the electroactive materials and the bioreceptors, in addition to having affordable prices and competitive production. For this reason, this work will address the proposal to develop a portable electrochemical biosensor composed of electroactive materials and their conjugation with antibodies for the detection of influenza A viruses simultaneously and with a prompt response.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) de origen vírico son un problema de salud con importancia a nivel global, perjudicando especialmente a naciones en vías de desarrollo donde encontramos a México, afectando los servicios de salud, causando incapacidades escolares y laborales, posicionándose dentro de las tres principales causas de muerte, siendo los infantes menores de 5 años, adultos mayores de 60 años e individuos con el sistema inmune comprometido las poblaciones más vulnerables ante estos cuadros patológicos.

Durante la temporada invernal los virus de la influenza A se encuentran dentro de los agentes virales más importantes en el desarrollo de las IRAs, además de ser los causantes de grandes epidemias y pandemias suscitadas por la alta tasa de mutación que presentan las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La serie de pandemias derivadas a partir de los virus de la influenza A radica desde los años de 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) y en el año 2009 (H1N1pdm09). Por otro lado, encontramos a los virus de la influenza aviar, siendo el subtipo H5N1 el que presenta mayor importancia debido a que es capaz de enfermar de manera grave a las aves, así como al ser humano, clasificándolo como un agente con potencial pandémico.

Entre los métodos más empleados para la detección del virus de influenza A encontramos los métodos basados en técnicas moleculares y métodos serológicos; caracterizados por presentar alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, son pruebas que requieren protocolos laboriosos, instalaciones especializadas y de personal altamente capacitado. Por lo cual, es necesario la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que superen las limitaciones que presentan las técnicas convencionales. Es por esto, que el desarrollo de biosensores electroquímicos, caracterizados por ser dispositivos capaces de detectar analitos de interés mediante un bioreceptor compuesto por anticuerpos, enzimas o material genómico, podrían ser una alternativa al tener constatada una alta sensibilidad y selectividad en la detección de agentes infecciosos, además de ser un método de bajo costo y pronta respuesta, con potencial para miniaturización y portabilidad.

Es por esto que en el presente trabajo se desarrollará una plataforma de inmunosensor portátil basado en nanoestructuras de materiales electrocatalíticos para la detección de virus respiratorios del género A de la influenza.

2. ANTECEDENTES

2.1 Infecciones respiratorias agudas (IRAs)

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) se clasifican como un conjunto de enfermedades que se presentan con mayor frecuencia en el ser humano, afectando distintas áreas del sistema respiratorio, además de ser causantes de una alta tasa mortalidad en todo el mundo, clasificándolas como una de las 10 principales causas de muerte, afectando principalmente a niños menores de 5 años, adultos de la tercera edad, así como a individuos que presentan alguna comorbilidad (Rosete Olvera et al., 2002; Rey et al., 2011; Chirinos-Saire et al., 2021).

Existen distintos agentes causantes del desarrollo de estas infecciones, entre los cuales encontramos a las bacterias, hongos, parásitos y virus, siendo este último el agente más importante debido a que es capaz de causar el 70-80% de estas enfermedades, encontrado a aquellos que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpeviridae*, *Coronaviridae* y *Reoviridae*, como los rinovirus, siendo responsables del 40% de los casos de resfriados anuales, los coronavirus del 10%, el virus sincicial respiratorio (RSV) del 10-15%, el virus de la parainfluenza del 10-15%, los virus de la influenza del 10-15%, otros virus del 5% y virus inespecíficos del 20-30% (Rosete Olvera et al., 2002; West et al., 2002; Bayona Ovalles and Niederbacher; Zhang et al., 2020).

2.2 Virus respiratorios con potencial pandémico

El potencial pandémico de un virus respiratorio puede ser determinado con base a tres factores: la capacidad de infectar y causar enfermedades en los seres humanos, la baja inmunidad que presenta la población y, por último, la capacidad de transmisión (Tanner et al., 2015; Lipsitch et al., 2016; WHO, 2018).

Los virus de la influenza son responsables de causar las infecciones del tipo respiratorio más comunes en los seres humanos, posicionándolos como los más importantes debido a la alta morbilidad y mortalidad que presentan, reportando distintas epidemias y pandemias desde la antigüedad, debido a la alta tasa de mutación que posee, así como el ser un virus de origen zoonótico, como aquellos de origen aviar que han demostrado presentar

potencial pandémico al ser capaces de infectar y causar una enfermedad grave al ser humano, por lo que ha sido un punto de importancia dentro del sector salud (Taubenberger et al., 2008; WHO, 2018; WHO, 2023).

2.2.1 Influenza

La influenza es una de las infecciones respiratorias agudas más comunes que se encuentra presente durante todo el año, sin embargo, su incidencia se ve aumentada de manera importante durante los meses de otoño e invierno afectando el sistema respiratorio superior, ocasionando una serie de síntomas como fiebre, secreción nasal, tos, dolor de cabeza, garganta y muscular, así como fatiga, e incluso puede ser grave y letal cuando esta llega a los órganos del tracto respiratorio inferior, desarrollando los síntomas durante los primeros 4 días después de la exposición con el virus. La manera de contagio es mediante gotitas de saliva, al hablar, toser o estornudar debido a que capaz de viajar hasta un metro de distancia, así como el tener contacto con superficies que se encuentran contaminadas (Ruiz et al., 2017; Krammer et al., 2018; WHO, 2023).

La influenza es causada por un agente viral perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, dentro de esta familia encontramos seis géneros siendo influenza A, B, C y D (IAV, IBV, ICV e IDV), Thogotovirus e Isavirus (Henritzi et al., 2019; Zhang et al., 2020).

El género IAV en el área de salud pública es clasificado de los más importantes debido a su potencial pandémico, este virus tiene la capacidad de infectar tanto a los seres humanos como a distintos animales. El IAV se clasifica en distintos subtipos con base a las propiedades genéticas y antigénicas de las glicoproteínas de superficie, para la hemaglutinina (HA) se han determinado 19 tipos (H1-H19) y para la neuraminidasa (NA) se conocen 11 tipos (N1-N11) esto es debido a la alta tasa de mutación que estas glicoproteínas presentan. También pueden ser clasificados con base al huésped original como aviares, porcinos o de otros animales (WHO, 2018; Henritzi et al., 2019; Zhang et al., 2020; Mostafa et al., 2024).

A lo largo de la historia el IAV ha desarrollado una serie de epidemias y pandemias debido a la capacidad de variación antigénica que presentan sus glicoproteínas de superficie

(HA y NA) (Figura 1), en 1918 conocida como “gripe española” desarrollada por el subtipo H1N1, clasificándola como la pandemia más letal causó entre 50 y 80 millones de muertes, en 1957 en China se registró la “gripe asiática” provocada por el subtipo H2N2, en 1968 en Hong Kong apareció la “gripe de Hong Kong” causada por el subtipo H3N2 y en el 2009 por H1N1pdm09 afectando en un inicio a Norteamérica, siendo México uno de los países donde se presentaron los primeros casos, y hasta la fecha solo se han reportado infecciones a causa de los últimos dos subtipos, los cuales se encuentran en co-circulación. Por otro lado, también se ha reportado que los virus de la influenza aviar, como el subtipo H5N1 presenta una gran importancia para el sector salud, debido a que pueden infectar a los humanos causando una enfermedad grave, así como presentar una tasa de mortalidad del 60% y ser de alta patogenicidad. En 1997, se reportaron casos en humanos a causa del subtipo H5N1 en Asia y durante el periodo que comprende del 2003 hasta el 2023 la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 878 casos, de las cuales 458 fueron defunciones, presentando una tasa de letalidad del 52%. El hecho de que este tipo de virus se encuentre en mayor proporción en aves y que solo se ha reportado el contagio entre ave y humano, es de gran importancia la vigilancia del mismo, debido a que al presentar una alta tasa de mutación podría ser capaz de provocar contagios entre humanos (Girard et al., 2010; Poovorawan et al., 2013; Rojas, 2014; Ruiz et al., 2017; Tepeli and Ülkü, 2018; WHO, 2018; PAHO, 2023).

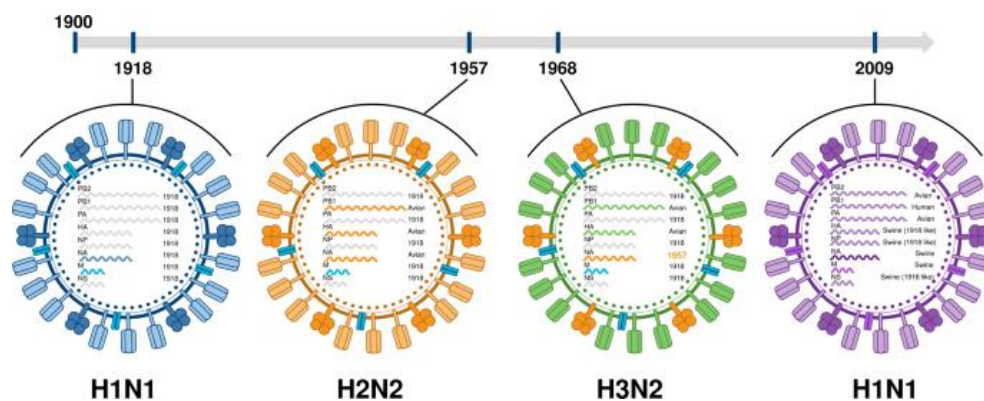


Figura 1. Pandemias suscitadas por el virus de la influenza A a través del tiempo (Harrington et al., 2021).

El IBV fue identificado en el año de 1940, este género de influenza se divide en dos linajes siendo estos Victoria y Yamagata, los cuales son capaces de infectar a los seres humanos y se encuentran en circulación en conjunto con los IAV, sin embargo, desde el 2020

no se han tenido reportes de infecciones a causa del linaje Yamagata. El IBV puede infectar a los seres humanos y al no poseer un reservorio animal específico ocasiona únicamente epidemias estacionales (Koutsakos et al., 2016; Uyeki et al., 2022).

El ICV es menos frecuente que el IAV e IAB, sin embargo, este virus puede infectar a los seres humanos causando una enfermedad leve, además, se ha observado que puede infectar algunos animales como perros, cerdos y vacas (Krejцова et al., 2014; Henritzi et al., 2019; Uyeki et al., 2022).

El IDV es un tipo de influenza que afecta principalmente al ganado, ocasionando una enfermedad respiratoria leve. Este fue identificado por primera vez en cerdos en el año 2011 en los Estados Unidos, sin encontrarse hasta el momento casos en los seres humanos (Henritzi et al., 2019; Javanian et al., 2021).

2.2.2 Estadísticas en México del IAV

Los casos debido al IAV se da principalmente durante los meses que comprenden las estaciones de otoño e invierno, siendo los grupos que presentan mayor riesgo los infantes menores de 1 año, adultos mayores de 60 años, mujeres embarazadas e individuos que padecen de alguna comorbilidad como la diabetes, obesidad, cardiopatías, cáncer, asma o insuficiencia renal. La tasa anual de prevalencia de la influenza en niños en todo el mundo es alrededor del 20 al 30% y en adultos mayores del 5 al 10%, causando de 3 a 5 millones de casos graves y de 290,000 a 650,000 muertes (Ruiz et al., 2017; WHO, 2023).

La aparición de los primeros casos de la pandemia de la influenza en el 2009 fue en México, derivada por el subtipo H1N1pdm09, registrando hasta julio del 2010 un total de 72,548 casos y 1,316 muertes (CENAPRECE, 2015). Posteriormente, en las temporadas del 2010-2011, 2012-2013 y 2014-2015, el subtipo predominante de influenza fue el H3N2, mientras que en las temporadas del 2011-2012, 2013-2014 y 2015-2016 el subtipo predominante fue el H1N1pdm09. En la tabla 1, se muestra el número de casos, defunciones y la tasa de letalidad a causa del virus de la influenza A por temporada, del 2010 hasta la segunda semana del 2024 en México, registrados por la Subsecretaría de Prevención y

Promoción de la Salud (Ruiz et al., 2017; *SINAVE*, 2023; Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2024).

Tabla 1. Tasa de letalidad por influenza por temporada, México 2010-2024.

Temporada de influenza	Casos	Defunciones	Tasa de letalidad
2010-2011	3,160	43	1.36
2011-2012	7,281	344	4.72
2012-2013	2,891	56	1.94
2013-2014	9,051	1,111	12.27
2014-2015	2,785	84	3.02
2015-2016	9,721	537	5.52
2016-2017	6,371	160	2.51
2017-2018	3,692	160	4.33
2018-2019	7,455	838	11.24
2019-2020	6,204	410	6.60
2020-2021	7	1	14.28
2021-2022	3,179	155	4.87
2022-2023	10,084	324	3.21
2023-2024	6,295	201	3.19

(Ruiz et al., 2017; *SINAVE*, 2023; Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2024).

Por otro lado, los casos reportados en México por el Servicio Nacional de Salud, Inocuidad y Calidad de Alimentos (SENASICA) a causa del subtipo H5N1 fue de un total 5.9 millones de casos de los cuales 50 fueron clasificados como altamente patogénicos, afectando principalmente a las aves que se encontraban en granjas avícolas, así como aquellas aves domésticas y silvestres en 13 distintos estados de la República Mexicana, encontrando a Aguascalientes, Baja california, Chiapas, Chihuahua, Estado de México, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tamaulipas y Yucatán. Sin embargo, a pesar de que no se ha reportado algún caso de infección en humanos por el subtipo H5N1, es importante tomar en cuenta que este subtipo es capaz de enfermar e infectar de manera grave al ser humano (PAHO, 2023).

2.2.3 Virus de la influenza

Las partículas del virus de la influenza presentan una morfología esférica con un diámetro de 100 a 120 nm con un genoma de RNA monocatenario de sentido negativo segmentado; los géneros de influenza A y B poseen ocho segmentos de RNA, mientras que los géneros C y D presentan siete segmentos, los cuales codifican para cada proteína viral que conforma al virus. El tamaño total del genoma del IAV es de 13.6 kb, y cada segmento consta alrededor de 0.9 a 2.3 kb. La estructura de los segmentos se compone de extremos 5' y 3' conservados, regiones no traducidas específicas del segmento (UTR) y al menos un marco de lectura abierto (ORF). Los complejos de ribonucleoproteína viral (vRNP) se obtienen al ensamblarse los segmentos del RNA viral (RNAv), los extremos 5' y 3' se encuentran unidos a la RNA polimerasa dependiente de RNA viral (RpdR) y las regiones UTR, así como el ORF se encuentra unido por una nucleoproteína viral oligomérica (NP) tomando una forma de varilla de doble hélice. La RpdR se encuentra conformada por tres proteínas, la polimerasa básica 1 (PB1) involucrada en la síntesis del RNA mensajero viral (mRNAv) y además posee actividad endonucleasa, la polimerasa básica 2 (PB2), tiene la función de iniciar la transcripción del RNAv, y por la polimerasa ácida (PA) conocida como P3 en los géneros del virus C y D, presentando actividad endonucleasa. Otra proteína es la hemaglutinina (HA), la cual es una glicoproteína de superficie que se encuentra involucrada en la absorción y fusión del virus al unirse a los receptores del ácido siálico presente en la superficie de la célula huésped, se compone de los dominios HA1 encargados del reconocer los receptores del ácido siálico y de los dominios HA2 que median la fusión. También se compone de la glicoproteína neuraminidasa (NA), cuya función se encuentra relacionada con el rompimiento del ácido siálico permitiendo de esta manera la liberación de las partículas virales recién sintetizadas de la célula huésped, la nucleoproteína (NP), se encuentra asociada a segmentos del RNAv con el objetivo de formar la ribonucleoproteína viral (RNPv), también se encuentra involucrada en la regulación de importación nuclear. Otra proteína codificada es la proteína de matriz (M1), esta es el componente estructural más importante del virus, se localiza debajo de la bicapa lipídica proporcionando soporte a la cápside, además, se encuentra involucrada en la regulación de la exportación nuclear del RNAv, así como de la gemación viral. La proteína de matriz 2 (M2) es una proteína presente en la superficie de las células infectadas, se encuentra involucrada en la formación del canal iónico, en el

descubrimiento y ensamblaje del virus. Por último, encontramos a la proteína no estructural (NS1), puede estar involucrada en la regulación de la expresión génica del huésped y, por último, encontramos a la proteína no estructural (NS2) involucrada en la exportación nuclear del RNA_v (Figura 2) (Oxford and Hockley, 1987; Bouvier and Palese, 2008; Fodor and Te Velthuis, 2020).

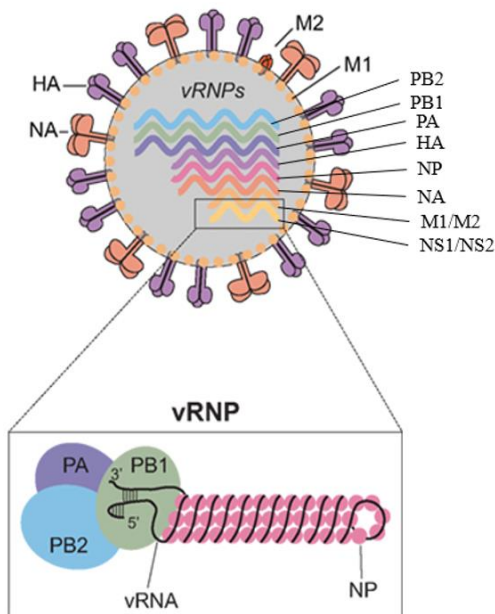


Figura 2. Estructura del virus de la influenza A (Dou et al., 2018).

2.2.4 Mecanismo de infección

El mecanismo de infección del IAV comienza cuando el virión se une a la superficie celular de la célula huésped, la proteína de superficie HA se une a los receptores del ácido siálico de la célula huésped en donde ingresa mediante el mecanismo de endocitosis y fusión, la cual se cree que es mediada por mecanismos dependientes e independientes de clatrina. Después de ingresar a la célula huésped, el endosoma de la célula sufre un cambio de pH hacia un pH más ácido provocando un cambio conformacional de la proteína viral HA exponiendo el péptido de fusión hidrofóbico (subunidad HA2), insertándose en la membrana endosomal causando una fusión con la membrana viral, luego la proteína M2, forma un canal iónico modulando el pH permitiendo el paso del flujo de protones a través de la membrana viral al núcleo viral induciendo de esta manera la disociación de la nucleocápside y la proteína de matriz M1, liberando los complejos de RNP_v en el citoplasma de la célula

huésped que después son importados al núcleo a través de los poros nucleares por señales de localización nuclear (NLS), donde se replica obteniendo RNA complementario el cual es utilizado posteriormente como molde para la obtención de grandes cantidades de nuevo RNAv, también se lleva a cabo la transcripción para la obtención de mRNA viral por acción de la RpdR. Luego el mRNA viral es exportado al citoplasma por las proteínas M1 y NS2 para ser traducido utilizando la maquinaria ribosomal de la célula huésped para la obtención de las proteínas virales. Las proteínas PB1, PB2, PA, NP, M1, NS1 Y NS2 sintetizadas, son importadas al núcleo para formar nuevas RNPv en conjunto con el RNAv, las proteínas M2, HA y NA traducidas son transportadas al retículo endoplásmico rugoso para un plegado correcto, y luego son trasladadas al aparato de Golgi para las modificaciones postraduccionales, luego se dirigen hacia la membrana celular donde se realiza el ensamblaje quedando expuestas en la superficie de la célula infectada. Los RNPv sintetizados son exportados a la membrana plasmática mediante NS2 Y M1, ensamblándose con las proteínas HA, NA y M2 mediante la proteína M1 donde son recubiertos por la envoltura lipoproteica obtenida a partir de la membrana plasmática de la célula huésped. Por último, la liberación de las nuevas partículas virales es mediada por la proteína NA, la cual rompe los residuos de ácido siálico de la célula huésped permitiendo de esta manera la salida de nuevas partículas virales mediante gemación (Figura 3) (Matsuoka et al., 2013; Krejcova et al., 2014; Nuñez and Ross, 2019; Du et al., 2023).

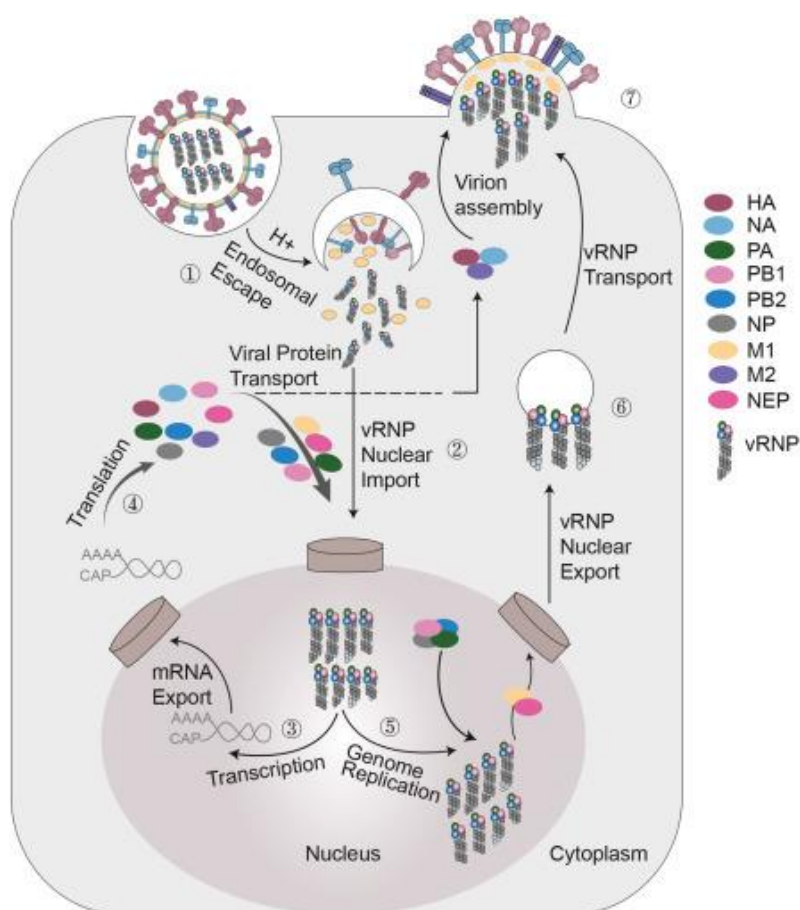


Figura 3. Mecanismo de infección del virus de influenza A en una célula huésped (Du et al., 2023).

2.3 Métodos convencionales para la detección del virus de la influenza

Existen distintos métodos convencionales para la detección del IAV, los cuales se pueden clasificar como métodos tradicionales encontrando principalmente al cultivo de aislamiento del virus, pruebas serológicas como pruebas inmunofluorescentes, fijación del complemento (CF), ensayo de doble inmunodifusión, prueba de inmunodifusión radial única, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) e inhibición de la hemaglutinación, los métodos rápidos y avanzados como las pruebas de detección rápida de influenza (RIDT), así como las técnicas basadas en técnicas moleculares como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los métodos de detección específicos de RNA no basados en PCR (Ravina et al., 2020).

Cultivo de aislamiento viral. Este método se caracteriza por tener alta sensibilidad y especificidad, donde se utilizan distintas líneas celulares como las células epiteliales primarias de adenoides humanos, células Vero, MRC-5, células primarias de riñón de mono Rhesus (RMK), y la línea continua LLC-MK2, así como las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), siendo las más apropiadas, sin embargo, una de sus desventajas es que el procedimiento requiere de mayor tiempo para la obtención de resultados, siendo este alrededor de 7 a 10 días para poder observar el efecto citopático, así como ser un método costoso y de requerir instalaciones específicas (Valdés et al., 2003; Amano and Cheng, 2005; Ravina et al., 2020).

Prueba de flujo lateral (LFA). Esta es una prueba rápida, dónde nos permite detectar de manera rápida distintos agentes infecciosos, obteniendo resultados en un periodo entre 5 a 30 minutos. A demás es clasificada como una prueba de bajo costo y de fácil manejo, la cual no requiere de infraestructura en específico para realizar el análisis. Esta técnica se basa en la observación de la interacción de nanoconjugados de nanopartículas de oro coloidal con anticuerpos específicos y el agente infeccioso, que posteriormente, interaccionan con anticuerpos anclados en una tirilla cuando la muestra a analizar es positiva dando como resultado un resultado colorimétrico observando bandas color rojo, sin embargo, esta prueba no presenta una alta sensibilidad (Han et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Pruebas inmunofluorescentes. En este método se utiliza un portaobjetos dónde se fijan las células de la muestra, que posteriormente se tiñen y conjugan con anticuerpos específicos marcados con un fluoróforo. A pesar de que esta técnica presenta una sensibilidad del 70 al 100% y de una especificidad del 80 al 100%, es clasificado como un método que requiere de mayor tiempo para la obtención de resultados, debido a que requiere de 2 a 4 horas para detectar el virus y de requerir de un microscopio de fluorescencia para poder observar el resultado final (Ravina et al., 2020).

Fijación del complemento (CF). Esta técnica permite detectar la presencia de anticuerpos presentes en una muestra. Se lleva a cabo mediante el uso de un suero el cual es inactivado, posteriormente se le adiciona el antígeno de interés y las proteínas del complemento, por último, se le agregan eritrocitos de oveja como indicador. El resultado se

considera positivo cuando el suero analizado contiene anticuerpos contra el antígeno de interés, al formar el complejo antígeno-anticuerpo este interacciona con las proteínas del complemento, por lo cual no ocurre la hemólisis de los eritrocitos, por otro lado, el resultado es considerado como negativo cuando se observa la hemólisis en la muestra, debido a que el complejo antígeno-anticuerpo no se forma y las proteínas del complemento al estar libres en la muestra se unen a los eritrocitos provocando la hemólisis de los mismos. Es una prueba es considerada por ser laboriosa, por lo tanto, requiere de mayor tiempo para obtener resultados, además de requerir reactivos específicos, por otra parte, es considerada como una técnica que no permite distinguir entre diferentes cepas del mismo virus (Ravina et al., 2020).

Doble inmunodifusión (DI). Es una técnica que se utiliza para la tipificación del virus de la influenza la cual permite detectar antígenos y anticuerpos. Se utiliza un gel agarosa en el cual se colocan pocillos circulares adyacentes dónde se coloca en el centro una muestra de suero que contenga anticuerpos, y en los hoyos que los rodean la muestra, si este contiene antígenos con el antisuero, estos migrarán. Se clasifica como un método laborioso y de requerir mayor tiempo para la obtención de resultados, debido a que requiere del cultivo del virus (Ravina et al., 2020).

Prueba de inmunodifusión radial única. Es un método utilizado para determinar la antigenicidad de la HA del virus. Los anticuerpos anti-HA son separados de la muestra de suero, posteriormente el antígeno se coloca en pocillo de gel de agarosa formando un anillo de precipitación que corresponde a la inmunoreacción antígeno-anticuerpo (Ravina et al., 2020).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Esta técnica se basa en un formato ELISA tipo sándwich utilizando para la detección del antígeno del IAV anticuerpos de captura monoclonales específicos de la NP, los cuales se encuentran unidos a una matriz sólida posteriormente, se utiliza un anticuerpo de detección policlonal el cual se encuentra biotinilado. Esta técnica se clasifica por ser altamente sensible y específica, sin embargo, requiere de grandes periodos de incubación lo cual prolonga el tiempo de obtención de resultados (Charlton et al., 2009).

Inhibición de la hemaglutinación (IHA). Es una técnica simple y rápida utilizada para determinar el tipo antigénico y confirmar la infección del virus. Se basa en inhibir la reacción de hemaglutinación, es decir, se utilizan anticuerpos anti-HA, evitando que el antígeno HA del IAV se una a los receptores del ácido siálico presente en los eritrocitos y formen un complejo. A pesar de poseer una alta sensibilidad, presenta a su vez limitaciones, como de requerir personal altamente capacitado, realizar un procesamiento de la muestra, así como una baja reproducibilidad y en ocasiones puede producir una reacción cruzada con otros virus (Ravina et al., 2020).

Pruebas de detección rápida de influenza (RIDT). Estas técnicas permiten obtener resultados en un tiempo de 30 minutos, mediante la detección de antígenos virales dando como resultado una señal colorimétrica. Una de las desventajas de estas pruebas es que pueden obtener falsos positivos debido a la poca sensibilidad que posee, puesto a que puede variar dependiendo del tipo de muestra a analizar, el tiempo de infección, edad del paciente, entre otros factores. A pesar de permitir diferenciar entre IAV e IBV, no es capaz de determinar los subtipos del IAV. Entre estas pruebas podemos encontrar NanoSign Influenza A/B kit, QuickVue Influenza A+B(Quidel), TruFlu rapid influenza A and B, Directigen EZ Flu A+B test y Direct Immunofluorescence assay (DFA) (Ravina et al., 2020).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es el principal método utilizado para la detección de distintos patógenos. Esta técnica puede ser basada en transcriptasa inversa (RT-PCR) o tiempo real. La técnica de RT-PCR convierte el RNA del virus en cDNA mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa que posteriormente es amplificada, esto se realiza específicamente del gen de la matriz debido a la alta conservación que presenta en el virus de la influenza, lo cual permite la tipificación del virus, por otro lado, la subtipificación es realizada mediante la amplificación del gen de HA utilizando cebadores específicos. Una de las ventajas de este método es su alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, requiere de mayor tiempo para la obtención de resultados (>80 min), es un método laborioso, costoso y requiere personal altamente capacitado, así como de instrumentación en específico (Ravina et al., 2020).

Métodos de detección específicos de RNA no basados en PCR. La técnica de transcripción reversa-LAMP (RT-LAMP) se basa en la amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso mediante la conversión del RNA a cDNA por acción de la transcriptasa reversa, posteriormente es amplificado por acción de la DNA polimerasa. Esta técnica es específica para la detección de genomas de RNA, es considerada como una técnica sencilla al solo requerir un paso y de no requerir un termociclador para realizar la reacción (Carmona et al., 2018; Ravina et al., 2020).

Debido a las limitaciones que presentan las técnicas convencionales en la detección de agentes infecciosos como son los virus de la influenza A, se ha buscado el desarrollo de nuevos métodos de detección como lo es el desarrollo de biosensores, con el fin de disminuir el tiempo de obtención de resultados, el procesamiento de las muestras, costos y de requerir personal altamente capacitado, pero presentando sensibilidad, especificidad y portabilidad (Ravina et al., 2020).

2.4 Sensores

Los sensores son dispositivos que nos permiten detectar una molécula de interés inmersa en un medio; éste se compone de dos elementos principales, el receptor y el transductor (Figura 4). El receptor es el elemento que recibe la señal que proviene del medio, esta puede ser física o química, posteriormente, transmite esta señal en forma de energía eléctrica hacia el transductor, elemento que tiene como objetivo traducir esta energía en datos cuantificables. Podemos encontrar una vasta cantidad de sensores desarrollados debido a que existen distintas moléculas o estructuras que pueden fungir como receptores, entre los cuales encontramos a los biosensores (Buenger et al., 2012; Ali et al., 2017; Huang et al., 2021).

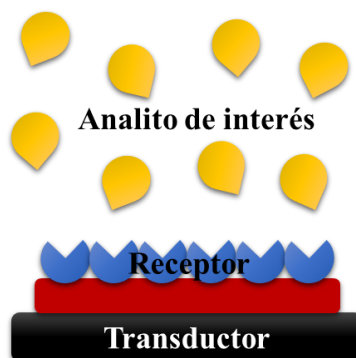


Figura 4. Partes que componen a un sensor.

2.4.1 Biosensores

Los biosensores son dispositivos que permiten detectar una molécula de interés mediante el análisis de reacciones biológicas. Estos utilizan principalmente el acoplamiento de moléculas de tipo biológico para que funjan como receptores, conocidos como bioreceptores, algunos ejemplos son el uso de enzimas, anticuerpos, proteínas, ácidos nucleicos, células completas, tejidos, orgánulos (Ibraheem and Campbell, 2010; Monošík, 2012; Arduini et al., 2016; Naresh and Lee, 2021).

2.4.1.1 Tipos de biosensores

Los biosensores se pueden clasificar con base a dos criterios principales, dependiendo el tipo de biomolécula empleada como bioreceptor, o bien basados en la clase de transductor a utilizar (Figura 5), esto depende de tipo de análisis que se desea realizar, así como el analito a detectar (Monošík, 2012; Naresh and Lee, 2021).

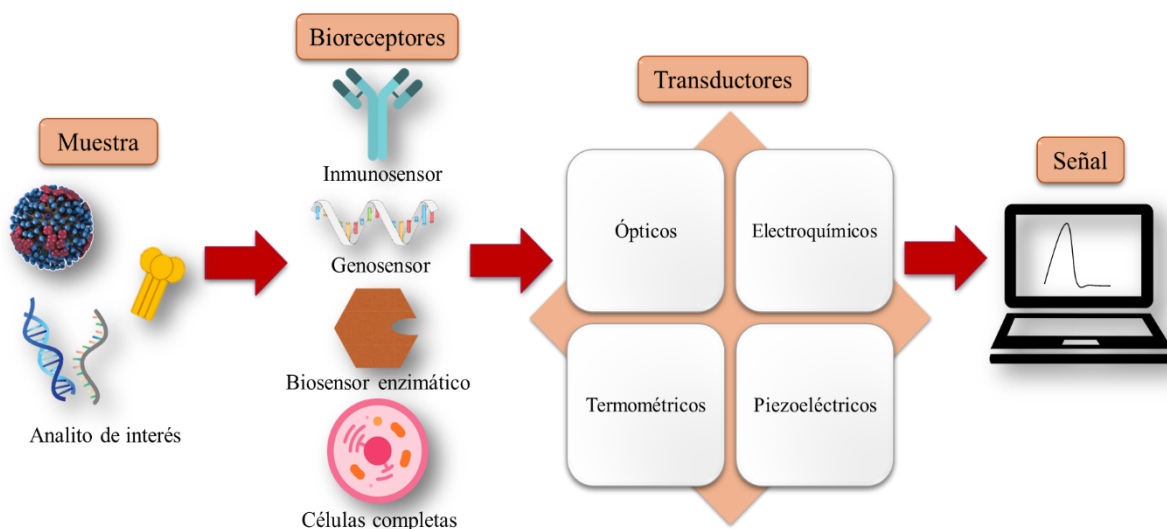


Figura 5. Esquema general de las biomoléculas utilizadas como bioreceptores y los tipos de transductores empleados en los diferentes biosensores.

2.4.1.2 Basados en el bioreceptor

Podemos encontrar distintos tipos de biosensores basados en la molécula biológica empleada como bioreceptor, entre las cuales podemos encontrar principalmente a las

enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos y células completas (Monošík, 2012; Ribeiro et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

Enzimas. Los biosensores basados en enzimas, conocidos como biosensores enzimáticos, basan su detección en el análisis del producto derivado de la catálisis del sustrato por la enzima específica, mediante el uso de un transductor. Además, son caracterizados por presentar alta especificidad característica brindada por la alta afinidad que presenta la interacción enzima-sustrato, siendo la glucosa y la urea las enzimas más implementadas para el desarrollo de los biosensores enzimáticos (Monošík, 2012; Ribeiro et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

Anticuerpos. Este tipo biosensor es conocido como inmunosensor, el cual basa la detección del analito de interés en la formación del complejo que se obtiene de la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, además pueden clasificarse como no etiquetados, aquellos que basan su detección por la afinidad del antígeno al anticuerpo y los etiquetados, aquellos dónde la etiqueta que se utiliza para marcar al bioreceptor es detectable. Estos se caracterizan por presentar una alta especificidad, sensibilidad y un bajo límite de detección y su utilización radica principalmente en la detección de organismos patógenos, toxinas, elementos del sistema inmune, marcadores tumorales, hormonas y virus (Buenger et al., 2012; Monošík, 2012; Ribeiro et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

Ácidos nucleicos. Los biosensores basados en ácidos nucleicos conocidos como genosensores utilizan DNA o RNA o ácido nucleico peptídico como bioreceptor para la detección de una señal mediante la hibridación de bases entre el bioreceptor y la secuencia complementaria específica del analito de interés. Son implementados principalmente en el área médica para la detección de enfermedades genéticas, enfermedades específicas, proteínas de interés clínico, así como para la detección de organismos patógenos y se caracterizan por presentar una alta sensibilidad y selectividad (Monošík, 2012; Naresh and Lee, 2021).

Células completas. Este tipo de biosensores utilizan la célula completa para la detección de microorganismos patógenos o toxinas, debido a que las proteínas de superficie, glicoproteínas, la envoltura celular, lipopolisacáridos o peptidoglicanos actúan como

elementos de reconocimiento. Se caracterizan por presentar límites de detección muy bajos, sin embargo, estos pueden dar como resultados falsos positivos, debido a que se pueden presentar interacciones inespecíficas. Su aplicación radia principalmente en el área médica y medio ambiente, en la detección de organismos patógenos, toxinas, análisis de compuestos farmacéuticos, pesticidas, metales pesados y contaminantes (Monošík, 2012; Ribeiro et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

2.4.1.3 Basados en el transductor

Los biosensores también pueden clasificarse dependiendo del tipo de transductor implementado para la detección, encontrando biosensores de tipo electroquímicos, eléctricos, ópticos, piezoeléctricos y termométricos (Monošík, 2012; Kulkarni et al., 2022).

2.4.1.3.1 Biosensores electroquímicos

Los biosensores basados en un transductor de tipo electroquímico son considerados los más implementados y estudiados, esto debido a su alta sensibilidad, fácil manejo, bajo costo de instrumentación, posibilidad de miniaturización y automatización. Este tipo de transductor realiza la medición mediante la observación de una respuesta eléctrica cuando el analito de interés interacciona con el bioreceptor al producir o consumir iones o electrones afectando las propiedades eléctricas tras aplicar un voltaje, resistencia o corriente eléctrica (Monošík, 2012; Arduini et al., 2016; Khan et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

De acuerdo al tipo de transductor y las técnicas implementadas para la medición, los biosensores de tipo electroquímico son clasificados como potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e impedimétricos (Touhami, 2014; Naresh and Lee, 2021).

Potenciométricos. Estos biosensores determinan su detección mediante la medición de la carga acumulada observada entre la interacción del analito de interés y el bioreceptor en el electrodo de trabajo la cual es comparada con el electrodo de referencia, el cual posee un valor de corriente cero (Ronkainen et al., 2010; Naresh and Lee; 2021).

Amperométricos. Los biosensores de tipo amperométricos miden un cambio en la corriente resultante tras los procesos de oxidación o reducción de las especies electroactivas

al aplicar un potencial constante deseado, relacionando la cantidad del analito con la magnitud de la corriente obtenida (Ronkainen et al., 2010; Naresh and Lee, 2021).

Voltamperométricos. Este tipo de biosensor realiza un escaneo en un rango de potencial controlado y establecido obteniendo como respuesta cambios en la corriente anódica, donde ocurren procesos de oxidación o en la corriente catódica donde ocurren procesos de reducción, la cual es proporcional a la concentración del analito en cuestión. Las técnicas electroquímicas mayormente utilizadas para este tipo de transductor es la voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría cíclica, voltamperometría hidrodinámica, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna y voltamperometría de stripping. Por otro lado, los biosensores voltamétricos se clasifican por realizar mediciones con alta sensibilidad y el poder realizar la detección de distintos analitos inmersos en una muestra de manera simultánea (Ronkainen et al., 2010; Naresh and Lee, 2021).

Impedimétricos. Los biosensores electroquímicos que basan sus mediciones en la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) determinan las propiedades resistivas, es decir, la oposición del flujo de electrones, y las propiedades capacitivas, la capacidad que tiene el material de retener la corriente, al aplicar una corriente alterna sinusoidal de pequeña amplitud. Este tipo de biosensor es implementado en la detección de las inmunoreacciones, obteniendo cambios en la resistencia, los cuales son proporcionales a la concentración del antígeno (Ronkainen et al., 2010; Naresh and Lee, 2021).

2.4.1.3.2 Biosensores eléctricos

Conductimétricos. Realizan las mediciones al monitorear cambios en la conductancia observados en los electrodos cuando la composición cambia en el curso de la reacción química debido a la interacción del bioreceptor con el analito de interés (Ronkainen et al., 2010; Monošík, 2012; Naresh and Lee, 2021).

2.4.1.3.3 Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos miden señales de luz, tal como la intensidad de la mismo o bien la frecuencia de absorción o emisión, encontrando dispositivos que utilizan distintos tipos de espectroscopía como fluorescencia, absorción, fosforescencia, Raman, SERS, refracción y espectrometría de dispersión. difracción óptica. Las principales propiedades que se miden es la energía, polarización, amplitud, tiempo de caída y/o fase. Este tipo de biosensores son implementados en la detección de elementos biológicos, así como las interacciones moleculares utilizando métodos ópticos (Monošík, 2012; Touhami, 2014; Huang et al., 2021).

2.4.1.3.4 Biosensores sensibles a masas

Piezoeléctricos. Estos biosensores realizan su análisis mediante la detección de un cambio en la frecuencia de oscilación del material piezoeléctrico tras aplicar una señal eléctrica de una frecuencia específica. Cuando ocurre la interacción entre el analito y el bioreceptor que se encuentra anclado al material piezoeléctrico ocurre un aumento en la masa del cristal debido a la masa adicional provocando un cambio en la frecuencia de oscilación evaluando la masa agregada. Dentro de los materiales piezoeléctricos más utilizados se encuentra el cristal de cuarzo, sin embargo, también podemos encontrar la turmalina, niobato de lito o tantalato de litio, óxido de zinc o nitruro de aluminio. Este tipo de biosensor es implementado en el área de alimentos, medio ambiente y en el área médica (Monošík, 2012; Huang et al., 2021).

Microcantilever. Analiza cambio en la curvatura del cantilever o la frecuencia vibratoria, mediante la transducción de la adsorción molecular o las interacciones moleculares en una superficie en el cantiléver. Las principales propiedades determinadas mediante este tipo de dispositivo en la viscosidad, densidad y la tasa de flujo (Monošík, 2012).

2.4.1.3.5 Biosensores termométricos

Este tipo de biosensores basan su medición al detectar reacciones exotérmicas o endotérmicas observadas en la interacción del bioreceptor y el analito de interés, midiendo la energía térmica que es liberada o absorbida la cual es proporcional a la concentración del analito inmerso en la muestra. Estos biosensores son utilizados principalmente en los análisis de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Monošík, 2012; Naresh and Lee; 2021; Kulkarni et al., 2022).

2.5 Aplicaciones de los biosensores

El desarrollo de los biosensores ha presentado un auge en la aplicación de distintas áreas de investigación, entre las cuales se encuentran el medio ambiente, médico, agricultura y en la industria alimentaria (Ali et al., 2017; Kulkarni et al., 2022).

Dentro del área ambiental, los biosensores son utilizados en la detección de agentes contaminantes como toxinas, pesticidas y metales pesados, siendo estos últimos los que presentan mayor amenaza, encontrando principalmente plomo, cadmio, mercurio, cobre, níquel y cobalto. Estos agentes son responsables de causar peligro en el medio ambiente en el agua, cielo y aire, así como afectar la salud de los seres humanos. Los biosensores implementados son aquellos basados en enzimas y ácidos nucleicos (Ali et al., 2017; Kulkarni et al., 2022).

En el área médica se han implementado los biosensores en la detección de analitos específicos involucrados en el desarrollo de distintas patologías como la detección de marcadores tumorales, hormonas, glucosa, enfermedades cardiovasculares y genéticas, así como la detección de agentes patógenos como lo son los virus y bacterias (Ali et al., 2017; Kulkarni et al., 2022).

Ya se tienen reportes del desarrollo de biosensores para distintos tipos de virus como el virus de la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del ébola, virus Zika, novovirus, dengue, coronavirus y el virus de la influenza, entre otros (Saylan et al., 2019).

Por otro lado, una de las aplicaciones más buscadas de los biosensores en el diagnóstico y detección de agentes patógenos es que estos puedan ser implementados como pruebas en el punto de atención (POCT), lo cual nos permitiría realizar la prueba cerca del paciente, con el objetivo de obtener resultados de manera más rápida para poder optar por la mejor atención y tratamiento para el paciente y evitar el contagio de la misma (Ribeiro et al., 2020).

En la industria alimentaria los biosensores han sido utilizados principalmente para garantizar la sanidad e inocuidad de los alimentos, mediante la detección e identificación de organismos patógenos como *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* y *Salmonella* son ejemplos de bacterias causantes del deterioro de los alimentos, así como la intoxicación en los seres humanos por consumir alimentos contaminados. Los hongos también son causantes del deterioro de los alimentos, entre ellos se encuentran la identificación de *Botrytis sp.*, *Aspergillus* y *Colletotrichum*, entre otros (Ali et al., 2017; Kulkarni et al., 2022).

2.6 Electrodo serigrafiados (SPEs)

Los electrodos serigrafiados (SPEs) ya han sido implementados en el área de sensores, sirviendo como una plataforma en la cual es posible modificar fácilmente con distintos elementos como nanopartículas, polímeros, metales, enzimas, entre otros, para la detección de un analito de interés. Los SPEs basan su tecnología en la serigrafía, donde utilizan sustratos como la cerámica o el plástico en los cuales con ayuda de mallas se imprime una tinta, esta puede ser a base de carbono, oro, plata, platino, grafeno, enzimas, polímeros, metales, óxidos metálicos, por mencionar algunos ejemplos, otorgándole una forma y tamaño al electrodo, además se coloca un aislante con el objetivo de evitar interferencia entre los tres electrodos que componen al electrodo serigrafiado. La sensibilidad y selectividad del electrodo se determina mediante la composición de la tinta utilizada, así como de la modificación realizada en su superficie, cabe destacar que estos dispositivos ya se encuentran comercializados, debido a la amplia variedad de los tipos de electrodos elaborados (Mohamed, 2016; Pérez-Fernández et al., 2020).

Algunas ventajas que posee esta tecnología en el desarrollo de sensores es su fácil manejo, evitando el requerimiento de personal altamente especializado, presentan confiabilidad, alta reproducibilidad entre los electrodos, bajo costo, portabilidad, lo cual le permite llegar a zonas que son de difícil acceso, requiere de microvolúmenes de la muestra, así como de reactivos para poder realizar el análisis, son dispositivos confiables y desechables evitando contaminación cruzada con otras muestras, clasificándolos como Point of Care Testing (POCT) (Arduini et al., 2016; Mohamed, 2016; Pérez-Fernández et al., 2020).

Los SPEs son clasificados como un circuito eléctrico que consta de tres electrodos principales, uno de ellos es el electrodo de trabajo (WE), el cual es el área donde se realiza la modificación con el material que se desea según sea el análisis que se quiera realizar, además de ser el lugar donde ocurre la interacción directa entre el analito de interés y el receptor, elaborado de un material conductor químicamente estable. El segundo electrodo se conoce como contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE), se encarga presentar una conexión entre el electrodo de trabajo y el electrolito brindando la corriente necesaria para equilibrar la corriente observada en el electrodo de trabajo. El tercer electrodo es el electrodo de referencia (RE), el cual es el encargado de proveer un potencial estable y conocido, siendo los más utilizados los Ag/AgCl o el electrodo saturado de calomelanos (SCE) (Figura 6) (Wujcik et al., 2014; Paimard et al., 2023).

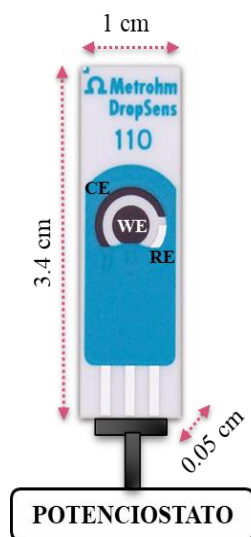


Figura 6. Esquema de un electrodo de carbono serigrafiado (Metrohm, 2019).

2.6.1 Electrodo de carbono serigrafiado (SPCE)

Los electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) presentan algunas ventajas sobre los electrodos basados en otro tipo de tintas, debido al uso de carbono como tinta, son clasificados como electrodos económicos, son químicamente inerte y adaptables. Estos tipos de electrodos ya han sido implementados en distintas áreas como biosensores electroquímicos, una de ellas es en el diagnóstico médico, monitoreo del medio ambiente, así como en el análisis de alimentos (Renedo et al., 2007; Mohamed, 2016; Paimard et al., 2023).

En el 2021, Rahmati et al., reportaron el uso de un electrodo de carbono serigrafiado como plataforma para el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgM/IgG específicos contra el SARS-CoV-2, mediante la electrodeposición de nanopartículas de hidróxido de níquel en las cuales se les inmovilizó en su superficie proteínas spike del SARS-CoV-2 fungiendo como bioreceptores para la detección de los anticuerpos. El sistema fue caracterizado mediante voltamperometría de pulso diferencial logrando detectar anticuerpos en un rango de 1 fg/mL a 1 µg/mL, determinando que el inmunosensor presenta un LOD de 0.3 fg/mL y permite la obtención de resultados en menos de 20 minutos.

2.6.2 Electrodo de platino serigrafiado (SPPE)

Los electrodos de platino serigrafiados (SPPE) se han utilizado como sensores, presentando ventajas sobre los electrodos elaborados a base de otros elementos, una de ellas es que presenta una cinética más rápida al ser un elemento electrocatalítico. Sin embargo, una de sus desventajas es que presentan un alto costo (Metters et al., 2012; Nguyen et al., 2019).

En el 2019, Nguyen et al., utilizaron un electrodo de platino serigrafiado como plataforma para el desarrollo de un biosensor electroquímico que permita la detección de patógenos bacterianos como *Salmonella enteritidis*. El biosensor se conformaba por el uso anticuerpos policlonales de *Salmonella enteritidis* como bioreceptores inmovilizados sobre la superficie de nanorods de óxido de zinc (NRs). Mediante voltamperometría cíclica y

espectroscopía de impedancia electroquímica se logró detectar la bacteria en una concentración de 10^3 UFC/mL.

2.7 Materiales electrocatalíticos

Uno de los objetivos por lo cual se ha implementado la modificación de los SPEs con materiales electrocatalíticos es el mejoramiento de las características analíticas del sistema, al presentar un área superficial alta, lo cual proporciona una mayor capacidad de carga de tipo eléctrica y mayor conductividad, presentan una estabilidad química, baja toxicidad, excelente actividad catalítica. Para determinar que un material es adecuado para su uso en el desarrollo de biosensores de tipo electroquímico, estos deben presentar buenas propiedades electrocatalíticas, facilitar el paso de electrones y presentar biocompatibilidad con distintos bioreceptores. Dentro de los materiales electrocatalíticos utilizados encontramos a los basados en carbono como los nanotubos de carbono (CTNs), grafeno (GR), carbon dots (CDs), quantum dots de grafeno (GQDs) y quantum dots de óxido de grafeno (GOxQDs), nanopartículas de carbono (CNP), nanopartículas metálicas como las nanopartículas de oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), hierro (Fe), cobalto (Co), Cobre (Cu), paladio (Pd) y óxidos metálicos, así como perlas magnéticas (Zhu et al., 2015; Arduini et al., 2016; Cho et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

Se ha determinado que los nanomateriales al estar particulados estos tienen la capacidad de aumentar la sensibilidad de los biosensores desarrollados debido a que estas presentan una alta relación superficie-volumen, permitiendo aumentar el número de elementos de reconocimiento en su superficie, provee una mayor eficiencia de transferencia de electrones, alta conductividad eléctrica, amplificando y mejorando la señal, buena estabilidad química, robustez mecánica, además poseen un tamaño que les permite la miniaturización del sistema y permite interactuar con elementos de reconocimiento biológicos, debido a que se encuentra a la misma escala permitiendo obtener una sinergia (Kaya et al., 2020; Naresh and Lee, 2021).

2.7.1 Nanopartículas de carbono (CNPs)

Las CNPs poseen características que las hacen adecuadas su implementación en distintas aplicaciones dentro del área médica, entre las aplicaciones encontramos la administración de fármacos, terapia génica y fotodinámica, bioimagen, así como en el desarrollo de sensores y biosensores. Algunas de las propiedades que caracterizan las CNPs son las propiedades ópticas como la fluorescencia y fotoluminiscencia, presentan biocompatibilidad y excelentes propiedades electroquímicas, son químicamente inertes, presentan buena estabilidad química, baja toxicidad y bajo costo de producción (Lai et al., 2017; Asadian et al., 2019; Cho et al., 2020).

En el 2017, Lai et al., reportaron el desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección del virus de la encefalitis japonesa (JEV) basado en un electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) en el cual fueron inmovilizados nanoconjugados de nanopartículas de carbono (CNPs) funcionalizadas con anticuerpos monoclonales específicos del JEV. Se utilizaron las técnicas electroquímicas como voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica para su caracterización, demostrando un rango de detección de 1-20 ng/mL, con un LOD de 0.36 ng/mL y una sensibilidad de 0.024 ng/mL, además, se determinó que el biosensor presentó alta selectividad al JEV y permite obtener los resultados en un lapso de 10 minutos.

2.7.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Las AuNPs son las nanopartículas metálicas mayormente utilizadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos debido a las características y propiedades específicas que poseen, dentro de estas podemos encontrar las propiedades optoelectrónicas, alta relación superficie-volumen, permiten ser funcionalizadas fácilmente con distintas biomoléculas como oligonucleótidos, anticuerpos y proteínas sin modificar su bioactividad, también presentan buena biocompatibilidad, baja toxicidad, alta energía superficial y mejoramiento de la transferencia de electrones, por otro lado las propiedades físicas que poseen son la resonancia de plasmón superficial, así como la capacidad de apagar la fluorescencia. Estas nanopartículas son implementadas en la detección de moléculas diana y diagnóstico de enfermedades de manera *in vitro*, administración de agentes terapéuticos, terapia fototermal

y fotodinámica, visualización y bioimagen, así como en el desarrollo de biosensores (Pedrero et al., 2012; Yi-Cheun et al., 2012; Hegde et al., 2022; Bao et al., 2023).

Se han desarrollado distintos biosensores que aprovechan las propiedades de las AuNPs como material electrocatalítico para aumentar la sensibilidad de detección, como fue el reportado por Svirgel et al., en el 2022, donde desarrollaron un biosensor impedimétrico el cual utilizaba aptámeros implementados como bioreceptores anclados en la superficie de las AuNPs para la detección de la gliadina, proteína presente en el gluten, sobre el SPCE, demostrando que las AuNPs electrodepositadas aumentaban y mejoraban la conductividad del sistema de detección, logrando detectar la gliadina en un rango de 0.1 a 1 mg/L y presentando un LOD de 0.05 mg/L.

2.7.3 Quantum Dots de Grafeno (GQDs)

Los GQDs son láminas de grafeno menores a 100 nm que han sido implementados en el área de la medicina como en bioimagen, desarrollo de biosensores, liberación de fármacos y genes, así como en la terapia fotodinámica. Dentro de los biosensores estos nanomateriales presentan distintas propiedades que los hacen adecuados en el desarrollo de los biosensores electroquímicos, como el presentar una alta área superficial, baja toxicidad, son químicamente inertes, excelente solubilidad, alta estabilidad, fotoluminiscencia, alta velocidad de transferencia de electrones, excelente conductividad eléctrica y térmica, mejora la señal electroquímica, además, son de fácil modificación al tener distintos sitios funcionales. Las principales áreas de aplicación de los biosensores basados en GQDs son la detección de patógenos en el área agroalimentario, en el monitoreo ambiental, así como en el área médica en el diagnóstico de distintas enfermedades (Campuzano et al., 2019; Chung et al., 2019; Nesakumar et al., 2022).

En el 2021, Mansuriya y Altintas desarrollaron un nanoinmunosensor electroquímico para la detección de la troponina I cardíaca (cTnl) implicada en el infarto agudo de miocardio utilizando GQDs y AuNPs como nanomateriales electroactivos, los cuales fueron inmovilizados sobre la superficie de un electrodo de oro serigrafiado (SPGE) y en los cuales se anclaron anticuerpos anti-cTnl. Se observó un aumento en la corriente máxima de manera significativa al inmovilizar los nanomateriales en comparación del electrodo sin modificar.

Se logró detectar la cTnl en sueros y en buffer en un rango de 10-1000 pg/mL y de 1-1000 pg/mL, respectivamente, obteniendo los resultados entre 10.5 a 13 minutos y presentando un LOD en buffer de 0.1 pg/mL y de 0.5 pg/mL en suero humano. El sistema presentó una sensibilidad de 6.81 pg/mL y una alta especificidad al solo detectar a la cTnl en un ensayo se reactividad cruzada en comparación de las otras cinco biomoléculas.

2.8 Biosensores para influenza

A través del tiempo se han desarrollado diferentes biosensores electroquímicos para la detección de distintos subtipos del virus de la influenza A.

En el 2014, Xie et al., desarrollaron un inmunosensor electroquímico con la capacidad de detectar de manera selectiva y ultrasensible el subtipo H5 del virus de la influenza aviar. El inmunosensor se construyó mediante el uso de un electrodo de oro el cual fue modificado con anticuerpos monoclonales de captura H5 acoplados a nanopartículas de oro, una vez agregada la muestra donde se encuentra inmersa la proteína H5 utilizaron un nanocompuesto de anticuerpos policlonales H5 conjugados con nanoestructuras de óxido de grafeno y BSA (GO-PAb-BSA) para su detección. El óxido de grafeno fue utilizado con el objetivo de amplificar la señal de detección, obteniendo un sistema de alta sensibilidad para AIV H5 al presentar un aumento de 256 veces al compararlo con un sistema que no presenta el óxido de grafeno.

En el 2016, Veerapandian et al., desarrollaron una plataforma de inmunosensor dual electroquímico para la detección simultánea de la HA de los virus de la influenza A subtipo H1N1 y H5N1. El sistema se basó en el uso un electrodo de carbono serigrafiado dual modificado con nanoestructuras de óxido de grafeno las cuales fueron electroadsorbidas con el colorante azul de metileno (MB), elementos utilizados como materiales electroactivos para aumentar la sensibilidad de detección del sistema, posteriormente, se utilizó el quitosán y la proteína A para el acoplamiento y direccionamiento correcto de los anticuerpos monoclonales H1 o H5 sobre la superficie del electrodo serigrafiado implementados como bioreceptores. El sistema presentó una alta sensibilidad de detección al poder detectar concentraciones de las HA en un rango de 25-500 pM y un tiempo de respuesta menor a 1 minuto.

En el 2016, Han et al., desarrollaron un inmunosensor electroquímico múltiple de nanoflujo para la detección simultánea de los virus de la influenza H1N1, H5N1 y H7N9 basado en el inmunoensayo ELISA sándwich. El inmunosensor estaba compuesto por nanorods de ZnO (NR) cultivados sobre la superficie interna el sensor de polidimetilsiloxano (PDMS) de tres electrodos de triple matriz en los cuales se inmovilizaron anticuerpos primarios dirigidos para cada HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) para la detección de cada subtipo y el producto obtenido de la reacción fue analizado mediante amperometría. El sistema permitió detectar los tres subtipos de manera independiente y presentó alta selectividad y sensibilidad reportando un LOD de 1 pg/mL de los virus.

En el 2020, Dunajová et al., desarrollaron un inmunosensor impedimétrico para la detección del virus de la influenza A subtipo H3N2, mediante el acoplamiento de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleoproteína del virus sobre la superficie de un electrodo de carbono serigrafiado. El inmunosensor presentó una alta selectividad y sensibilidad al presentar un LOD de 0.79 fM y realizando las lecturas mediante la técnica electroquímica espectroscopía de impedancia electroquímica.

En el 2021, Torres Méndez et al., reportaron el desarrollo de un biosensor electroquímico que permitía detectar el virus de la influenza A subtipo H1N1. Utilizaron los electrodos de carbono serigrafiados como plataformas para construir el biosensor, los cuales fueron modificados AuNPs con el objetivo de aumentar la sensibilidad de detección del biosensor, y se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la H1 los cuales fueron anclados al nanomaterial utilizados como bioreceptores y presentaron una alta afinidad a la proteína a detectar. El sistema fue caracterizado mediante tres técnicas electroquímicas, siendo la voltamperometría cíclica, voltamperometría de pulso diferencial y espectroscopía de impedancia electroquímica.

En el 2023, Bao et al., desarrollaron un biosensor electroquímico para la detección del virus de la influenza A H1N1. El biosensor estaba compuesto por utilizando AuNPs como material electrocatalítico, caracterizado por ser altamente sensible y de pronta respuesta, presentando una sensibilidad de detección de 92.1 μ A y un LOD de 0.25 pg/mL, así como la obtención de resultados alrededor de 30 segundos.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que han tomado las enfermedades virales respiratorias en el desarrollo de epidemias y pandemias, así como las limitaciones que presentan los métodos estándar empleados para la detección de agentes infecciosos virales, se ha potenciado de forma importante la necesidad del desarrollo de pruebas rápidas, portables y de bajo costo con cualidades de sensibilidad y especificidad. Es en este sentido donde los biosensores electroquímicos se posicionan como una herramienta avanzada para mejorar los sistemas de detección y diagnóstico. Es por lo anterior, que el desarrollo de una plataforma de inmunosensor portátil basada en nanoestructuras de materiales electroactivos permitirá la detección de virus de la influenza A subtipo H1N1 y H5N1.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo de inmunosensores electroquímicos basados en nanoestructuras electroactivas permitirá la detección de virus de la influenza A en forma sensible y específica.

5. OBJETIVO GENERAL

Diseñar y construir un sistema portátil de detección de virus de la influenza A basado en inmunosensores electroquímicos.

5.1 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de carbono con núcleo magnético, oro y quantum dots de grafeno.
2. Analizar las propiedades electrocatalíticas del conjunto electrodo serigrafiado/nanopartículas.
3. Sintetizar y caracterizar nanoconjugados de nanopartículas-anticuerpos contra virus de influenza A H1N1 y H5N1.
4. Desarrollar inmunosensores electroquímicos portátiles para cada subtipo del virus de influenza A H1N1 y H5N1, y determinar su capacidad de detección.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diagrama general

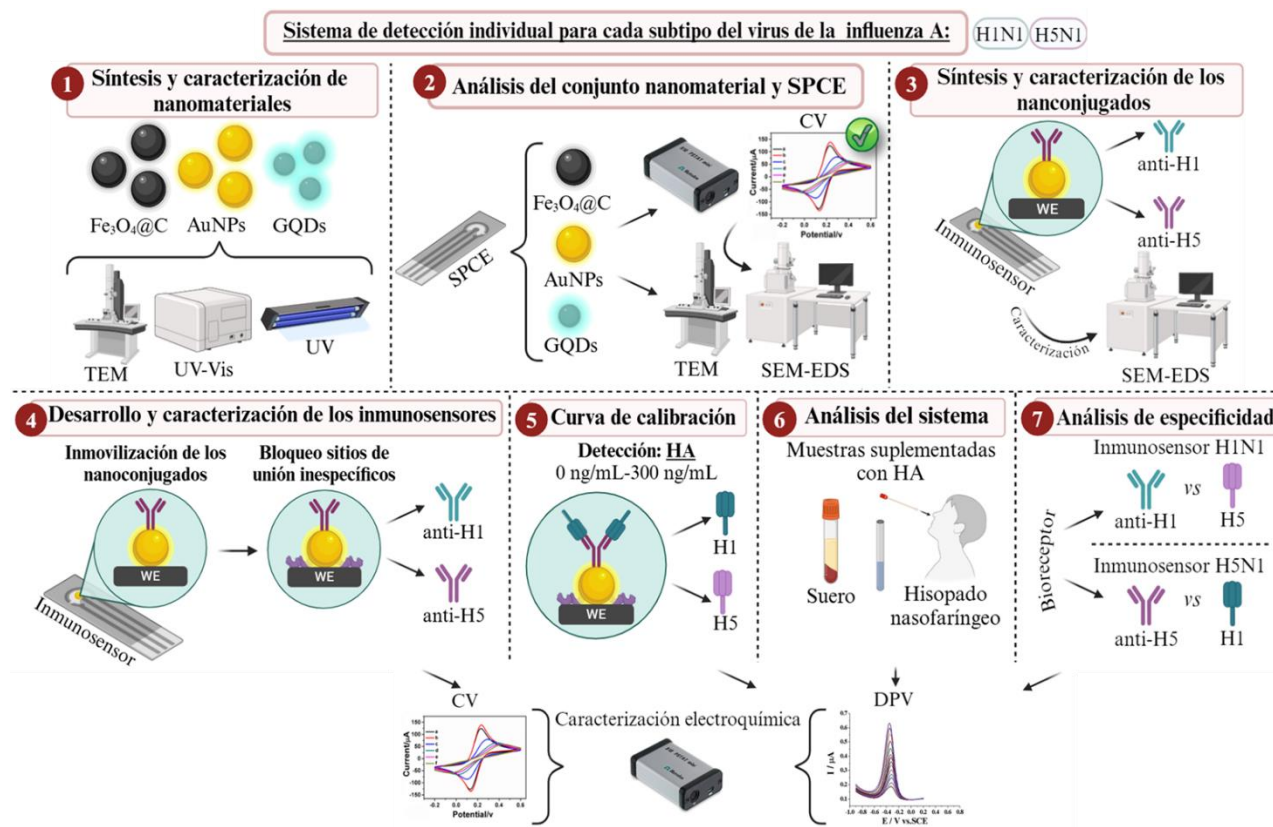


Figura 7. Diagrama experimental general del proyecto para la obtención de inmunosensores electroquímicos para la detección de los virus de la influenza A H1N1 y H5N1.

6.2 Síntesis de nanomateriales ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs, AuNPs y GQDs)

6.2.1 Nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbono ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs)

Se obtuvieron nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4 NPs) mediante el método de coprecipitación. Se utilizó como fuente de material magnético 202.6 mg de sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich) y 546.1 mg de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich), los cuales fueron disueltos en 50 mL de ddH₂O, luego se agregó mediante goteo 15 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH) (Productos Químicos Monterrey) y se incubó a 60 °C por 2 h en presencia de agitación magnética y con un flujo continuo de argón. Posteriormente, se realizaron 10 lavados con ddH₂O, etanol y acetona y se dejaron secar durante 12 h a 25 °C. Para la obtención de la cubierta de carbono,

las Fe₃O₄ NPs se sometieron a un proceso hidrotermal a 180 °C utilizando una autoclave termal (Techinstro) durante 10 h, utilizando como fuente de carbono 300 mg de curcumina (Sigma-Aldrich).

6.2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Para la obtención de las AuNPs se utilizó 20 mL de ácido cloroáurico (HAuCl₄) a 1 mM (Sigma-Aldrich), los cuales fueron calentados a 250 °C durante 10 min en presencia de agitación magnética, posteriormente, 2 mL de citrato de sodio al 1% fueron añadidos y se dejó incubando hasta obtener un color rojizo bajo agitación magnética.

6.2.3 Quantum dots de grafeno (GQDs)

Los GQDs fueron obtenidos mediante el proceso de pirolisis del ácido cítrico. Brevemente, 2 g de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) se calentaron a 200 °C hasta obtener una tonalidad naranja brillante. Luego, 30 mL de hidróxido de sodio (NaOH) (Fisher Chemical) a 1 mg/mL fueron agregados por goteo.

6.3 Caracterización de los nanomateriales sintetizados

La caracterización de los nanomateriales se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando para el análisis de las imágenes el programa IMAGE J y se realizó un espectro de absorbancia a través de espectroscopía de absorción UV/Vis en un rango de 450 a 600 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode microplate reader).

6.4 Análisis de las propiedades electrocatalíticas de los electrodos serigrafiados (SPEs)

Las propiedades electrocatalíticas del conjunto nanomaterial y electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) (Ref: C110) (Metrohm) o electrodo de platino serigrafiado (SPPE) (Ref: 550) (Metrohm) fueron evaluadas inmovilizando 10 µL de los nanomateriales sobre la superficie del electrodo de trabajo (WE) de cada electrodo, respectivamente, dejando incubar durante 24 h a 25 °C. La propiedad electrocatalítica se determinó mediante la técnica electroquímica voltamperometría cíclica (CV) utilizando un potencial con 2 ciclos entre -0.4 V y 0.9 V, con una velocidad de escaneo de 50 mVs⁻¹, utilizando PBS 1X, pH 7.4 (Thermo

Fisher Scientific) como electrolito y un potenciostato (910 PSTAT mini Metrohm). El conjunto electrodo-nanomaterial que presente una mayor respuesta eléctrica se seleccionará como matriz final para la plataforma del inmunosensor electroquímico portátil y se analizará su superficie mediante microscopía electrónica de barrido acoplado a EDS (SEM-EDS).

6.5 Síntesis y caracterización de los nanoconjugados (NCs)

Una vez determinada la plataforma y el nanomaterial con mayor potencial electrocatalítico se obtuvieron los nanoconjugados (NCs) para cada subtipo del virus de la influenza A. Se utilizaron anticuerpos anti-H1N1 y anti-H5N1 (SinoBiological) para la detección de H1N1 y H5N1, respectivamente. El nanomaterial inmovilizado sobre el WE del SPE seleccionado fue tratado con 20 μ L de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 50 mM) y 60 μ L de *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 100 mM) (Sigma-Aldrich) por 24 h a 25 °C. Luego, 2 μ L del anticuerpo (10 μ M) respectivo, fue agregado sobre el nanomaterial y se dejó incubar durante 24 h a 4 °C. La conjugación se obtuvo mediante la formación del enlace amida entre los grupos amino de los anticuerpos con los grupos carboxilo del nanomaterial implementado. Posteriormente, la caracterización de cada NCs se corroboró mediante SEM-EDS analizando la cantidad de nitrógeno presente.

6.6 Obtención de inmunosensores electroquímicos portátiles

Una vez obtenidos los NCs sobre el WE del SPE para la detección de cada subtipo de virus de la influenza A se bloquearon los sitios de unión inespecíficos utilizando 2 μ L de albúmina sérica bovina (BSA, 1%) (Sigma-Aldrich) y se dejó incubar durante 1 h a 4 °C.

6.7 Caracterización de inmunosensores electroquímicos portátiles

La caracterización de cada inmunosensor electroquímico portátil se realizó evaluando de manera individual cada elemento agregado sobre la superficie del WE (SPE sin modificar, SPE modificado con el nanomaterial, NCs y BSA) mediante la técnica electroquímica CV utilizando las especificaciones mencionadas en el apartado 6.4, utilizando Ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6$, 10 mM (J.T. Baker) y KCl 100 mM) como electrolito y un potenciostato.

6.8 Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles

Se retó cada inmunosensor electroquímico por individual incubando 10 μL de concentraciones conocidas de la hemaglutinina de H1 o H5 (SinoBiological) en un rango de 0 a 300 ng/mL durante 5 min a 25 °C. Posteriormente, se analizó mediante la técnica electroquímica voltamperometría de pulso diferencia (DPV) utilizando un potencial con 1 ciclo entre -0.6 V y 0.6 V, a una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , utilizando $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y KCl 100 mM como electrolito y un potenciostato.

6.9 Validación de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos

Se validó cada inmunosensor electroquímico portátil por individual mediante el análisis de muestras de fluidos biológicos suplementadas con la hemaglutinina de H1 o H5 en un rango de 0 a 300 ng/mL, entre ellos: 5 muestras de suero (1:1000) y 10 muestras de hisopado nasofaríngeo, respectivamente. Se incubaron 10 μL de cada muestra durante 5 min a 25 °C y se analizaron mediante DPV siguiendo las especificaciones mencionadas en el apartado 6.8.

6.10 Evaluación de la especificidad de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos

Se determinó la especificidad de cada inmunosensor electroquímico portátil por individual analizando muestras de suero sanguíneo (1:1000) suplementados con la hemaglutinina de H1 o H5 en un rango de 0 a 300 ng/mL, para el inmunosensor que detecta H1N1 se retó con la muestra de suero suplementada con H5 y para el inmunosensor que detecta H5N1 se retó con la muestra de suero suplementada con H1. Se incubaron 10 μL de cada muestra durante 5 min a 25 °C y se analizaron mediante DPV siguiendo las especificaciones mencionadas en el apartado 6.8.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de los nanomateriales sintetizados

7.1.1 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$

Se sintetizaron tres distintos nanomateriales como candidatos para determinar cuál es el que presenta las mejores propiedades electrocatalíticas para ser implementados en el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos. En la figura 8a se puede observar las NPs de Fe_3O_4 presentando una morfología de nanocristales y un tamaño alrededor de 10 nm. Posteriormente, las NPs de Fe_3O_4 fueron recubiertas con una capa de carbono obteniendo NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ de un tamaño de 15 nm con morfología cuasiesférica lográndose observar en la figura 8b.

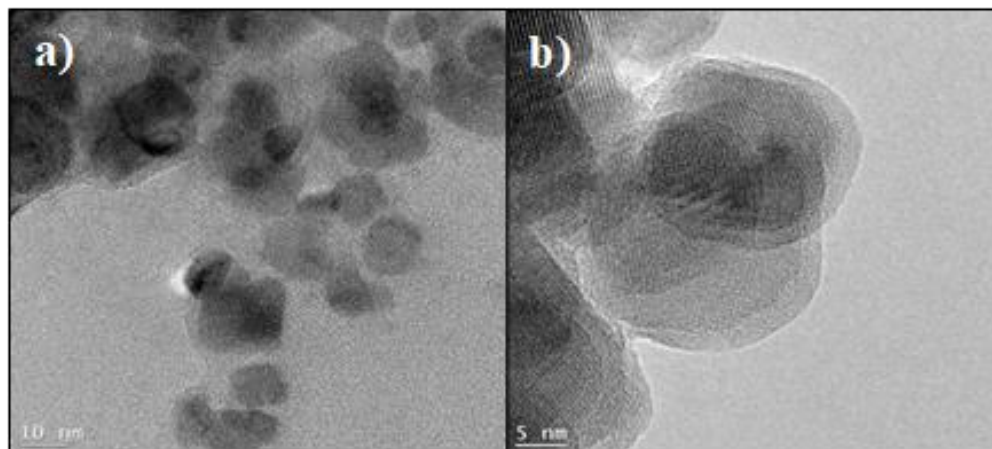


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. a) NPs de Fe_3O_4 . b) NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. Barra de escala= 5 nm y 10 nm.

7.1.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

En la figura 9a, se puede observar la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de las AuNPs obtenidas, estas presentaron un tamaño de 35-40 nm y una morfología cuasiesférica. En la figura 9b-f y 10 se observa el análisis elemental que se le realizó a las nanopartículas sintetizadas, determinando el oro como el elemento que se encuentra en mayor proporción en la composición de la muestra.

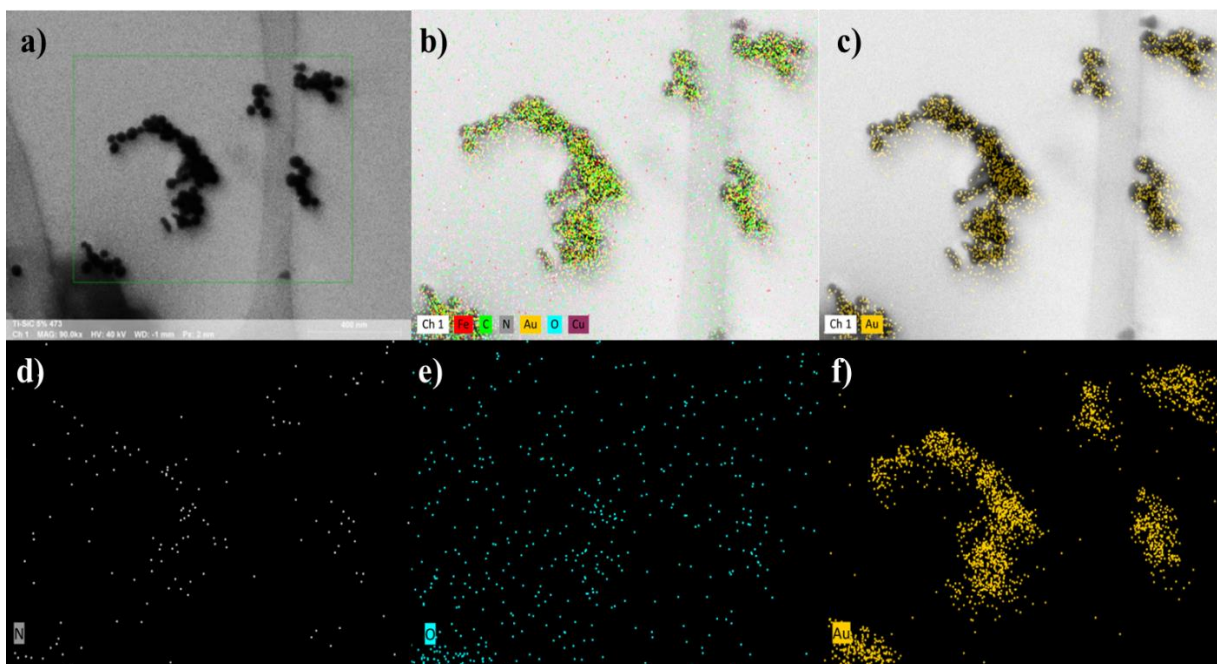


Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de AuNPs. a) Muestra de AuNPs. **b)-f)** Análisis de la composición química de las AuNPs.

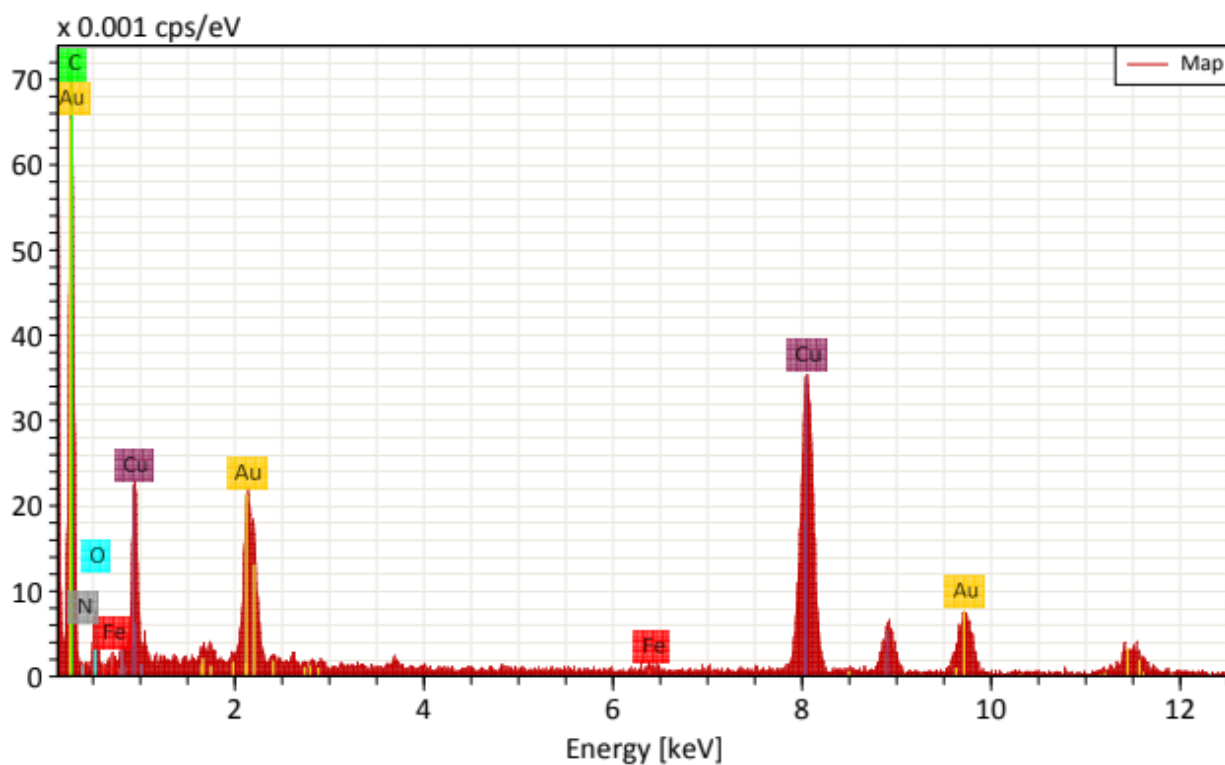


Figura 10. Análisis de la composición química de las AuNPs.

Posteriormente, en la figura 11 se puede observar el análisis de UV-Vis para confirmar la presencia de oro en las AuNPs sintetizadas, observando un pico a la longitud de onda a 521 nm.

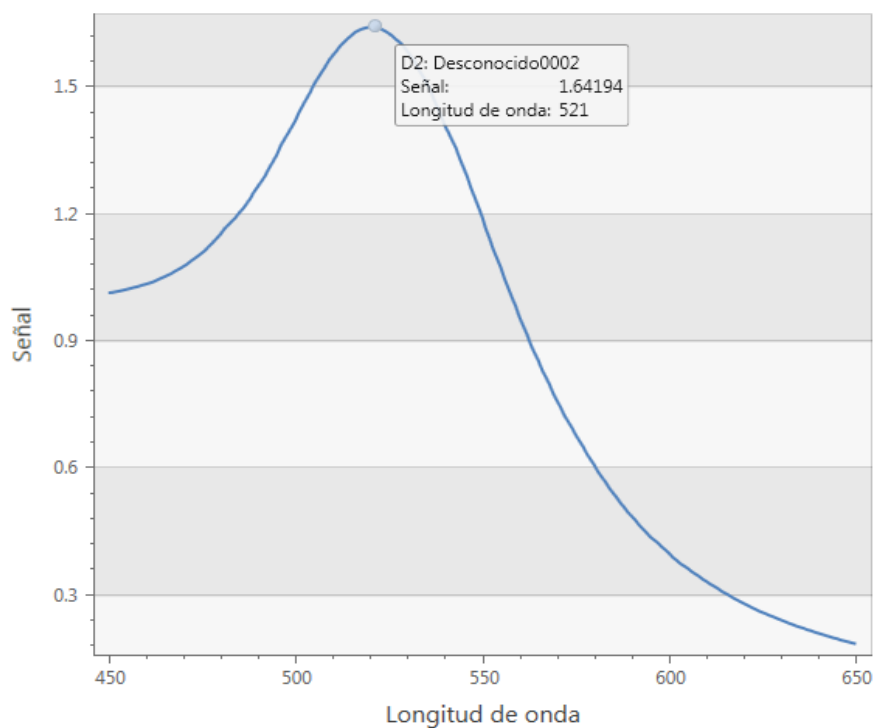


Figura 11. Análisis de UV-Vis de las AuNPs en un rango de 450 a 650 nm.

7.1.3 Quantum Dots de Grafeno (GQDs)

La figura 12 corresponde al último nanomaterial sintetizado, siendo los GQDs. En la figura 12a se muestran los GQDs bajo luz UV, esta presentó una tonalidad de fluorescencia color cian, lo cual concuerda con el tamaño observado de 4 a 5 nm en la microscopía electrónica de transmisión correspondiente a la figura 12b.

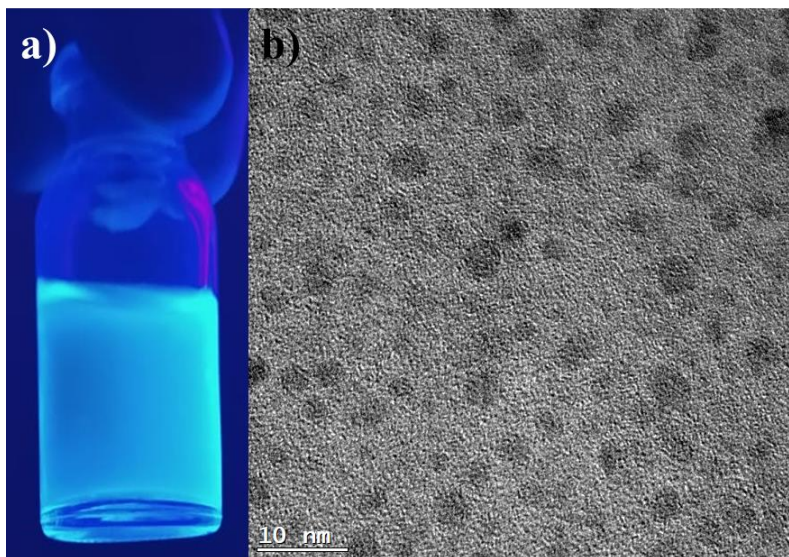


Figura 12. Caracterización de los GQDs. a) GQDs bajo luz UV. **b)** TEM de los GQDs. Barra de escala= 10 nm.

7.2 Análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPE y nanomaterial

7.2.1 Electrodo de Carbono Serigrafiado (SPCE) y nanomateriales

Una vez obtenidos y caracterizados los nanomateriales, se prosiguió a determinar cuál de ellos presenta mayor propiedad electrocatalítica en conjunto con el SPCE mediante voltamperometría cíclica y utilizando el PBS como electrolito. En la figura 13 se observa que el SPCE sin modificar presentó una corriente resultante (I) anódica de $0.89 \mu\text{A}$, al ser modificado con $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ la I anódica obtenida fue de $0.39 \mu\text{A}$, posteriormente, al inmovilizar los GQDs la I anódica aumentó a $2.36 \mu\text{A}$, sin embargo, tras inmovilizar las AuNPs en la superficie del WE del SPCE la I anódica fue de $5.97 \mu\text{A}$, el cual fue el nanomaterial que presentó mayor propiedad electrocatalítica y el que fue seleccionado para el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos.

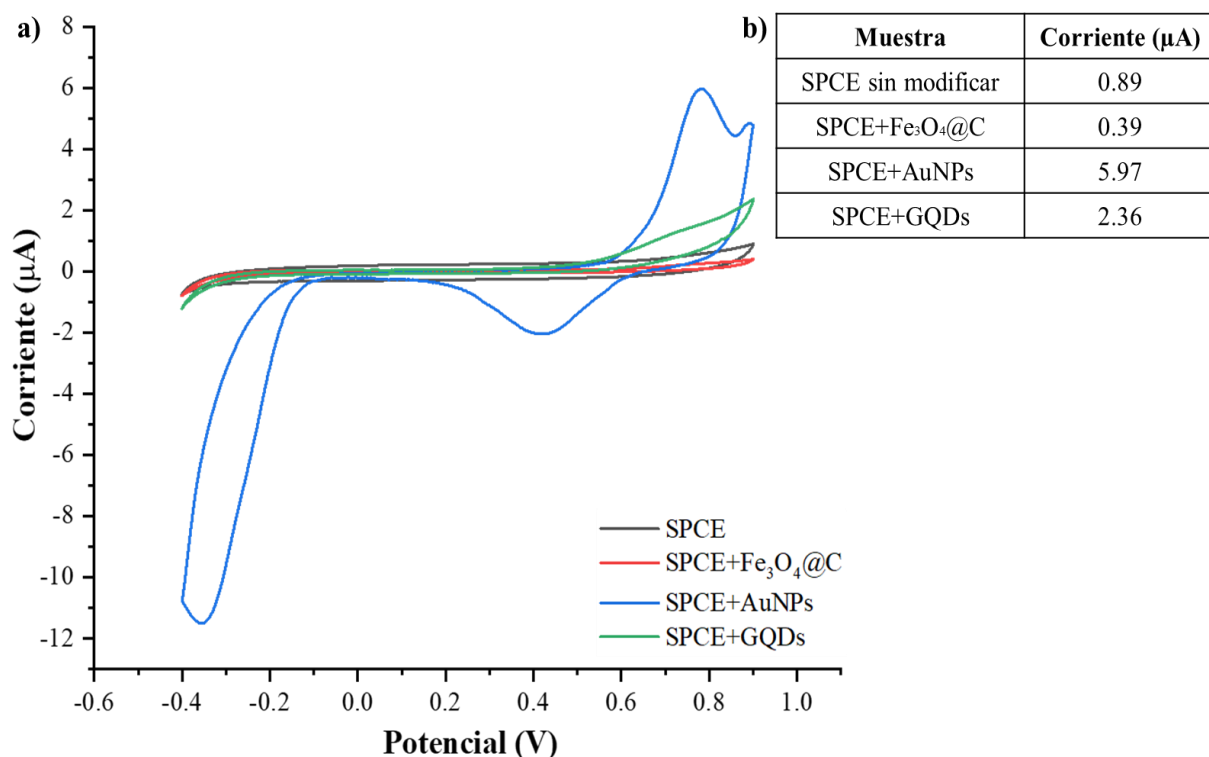


Figura 13. a) Voltamograma cíclico del análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomaterial electroactivo. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con: Fe₃O₄@C (rojo), AuNPs (azul), GQDs (verde). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.9 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs⁻¹, con el electrolito PBS 1X (pH 7.4). **b)** Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.

7.2.1.1 Análisis del SPCE y AuNPs

Después de determinar que las AuNPs presentan mayor propiedad electrocatalítica en comparación de los otros nanomateriales, se corroboró dicha propiedad mediante voltamperometría cíclica y utilizando el K₄Fe(CN)₆ y KCl como electrolito, el cual nos permite observar procesos de oxidación y reducción. En la figura 14, se observa un aumento de la I anódica al modificar el WE del SPCE con las AuNPs, siendo este aumento de 102.44 a 120.60 µA.

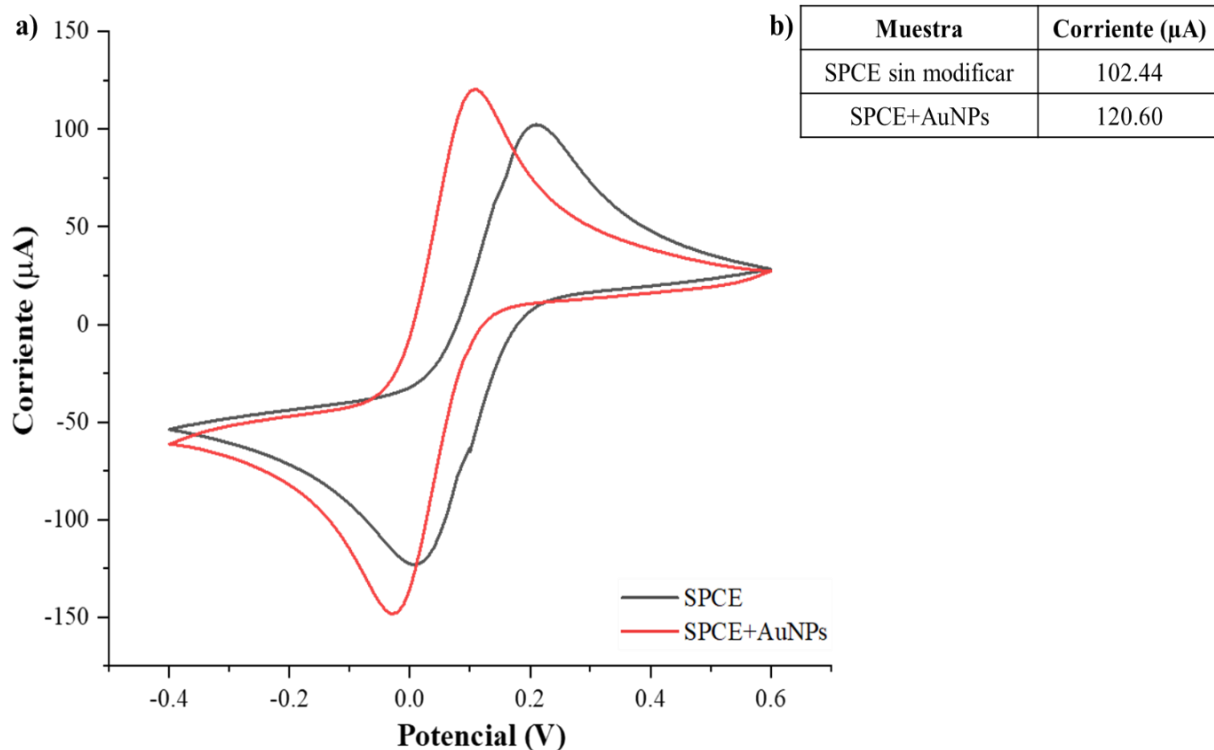


Figura 14. a) Voltamograma cíclico del conjunto SPCE y AuNPs. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con AuNPs (rojo). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b)** Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.

Luego, se determinó la repetibilidad de la inmovilización de las AuNPs sobre el WE del SPCE, observándose que no hay una diferencia significativa entre las repeticiones, al obtener una I anódica de 121.48, 121.82 y 122.61 μA , respectivamente en la figura 15.

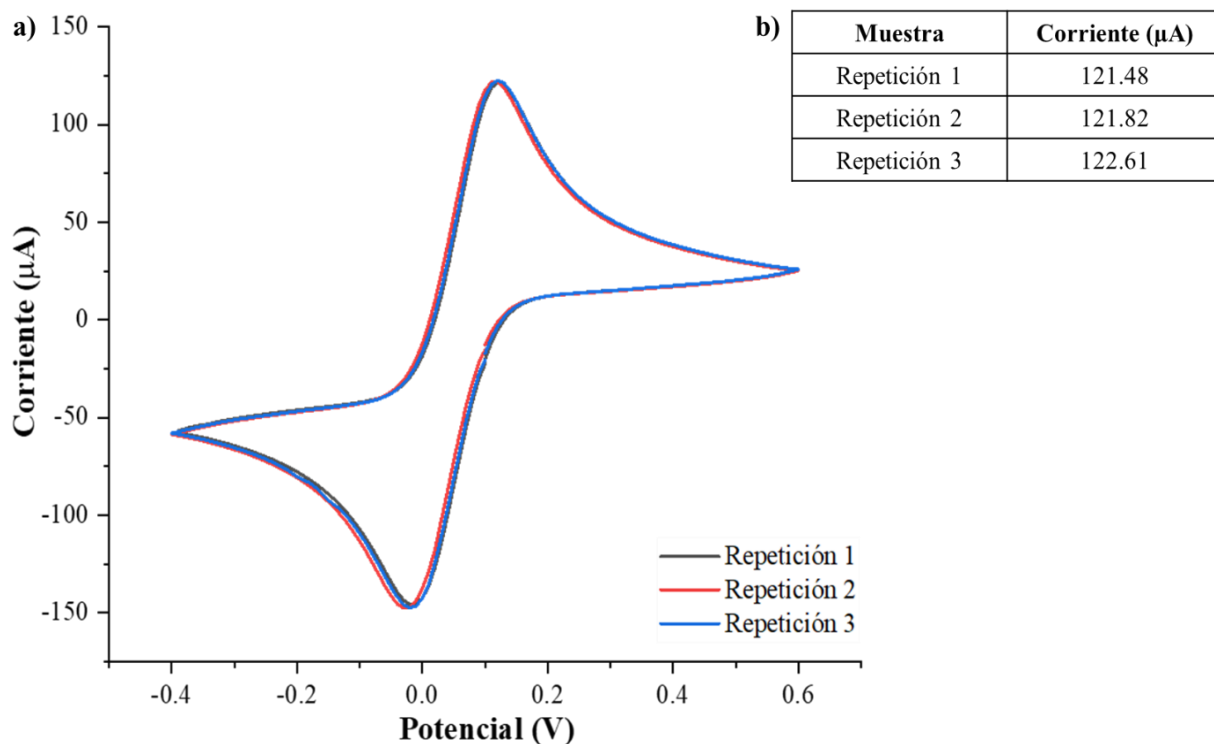


Figura 15. a) Voltamograma cíclico del análisis de repetibilidad del SPCE modificado con AuNPs. Repetición 1 (negro). Repetición 2 (rojo), Repetición 3 (azul). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b) Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.**

Posteriormente, se realizó la caracterización del SPCE modificado con las AuNPs mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La figura 16a corresponde a la superficie del WE del SPCE sin modificar, observando únicamente hojuelas de carbono, debido a que el WE del SPCE que se está utilizando para desarrollar los inmunosensores está elaborado a base de este elemento. Luego, al ser recubierto con las AuNPs podemos observar en la figura 16b las nanopartículas inmovilizadas recubriendo la superficie del WE del SPCE de manera homogénea y uniforme.

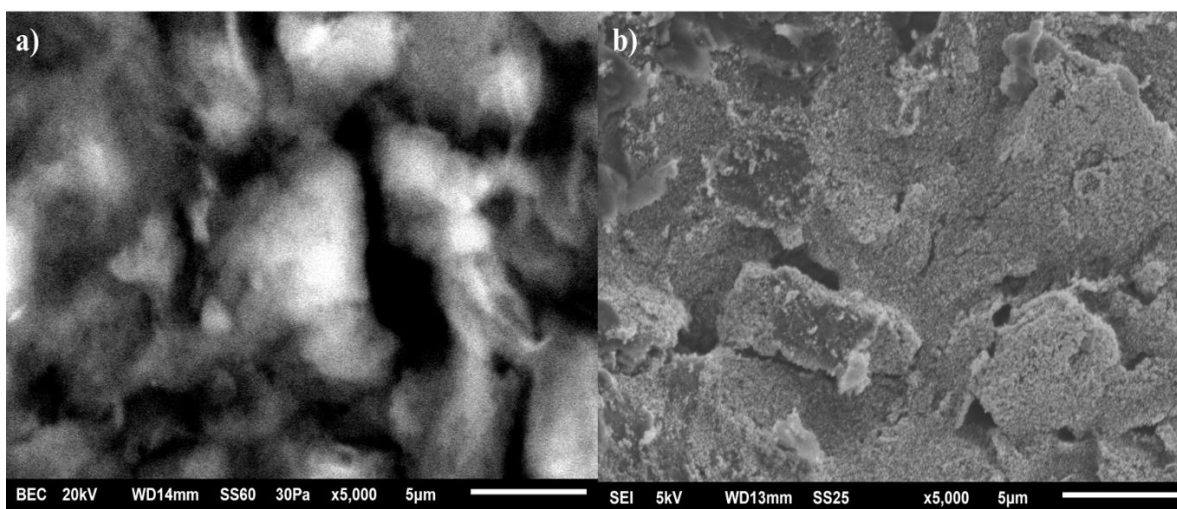


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del WE del SPCE. a) SPCE sin modificar. b) SPCE modificado con AuNPs. Barra de escala= 5 μ m.

También se realizó un análisis de la composición química de la superficie del WE del SPCE sin modificar mediante SEM-EDS, corroborando que el mayor porcentaje del WE se encuentra conformado a base de carbono en un 96.9%, el cual se observa en la figura 17. Por su parte, el análisis del WE del SPCE modificado con las AuNPs presentó una disminución en el porcentaje del carbono a 34.6% y se observó la aparición del elemento oro en un 59.6%, correspondiente a la inmovilización de las nanopartículas en la superficie del WE en la figura 18.

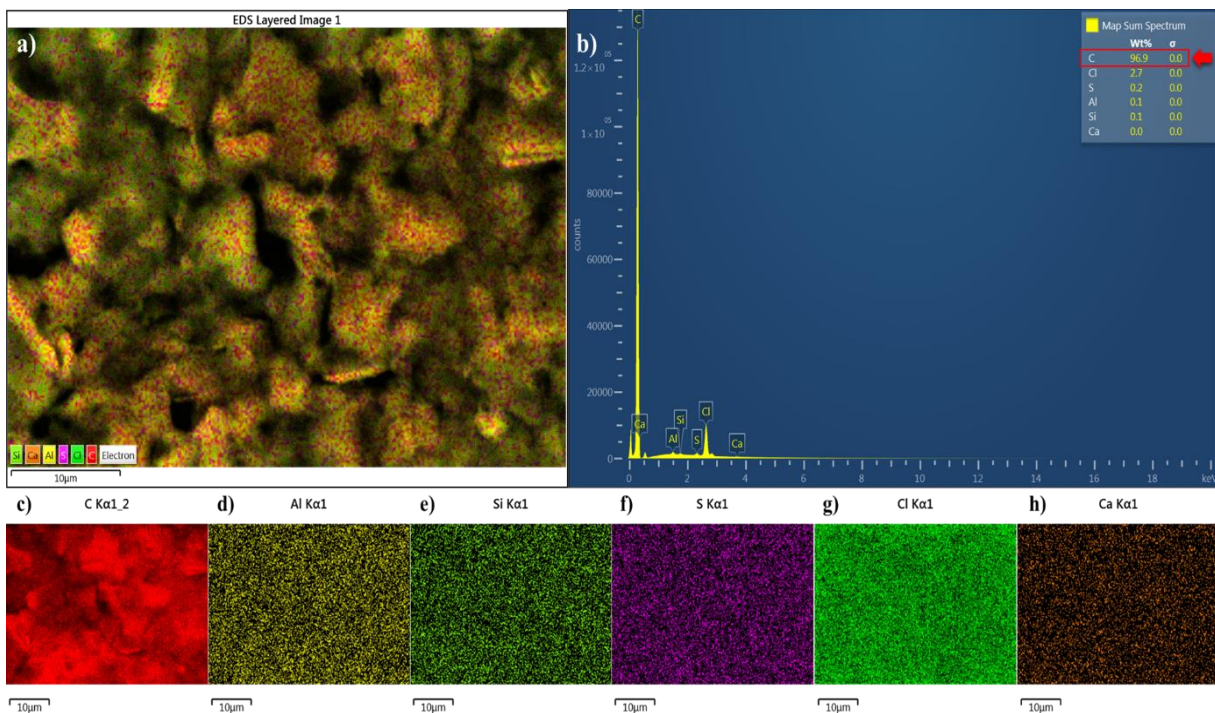


Figura 17. a) Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE sin modificar. B) Análisis elemental del SPCE sin modificar. Relación de: c) carbono, d) aluminio, e) silicio, f) azufre, g) cloro y h) calcio del SPCE sin modificar. Barra de escala= 50 µm.

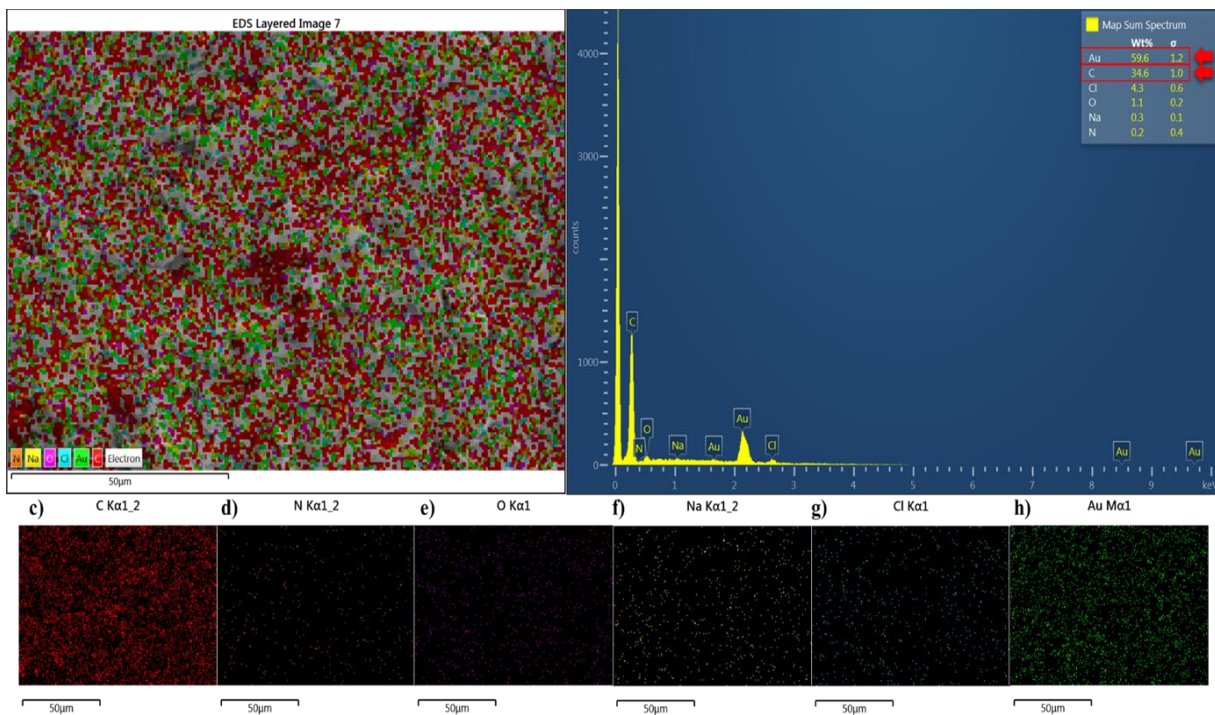


Figura 18. a) Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs. b) Análisis elemental del SPCE modificado con AuNPs. Relación de: c) carbono, d) nitrógeno, e) oxígeno, f) sodio, g) cloro y h) aluminio del SPCE sin modificar. Barra de escala= 50 µm.

7.2.2 Electrodo de Platino Serigrafiado (SPPE) y nanomateriales

También se realizó un análisis utilizando el SPPE y los nanomateriales sintetizados mediante voltamperometría cíclica y utilizando el PBS como electrolito, observando en la figura 19 que el SPPE sin modificar presentó una I anódica de $2.58 \mu\text{A}$, al ser modificado con las $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ la I anódica aumentó a $7.07 \mu\text{A}$, tras modificar el SPPE con los GQDs la I anódica siguió aumentando hasta $28.08 \mu\text{A}$, sin embargo, al inmovilizar las AuNPs sobre la superficie del WE del SPPE la I anódica aumentó hasta $204.89 \mu\text{A}$, siendo este último nanomaterial el que presentó un mayor aumento en la corriente.

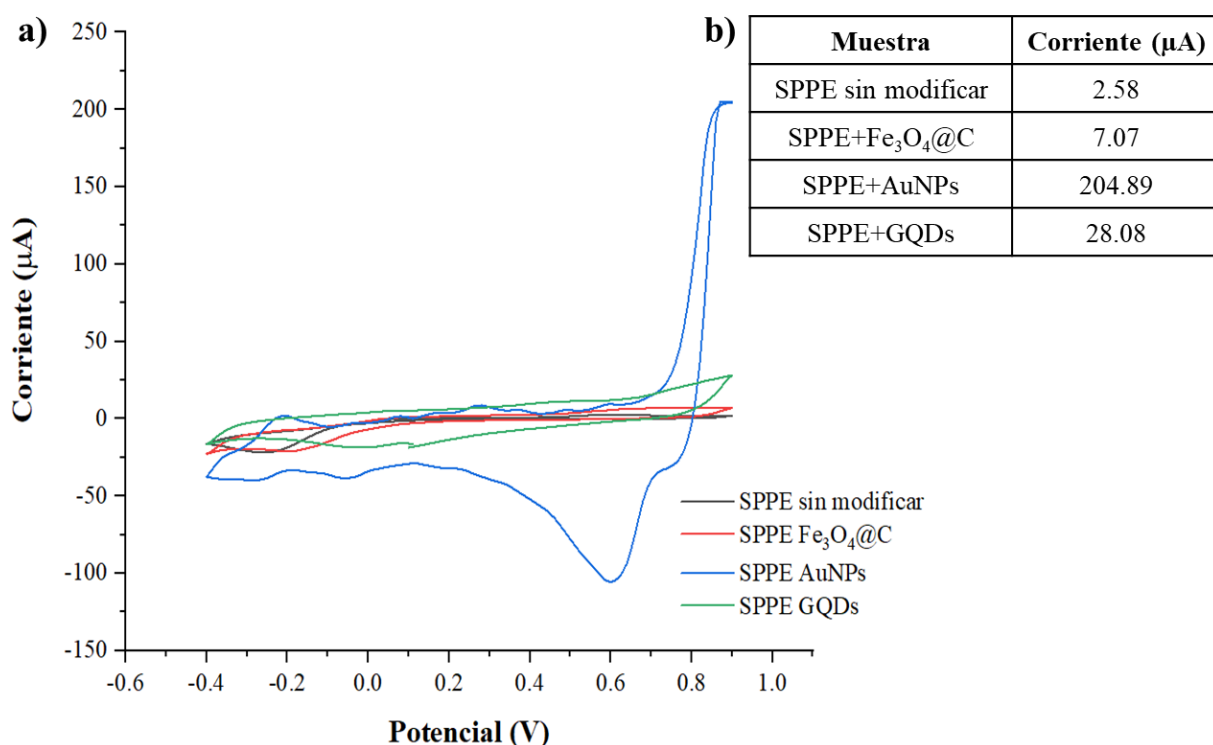


Figura 19. a) Voltamograma cíclico del análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPPE y nanomaterial electroactivo. SPPE sin modificar (negro). SPPE modificado con: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ (rojo), AuNPs (azul), GQDs (verde). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.9 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito PBS 1X (pH 7.4). **b) Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.**

7.3 Caracterización de los nanoconjugados AuNPs+anticuerpo

Los nanoconjugados (NC) se obtuvieron a partir de la formación del enlace amida entre los grupos amino de los anticuerpos y los grupos carboxilo de las nanopartículas, posteriormente estos fueron caracterizados mediante SEM-EDS. En la figura 20a se observa

la microscopía electrónica de barrido de la superficie del WE del SPCE modificado con los NC de AuNPs+anti-H1N1, dónde encontramos la presencia de cubos sobre la superficie, por otro lado, la figura 20b corresponde al análisis elemental realizado, en el cual se puede observar aparición del elemento nitrógeno en un 9.1% siendo atribuible al nitrógeno presente en los anticuerpos anti-H1N1 anclados en la superficie de las AuNPs. Del mismo modo, en la figura 21a observamos la SEM de los NC de AuNPs+anti-H5N1, demostrando la presencia de cubos en la superficie, por último, la figura 21b corresponde al análisis elemental determinando la presencia del nitrógeno en un 2.9% correspondiente a los anticuerpos de los NC.

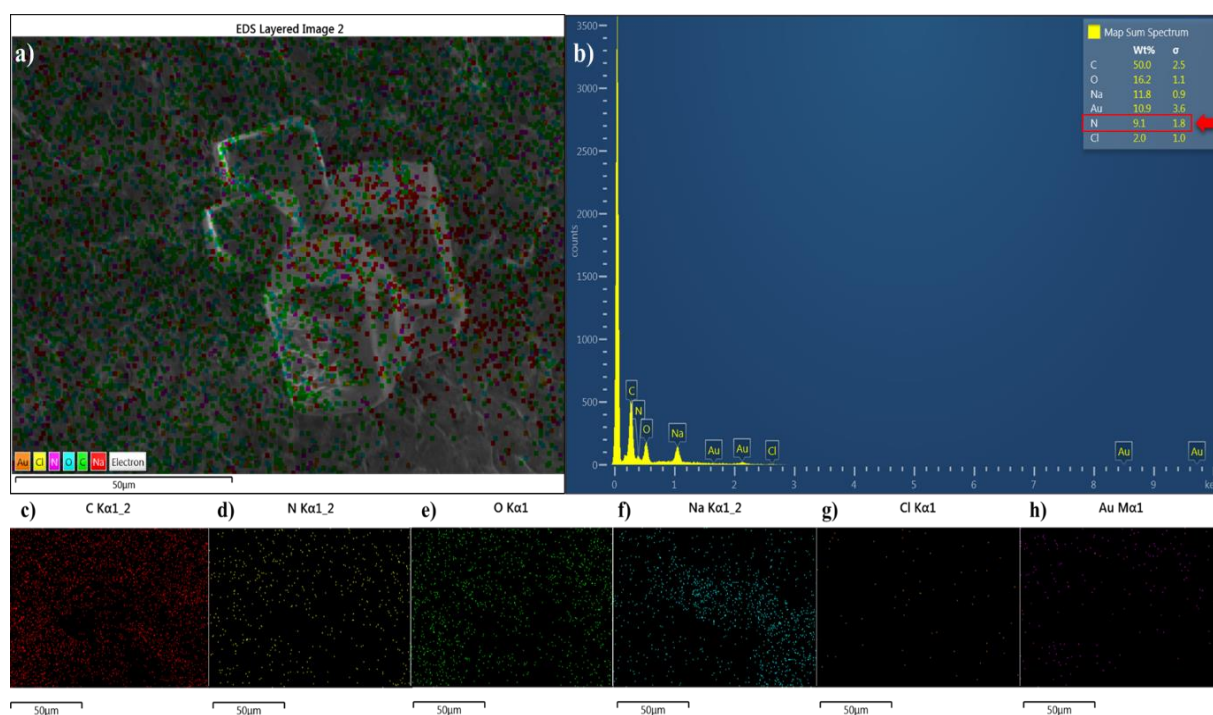


Figura 20. a) Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs y anti-H1N1. b) Análisis elemental del SPCE modificado con AuNPs y anti-H1N1. Relación de: c) carbono, d) nitrógeno, e) oxígeno, f) sodio, g) cloro y h) aluminio del SPCE modificado con AuNPs y anti-H1N1. Barra de escala= 50 µm.

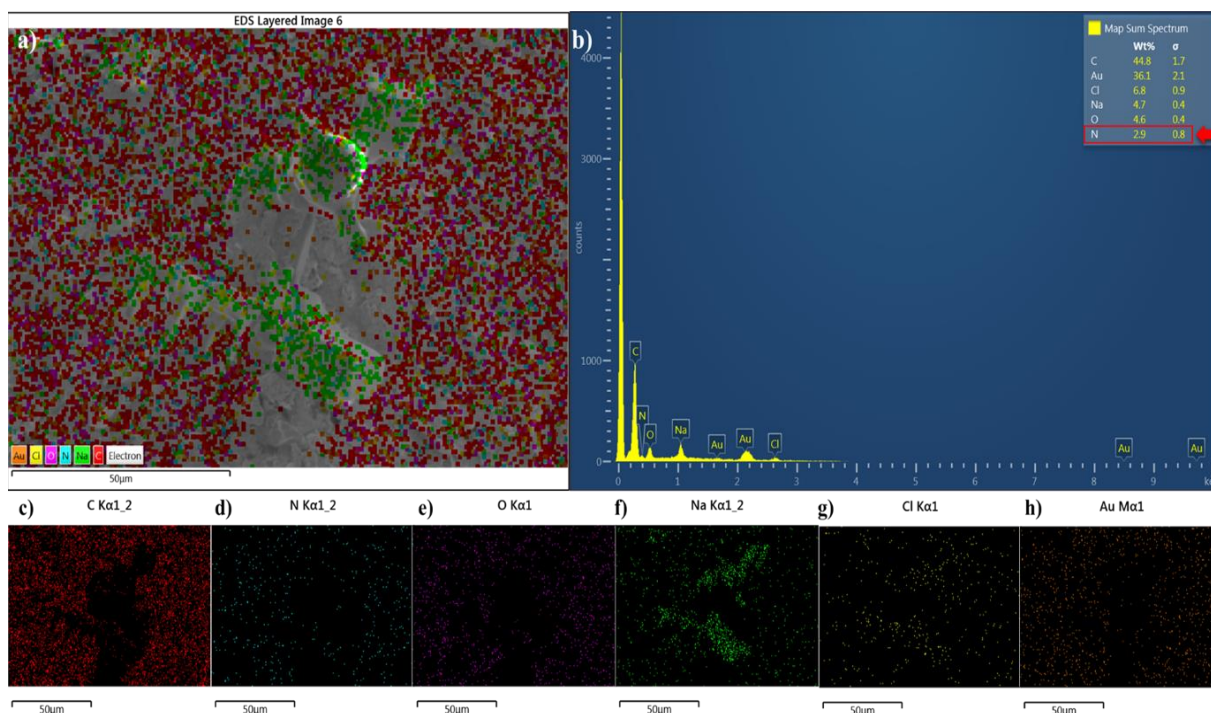


Figura 21. a) Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS del SPCE modificado con AuNPs y anti-H5N1. b) Análisis elemental del SPCE modificado con AuNPs y anti-H5N1. Relación de: c) carbono, d) nitrógeno, e) oxígeno, f) sodio, g) cloro y h) aluminio del SPCE modificado con AuNPs y anti-H5N1. Barra de escala= 50 μm.

7.4 Caracterización de los inmunosensores electroquímicos portátiles

Una vez determinado el tipo de nanomaterial y el SPE que presenta mayor propiedad electrocatalítica y la caracterización de los NCs, se desarrollaron los inmunosensores electroquímicos para detectar cada subtipo de la HA de los virus de la influenza A H1N1 y H5N1 de manera individual, que posteriormente fueron caracterizados mediante CV, determinando el valor de la I anódica al agregar cada elemento en la superficie del WE. La figura 22 corresponde a la caracterización del inmunosensor para detectar H1N1, observando que el SPCE sin modificar obtuvo una I anódica de 102.44 μA, al ser modificado con las AuNPs la I anódica aumentó a 120.60 μA, sin embargo, tras inmovilizar los NC de AuNPs + anti-H1N1 la I anódica disminuyó a 115.57 μA, disminuyendo un poco más al aplicar el agente de bloqueo BSA obteniendo una I anódica de 112.87 μA. Este mismo fenómeno se logró observar en la figura 23 tras caracterizar el inmunosensor para detectar H5N1, obteniendo una I anódica de los nanoconjugados de AuNPs + anti-H5N1 de 110.38 μA y al añadir el agente de bloqueo BSA la I anódica disminuyó a 106.54 μA.

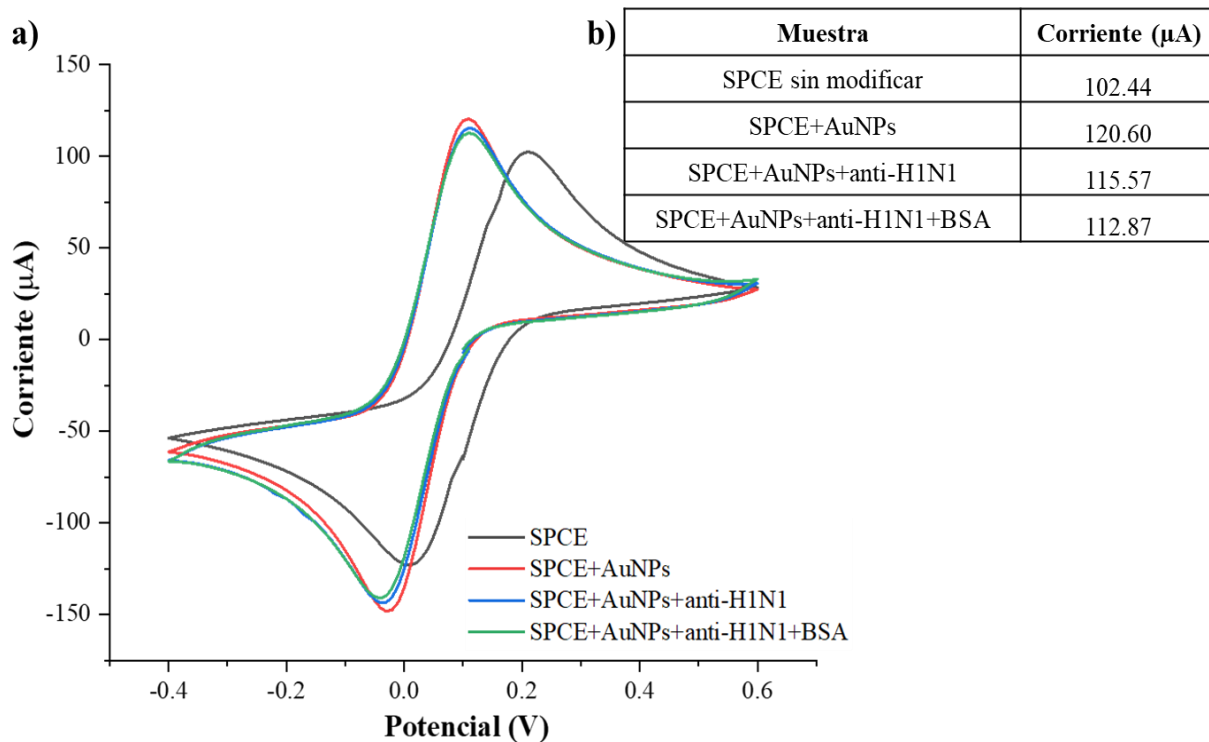


Figura 22. a) Voltamograma cíclico de la caracterización del inmunosensor electroquímico para H1N1. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con: AuNPs (rojo), anti-H1N1 (azul), anti-H1N1+BSA (verde). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b) Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.**

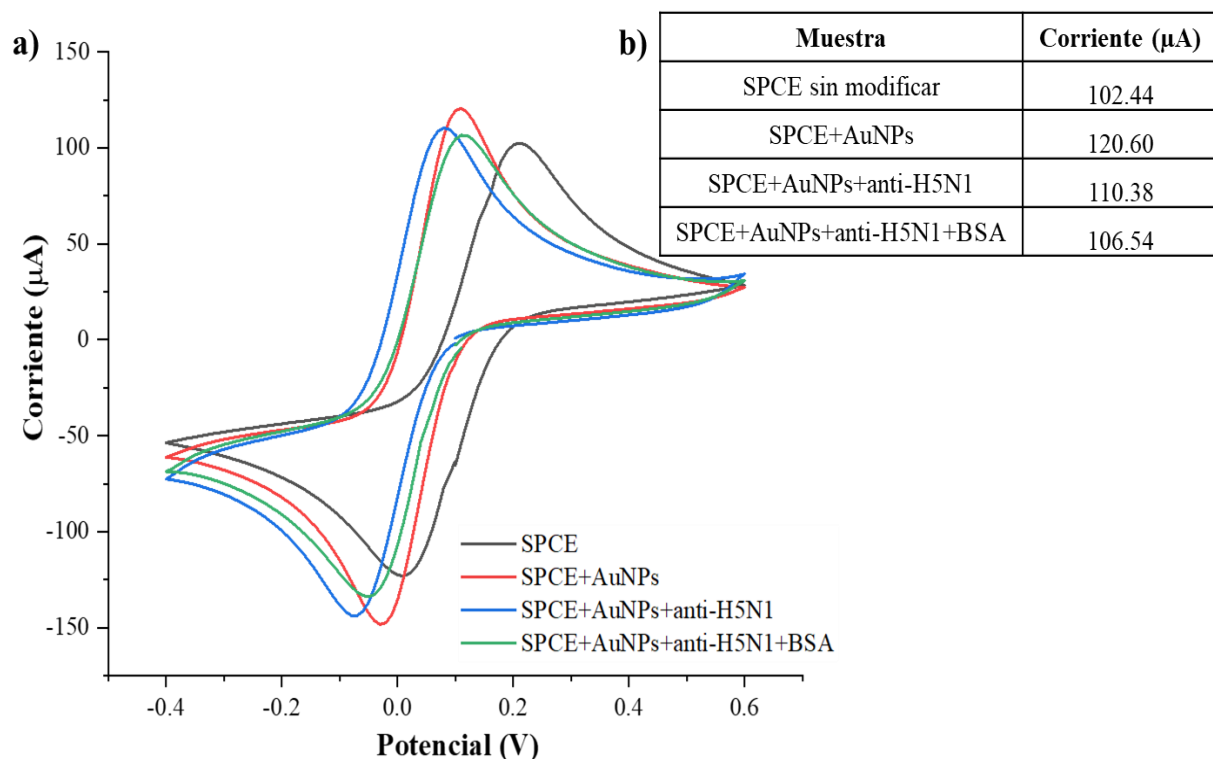


Figura 23. a) Voltamograma cíclico de la caracterización del inmunosensor electroquímico para H5N1. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con: AuNPs (rojo), anti-H5N1 (azul), anti-H5N1+BSA (verde). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b) Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.**

7.5 Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles

Después de la caracterización de cada inmunosensor electroquímico se realizó la curva de calibración para cada subtipo del virus de la influenza A H1N1 y H5N1, observándose en las figuras 24a y 25a respectivamente, utilizando concentraciones conocidas de la HA en un rango de 0-300 ng/mL, las cuales fueron analizadas mediante DPV. Se observó que en cada curva de calibración la I anódica fue disminuyendo tras aumentar la concentración de la proteína, siendo para el subtipo H1N1 de 41.5 a 20.48 μA (Figura 24b) y para el subtipo H5N1 de 47.94 a 34.89 μA (Figura 25b).

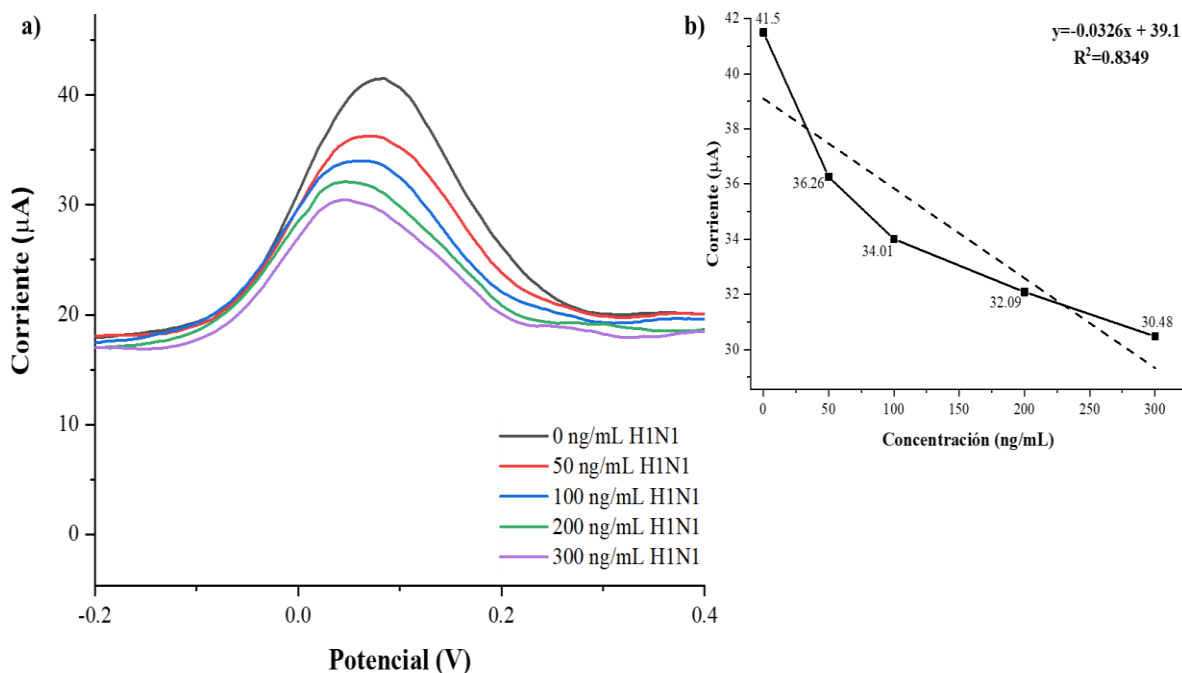


Figura 24. a) Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración de la proteína HA para H1N1. Concentración de HA: 0 ng/mL (negro). 50 ng/mL (rojo), 100 ng/mL (azul), 200 ng/mL (verde), 300 ng/mL (morado). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b)** Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.

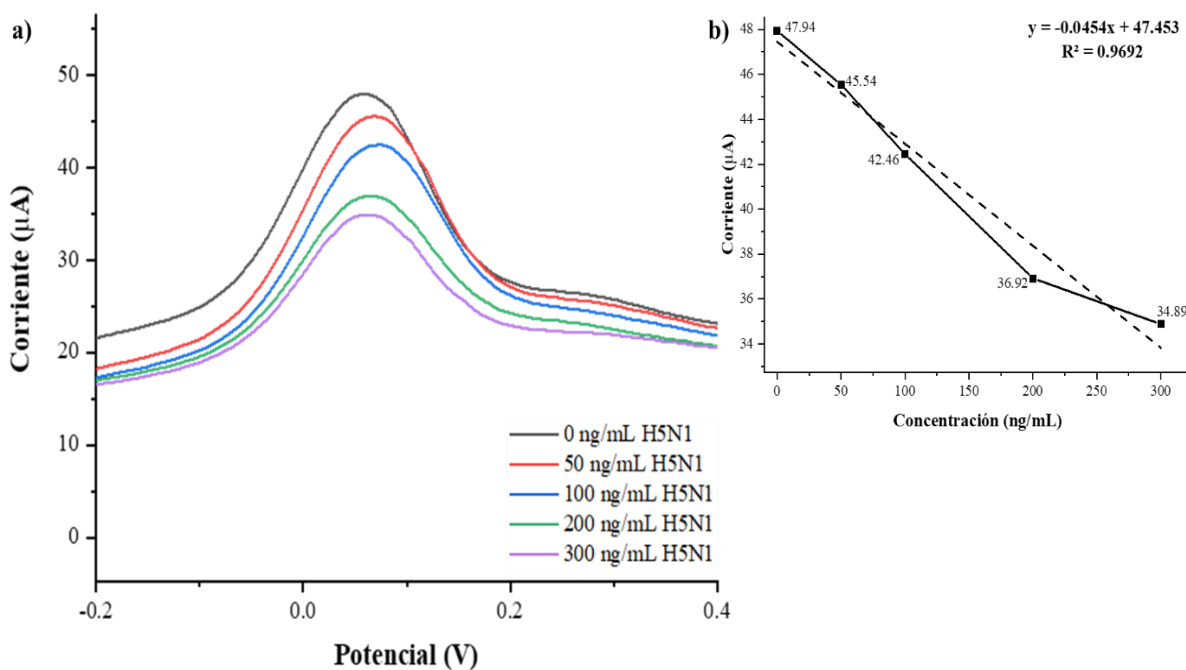


Figura 25. a) Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración de la proteína HA para H5N1. Concentración de HA: 0 ng/mL (negro). 50 ng/mL (rojo), 100 ng/mL (azul), 200 ng/mL (verde), 300 ng/mL (morado).

(morado). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b)** Valores máximos de la corriente catódica de cada muestra.

7.6 Validación de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos

Para la validación de los inmunosensores electroquímicos se analizaron dos tipos de muestras de fluidos biológicos mediante DPV, siendo muestras de suero e hisopado nasofaríngeo suplementados con la HA correspondiente para cada subtipo del virus de la influenza A. En el caso del inmunosensor para H1N1, en la figura 26a se observa que el valor máximo de cada lectura de las 5 muestras de suero suplementadas con la proteína H1 en un rango de 0 a 300 ng/mL, determinando una homogeneidad en los valores de cada muestra con excepción de la muestra de suero 4, observando que conforme aumenta la concentración de la H1 la corriente anódica disminuye, 17.43 a 12.50 μA (Figura 26b). En el caso del análisis para H5N1, en la Figura 27a se observa una homogeneidad en los valores referentes a cada muestra y de mismo modo, conforme se adiciona y aumenta la concentración de la H5, la I anódica disminuye de 14.40 a 12.12 μA (Figura 27b).

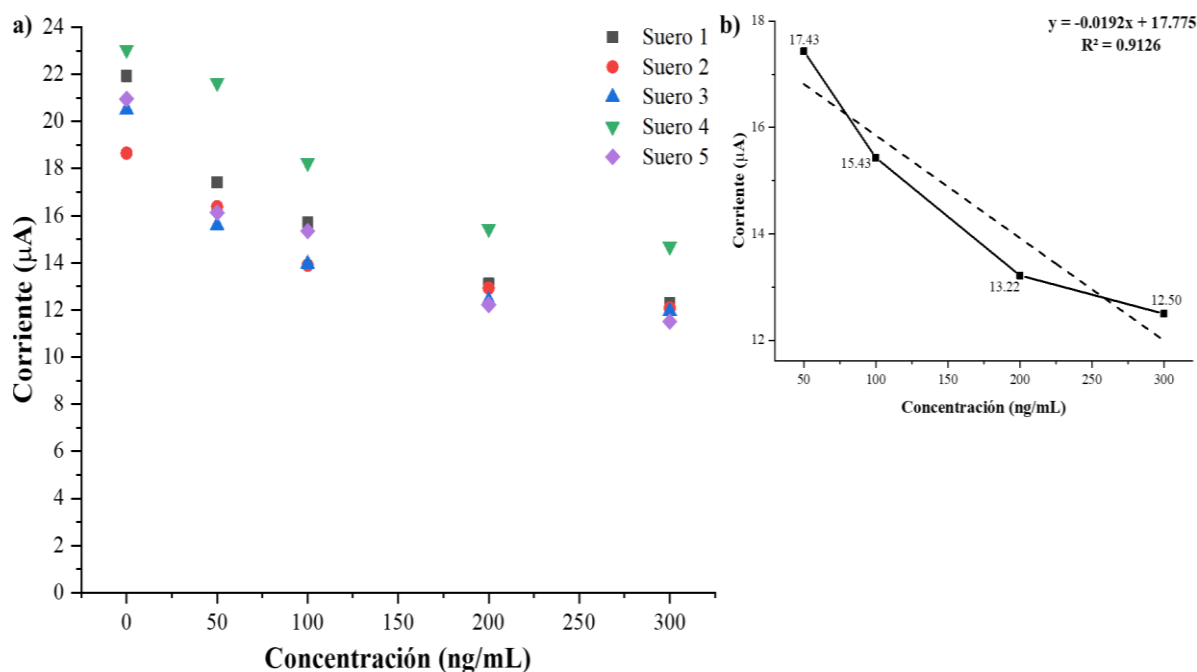


Figura 26. a) Voltamograma de pulso diferencial del análisis de muestras de sueros suplementados con la proteína H1. Concentración de H1: 0 ng/mL (negro), 50 ng/mL (rojo), 100 ng/mL (azul), 200 ng/mL (verde), 300 ng/mL (morado). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50

mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b)** Valores máximos del promedio de la corriente catódica de las muestras de suero.

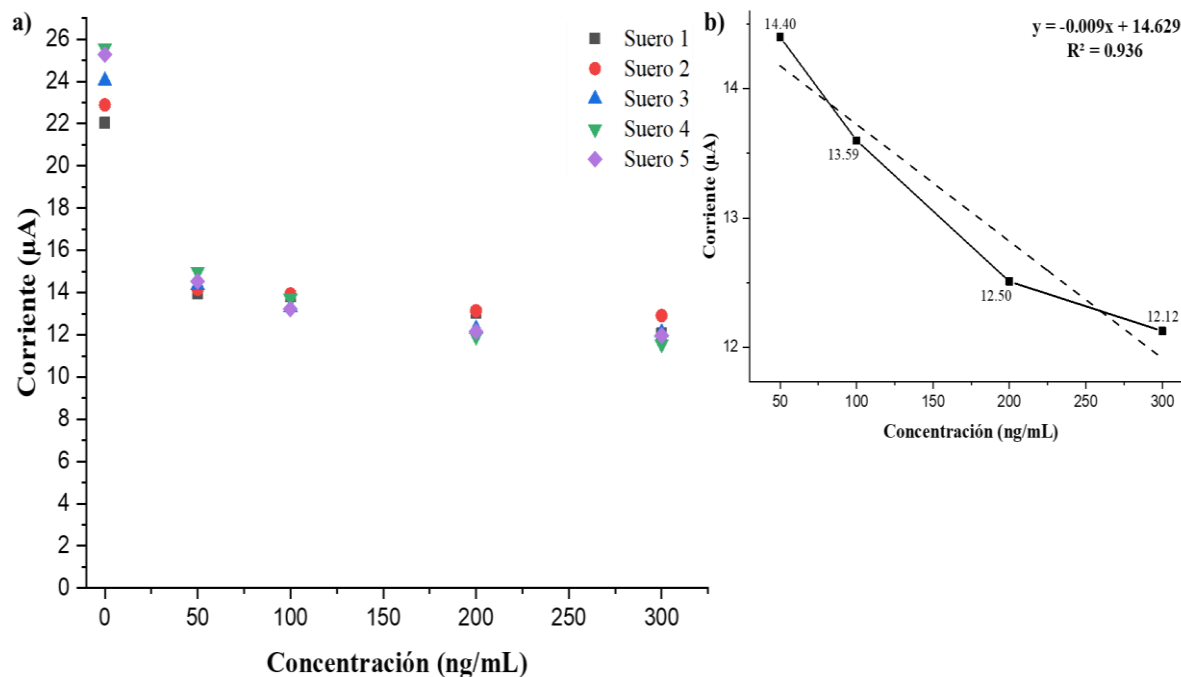


Figura 27. a) Voltamograma de pulso diferencial del análisis de muestras de sueros suplementados con la proteína H5. Concentración de H5: 0 ng/mL (negro), 50 ng/mL (rojo), 100 ng/mL (azul), 200 ng/mL (verde), 300 ng/mL (morado). Potencial con ciclos entre -0.4 V y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM y KCl 100 mM). **b)** Valores máximos del promedio de la corriente catódica de las muestras de suero.

Posteriormente, se analizaron 10 y 8 muestras de hisopados nasofaríngeos suplementados con concentraciones de la hemaglutinina de H1N1 y H5N1, respectivamente, en un rango de 0 a 300 ng/mL , observándose los valores de cada concentración para cada muestra en la figura 28a y 29a. Al analizar los resultados se determinó que para cada muestra de hisopado nasofaríngeo tras ser suplementados con la concentración de la proteína y esta aumentaba, la I anódica disminuía. En el caso para la detección de H1N1 la I anódica disminuyó de 29.64 a 15.85 μA (Figura 28b) y para H5N1 de 11.78 a 10.20 μA (Figura 29b).

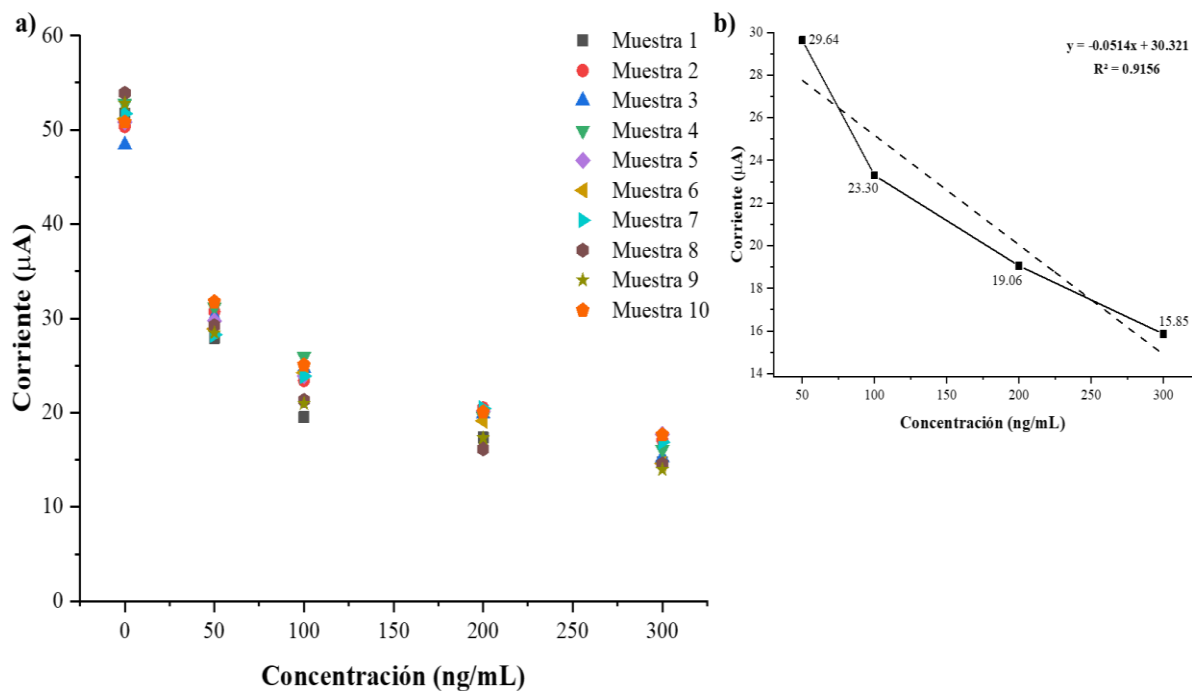


Figura 28. a) Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos analizados proteína H1. Muestras 1-10. **b)** Valores máximos del promedio de la corriente catódica de las muestras de hisopados nasofaríngeos.

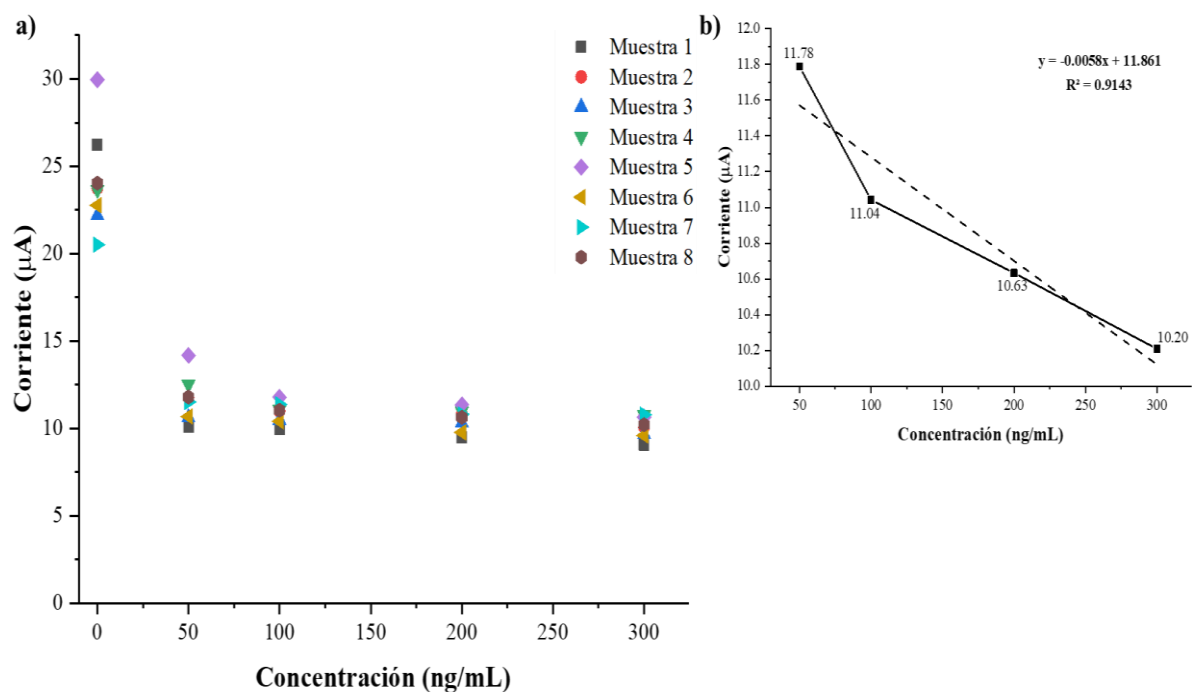


Figura 29. a) Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos analizados proteína H5. Muestras 1-8. **b)** Valores máximos del promedio de la corriente catódica de las muestras de hisopados nasofaríngeos.

7.7 Evaluación de la especificidad de los inmunosensores electroquímicos en muestras fluidos biológicos

Por último, se retó cada inmunosensor electroquímico con ambas hemaglutininas del virus de la influenza A, con el objetivo de determinar la especificidad de cada sistema, analizando muestras de suero suplementadas con la proteína correspondiente. En la figura 30, podemos observar el análisis de especificidad del inmunosensor electroquímico que es capaz de detectar la HA del subtipo H1N1 del virus de la influenza A, determinando que conforme aumenta la concentración de la proteína, la I anódica tiende a disminuir de 25.49 a 10.27 μA , por el contrario, tras analizar la HA del subtipo de H5N1 la I disminuyó en menor medida de 24.88 a 21.79 μA . Este mismo efecto se observó tras realizar el análisis del inmunosensor electroquímico para detectar H5N1, cuando se retó al sistema contra la HA de H5N1 la I anódica fue de 16.20 a 7.77 μA y en menor medida al analizar la HA de H1N1 de 16.85 a 14.04 μA .

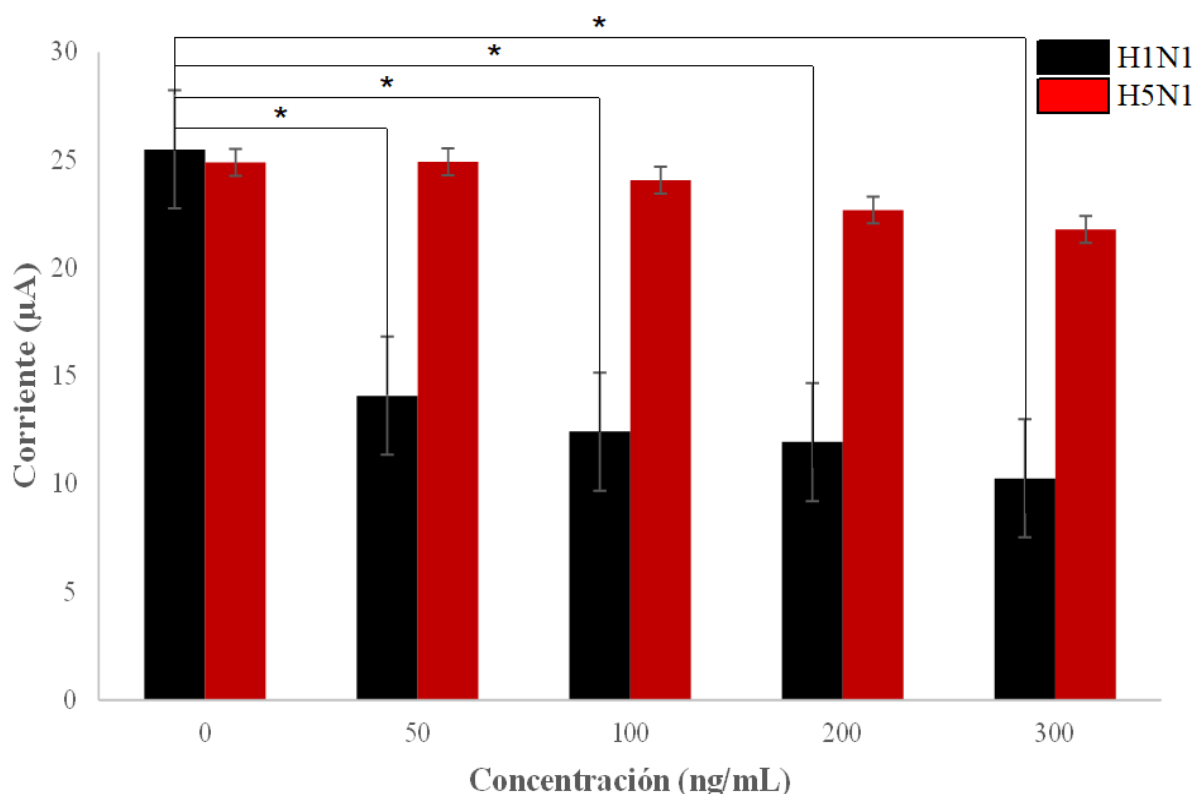


Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de especificidad del inmunosensor para la detección de la proteína H1. Análisis contra la proteína H1 (negro), proteína H5 (rojo). ANOVA ($p < 0.005$). Tukey.

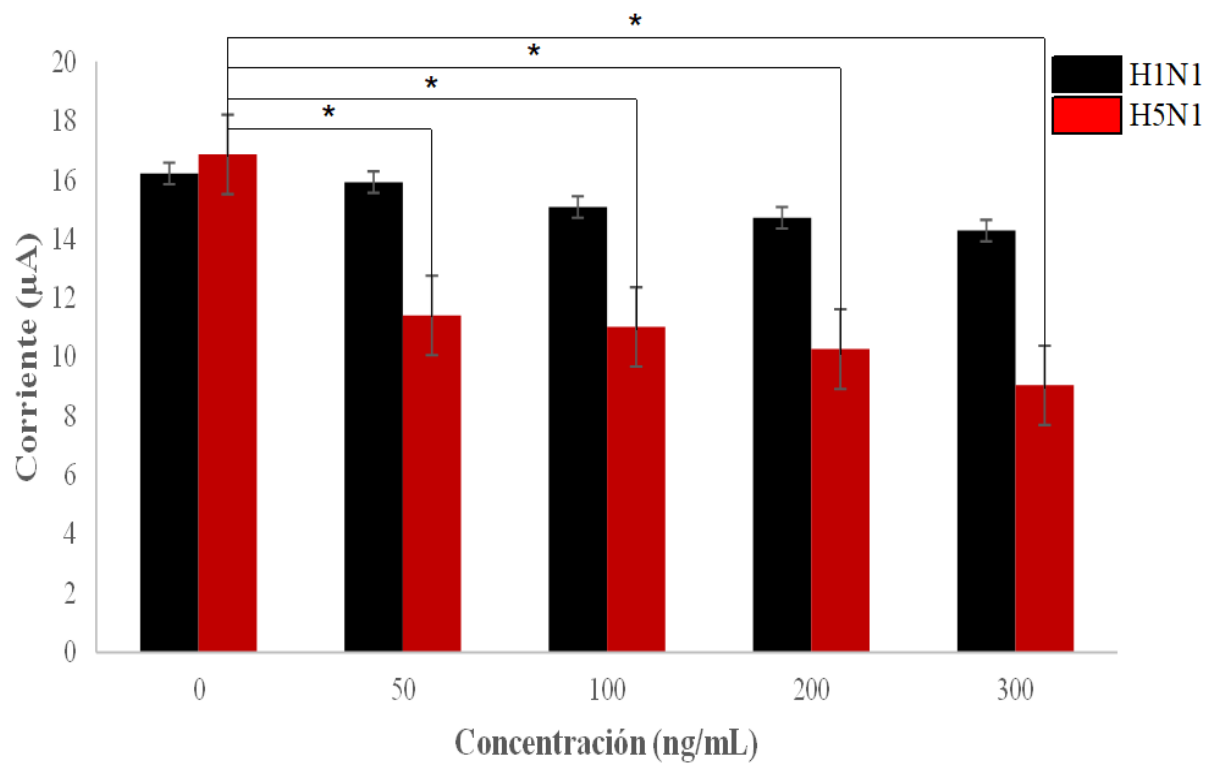


Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial del análisis de especificidad del inmunosensor para la detección de la proteína H5. Análisis contra la proteína H1 (negro), proteína H5 (rojo). ANOVA ($p < 0.005$). Tukey.

8. DISCUSIÓN

En el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos para la detección de virus de la influenza A subtipo H1N1 y H5N1 se sintetizaron distintos nanomateriales con el fin de aumentar la sensibilidad de detección del sistema y poder detectar concentraciones de las proteínas a nivel de nanogramos. Dentro de estos nanomateriales se analizaron nanopartículas de carbono con núcleo magnético ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$), nanopartículas de oro (AuNPs) y quantum dots de grafeno (GQDs), debido a que se ha demostrado que cada uno de estos materiales presentan propiedades electrocatalíticas que los hacen adecuados para el desarrollo de biosensores electroquímicos como el permitir y mejorar la transferencia de electrones, así como el poder funcionalizarlos para inmovilizar el bioreceptor.

En primera instancia los nanomateriales fueron caracterizados mediante distintas técnicas determinando su forma, tamaño y composición. El primer material sintetizado fueron los núcleos magnéticos de Fe_3O_4 , como pudimos observar en la caracterización mediante TEM, se obtuvieron núcleos magnéticos con morfología de nanocristales con un tamaño alrededor de los 10 nm, siendo esta morfología característica de los núcleos magnéticos obtenidos a partir del método de co-precipitación, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Ozel y Kockar en el 2017, y por LaGrow et al., en el 2019, dónde ambos equipos de trabajo obtuvieron nanopartículas de óxido de hierro alrededor de los 7 nm con morfología de nanocristales coasiesféricos mediante el método de co-precipitación, el cual se ha reportado como el mayormente utilizado para la obtención de este tipo de nanopartículas. También se logró observar que los núcleos magnéticos presentaban una aglomeración, esto puede ser a la alta carga de energía libre superficial de las nanopartículas, la cual puede ser controlada utilizando distintos agentes estabilizadores que revierten este fenómeno causado. Posterior a la obtención de los núcleos magnéticos, estos fueron recubiertos por una capa de carbono mediante el método de síntesis hidrotermal utilizando a la curcumina como fuente principal, obteniendo un aumento en el tamaño a 15 nm, debido a la presencia de la cubierta de carbono (Arizaga, 2013; Sodipo et al., 2023).

El segundo nanomaterial fue las AuNPs obtenidas a partir de la reducción de sales de oro por el citrato de sodio. Las nanopartículas sintetizadas demostraron presentar un tamaño alrededor de los 35-40 nm y una morfología coasiesférica. Al realizar el análisis elemental

se corroboró que las nanopartículas se encuentran conformadas por el elemento oro en mayor proporción, del mismo modo tras realizar un rango de espectro de absorbancia la muestra del nanomaterial arrojó una lectura a los 521 nm, lo cual concuerda con la longitud de onda a la cual absorbe el elemento oro (Hammami and Alabdallah, 2021; Safraz and Khan, 2021).

Como último nanomaterial sintetizado fue los GQDs, estos fueron obtenidos mediante la pirólisis del ácido cítrico, el cual se basa en el método bottom-up en donde las nanopartículas son formadas a través de la acumulación de moléculas de carbono derivadas de la materia orgánica que fue descompuesta químicamente, éste método también es conocido por ser sencillo, fácil y económico, en comparación del método top-down, el cual se basa en la obtención de nanopartículas a partir del corte o descomposición del material y de ser una técnica costosa y laboriosa (Gus et al., 2020; Tabish et al., 2021).

Después de tener los nanomateriales sintetizados y caracterizados, se realizó un análisis para determinar cuál de ellos presenta las mejores propiedades electroquímicas en conjunto con el electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) para el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos. Tras analizar cada material mediante voltamperometría cíclica, se observó que las $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ presentaron menor I anódica que las AuNPs y los GQDs, esto puede ser debido a la falta de cualidades conductivas en comparación con ambos materiales mencionados, aunado a esto la estructura coreshell de las nanopartículas de hierro si bien aumenta la dispersión del material, al provenir de una macromolécula orgánica como la curcumina, afecta las propiedades electrocatalíticas al no poseer sitios electroactivos (David et al., 2023). Por otro lado, a pesar de que los GQDs aumentaron la corriente, estos presentaron menor aumento que al utilizar las AuNPs, esto concuerda con lo reportado por Rani et al., en el 2022, el cual expone que en ocasiones las características ópticas y electrocatalíticas de los quantum dots pueden encontrarse en contraposición, pues mientras características como tamaño, forma y condiciones del medio pueden potenciar las propiedades ópticas, estas se interpondrán en la cualidades electrocatalíticas de dichas estructuras, para dar una explicación más certera a esta situación se requieren análisis adicionales de este material. Por otro lado, las AuNPs aumentaron en mayor proporción la corriente que los otros nanomateriales analizados, siendo el que presentó las mejores propiedades electrocatalíticas siendo seleccionado para el desarrollo de los inmunosensores,

esto es debido a que el oro es un elemento que ha demostrado ser un material que presenta buenas propiedades electrocatalíticas, siendo ideal para el desarrollo de biosensores, entre ellas alta energía superficial y mejoramiento de la transferencia de electrones.

Tras determinar que las AuNPs es el nanomaterial que se utilizará para el desarrollo de los inmunosensores y que el SPCE se implementará como matriz, se realizó una microscopía del WE del SPCE modificado con y sin las nanopartículas, observando que en comparación del SPCE sin modificar el electrodo modificado presenta una monocapa de las AuNPs de manera homogénea, esto es debido a que las AuNPs fueron electrodepositadas directamente en el WE del SPCE mediante voltamperometría de pulso diferencial, lo cual nos permite obtener nanopartículas de manera rápida, sencilla y más homogéneas en forma y tamaño, sin requerir de algún otro agente para la obtención de las mismas, como lo es mediante reducción química del ácido cloroáurico por el citrato de sodio, como se implementó en un principio (Laygah and Eissa, 2019; Paimard et al., 2023). A demás se realizó un análisis elemental de la superficie del SPCE modificado con las AuNPs electrodepositadas determinando que el WE se encuentra recubierto por oro al observar la aparición del elemento en un 59.6%, así como la disminución del carbono de 96.9 a un 34.6%, corroborando de esta manera la inmovilización de las nanopartículas de oro sobre la superficie del WE del SPCE.

Para la obtención de los nanoconjugados compuestos por anticuerpos y nanopartículas de oro para cada uno de los subtipos del virus de la influenza A, se realizó mediante la formación de los enlaces amida que se forman entre los grupos carboxilo presentes en las AuNPs y los grupos amino de los anticuerpos tras la activación de los mismos mediante los agentes EDC y NHS, aunado a este tipo de conjugación, al presentarse una interacción directa entre AuNPs y anticuerpos, las propiedades intrínsecas del oro permiten afianzar aún más la conjugación mediante la adsorción electrostática que estas nanopartículas otorgan (Jazayeri et al., 2016; Wang et al., 2016; Jeong et al., 2020; Marques et al., 2020). Posteriormente, la caracterización de los nanoconjugados se llevó a cabo mediante un análisis elemental del SPCE modificado con los NC para cada subtipo del virus de la influenza, dónde el porcentaje del nitrógeno del SPCE modificado únicamente con las AuNPs aumentó de 0.2

a 9.1 y 2.1% tras inmovilizar los NCs para el subtipo H1N1 y H5N1, respectivamente, siendo el nitrógeno proveniente de los anticuerpos de cada NC.

Una vez obtenido y caracterizado los nanoconjugados, se realizó la caracterización electroquímica del desarrollo de los inmunosensores mediante voltamperometría cíclica (CV) tras analizar la inmovilización de cada elemento que conforman los sistemas, observando que en ambos inmunosensores las AuNPs aumentan la I anódica en comparación del SPCE sin modificar reportando un aumento de la I anódica de 102.44 a 120.60 μA , debido a que el oro es un material altamente electroactivo el cual permite la transferencia de electrones de manera fácil y eficiente (Vu et al., 2021), por otro lado, tras analizar la inmovilización de los NCs, estos disminuyeron la I anódica en ambos sistemas, esto se debe a que los anticuerpos que se encuentran anclados sobre las AuNPs utilizados como bioreceptores no permiten el paso de electrones de manera efectiva disminuyendo la I anódica resultante de 120.60 a 115.57 y 110.38 μA , para el subtipo H1N1 y H5N1 respectivamente. Este mismo efecto se observó cuando los sitios de unión inespecífico fueron bloqueados con el BSA en cada sistema, este al ser una proteína, esta al no presentar sitios activos que aumenten la corriente resultante disminuye aún más la I anódica resultante, a 112.87 y 106.54 μA respectivamente (Buk and Pemble, 2019; Saenchoopa et al., 2021).

Posteriormente, se analizó la efectividad de detección de cada hemaglutinina por los inmunosensores desarrollados realizando una curva de calibración mediante CV, determinando que conforme se aumente la concentración de la proteína de HA de 0 a 300 ng/mL la I anódica disminuye, en el caso del inmunosensor para el subtipo H1N1 la corriente disminuyó de 41.5 a 30.48 μA y para el subtipo H5N1 de 47.94 a 34.89 μA . Cuando el anticuerpo utilizado como bioreceptor detecta la hemaglutinina, estos forman un complejo conocido como antígeno-anticuerpo, por lo cual los electrones se encuentran retenidos en la inmunoreacción tras aplicar un rango de potencial, por lo cual la capa de difusión se crea de manera más rápida con forme aumenta la concentración de la proteína, impidiendo la transferencia de electrones y de esta manera la corriente tiende a disminuir. Entre los diversos trabajos que corroboran el fenómeno previamente presentados podemos encontrar los reportes por parte de Torres-Méndez en el 2021 y de Büyüksünetçi et al., en el 2023, los cuales desarrollaron sistemas de detección para la proteína H1 del virus influenza, mediante

el uso de matrices SPCE, en donde también se encontró una correlación inversamente proporcional entre la corriente resultante y la cantidad de proteína presente en la muestras, ya sea mediante análisis voltamperométricos o bien aumentando la impedancia reportada por partes de los biosensores.

Para determinar la estabilidad y efectividad de detección de los inmunosensores electroquímicos, estos fueron retados bajo el análisis de CV de muestras de fluidos biológicos, siendo sueros e hisopados nasofaríngeos suplementados con la hemaglutinina de H1N1, así como de H5N1, respectivamente en un rango de 0 a 300 ng/mL. Tras analizar las muestras de sueros suplementadas con la proteína de H1N1 observamos que la I anódica disminuye conforme aumentamos la concentración de la proteína yendo de 17.43 a 12.50 μA , del mismo modo se observó para las muestras de suero suplementados con la proteína de H5N1, reportando valores de I anódica de 14.40 a 12.12 μA . Al analizar los hisopados nasofaríngeos suplementados con cada proteína de HA observamos el mismo efecto obtenido con las muestras de los sueros suplementados, es decir, la disminución de la I anódica de 29.64 a 15.85 μA en el caso de H1N1 y de 11.78 a 10.20 μA para H5N1. Sin embargo, podemos observar que entre los análisis de sueros e hisopados nasofaríngeos la I anódica disminuye en mayor medida cuando se analizan los sueros, esto es debido a que este tipo de muestras presentan mayor cantidad de proteínas séricas endógenas tal como la albúmina, siendo reportada como una de los principales componentes no electroactivos, lo cual hace que los valores de la I anódica disminuyan aún más (Adkins et al., 2002).

Por último, se realizó el análisis de especificidad para cada sistema desarrollado mediante DPV, realizando una reacción cruzada para ambos inmunosensores electroquímicos. Mediante este análisis logramos observar que en ambos sistemas al analizar la HA correspondiente al bioreceptor, la I anódica disminuye conforme aumenta la concentración de la proteína blanco, sin embargo, tras analizar la proteína contraria en ambos sistemas, no se observaron diferencias significativas en los valores de la I anódica siendo estos similares a los de la muestra de suero sin suplementar, este mismo efecto fue observado por Xie et al., en el 2014, dónde retaron un inmunosensor electroquímico que es capaz de detectar H5N1 contra distintos tipos de HA, determinando que el sistema detecta de manera selectiva la H5.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró la obtención y caracterización de las nanopartículas de carbono con núcleo magnético, nanopartículas de oro y quantum dots de grafeno.
2. Se determinó que el conjunto electrodo serigrafiado de carbono y nanopartículas de oro cumplen con las mejores propiedades electrocatalíticas para el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos.
3. Se logró la obtención del nanoconjugado de nanopartículas de oro con la HA del virus de la influenza A H1N1 y el nanoconjugado para el subtipo H5N1, para ser utilizados como bioreceptores en el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos.
4. Se logró el desarrollo y caracterización de los inmunosensores electroquímicos para la detección de la HA de los virus de la influenza A H1N1 y H5N1.
5. Se determinó ambos inmunosensores electroquímicos tienen la sensibilidad para detectar 50 ng/mL de la HA en muestras de fluidos biológicos suplementadas, como suero e hisopado nasofaríngeo.
6. Se determinó que, bajo condiciones controladas, los inmunosensores electroquímicos desarrollados basados en los SPCE presentan reproducibilidad, sensibilidad y especificidad para la detección de la HA de los subtipos del virus de la influenza A H1N1 y H5N1.

10. PERSPECTIVAS

Los inmunosensores electroquímicos desarrollados lograron demostrar ser una prueba de detección sensible y específica de los virus de la influenza A H1N1 y H5N1, mediante la detección de la HA correspondiente en diferentes medios, como buffer de fosfatos y en muestras de fluidos biológicos, como suero e hisopado nasofaríngeo. Con el objetivo de lograr la validación de estos sistemas como pruebas de detección viral, es necesario que se analicen muestras que sean positivas o que presenten agentes pseudovirales para los diferentes subtipos del virus de la influenza A abordados en este proyecto, así como aumentar el número de muestras analizadas y el límite de detección mediante el uso de evaluaciones electroquímicas complementarias como lo es la espectroscopía de impedancia electroquímica.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG. 2002. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*: MCP, 1(12):947–955.

Ali J, Najeeb J, Asim Ali M, Farhan Aslam M, Raza A. 2017. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, 8(1):1–9.

Amano Y, Cheng Q. 2005. Detection of influenza virus: Traditional approaches and development of biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(1), 156–164.

Arduini F, Micheli L, Moscone D, Palleschi G, Piermarini S, Ricci F, Volpe G. 2016. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, 114–126.

Arizaga A. 2013. Synthesis of core-shell magnetic nanoparticles for biomedical applications. (Tesis Doctoral). Universidad de Zaragoza, España.

Asadian E, Ghalkhani M, Shahrokhian S. 2019. Electrochemical sensing based on carbon nanoparticles: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 293:183–209.

Bao Q, Li G, Yang Z, Liu J, Wang H, Pang G, Guo Q, Wei J, Cheng W, Lin L. 2023. Electrochemical biosensor based on antibody-modified Au nanoparticles for rapid and sensitive analysis of influenza A virus. *Ionics*, 29(5), 2021-2029.

Bayona Ovalles Y, Niederbacher Velásquez J. 2015. Infecciones respiratorias virales en pediatría: generalidades sobre fisiopatogenia, diagnóstico y algunos desenlaces clínicos. *Revista Médicas Uis*, 28(1), 133–141.

Bouvier NM, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(Suppl 4), D49–D53.

Buenger D, Topuz F, Groll J. 2012. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 37(12), 1678–1719.

Buk V, Pemble ME. 2019. A highly sensitive glucose biosensor based on a micro disk array electrode design modified with carbon quantum dots and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 298, 97-105.

Büyüksünetçi YT, Anık Ü. 2023. Electro-nano diagnostic platform based on antibody–antigen interaction: an electrochemical immunosensor for influenza A virus detection. *Biosensors*, 13(2), 176.

Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. 2019. Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing. *Nanomaterials*, 9(4), 1–18.

Carmona L, la Cruz Pérez D, Rodríguez M, Montes R. 2018. Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya. *Mensaje Bioquímico*, 42, 92–102.

Charlton B, Crossley B, Hietala S. 2009. Conventional and future diagnostics for avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 341–350.

Chirinos-Saire Y, Reyna-García R, Aguilar-Huauya E, Santillán-Salas C. 2021. Respiratory viruses and clinical-epidemiological characteristics in episodes of acute respiratory infection. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 38(1), 101–107.

Cho IH, Kim DH, Park S. 2020. Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*, 24(1), 1–12.

Chung S, Revia RA, Zhang M. 2019. Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy. *Advanced Materials*, 1904362, 1–26.

David IG, Iorgulescu EE, Popa DE, Buleandra M, Cheregi MC, Noor H. 2023. Curcumin Electrochemistry—Antioxidant Activity Assessment, Voltammetric Behavior and Quantitative Determination, Applications as Electrode Modifier. *Antioxidants*, 12(11), 1908.

Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R, Daniels R. 2018. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–17.

Du R, Cui Q, Chen Z, Zhao X, Lin X, Rong L. 2023. Revisiting influenza A virus life cycle from a perspective of genome balance. *Virologica Sinica*, 38(1), 1-8.

Dunajová AA, Gál M, Tomčíková K, Sokolová R, Kolivoška V, Vaněčková E, Kielar F, Kostolanský F, Varečková E, Naumowicz M. 2020. Ultrasensitive impedimetric immunosensor for influenza A detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 858.

Fodor E, Te Velhuis, AJW. 2020. Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(9), a038398.

Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, 28(31), 4895–4902.

Gu S, Hsieh CT, Yuan CY, Gandomi YA, Chang JK, Fu CC, Yang JW, Juang RS. 2020. Fluorescence of functionalized graphene quantum dots prepared from infrared-assisted pyrolysis of citric acid and urea. *Journal of Luminescence*, 217, 116774.

Hammami I, Alabdallah NM. 2021. Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of king Saud university-science*, 33(7), 101560.

Han J-H, Lee D, Chew C, Kim T, Pak J. 2016. A Multi-Virus Detectable Microfluidic Electrochemical Immunosensor for Simultaneous Detection of H1N1, H5N1, and H7N9 Virus Using ZnO Nanorods for Sensitivity Enhancement. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 228.

Han MY, Xie TA, Li JX, Chen HJ, Yang XH, Guo XG. 2020. Evaluation of Lateral-Flow Assay for Rapid Detection of Influenza Virus. *Biomed Research International*. 3969868.

Harrington WN, Kackos CM, Webby RJ. 2021. The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(5), 737–749.

Hegde M, Pai P, Shetty MG, Babitha KS. 2022. Gold nanoparticle based biosensors for rapid pathogen detection: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 100756.

- Henritzi D, Hoffmann B, Wacheck S, Pesch S, Herrler G, Beer M, Harder TC. 2019. A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 13(1), 71–82.
- Huang X, Zhu Y, Kianfar E. 2021. Nano biosensors: properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1649-1672.
- Ibraheem A, Campbell RE. 2010. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14:30-36.
- Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala VKR, Ebrahimpour S. 2021. A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4638–4646.
- Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B. 2016. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and bio-sensing research*, 9, 17-22.
- Jeong S, Park JY, Cha MG, Chang H, Kim YI, Kim HM, Jun BH, Lee DS, L YS, Jeong JM, Lee YS, Jeong DH. 2017. Highly robust and optimized conjugation of antibodies to nanoparticles using quantitatively validated protocols. *Nanoscale*, 9(7), 2548-2555.
- Kaya SI, Karadurmus L, Ozcelikay G, Bakirhan NK, Ozkan SA. 2020. Electrochemical virus detections with nanobiosensors. *Nanosensors for Smart Cities, January*, 303–326.
- Khan MZH, Hasan MR, Hossain SI, Ahommed MS, Daizy M. 2020. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, 166, 112431.
- Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, García-Sastre A. 2018. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–21.

Krejcova L, Hynek D, Michalek P, Milosavljevic V, Kopel P, Zitka O, Kizek R. 2014. Electrochemical sensors and biosensors for influenza detection - literature survey 2012-2013. *International Journal of Electrochemical Science*, 9(7), 3440–3448.

Koutsakos M, Nguyen TH, Barclay WS, Kedzierska K. 2016. Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiology*, 11(1), 119–135.

Kulkarni MB, Ayachit NH, Aminabhavi TM. 2022. Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. *Biosensors*, 12(7), 543.

Lai HC, Chin SF, Pang SC, Henry Sum MS, Perera D. 2017. Carbon Nanoparticles Based Electrochemical Biosensor Strip for Detection of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Nanomaterials*, 1–7.

Layqah LA, Eissa S. 2019. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. *Microchimica Acta*, 186, 224.

Lipsitch M, Barclay W, Raman R, Russell CJ, Belser JA, Cobey S, Kasson PM, Lloyd-Smith JO, Maurer-Stroh S, Riley S, Beauchemin CA, Bedford T, Friedrich TC, Handel A, Herfst S, Murcia PR, Roche B, Wilke CO, Russell CA. 2016. Viral factors in influenza pandemic risk assessment. *ELife*, 5, 1–38.

Mansuriya BD, Altintas Z. 2021. Enzyme-free electrochemical nano-immunosensor based on graphene quantum dots and gold nanoparticles for cardiac biomarker determination. *Nanomaterials*, 11, 578.

Marques AC, Costa PJ, Velho S, Amaral MH. 2020. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *Journal of Controlled Release*, 320, 180-200.

Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Eisfeld AJ, Neumann G, Hase T, Ghosh S, Shoemaker JE, Lopes TJS, Watanabe T, Watanabe S, Fukuyama S, Kitano H, Kawaoka Y. 2013. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology*, 7(97).

Metrohm. 2019. Electrodo serigrafiado de carbono. [Online]. Disponible en: https://www.metrohm.com/es_mx/products/110/110.html

Metters JP, Tan F, Kadara RO, Banks CE. 2012. Platinum screen printed electrodes for the electroanalytical sensing of hydrazine and hydrogen peroxide. *Analytical Methods*, 4(5), 1272–1277.

Monošík R, Stred'anský M, Šturdík E. 2012. Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5:109-120.

Mohamed HM. 2016. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 1–11.

Mostafa A, Naguib MM, Nogales A, Barre RS, Stewart JP, García-sastre A, Martinez-Sobrido L. 2024. Avian influenza A (H5N1) virus in dairy cattle: origin, evolution, and cross-species transmission. *MBio*, Nov 13:e0254224.

Naresh V, Lee N. 2021. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109.

Nesakumar N, Srinivasan S, Alwarappan S. 2022. Graphene quantum dots: synthesis, properties, and applications to the development of optical and electrochemical sensors for chemical sensing. In *Microchimica Acta* 189(7).

Nguyen THP, Tonezzer M, Dang TT Le, Vu QK, Tran QH, Nguyen DH, Nguyen VH. 2019. Stable Electrochemical Measurements of Platinum Screen-Printed Electrodes Modified with Vertical ZnO Nanorods for Bacterial Detection. *Journal of Nanomaterials*, 2019.

Nuñez IA, Ross TM. 2019. A review of H5Nx avian influenza viruses. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 7, 1–15.

Oxford JS, Hockley, DJ. 1987. Orthomyxoviridae. In *Animal Virus Structure* (Vol. 3, pp. 213–232).

Pan American Health Organization (PAHO). Epidemiological Update Outbreaks of avian influenza caused by influenza A(H5N1) in the Region of the Americas. 2023. [Online]. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-outbreaks-avian-influenza-caused-influenza-ah5n1-region-americas-0>

Paimard G, Ghasali E, Baeza M. 2023. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors*, 11(2), 113.

Pedrero M, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. 2012. Gold Nanoparticle-Based Electrochemical DNA Biosensors. In *Electrochemical DNA Biosensors* (Vol. 9, pp. 104–140).

Pérez-Fernández B, Costa-García A, Muñiz ADLE. 2020. Electrochemical (bio) sensors for pesticides detection using screen-printed electrodes. *Biosensors*, 10(4), 32.

Poovorawan Y, Pyungporn S, Prachayangprecha S, Makkoch J. 2013. Global alert to avian influenza virus infection: From H5N1 to H7N9. *Pathogens and Global Health*, 107(5), 217–223.

Rahmati Z, Roushani M, Hosseini H, Choobin H. 2021. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Microchemical Journal*, 170, 106718.

Rani P, Dalal R, Srivastava S. 2022. Study of electronic and optical properties of quantum dots. *Applied Nanoscience*, 12(7), 2127-2138.

Ravina, Dalal A, Mohan H, Prasad M, Pundir CS. 2020. Detection methods for influenza A H1N1 virus with special reference to biosensors: A review. *Bioscience Reports*, 40(2), 1–18.

Renedo OD, Alonso-Lomillo MA, Martínez MJA. 2007. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202–219.

Rey CC, García MLG, Flecha IC, Breña PP. 2011. Infecciones respiratorias virales. Protocolos de Infectología. Asociación Española de Pediatría. *Sociedad Española de Infectología Pediátrica*, 189–204.

Ribeiro BV, Cordeiro TAR, Oliveira e Freitas GR, Ferreira LF, Franco DL. 2020. Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta Open*, 2, 100007.

Rojas XIM. 2014. *El virus de la gripe: Patógeno emergente y reemergente*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Salamanca, España.

Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. 2010. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763.

Rosete Olvera DP, Archundia Sánchez FJ, Cabello Gutiérrez C, Manjarrez Zavala ME. 2002. Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 15(4), 239–254.

Ruiz C, Kuri P, Narro J. 2017. Comportamiento de las temporadas de influenza en México de 2010 a 2016, análisis y prospectiva. *Gaceta Medica de México*, 153, 205–218.

Sarfraz N, Khan I. 2021. Plasmonic gold nanoparticles (AuNPs): properties, synthesis and their advanced energy, environmental and biomedical applications. *Chemistry–An Asian Journal*, 16(7), 720–742.

Saenchoopa A, Klangphukhiew S, Somsab R, Talodthaisong C, Patramanon R, Daduang J, Kulchat S. 2021. A disposable electrochemical biosensor based on screen-printed carbon electrodes modified with silver nanowires/hpmc/chitosan/urease for the detection of mercury (ii) in water. *Biosensors*, 11(10), 351.

Saylan Y, Erdem Ö, Ünal S, Denizli A. 2019. An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection. *Biosensors*, 9(2).

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Dirección General de Epidemiología (DGE). Informe semanal de enfermedad respiratoria viral. Informe semanal de la temporada de influenza estacional y otros virus respiratorios 2022-2023. Semana 01-2023. 2023.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/789589/INFLUENZA_OVR_SE01_2023.pdf

Sodipo BK, Noqta OA, Aziz AA, Katsikini M, Pinakidou F, Paloura EC. 2023. Influence of capping agents on fraction of Fe atoms occupying octahedral site and magnetic property of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles by one-pot co-precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, 938, 168558.

Svigelj R, Zuliani I, Grazioli C, Dossi N, Toniolo R. 2022. An Effective Label-Free Electrochemical Aptasensor Based on Gold Nanoparticles for Gluten Detection. *Nanomaterials*, 12, 987.

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Plan Nacional para la Preparación y Respuesta ante la Intensificación de la Influenza Estacional o ante una Pandemia de Influenza. Manual de Atención a la Salud ante Emergencias. 2015. [Online]. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/emergencias/descargas/pdf/Plan_Nacional_Influenza.pdf

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Informe Semanal de la COVID-19, Influenza y otros Virus Respiratorios, 2024. 2024. [Online]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/918583/ERV_SE20_2024.pdf

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Informe Semanal de la COVID-19, Influenza y otros Virus Respiratorios, 2024. 2024. [Online]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/918583/ERV_SE20_2024.pdf

Tabish TA, Hayat H, Abbas A, Narayan RJ. 2022. Graphene quantum dots-based electrochemical biosensing platform for early detection of acute myocardial infarction. *Biosensors*, 12(2), 77.

Tanner WD, Toth DJA, Gundlapalli AV. 2015. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: A review. *Epidemiology and Infection*, 143(16), 3359–3374.

Taubenberger, JK, Morens DM. 2008. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annual Review of Pathology*, 23(1), 1–7.

Tepeli Y, Ülkü A. 2018. Electrochemical biosensors for influenza virus a detection: The potential of adaptation of these devices to POC systems. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 254, 377–384.

Torres-Méndez C, Ellamathy J, Mascarenhas MI, Liu Y, Gkountana GV, Kühne P, Sebastián J, Jovanovic I, Bern D, Nandi S, Lüftner M, Langwallner V, Lysandrou M, Taylor S, Martinovic K, Atif AR, Doulabi EM, Kamali-Moghaddam M, Mestres G. 2021. Developing an Electrochemical Biosensor for the Detection of Hemagglutinin Protein of Influenza A Virus Subtype H1N1 in Artificial Saliva. *Chemistry Proceedings*, 5(1), 80.

Touhami A. 2014. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. *Nanomedicine* 374–403.

Uyeki TM, Hui DS, Zambon M, Wentworth DE MA. 2022. Influenza. *Lancet*, 400, 693–706.

Valdés CS, Hernández ÁG, Fernández SO, Ramírez OV, Herrera BA, Muñoz GG, Santos LP, Caraballo LP, Ramos AP. 2003. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. *Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri.”*

Veerapandian M, Hunter R, Neethirajan S. 2016. Dual immunosensor based on methylene blue-electroadsorbed graphene oxide for rapid detection of the influenza A virus antigen. *Talanta*, 155, 250–257.

Vu QK, Tran QH, Vu NP, Anh TL, Le Dang TT, Matteo T, Nguyen THH. 2021. A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Materials Today Communications*, 26, 101726.

Wang A, Perera YR, Davidson MB, Fitzkee NC. 2016. Electrostatic interactions and protein competition reveal a dynamic surface in gold nanoparticle–protein adsorption. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(42), 24231–24239.

West JV. 2002. Acute upper airway infections. *British Medical Bulletin*, 61, 215–230.

World Health Organization. Virus de la gripe aviar y otros virus de la gripe de origen zoonótico. 2018. [Online]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))

World Health Organization. Influenza (seasonal). 2023. [Online]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

Wujcik EK, Wei H, Zhang X, Guo J, Yan X, Sutrave N, Guo Z. 2014. Antibody nanosensors: A detailed review. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4(82):43725–43745.

Xie Z, Huang J, Luo S, Xie Z, Xie L, Liu J, Pang Y, Deng X, Fan Q. 2014. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for avian influenza subtype H5 using nanocomposite. *Public Library of Science ONE*, 9(4), 96–99.

Yi-Cheun Yeh, Brian Creran, VMR. 2012. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880.

Zhang R, Liao T, Wang X, Zhai H, Yang D, Wang X, Haiyan W, Feng, F. 2022. Second near-infrared fluorescent dye for lateral flow immunoassays rapid detection of influenza A/B virus. *Analytical Biochemistry*, 655, 114847.

Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, Hu L, Su Y, Ren J, Yu F, Du L, Jiang S. 2020. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 408–417.

Zhu C, Yang G, Li H, Du D, Lin Y. 2015. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical Chemistry*, 87(1), 230–249.