

Incremento de la sensibilidad de dispositivos de detección de agentes de guerra biológica utilizando soportes nanoestructurados biofuncionalizados

Autores: Laura González López, Matilde Gil García, Inés Peraile Muñoz, Gabriel Rozas Sanz, Nushin Alba Dabbagh Escalante, Juan Carlos Cabria Ramos y Paloma Lorenzo Lozano, Área de Defensa Biológica, Departamento de Defensa NBQ, Subdirección General de Sistemas Terrestres, INTA e Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España, ISDEFE.

Palabras clave: agentes de guerra biológica, inmunobiosensor, simulante, soporte nanoestructurado, dispositivos de detección.

Líneas Tecnológicas ETID relacionadas: 10.2.1, 10.2.2, 10.2.4, 10.2.5, 10.2.7.

Introducción

La producción de agentes biológicos, debido al creciente desarrollo tecnológico, es relativamente sencilla. Algunos de estos agentes, por sus características de infectividad, toxicidad, patogenicidad y transmisibilidad, así como su facilidad para ser diseminados, son susceptibles de ser utilizados como agentes de guerra

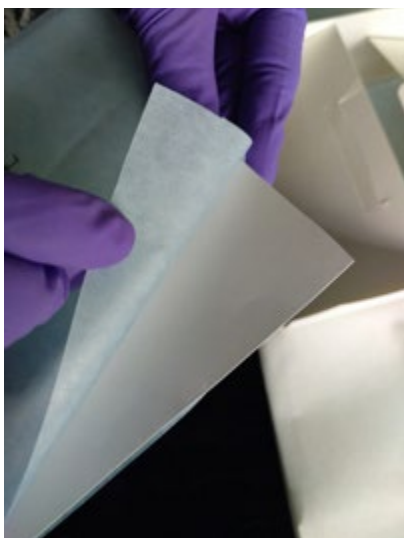


Figura 2. Membrana Zprobe, Bio-Rad Laboratories, S.A. (Fuente: propia).

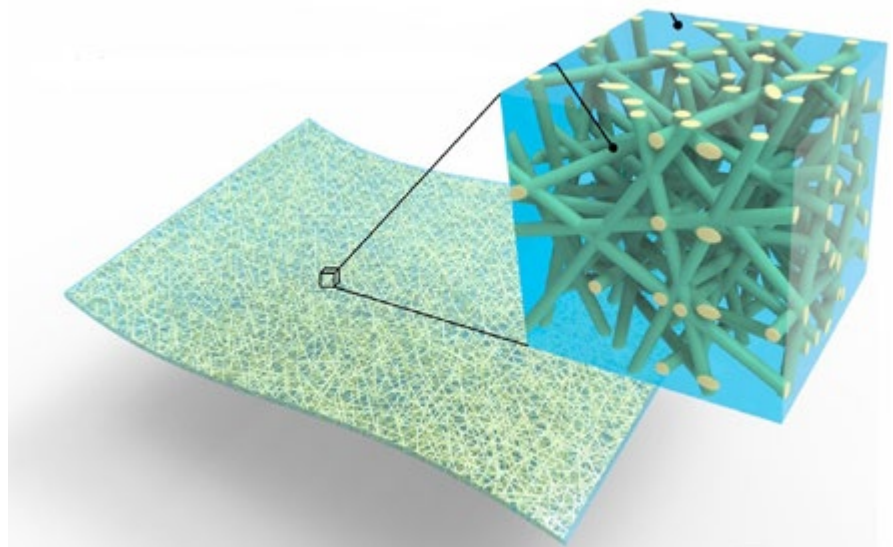


Figura 1. Soporte nanoestructurado. (Fuente: Fu et al., 2016. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1600422113).

biológica, constituyendo un riesgo real para la población. Estos agentes pueden ser dirigidos contra la población, los cultivos y el ganado [1], provocando efectos devastadores en la salud (mortalidad, morbilidad, incapacidad) y en la economía (cosecha fallida, muerte del ganado, inversión en salud y seguridad) de los países [2].

A pesar de la gran participación de la comunidad internacional en la Convención para la prohibición de armas bacteriológicas (biológicas) y tóxicas [3], hay varios países sospechosos de almacenar agentes biológicos con fines ofensivos. Por ello, la mayoría de los países se han visto obligados a invertir en la investigación y en el desarrollo de técnicas de detección e identificación de dichos agentes, siendo un objetivo prioritario el diseño de dispositivos que permitan una identificación temprana *in situ* lo más específica y sensible posible, de bajo coste, alta estabilidad, fáciles de usar y miniaturizables.

El Área de Defensa Biológica del Departamento de Sistemas de Defensa NBQ de la Subdirección General de Sistemas Terrestres del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial «Esteban Terradas» (INTA) participa en distintas actividades de I+D+i para el desarrollo y optimización de métodos de detección temprana e identificación de agentes biológicos de interés en Defensa. Parte de esta actividad se engloba dentro de la participación en distintos proyectos, tanto europeos

(Programa Horizonte 2020, Proyectos de la Agencia Europea de Defensa) como nacionales (Plan Estatal).

En el marco de los proyectos del Plan Estatal, financiados por MINECO/FEDER, uno de los más recientes en los que ha tomado parte el Área de Defensa Biológica, en colaboración con la empresa Tecnalia y el Centro de Tecnología Nanofotónica de la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido el proyecto coordinado OPTONANONSENS (TEC2015-63838-C3-2-R). El objetivo de este proyecto es el desarrollo de un dispositivo de detección de toxinas y agentes patógenos basado en un biosensor óptico nanométrico en el que se utilizan, como soporte para la inmovilización de anticuerpos, nanofibras de nylon con 5% de piridina.

Un biosensor es un dispositivo analítico que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas, permitiendo su cuantificación. En función de la naturaleza del proceso biológico, los biosensores pueden ser de distintos tipos. Los inmunobiosensores, basados en reacciones inmunológicas (unión específica antígeno-anticuerpo), constituyen una buena alternativa para su uso en dispositivos de detección, ya que esta unión es sensible, rápida y altamente específica [4, 5]. En estos biosensores el umbral de detección viene dado por el sistema de sensado acoplado al biosensor, mientras que la especificidad es fruto de la unión

Tecnologías emergentes

antígeno-anticuerpo [6]. Los inmunobiosensores son utilizados en diversos campos, como control ambiental, diagnóstico clínico, industria alimentaria, seguridad y defensa [7, 8, 9].

El uso de soportes nanoestructurados fabricados mediante *electrospinning* o electrohilado (estiramiento coaxial de una solución polimérica sometida a altos campos eléctricos) está en expansión debido a las diferentes propiedades que presentan, como una gran relación superficie/volumen, elevada porosidad, tamaño de poro regulable y la capacidad de dotarlos de funcionalidades. La funcionalización o biofuncionalización es un procedimiento que permite crear una unión estable entre la superficie de un material y diversos elementos bioactivos como, por ejemplo, anticuerpos [10, 11].

Objetivos

El objetivo de este trabajo es demostrar la mayor capacidad de unión de antígeno (inmuncaptura) que proporciona el soporte nanoestructurado funcionalizado con anticuerpos, por su mayor relación superficie/volumen (Fig. 1), respecto a una superficie planar, determinando la máxima sensibilidad que se puede alcanzar en el dispositivo final de sensado.

Metodología

Para ello se ha realizado un estudio con concentraciones crecientes de antígeno (simulante de toxinas proteicas, agentes de guerra biológica) en nanofibras fabricadas con diferente tiempo de electrohilado y en superficies planares de composición química similar, ambas biofuncionalizadas (Fig. 2). Las nanofibras fueron fabricadas por Tecnalia mediante la técnica de *electrospinning* con diferentes tiempos de electrohilado (10, 20 y 40 minutos) y una composición de 6 % de poliamina y 5% de piridina. La superficie planar ensayada fue la membrana Zprobe, proporcionada por Bio-Rad Laboratories, S.A.

En el sistema de inmuncaptura se emplean anticuerpos, unidos a un soporte, lo que permite la unión del antígeno a valorar. Los anticuerpos más utilizados en diagnóstico son los anticuerpos de tipo IgG. Estos anticuerpos presentan una región variable (Fab) que se une específicamente a determinadas regiones del antígeno (denominadas epítipo).

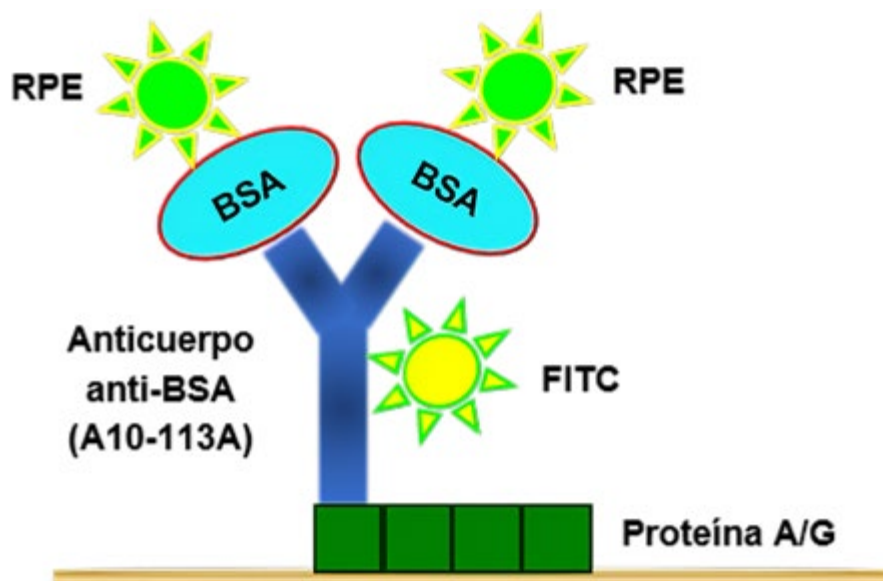


Figura 3. Esquema del sistema de inmuncaptura. (Fuente: propia).

También presenta una región constante (Fc) que es común a los anticuerpos dentro de una misma especie. Basándonos en estudios previos de los autores [4], el método utilizado para inmovilizar el anticuerpo en las superficies ensayadas (biofuncionalización) fue la inmovilización a través de proteína mediadora A/G. La proteína mediadora permite una buena orientación de la región de unión al antígeno (Fab), al unirse a la región Fc del anticuerpo, facilitando así la interacción antígeno-anticuerpo. En el sistema de inmuncaptura desarrollado en este trabajo se utilizó como antígeno un simulante de toxina proteica (por ejemplo, ricina), la albúmina de suero bovino (BSA). El anticuerpo utilizado fue un anticuerpo policlonal de oveja anti-BSA (Fig. 3).

Con el objeto de monitorizar el proceso de inmuncaptura de un modo directo, tanto el antígeno (BSA) como el anticuerpo (anti-BSA) utilizados se marcaron con diferentes moléculas que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda después de ser excitadas con luz (fluoróforos). El antígeno (BSA) fue marcado con ficoeritrina (RPE), que emite a una longitud de onda de 576 nm, y el anticuerpo con fluoresceína (FITC), que emite a una longitud de onda de 521 nm. De esta forma, se puede cuantificar la densidad de anticuerpo inmovilizado y de antígeno (BSA) inmuncapturado de manera independiente, además de obtener la eficiencia del sistema de inmuncaptura, es decir, el cociente entre la cantidad de

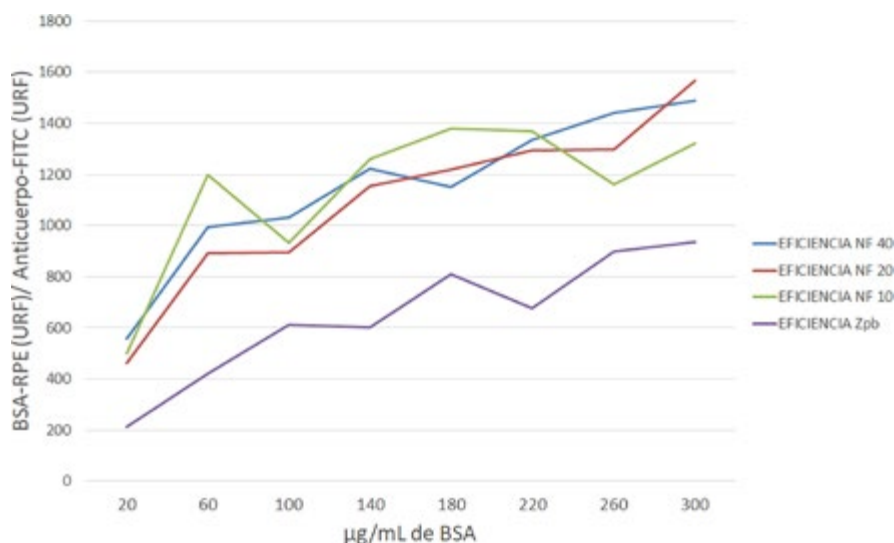


Figura 4. Eficiencia del sistema de inmuncaptura. (Fuente: propia).

antígeno capturado y la cantidad de anticuerpo inmovilizado en cada una de las superficies ensayadas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un *One-Way ANOVA* y *post-test Tukey* con el programa *GraphPad Prism*.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos muestran que el soporte nanoestructurado (NF) presenta mayor eficiencia de inmunocaptura que la superficie planar ensayada (membrana Zprobe) (Fig. 4). Esto concuerda con el hecho de que las nanofibras presentan una mayor relación superficie/volumen y porosidad.

La sensibilidad máxima alcanzada en el sistema de inmunocaptura utilizando superficies nanoestructuradas (NF) fue de 0,625 µg/mL de antígeno BSA-RPE (Fig 5).

El tiempo de electrohilado en la fabricación de nanofibras no es relevante respecto a la eficiencia y la sensibilidad del sistema de inmunocaptura, ya que no se observan diferencias significativas cuando se utilizan nanofibras fabricadas con tiempos de deposición de 10, 20 o 40 minutos

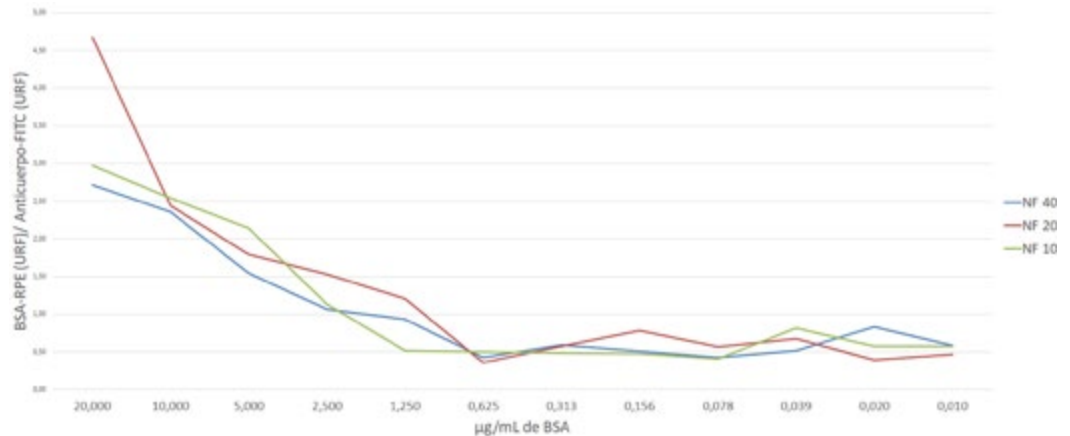


Figura 5. Sensibilidad del sistema de inmunocaptura. (Fuente: propia).

como superficie de inmovilización de los anticuerpos.

Conclusiones

Los datos obtenidos demuestran que el uso de las nanofibras como soporte para la inmovilización de anticuerpos confiere una mayor sensibilidad al dispositivo final, ya que es capaz de inmunocapturar mayor cantidad de antígeno frente al uso de superficies planares comerciales.

Aplicaciones futuras

La incorporación de soportes nanoestructurados en dispositivos de detección de agentes biológicos supone un incremento en la sensibilidad de estos sistemas. Este soporte, en

combinación con el sensado nanofotónico, ofrece una alternativa a los dispositivos disponibles en el mercado debido a su rápida respuesta, fácil manejo y bajo coste. El uso de este tipo de dispositivos por los equipos de primera intervención del Ejército y las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado supondría una mejora en cuanto a la respuesta frente a un incidente NBQ, facilitando una actuación precoz que permita mitigar la amenaza.

Agradecimientos

Los trabajos recogidos en este artículo están incluidos en el proyecto coordinado OPTONANOSENS TEC2015-63838-C3-2-R financiado con fondos MINECO/FEDER.

Referencias

- [1] Thavaselvam D, Vijayaraghavan R. *Biological warfare agents. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2010;2(3):179-188.
- [2] Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP. *The Economic Impact of a Bio-terrorist Attack: Are Prevention and Postattack Intervention Programs Justifiable? Emerging Infectious Diseases*. 1997;3(2):83-94.
- [3] Texto de la Convención para la prohibición del desarrollo, la producción y el almacenamiento de armas bacteriológicas (biológicas) y tóxicas y sobre su destrucción (CABT) <http://www.unog.or>.
- [4] Peraile I, Gil M, Guamán CE, González L, Cabria JC, Lorenzo P. Optimización del proceso de inmovilización de anticuerpos en inmunobiosensores. *Sanidad Militar (ISSN 1887-8571)*. 2018; 74(3): 151-156.
- [5] Petrakova AV, Urusov AE, Gubaydullina MK, Bartosh AV, Zherdev AV, Dzantiev BB. "External" antibodies as the simplest tool for sensitive immunochromatographic tests. *Talanta*. 2017 Dec 1;(175):77-81.
- [6] Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. *Antibodies and antibody-derived analytical biosensors*. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):9-18.
- [7] Cruz HJ, Rosa CC, Oliva GC. *Immunosensors for diagnostic applications*. *Parasitol Res*. 2002; 88(13 Suppl 1): S4-7.
- [8] Koch S, Wolf H, Danapel C, Feller KA. *Optical flow-cell multichannel immunobiosensor for the detection of biological warfare agents*. *Biosens Bioelectron*. 2000;14(10-11):779-784.
- [9] Matatagui D, Fontecha JL, Fernández MJ, Gràcia I, Cané C, José Pedro Santos JP, Horrillo MC. *Love-Wave Sensors Combined with Microfluidics for Fast Detection of Biological Warfare Agents*. *Sensors*. 2014;14:12658-12669.
- [10] Mohammadzadehmoghadam S, Dong Y, Barbhuiya S, Guo L, Liu D, Umer R, Qi X, Tang Y. *Electrospinning: Current Status and Future Trends. Nano-size Polymers: Preparation, Properties, Applications*. Springer; 2016.
- [11] Peraile I, Lorenzo P, Muriello N, Maudes J, Rozas G, Pérez A, González L, Cabria JC, Gil M. *Biofunctionalization of nylon nanofibers to be used in immunobiosensor for biological warfare agents detecting*. In *Global progress in applied microbiology: a multidisciplinary approach*. Méndez-Vilas, A., 2018.