

CAPACIDAD DE LA TECNOLOGÍA DE DISCO COMPACTO COMO HERRAMIENTA DE BAJO COSTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES TROPICALES

LTHI. Investigación y Compromiso Social

Ángel Maquieira Catalá, Diana Tamayo Correa, Luis Antonio Tortajada-Genaro, Sergi Morais Ezquerro, Rosa Puchades Pla

(1) Referencias autores: Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Departamento de Química. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46020 Valencia. luitorge@upv.es

RESUMEN

El correcto diagnóstico de las enfermedades infecciosas tropicales permite dar los tratamientos adecuados en tiempos mínimos, evitar la transmisión de la enfermedad, reducir los costes sanitarios y mejorar las condiciones de vida del enfermo. En fase temprana, los síntomas son generalmente poco específicos, y no pueden distinguirse de otras infecciones excepto con pruebas bioquímicas de laboratorio mediante la detección de biomarcadores específicos. Sin embargo, la implementación de este tipo de pruebas es muy baja en los países en desarrollo, principalmente por razones económicas, por lo que disponer de medios efectivos de diagnóstico clínico es de gran importancia.

La presente comunicación describe los avances realizados por nuestro grupo de investigación en el desarrollo de herramientas de diagnóstico de bajo coste. Se ha puesto a punto una metodología basada en la tecnología de disco compacto, cuyas características (portabilidad, gran capacidad de trabajo, reducido consumo de reactivos y suministro eléctrico, mantenimiento mínimo e implementación sencilla) permiten su aplicación efectiva en países en vías de desarrollo. El objetivo final de esta investigación es disponer de un ensayo multianalito para determinar simultáneamente en suero sanguíneo humano la infección por malaria, dengue y/o HIV, con capacidad para analizar 50 muestras en tiempos inferiores a una hora.

Palabras clave: enfermedades tropicales, diagnóstico de bajo coste, discos compactos

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS TROPICALES

Las **enfermedades infecciosas tropicales** son una muy seria amenaza para decenas de millones de personas y su incidencia se ve incrementada año a año. Alrededor de 1 millón de habitantes de las regiones tropicales mueren anualmente de malaria, 4,3 millones de infecciones respiratorias agudas, 2,9 millones por infecciones entéricas, y 5 millones a causa del SIDA y la tuberculosis. Otras enfermedades parasitarias y de transmisión sexual también son una amenaza para cientos de miles de individuos. En la Tabla 1 se recogen los síntomas, periodos de incubación (<10 días a un mes) y etiología de las principales enfermedades infecciosas.

Más del 95% de la mortalidad causada por enfermedades infecciosas se produce en países pobres y en desarrollo, ubicados en regiones tropicales y subtropicales. Uno de los problemas sanitarios más serios en los países endémicos es la transfusión de sangre contaminada, ya que carecen de sistemas exhaustivos de control de las donaciones y el tamizado de donantes no incluye la monitorización de los principales agentes infecciosos. Así, por ejemplo, en el Congo, no se efectúa habitualmente la prueba del SIDA en transfusiones de sangre porque se asume que la mayoría de la población es portadora de tal enfermedad.

Tabla 1.- Características de las principales enfermedades infecciosas tropicales

Enfermedad	Síntomas	Período de incubación	Etiología
Influenza	Resfriado, dolor de garganta, dolores musculares y articulares, cefalea, tos	<10 días	Viral. Virus de influenza
Fiebre amarilla	Fiebre elevada, escalofríos, cefalea, ictericia	<10 días	Viral. Virus de fiebre amarilla
Malaria	Fiebre y escalofríos cíclicos, sudoración, cefalea	>9 días	Protozoo parásito. <i>Plasmodium falciparum, malariae, vivax u ovale</i>
Hepatitis A y B	Fiebre, dolor en el costado derecho del abdomen, ictericia, orina oscura	>21 días	Viral. Virus de hepatitis A y B
Fiebre tifoidea	Fiebre, cefalea, diarrea	1 – 2 semanas	Bacteriana. <i>Salmonella typhi</i>
Rickettsiosis	Fiebre, cefalea, mialgia, somnolencia, delirio	1 – 2 semanas	Bacteriana. <i>Rickettsia</i>
Dengue	Fiebre, cefalea, dolor intenso en las articulaciones y músculos	<10 días	Viral. <i>Virus del dengue</i>
Borreliosis de Lyme	Fiebre, dolores musculares y articulares	3 – 32 días	Bacteriana. <i>Borrelia burgdorferi</i>
Leishmaniasis	Inflamación de hígado y bazo, distensión abdominal	>21 días	Protozoo. <i>Leishmania</i>

Las **pruebas de diagnóstico** tienen poco o ningún impacto en enfermedades que son fáciles de reconocer por sus síntomas clínicos (Mabey *et al.*, 2004). Por el contrario, estas pruebas son necesarias para enfermedades asintomáticas, aquellas con síntomas engañosos o requieren tratamientos diferentes, o aquellas que, por su tratamiento complejo o costoso, requirieran confirmación. Incluso para enfermedades fácilmente reconocibles, deben mantenerse estrategias de monitorización y de toma de medidas de control que eviten el riesgo de grandes epidemias. Por otro lado, la vigilancia de las enfermedades permite a los administradores de programas de salud monitorizar la efectividad de las estrategias de intervención e identificar qué poblaciones requieren intervenciones continuas.

Las nuevas herramientas de diagnóstico se han beneficiado del descubrimiento de **biomarcadores** junto a una mejor comprensión de los factores de virulencia de patógenos y los avances en las tecnologías de detección. La utilización de esta capacidad técnica en los países en desarrollo es un gran reto para el sector público, dada la falta de atractivos comerciales para las empresas.

Muchos de los **programas de control de enfermedades**, incluidos los de malaria y tuberculosis, se ven amenazados por el aumento de la resistencia farmacológica a los agentes patógenos y vectores, con el consiguiente incremento en complejidad, efectividad y coste de los tratamientos. En ausencia de tratamientos específicos y profilaxis, para muchas de estas enfermedades el diagnóstico es de vital importancia. Sin embargo, en fase temprana, los síntomas de las enfermedades infecciosas tropicales no son, por lo general, específicos, no pudiendo distinguirse clínicamente de otras infecciones más comunes, por lo que requieren de confirmación. Para muchas enfermedades como la malaria, el diagnóstico clínico se ve obstaculizado por los síntomas clínicos indiferenciados o la co-infección. La importancia del diagnóstico diferencial es aún mayor en los casos en que por lo menos una de las infecciones sintomáticas requiere tratamiento específico y no hay vacunas.

Para muchas enfermedades tropicales, las mejores herramientas de diagnóstico disponibles en la actualidad requieren personal de laboratorio entrenado, equipos sofisticados y especializados. Así pues, se hace necesario simplificar las pruebas para el diagnóstico de la mayoría de estas enfermedades, especialmente para su aplicación en escuelas de enseñanza primaria y centros de salud, con el fin de reducir errores, facilitando y agilizando la práctica sanitaria.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los **métodos clásicos de diagnóstico** de laboratorio, como el aislamiento de microorganismos infecciosos son los más utilizados por los servicios médicos (*Rodrigues et al., 2006*). El examen microscópico es la metodología de referencia para la confirmación del diagnóstico de enfermedades infecciosas tropicales, a pesar de no ser el más recomendable como primera opción en situaciones endémicas. Además, el aislamiento y la clasificación del agente etiológico requiere generalmente entre uno y tres días, la utilización de equipos como microscopios, conocimientos técnicos y mano de obra especializada. Las técnicas serológicas son más simples que el aislamiento y la detección del patógeno, pero generalmente también requieren varios días hasta que se produce en el paciente una concentración (título) de anticuerpo detectable. La serología es capaz de dar información directa e interpretable, incluso después de la primera exposición al patógeno. Sin embargo, en la práctica la serología es menos selectiva que el diagnóstico por cultivo.

Los **ensayos inmunológicos**, especialmente los ensayos por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), son actualmente los más empleados en el diagnóstico de enfermedades tropicales, siendo generalmente usados como ensayos de barrido o *screening*, de modo que sólo las muestras positivas son confirmadas por métodos de referencia. Estos ensayos, comercializados en diferentes formatos (placa, tira reactiva, etc.), son muy interesantes para su uso en zonas tropicales subdesarrolladas, ya que son fiables, requieren mínimo tratamiento de muestra y alcanzan buena sensibilidad. Sin embargo, son caros (entre 1 y 5 € determinación), suelen ser unialito y no dan información cuantitativa.

Los ensayos que utilizan la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** y otros relacionados se basan en la hibridación de ácidos nucleicos, y sólo requieren electroforesis del producto amplificado, mientras que la hibridación convencional requiere marcaje, purificación y normalización de las sondas. A pesar de su buena sensibilidad, los métodos basados en PCR son generalmente complejos, requieren mano de obra experta, equipos voluminosos para uso en campo, y el almacenamiento de las muestras a temperaturas muy bajas, lo que es impracticable en muchas regiones subdesarrolladas.

Los **microchips**, también llamados microarrays o biochips, son dispositivos que permiten monitorizar miles de biointeracciones (ácidos nucleicos, anticuerpos, etc.) utilizando cantidades mínimas de reactivos y muestra. La enorme cantidad de información genética obtenida de la secuenciación del genoma humano y los avances en proteómica, ha permitido desarrollar estas metodologías de diagnóstico molecular de fabricación en masa a bajo precio, miniaturizadas y con gran capacidad de trabajo. Sin embargo, su utilidad es aun limitada en los escenarios de actuación descritos, al requerir una instrumentación sofisticada y cara para lectura de resultados (detectores: precio entre 40.000 y 80.000 €). Además, el tratamiento de muestra es complejo y el tiempo de ensayo prolongado.

Por ello, muchas de las tecnologías descritas están todavía demasiado lejos de ser válidas como herramientas de ensayo tipo *point of care*, es decir, próxima al paciente. Las técnicas disponibles a menudo no alcanzan los requisitos básicos para un diagnóstico adecuado en países tropicales, principalmente: sencillez, costo, rapidez y exactitud. Es por ello, que el desarrollo de métodos o dispositivos que cumplan estas necesidades es un campo con una gran actividad investigadora.

Los **biosensores** son una alternativa con elevadas posibilidades en esta área. Son instrumentos que permiten la medición de parámetros biológicos o químicos combinando un componente de naturaleza biológica y otro físico-químico. El elemento biológico puede ser un tejido, un cultivo de microorganismos, enzimas, anticuerpos, cadenas de ácidos nucleicos, etc. que reconocen el analito bajo estudio. El transductor convierte la señal generada por el bioreconocimiento en una respuesta medible por el detector (óptico, eléctrico, térmico,

magnético, etc.). A diferencia de los bioensayos y sistemas convencionales, los biosensores no requieren procesamiento adicional (adición de reactivo, por ejemplo), y se caracterizan por ser selectivos, sensibles, rápidos, portátiles, fáciles de operar, baratos y proporcionan, en general, una respuesta cuantitativa.

Entre las diferentes presentaciones de los biosensores, los **dispositivos tipo lab-on-a-chip**, esencialmente una adaptación de microchips con canales y cámaras microfluídicos para desarrollar los ensayos, son una opción consolidada y muy efectiva. En una sola plataforma, estos dispositivos integran módulos de procesamiento de muestra, separación y detección. Al ser de un solo uso presenta ventajas adicionales, especialmente cuando se trata con agentes infecciosos, ya que no sólo elimina el riesgo biológico, sino que también evita la necesidad de lavado en la preparación de muestra, una grave carga en muchas regiones tropicales sin suministro de agua potable. Otras ventajas incluyen una menor contaminación, un bajo coste, así como rapidez y la posibilidad de automatización.

Por otro lado, una de las características más importantes de los **ensayos rápidos de diagnóstico** es la capacidad de proporcionar resultados en tiempos inferiores a 30 minutos, lo que es esencial para evitar retrasos en el inicio del tratamiento, reduciendo la mortalidad y costes de hospitalización. Un retraso en el diagnóstico puede también incrementar la virulencia de los patógenos, la aparición de síntomas más graves y complicaciones y el uso indebido de fármacos, con el riesgo de adquirir resistencia a medicamentos o respuestas alérgicas que esto conlleva.

Como resumen de lo expuesto, se puede decir que existen diferentes estrategias de diagnóstico de enfermedades tropicales (Tabla 2). Una aproximación es utilizar técnicas sólo aplicables en laboratorios bien dotados y con personal especializado, implicando una centralización de los análisis, lo que limita la actuación clínica. La otra estrategia se basa en aplicar métodos rápidos que permiten ensayos de campo, siendo cada vez más utilizada como demuestra la evolución anual descrita por los informes de la WHO (*WHO, 2006; WHO, 2011*). Pero en ocasiones estos métodos no se ajustan totalmente a las necesidades de cada entorno o son costosos para utilizar masivamente, ya que los precios de los kits son inasequibles para su uso rutinario. Por ejemplo, la detección de malaria en sangre oscila entre 1 y 5€, cantidades muy por encima de lo que una familia dispone para alimentarse y sobrevivir diariamente. Por tanto, se requiere de sistemas de ensayo fiables, robustos, económicos, de fácil manejo y disponibilidad, bajo mantenimiento y con gran capacidad de trabajo.

Tabla 2.- Clasificación de las metodologías de diagnóstico

	Métodos de confirmación	Métodos rápidos
Uso	Laboratorio	Campo
Metodologías	Recuento celular/ Microscopia Electroforesis Microarray (biochips)/Fluorescencia PCR Cuantitativa Espectrometría de masas	Tiras reactivas Lab-on-a-chip Biosensores

BIOMARCADORES

La selección de las enfermedades prioritarias debe basarse en su importancia, puesto que los resultados alcanzados en la mejora de su diagnóstico contribuirán a conseguir algunos de los objetivos recogidos en la **Declaración del Milenio**. Se trata de una iniciativa de la ONU que recoge ocho objetivos o propósitos de desarrollo humano. Concretamente, se centra en la consecución del objetivo número 6 e indirectamente, los objetivos 4, 5 y 8. El objetivo 6 está dirigido a combatir enfermedades con gran repercusión en la salud mundial. Los objetivos 4 y 5 están enfocados a reducir la mortalidad infantil y mejorar la salud materna. Las enfermedades seleccionadas deben permitir la protección de estos sectores de la población, especialmente vulnerables. El objetivo 8 es fomentar una asociación mundial para el desarrollo, atendiendo a las necesidades especiales de los países menos adelantados. Alcanzar los objetivos de mejora de las herramientas de diagnóstico significa disponer de una tecnología adaptable a las condiciones de países receptores que disponen de recursos materiales y humanos muy limitados.

Una vez seleccionadas las enfermedades prioritarias, deben estudiarse qué moléculas son las más adecuadas para utilizarse como **biomarcadores** que indiquen la presencia o ausencia de la enfermedad. La sensibilidad a alcanzar dependerá de diferentes propiedades: nivel de concentración en los pacientes, estabilidad, etc. La Tabla 3 muestra los métodos desarrollados y las moléculas objetivo que se utilizan para el diagnóstico diferencial de enfermedades infecciosas tropicales. Los métodos de referencia son, principalmente, exámenes microscópicos (*WHO, 2006; Chappuis et al., 2007*) y pruebas serológicas (*WHO, 1997; WHO, 2004; CPHLN, 2007; Blanco et al. 2008; Domingo et al., 2011; Keddy et al., 2011; WHO, 2011*).

En conclusión, los métodos de diagnóstico a desarrollar deben permitir la detección y cuantificación de los biomarcadores típicos de cada cuadro clínico con elevadas prestaciones analíticas (exactitud, precisión), siendo una alternativa ventajosa frente a los métodos actualmente disponibles, basados generalmente en técnicas de microscopía óptica o ensayos serológicos.

Tabla 3.- Métodos y moléculas diana para el diagnóstico de enfermedades infecciosas tropicales

Enfermedad	Agente etiológico	Métodos	Moléculas dianas
Malaria	Protozoo parásito <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>malariae</i> , <i>vivax</i> u <i>ovale</i>	Examen microscópico (gota gruesa) , Test de diagnóstico rápido	<i>HRP2</i> para <i>p. falciparum</i> / Lactato deshidrogenasa y aldolasa para todas las especies
Dengue	Virus del dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4)	Serología (detección de antígenos y anticuerpos anti-dengue) , Cultivo viral	Anticuerpos / Proteína NS1, proteína de envoltura (E)
Leishmaniasis	Protozoo <i>Leishmania</i>	Examen microscópico (observación del amastigote) , serológico (anticuerpos), prueba de montenegro	Anticuerpos
Fiebre amarilla	Viral. Virus de fiebre amarilla	Serología (test de neutralización) aislamiento del virus	Anticuerpos IgM (en ausencia de vacunación) Anticuerpos IgG en personas vacunadas
Fiebre tifoidea	Bacteriana <i>Salmonella typhi</i>	Serología (aglutinación, Test Widal) , Aislamiento de la bacteria de la médula ósea	Anticuerpos contra los antígenos H (flagelar) u O (somático) de la <i>Salmonella typhi</i>
Rickettsiosis	Bacteriana <i>Rickettsia</i>	Serología (inmunofluorescencia indirecta, ELISA)	Anticuerpos tipo IgM ó IgG (proteína externa fuertemente metilada B, OmpB)
Borreliosis de Lyme	Bacteriana <i>Borrelia burgdorferi</i>	Serología , Western blot (confirmatorio)	Anticuerpos tipo IgM
Influenza	Viral Virus de influenza	Aislamiento del virus en cultivo , inhibición de la hemaglutinación, RT-PCR	Proteína hemaglutinina

TECNOLOGÍA DE DISCOS COMPACTOS

La tecnología de **discos compactos** (CD's) se desarrolló en 1979 como sistema de almacenamiento de información digital. Los lectores de CDs están en cualquier lugar, habiendo actualmente en uso más de 600 millones de unidades, lo que nos da una idea de su ubicuidad. El precio de un disco es de aproximadamente 0,3 € y el de un reproductor oscila entre 25 € para el tipo disc-man y entre 100 y 300 € para un lector de DVD. Por lo tanto, se trata de una tecnología robusta, de bajo coste, diseñada y construida para ser manejada en diferentes condiciones ambientales.

El potencial de esta tecnología para el análisis de muestras biológicas y químicas se está demostrando desde principios de siglo XXI. Los CD's como **plataformas analíticas** presentan gran resistencia a los impactos, reactivos y temperatura, buenas propiedades ópticas, baja autofluorescencia, están disponibles a precios bajos y la eficiencia en el anclaje de biomoléculas es elevada.

Nuestro grupo de investigación viene desarrollando **sistemas de biosensado** basados en la tecnología de disco compacto utilizando formatos de ensayos similares a las de referencia (ensayo ELISA en placa, microarray) (Figura 1). Para ello, los elementos de bioconocimiento se inmovilizan sobre la superficie de discos comerciales y el resultado del ensayo es leído mediante un reproductor comercial de CD, DVD o Blu-ray.

La cantidad de reactivos utilizada en los métodos basados en CD's es, respecto a los métodos de referencia, muy baja, aproximadamente 2% de reactivo de recubrimiento o tapizado, un 0,05% de anticuerpo específico y, en los formatos que lo requieren, un 2,6% de la especie reveladora de la interacción molecular. La cantidad de muestra es también reducida, requiriendo, en el caso de suero sanguíneo, de 5 a 20 μL . En cuanto a capacidad de trabajo, la gran superficie analíticamente disponible del disco, permite determinar simultáneamente varias decenas de analitos y/o pacientes distintos, incluyendo además controles y patrones de calibración. Los tiempos de ensayo están entre 30 y 60 minutos.

La metodología ha permitido poner a punto ensayos multianalito para cuantificación de residuos de plaguicidas y fármacos (Morais *et al.*, 2009), alérgenos en alimentos (Tortajada-Genaro *et al.*, 2012), toxinas presentes en aguas de consumo (Morais *et al.*, 2010), bacterias (Arandis-Chover *et al.*, 2012) y virus (Bañuls *et al.*, 2012), utilizando formatos de microarray y técnicas de biología molecular.

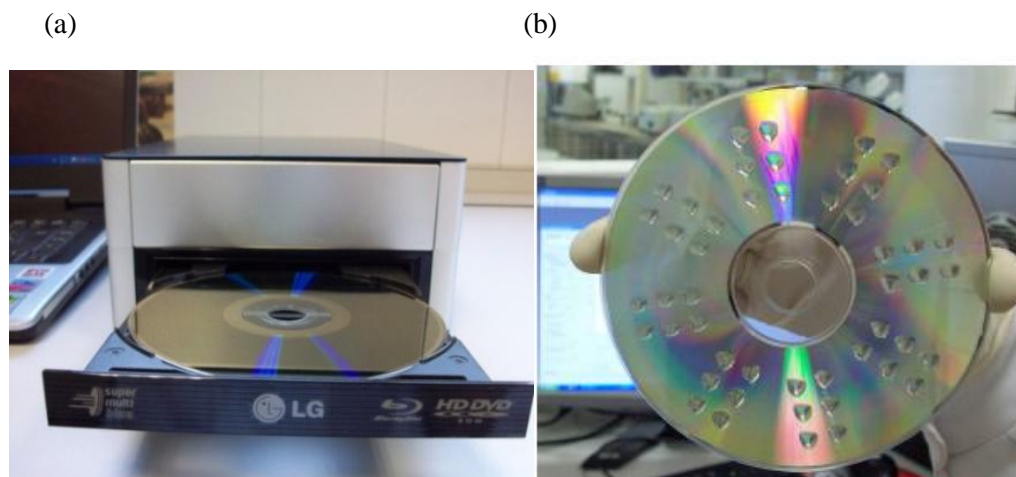


Figura 1.- (a) Prototipo de lector de discos compactos. (b) Imagen de un DVD durante el ensayo de 48 muestras.

PRUEBA DE CONCEPTO

El grupo de investigación está poniendo a punto sistemas de diagnóstico para influenza, malaria y dengue, utilizando la tecnología de discos compacto como herramienta de análisis: disco como plataforma y lector de CD's como detector. La Figura 2 muestra un esquema de los formatos de ensayo propuestos para la detección de malaria (a) y dengue (b). Los ensayos se basan en inmovilizar sobre la superficie de policarbonato de discos compactos tipo DVD, anticuerpos específicos para la proteína HRP2 (*histidine rich protein 2*), como antígeno diana, en el caso del ensayo para detectar malaria, y la proteína de la cápside del virus (proteína E) para la detección del virus de dengue. Los ensayos se realizan en formato microarray, depositando sobre los discos 36 matrices de 4x4 puntos (25 nL/punto). En una segunda etapa se deposita la muestra de suero, que puede contener la proteína HRP2 si el paciente está infectado con malaria, o anticuerpos anti-dengue del tipo IgM ó IgG si ha sido infectado con dengue. Las interacciones son detectadas con anticuerpos específicos marcados con peroxidasa (HRP). Finalmente, el revelado se logra por la adición de un sustrato enzimático (tetrametil bencidina, TMB) que produce un precipitado insoluble. Este producto modifica las propiedades ópticas del disco, obteniéndose un gradiente de señal proporcional a la concentración de analito.

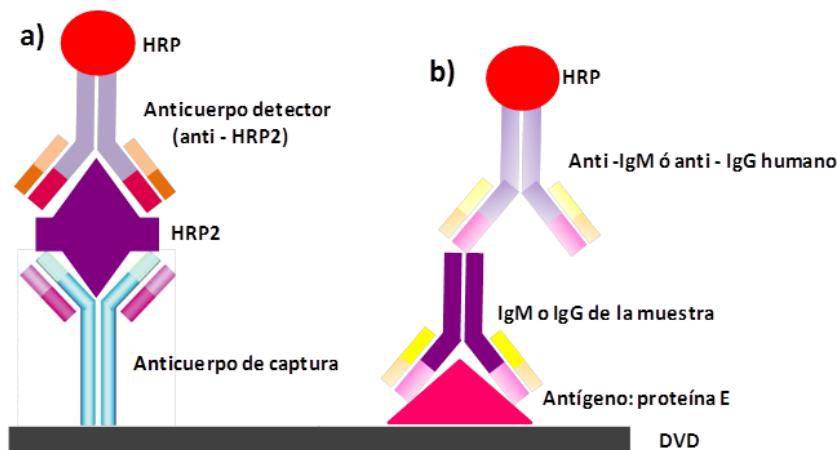


Figura 2.- Formatos de inmunoensayo para la detección de malaria (a) y dengue (b)

Como ejemplo de los resultados obtenidos, en la Figura 3 se muestra la recta de calibrado media para la detección de malaria ($n = 5$). Como puede observarse, la relación entre concentración de proteína HRP2 y la respuesta obtenida (SNR) es lineal en el intervalo 0 - 1000 $\mu\text{g/L}$ (coeficiente de correlación, $R^2 = 0,9963$). Los límites de detección y de cuantificación alcanzados son de 17,6 $\mu\text{g/L}$ y 75,7 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, con un tiempo total de ensayo de 38 minutos.

Según el informe de la *World Health Organization, WHO*, los límites de detección recomendados para un test de diagnóstico rápido para malaria oscilan entre 100 - 5000 parásitos/ μL (*WHO, 2003*). Un nivel de parasitemia de 200 parásitos/ μL equivale a niveles de HRP2 entre 1,6 y 52,7 $\mu\text{g/L}$ (*Pava et al., 2010*). Por lo tanto, la sensibilidad del ensayo puesto a punto cumple con este requerimiento, pudiendo ser utilizado como método de diagnóstico. La tecnología de CD's proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre esta enfermedad infecciosa de un modo sencillo, permitiendo al personal clínico ajustar los tratamientos de forma más eficaz que la prueba basada en el examen microscópico.

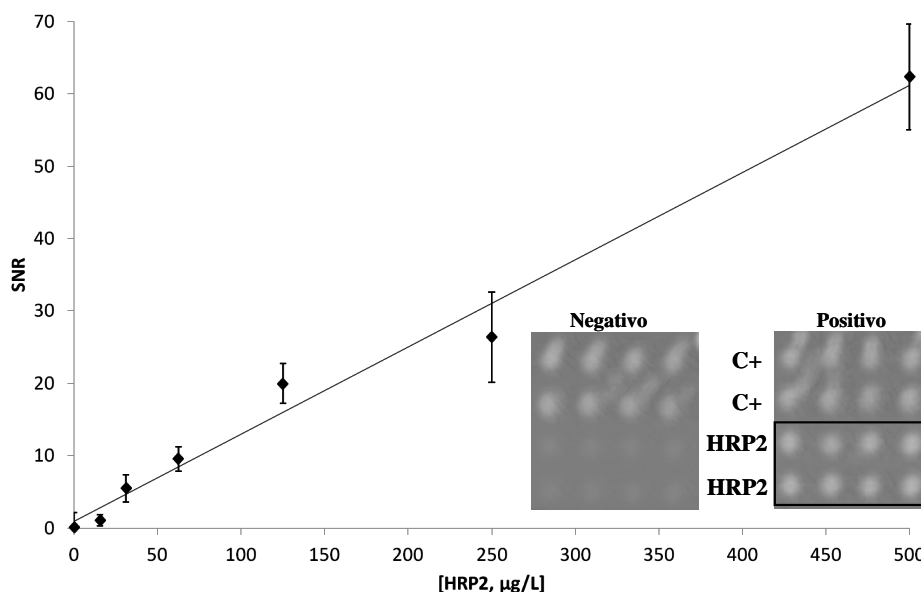


Figura 3.- Recta de calibrado para la determinación de HRP2 basada en la tecnología de discos compactos. El inserto recoge las imágenes generadas en un ensayo de una muestra negativa y una muestra positiva. C+: control positivo, HRP2: Resultado del ensayo para HRP2

APLICACIÓN EN ACTIVIDADES DE COOPERACIÓN Y DESARROLLO

La tecnología de discos compactos es una metodología de trabajo con elevadas prestaciones analíticas, que cumple los requisitos exigidos a sistemas tipo *point-of-care* (Figura 4). Hay que destacar que, sin perder las prestaciones analíticas - sensibilidad, exactitud y reproducibilidad -, permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas de un modo mucho más sencillo y en menor tiempo que muchas de las tecnologías utilizadas actualmente. Además, se puede aplicar por personal no cualificado, con un bajo coste de reactivos y mínimas necesidades logísticas. Su diseño es flexible, lo que permite incorporar más o menos analitos y/o muestras de pacientes en función de las necesidades.

La tecnología de discos compactos ha demostrado tener las propiedades requeridas para su uso en el diagnóstico de enfermedades tropicales en zonas con bajos recursos. No obstante, existen todavía retos a superar para su implantación en campo. Nuestro grupo de investigación tiene el objetivo de desarrollar los ensayos y mejorar sus prestaciones analíticas de modo que permitan medir los biomarcadores de este tipo de enfermedades de forma robusta y exacta, incluso en las condiciones menos favorables. Además, se estudiarán estrategias alternativas para contener los reactivos (por ejemplo viales desechables), formas de dispensación (por ejemplo, pipetas de volumen fijo) o contenedores para su transporte y conservación, que sean seguros aún en las condiciones de operación extremas.

Finalmente, se pretende conseguir información realista sobre el potencial de la tecnología en la consecución del objetivo. La ejecución de este estudio cuenta con el respaldo de las instituciones sanitarias y de ayuda-cooperación internacional siguientes:

- Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia (España) que posee una Unidad de Salud Internacional.
- Laboratorio Departamental de Salud Pública del Valle del Cauca. Cali. Colombia.
- Organización Navarra para Ayuda entre los Pueblos (ONAY), ONG que realiza actividades de colaboración internacional.
- Universidad Eduardo Mondlane (Maputo, Mozambique).

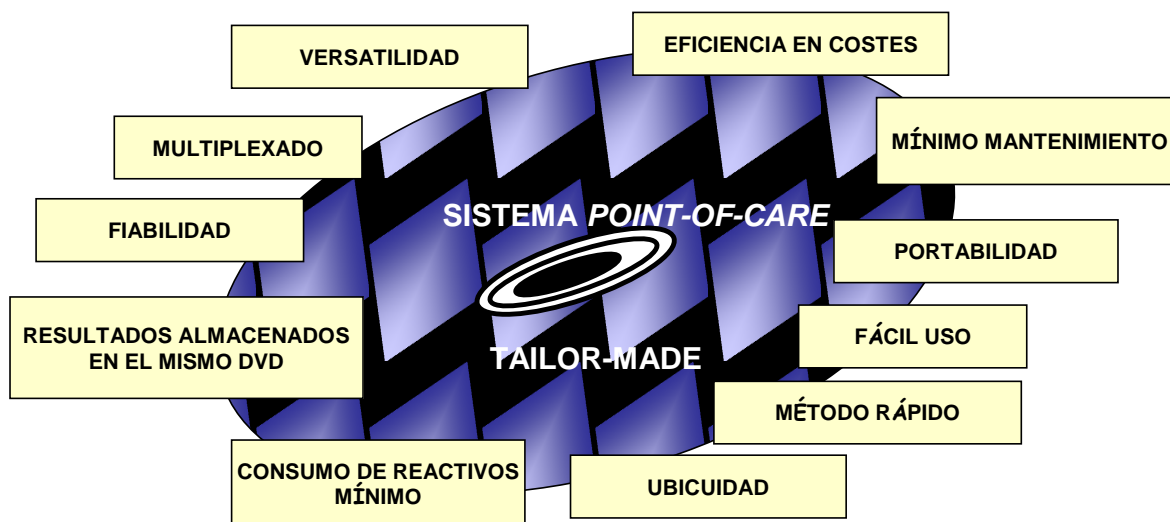


Figura 4.- Capacidad de la tecnología de discos compactos como sistema *point-of-care*

AGRADECIMIENTOS

D.F. Tamayo agradece a la Generalitat Valenciana la concesión de una beca Santiago Grisóla.

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (FEDER, MICINN CTQ2010-15943), a la Generalitat Valenciana (PROMETEO 2010/008 y ACOMP/2012/158) y a la UPV (Programa ADSIDEO Cooperación 2012) por la financiación de la investigación.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ÀREA DE COOPERACIÓ AL
DESENVOLUPAMENT

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Berganza, J.; Olabarria, G. (2012): Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on DVD disk. *Talanta*, 101: 405–412.
- Bañuls, M.J.; González-Pedro, M.V.; Puchades, R.; Maquieira, A. (2012): Influenza A virus infection diagnosis based on DVD reader technology. *Analytical Methods*, 4: 3133-3139.
- Blanco, J.R.; Jado, I.; Marín, M.; Sanfeliu, I.; Portillo, A.; Anda, P.; Pons, I. y Oteo, J.A (2008): Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: Anaplasma, Bartonella, Rickettsia, Tropheryma whipplei. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26(9): 573-80.
- Canadian Public Health Laboratory Network (2007). The laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Guidelines from the Canadian Public Health Laboratory Network. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 18 (2): 145 – 148.
- Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R.W.; Alvar, J. y Boelaert, M. (2007): Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5 (11): 873 – 882.
- Domingo, C.; Patel, P.; Linke, S.; Achazi, K.; y Niedrig, M. (2011): Molecular Diagnosis of Flaviviruses. *Future Virology*. 6 (9): 1059-1074.
- Keddy, K.H.; Sooka, A.; Letsoalo, M.E.; Hoyland, G.; Chaignat, C.L.; Morrissey, A.B. y Crump, J.A. (2011): Sensitivity and specificity of typhoid fever rapid antibody tests for laboratory diagnosis at two sub-Saharan African sites. *Bulletin World Health Organization*. 89: 640–647.
- Mabey, D., Peeling RW, Ustianowski A y Perkins MD (2004): Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 231–240.
- Morais, S.; Tortajada-Genaro, L.A; Arnandis-Chover, T.; Puchades, R.; Maquieira, A. (2009): Multiplexed micro-immunoassays on digital versatile disk (DVD). *Anal. Chem*. 81 (14): 5646–5654.
- Morais, S.; Tamarit López, J.; Puchades, R.; Maquieira, A. (2010): Determination of Microcystins in River Waters Using Microsensor Arrays on Disk. *Environ. Sci. Technol*. 44: 9024–9029.
- Pava, Z.; Echeverry, D.F.; Díaz, G.; Murillo, C. (2010): Short Report: Variation in Detection of Histidine-Rich Protein 2 in Plasmodium falciparum Isolates from Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 83: 834 – 837.

- Rodrigues Ribeiro Teles, F.S.; Pires de Távora Tavira, L.A. y Pina da Fonseca, L.J. (2010): Biosensors as rapid diagnostic tests for tropical diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 47(3): 139–169.
- Tortajada-Genaro, L.A.; Santiago-Felipe, S.; Morais, S.; Gabaldon, J. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. (2012) Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *J. Agric.Food Chem.* 60, 36–43.
- World Health Organization (1997): *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd edition. WHO, Geneva.
- World Health Organization (2003): *Malaria rapid diagnosis. Making it Work*. Meeting Report 20–23 January 2003. WHO, Geneva.
- World Health Organization (2006): *The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management*. Report of a WHO technical consultation, 25–26 October 2004. WHO, Geneva.
- World Health Organization. (2009): *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. WHO, Geneva.
- World Health Organization (2011): *Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. WHO, Geneva.