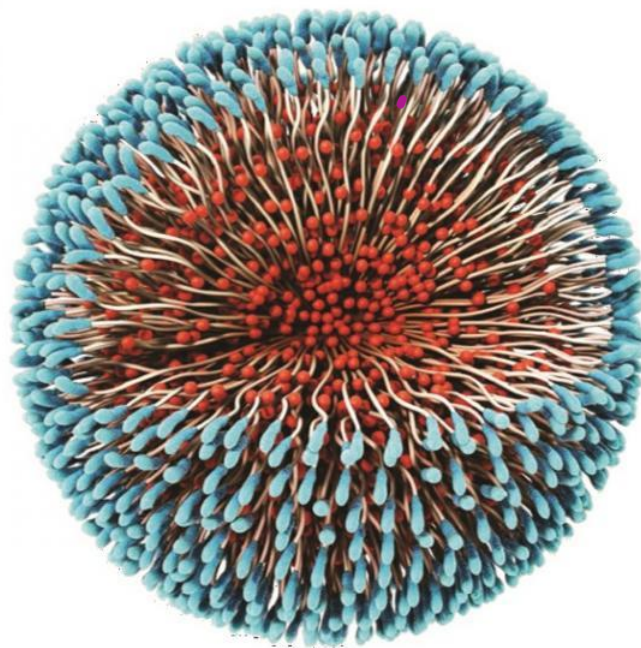


TRABAJO FIN DE GRADO

---

**Nanodiagnóstico: nuevas  
perspectivas en el diagnóstico de la  
leishmaniasis.**

---



Autor: Gabriel Mendoza Silva

Tutora: Emma Carmelo Pascual

Área de conocimiento: Parasitología

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**  
**GRADO EN FARMACIA.**  
Curso 2020-2021

ÍNDICE

**1. Resumen .....1**

**2. Abstract .....1**

**3. Introducción .....2**

**4. Objetivos .....5**

**5. Material y métodos .....5**

**6. Resultados .....5**

    6.1 Nanopartículas y métodos nanodiagnósticos.....5

        a) Métodos basados en ADN.....6

        b) Métodos basados en ARN.....12

        c) Métodos basados en proteínas.....13

        d) Métodos basados en ADN y proteínas.....17

    6.2 Aplicación de los nanodiagnóstico en la practica clínica.....20

**7. Discusión.....21**

**8. Conclusiones.....24**

**9. Bibliografía.....25**

## 1. Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad que causa un millón de nuevos casos al año, la mayoría de ellos asintomáticos. El diagnóstico precoz de esta enfermedad es esencial para poder controlar la enfermedad y evitar su propagación. Para ello, se usan los métodos convencionales. Sin embargo, estos métodos presentan una serie de limitaciones que son incompatibles con el objetivo de controlar la enfermedad. Por tanto, ante la necesidad de mejorar en el diagnóstico de la leishmaniasis ha surgido el diagnóstico basado en nanopartículas. Los métodos de nanodiagnóstico se presentan como un método revolucionario dispuesto a dejar atrás las limitaciones del diagnóstico convencional.

En este trabajo se recoge una revisión bibliográfica de los avances producidos en los nanodiagnósticos, cuáles son las nanopartículas utilizadas, que métodos se están desarrollando en la actualidad, en que consisten los diferentes métodos y cuáles de ellos se pueden aplicar en la práctica clínica. Para ello se han descrito una serie de criterios que debe cumplir un método de nanodiagnóstico para ser aplicado al diagnóstico de campo, en lugares donde el nivel de pobreza es extremo.

## 2. Abstract

Leishmaniasis is a disease that causes one million new cases per year, most of them asymptomatic. Early diagnosis of the disease is essential in order to control the disease and prevent its spread. Conventional methods are used for this purpose. However, these methods have a number of limitations that are incompatible with the objective of controlling the disease. Therefore, in response to the need to improve the diagnosis of leishmaniasis, nanoparticle-based diagnostics have emerged. Nanodiagnostic methods are presented as a revolutionary method ready to leave behind the limitations of conventional diagnosis.

This work includes a bibliographic review of the advances in nanodiagnosics, which nanoparticles are used, which methods are currently being developed, what the different methods consist of and which of them can be applied in clinical practice. To this end, a series of criteria have been described that a nanodiagnostic method must meet in order to be applied to field diagnostics in places where the level of poverty is extreme.

### 3. Introducción

El nanodiagnóstico es una técnica novedosa, que surge de la necesidad de obtener diagnósticos más sensibles, rápidos y económicos. Consiste en el uso de nanopartículas asociadas a una sonda que van a ser capaces de detectar cantidades muy pequeñas del parásito. Esto se consigue mediante la unión de la sonda a la molécula diana, generándose una señal detectable. Este método de diagnóstico surgió de la unión entre la nanomedicina y la nanotecnología, lo que ha permitido ir un paso más allá en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas [1,3].

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente a las áreas más pobres del planeta, donde las condiciones higiénico-sanitarias no son buenas para poder mantener una vida saludable. Está causada por parásitos protozoos y hay más de 20 especies diferentes que pueden afectar a humanos [2]. Se transmite por la picadura de hembras flebótomos que están infectadas. Aproximadamente cada año se producen un millón de nuevos casos de leishmaniasis, de los cuales la mayoría serán asintomáticos [2].

El diagnóstico de la leishmaniasis (Tabla 1) presenta numerosas limitaciones, que dificultan las estrategias de control de la enfermedad a nivel global [4]:

- Un alto porcentaje de personas infectadas en las zonas endémicas son asintomáticas, lo que contribuye a propagar la infección y mantener el patógeno.
- Las técnicas actuales requieren experiencia del profesional para llevar a cabo las pruebas parasitológicas y su correcta lectura.
- La toma de muestras para realizar el diagnóstico mediante algunas técnicas es complicada e invasiva por lo que requiere un buen equipamiento y un personal cualificado para ello, además de un malestar significativo en el paciente.
- La mayoría de las técnicas actuales presenta alta especificidad, pero su sensibilidad sigue siendo baja.
- Se necesitan infraestructuras y material para poder realizar las técnicas apropiadas, lo cual requiere una gran inversión.
- Ciertas técnicas no tienen una estandarización y seguridad adecuadas para aplicarse.
- Se pueden presentar reacciones cruzadas con otras enfermedades como la enfermedad de Chagas, producida por *T.cruzi*.
- Algunas de las técnicas actuales no permiten diferenciar una infección reciente de una persona ya curada.

**Tabla 1. Resumen de los métodos más usados en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral.**

Técnica	Objetivo	E y S	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Diagnóstico microscópico	Observación parásitos amastigotes en biopsia o aspirado de bazo o medula ósea	E: alta S: 60-85%	La visualización del parásito certifica la infección por <i>Leishmania</i>	Experiencia del profesional. Toma de muestras complicada e invasiva. Baja parasitemia, parásitos intracelulares.	[4,5]
KAtex. Detección de antígeno en orina.	Detección en suero de un antígeno estable al calor	E: 47-95% S: 82-100%  Inmuno deprimidos, S: 100% y E: 96%	Útil en pacientes inmunodeprimidos. Buen valor pronóstico, antígenos no se detectan tras el tratamiento. Detección en fases temprana.	Baja sensibilidad en pacientes inmunocompetentes. Dificultad para diferenciar entre negativos y positivos con baja carga.	[6,7,8,9]
IFI	Detección en suero de anticuerpos IgG	S: 87-100% E: 77-100%	Detección de anticuerpos en etapa temprana. Anticuerpos indetectables 6-9 meses después de la curación.	Habilidad y experiencia profesional. Laboratorio equipado. Muy costosa.	[4,10,11,12]

E: especificidad. S: sensibilidad

**Tabla 1. Continuación**

Técnica	Objetivo	E y S	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Test aglutinación directa.	Detección de anticuerpos en suero usando promastigotes de cultivo.	E: 97% S:95%	Fácil aplicación. Prueba serológica de elección para aplicar en campo.	Requiere un largo tiempo de incubación. Limitada en regiones endémicas, positivos hasta 5 años después de la curación	[13,14,15,]
ELISA	Detección de anticuerpos usando diferentes antígenos	<b>rK39</b> E: 79-89% S: 75-98% <b>CSA</b> E: 84-95% S: 80-100% <b>Fucosa-manosa</b> E:96% S:100%	Aplicable para estudios a gran escala. El rK39 permite seguir a pacientes en tratamiento y diagnóstico de recaídas.	Diferentes resultados según el antígeno usado. No aplicable en regiones endémicas. Requiere experiencia profesional y equipo adecuado.	[16, 17,18, 19]
Ensayos moleculares (PCR, qPCR)	Detección de ADN del parásito en muestras de sangre, bazo o médula.	PCR S:70-100% qPCR E: 98% S: 90-100%	Cuantifica la carga parasitaria. Seguimiento del paciente.	No presenta un protocolo estandarizado para aplicarse a gran escala. No diferencia entre parásito vivo o muerto	[4, 20]

E: especificidad, S: sensibilidad

#### **4. Objetivos**

Las técnicas actuales para el diagnóstico de la leishmaniasis se encuentran limitadas tanto para diagnosticar como para controlar la propagación de la enfermedad. Debido a esta limitación y a la gran incidencia de la enfermedad se han buscado nuevas técnicas de diagnóstico. Por ello, el trabajo plantea los siguientes objetivos:

- describir los avances que se han producido en el campo de la nanotecnología aplicada al diagnóstico de la leishmaniasis.
- analizar la posible aplicación a la práctica clínica de estos métodos.

#### **5. Material y métodos**

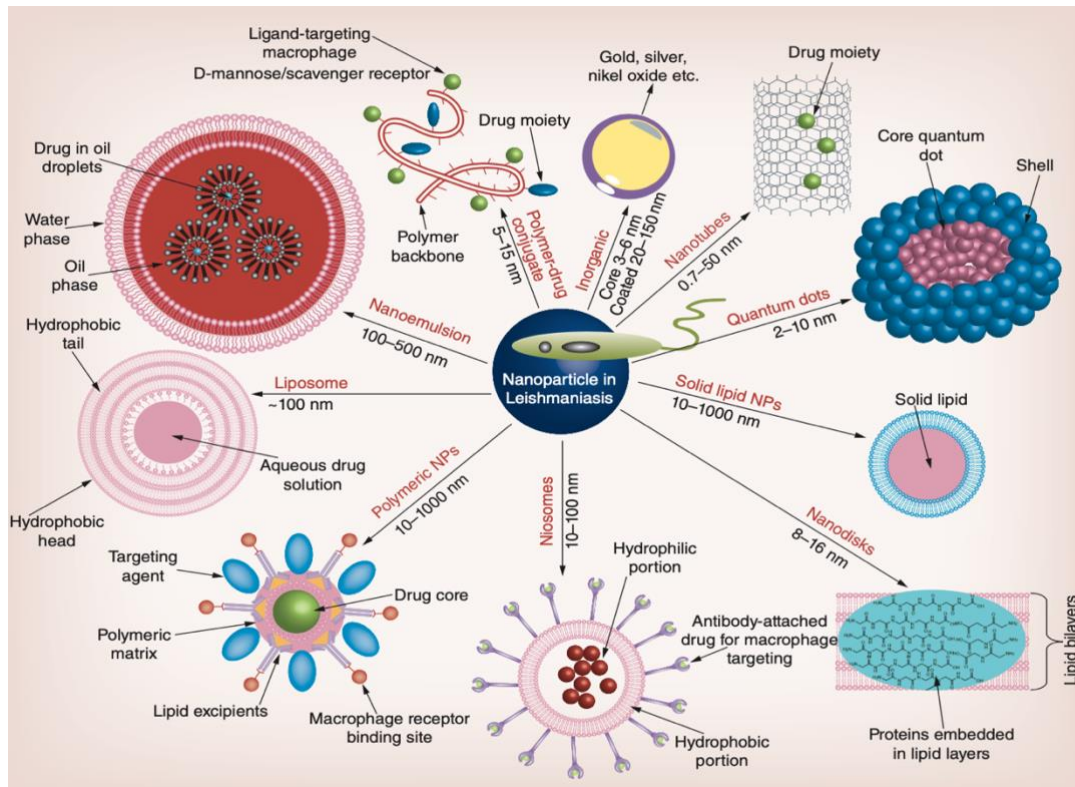
Para la realización del trabajo se ha realizado una búsqueda en la base de datos Pubmed que pertenece al centro nacional de información biotecnológica (NCBI) utilizando para ello palabras clave como *nanodiagnostic, leishmania, nanodiagnostic in infectious diseases, nanomedicine, nanoparticles, point of care, diagnostic of leishmania*.

La búsqueda se ha realizado desde el día 10 de mayo de 2021 hasta el día 27 de junio de 2021. Para realizar la búsqueda sobre los métodos de nanodiagnóstico se filtró información de los últimos 10 años con el fin de trabajar con la información más reciente y actualizada.

#### **6. Resultados**

##### **6.1. Nanopartículas y métodos nanodiagnósticos para el diagnóstico de la leishmaniasis**

En el nanodiagnóstico de *Leishmania* se utilizan diferentes nanopartículas unidas a una sonda con el fin de detectar una molécula diana. Estas sondas van conectadas a la nanopartícula. Las sondas pueden ser de ADN, ARN o proteínas [3]. Las nanopartículas más usadas se muestran en la figura 1 [3]. Estas nanopartículas van a ofrecer un diagnóstico rápido, rentable, sensible, específico y sin necesidad de realizar un cultivo. Esto se debe a las propiedades únicas de las nanopartículas y a su tamaño, lo que les permite interactuar con mayor facilidad con las moléculas biológicas [6].



**Figura 1.** Nanopartículas utilizadas en el nanodiagnóstico entre las que se incluye los liposomas, nanoemulsiones, niosomas, cocleados lipídicos, nanodiscos, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, polímeros polisacáridos, micelas poliméricas y quantum dots (puntos cuánticos) [3].

Los métodos de nanodiagnóstico más utilizados para *Leishmania* son los nanodiagnósticos basados en ADN, los basados en ARN y los basados en proteínas. Todos ellos tienen como objetivo detectar el parásito gracias a la unión entre la sonda y la molécula diana [3].

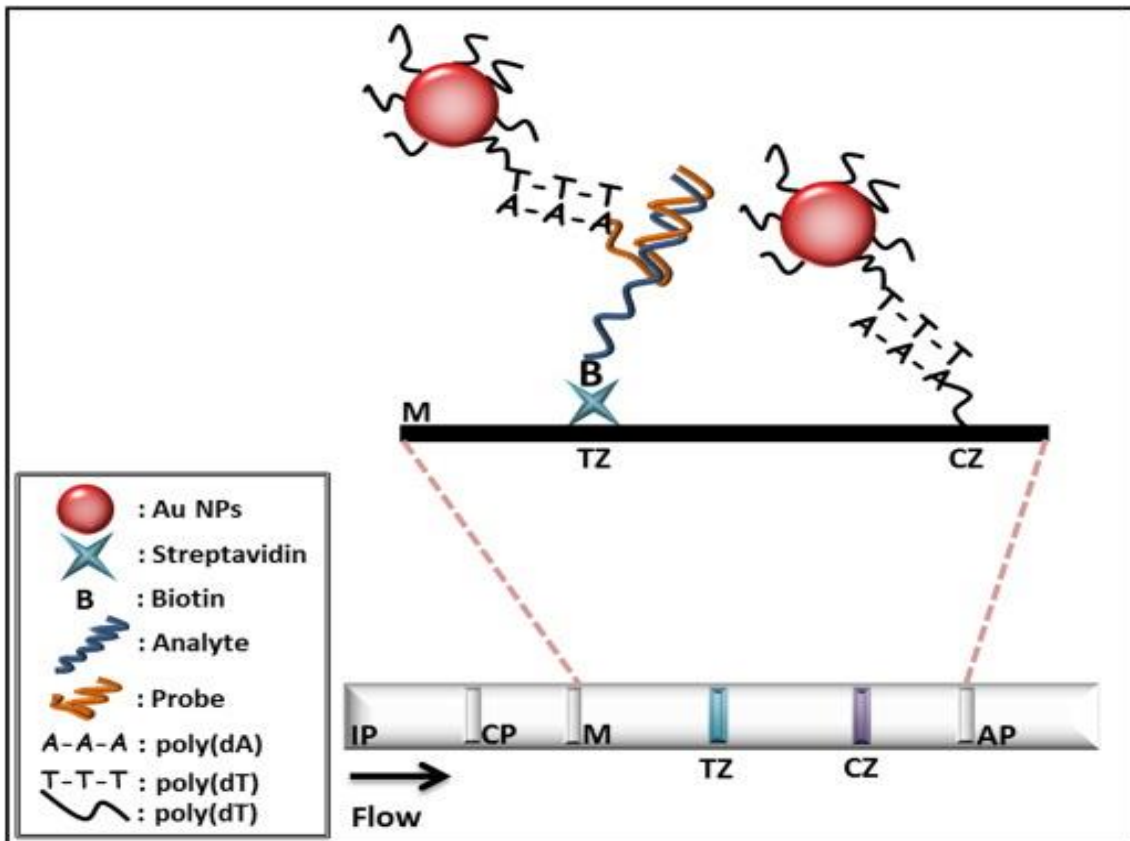
a) Nanodiagnóstico basado en ADN

El nanodiagnóstico mediante biosensor de flujo lateral empleando nanopartículas de oro, se desarrolló con un sensor que estaba basado en ADN con el objetivo de detectar e identificar ADN del parásito *Leishmania* (Tabla 2). El biosensor era capaz de detectar el ADN del parásito en concentraciones muy pequeñas con un límite de detección de 100 fmol de ADN diana, lo que correspondía a 3 parásitos/ $\mu$ L de muestra, lo que le confiere una alta sensibilidad [21].



**Tabla 2. Biosensor de flujo lateral para la detección de ADN de *L. infantum*.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de ADN de <i>L. infantum</i>	<p>Para realizar esta técnica se utilizaron nanopartículas de oro y ADN de <i>L. infantum</i> amplificado mediante PCR. Las muestras se recolectaron de perros sanos y perros sintomáticos y asintomáticos. Por un lado, las nanopartículas se conjugan con una sonda de oligonucleótidos y por otro lado el ADN amplificado se conjuga con biotina. Posteriormente se desnaturaliza el ADN y se hibrida con una sonda de oligonucleótidos específica, formándose el complejo biotina-ADN-oligonucleótido. Luego, se añaden las nanopartículas de oro conjugadas con oligonucleótidos y el complejo biotina-ADN-oligonucleótido en la almohadilla de conjugado.</p> <p>Una vez realizado este paso, se introduce el biosensor de flujo lateral (Figura 2) en la solución reveladora y comienza a correr por capilaridad a lo largo del sensor. Cuando llega a la almohadilla de conjugación, se produce el arrastre de las nanopartículas y del ADN formándose una hibridación entre ambos. Cuando dicha hibridación llega a la zona de prueba, se une a la estreptavidina fijada, gracias a la biotina, por la cual presenta una gran afinidad. Esto produce una línea roja debido a la acumulación de nanopartículas de oro. Las nanopartículas restantes siguen avanzando por capilaridad hasta encontrarse con una sonda de oligonucleótidos complementaria en la zona control, generándose una segunda línea roja que confirma el correcto funcionamiento de la prueba.</p>	[21]



**Figura 2.** Principio del biosensor de flujo lateral basado en nanopartículas de oro para la detección de productos de amplificación de *Leishmania*. Está compuesto por: IP: almohadilla de inmersión; CP: almohadilla de conjugación; M: membrana de diagnóstico; AP: almohadilla absorbente. La estreptavidina se ha inmovilizado en la zona de prueba (TZ) y el oligonucleótido poli (dA) se ha inmovilizado en la zona de control (CZ) de la membrana de diagnóstico de los biosensores. El híbrido de muestra consta del analito diana (producto de PCR), marcado con biotina (B) y una sonda de oligonucleótidos con cola de poli (dA) hibridado.. La muestra se aplica en la almohadilla de conjugación junto a nanopartículas de oro funcionalizadas con poli (dT) (NP de Au). El biosensor se sumerge en la solución de revelado, la muestra y las nanopartículas se capturan en la zona de prueba, dando una línea roja característica como señal positiva. El exceso de nanopartículas se une a la zona de control.[21]

En la siguiente técnica de nanodiagnóstico se utilizó como nanopartículas *quantum dots* (puntos cuánticos) de ferrita magnética de cobalto y zinc, cuya principal finalidad era la detección de *L.major* usando para ello una sonda de ADN monocatenario (Tabla 3). Esta técnica tiene la capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de ADN del parásito, con un límite de detección de  $1,80 \times 10^{-14}$  ng / $\mu$ L dando como resultado una alta sensibilidad y especificidad. [22]

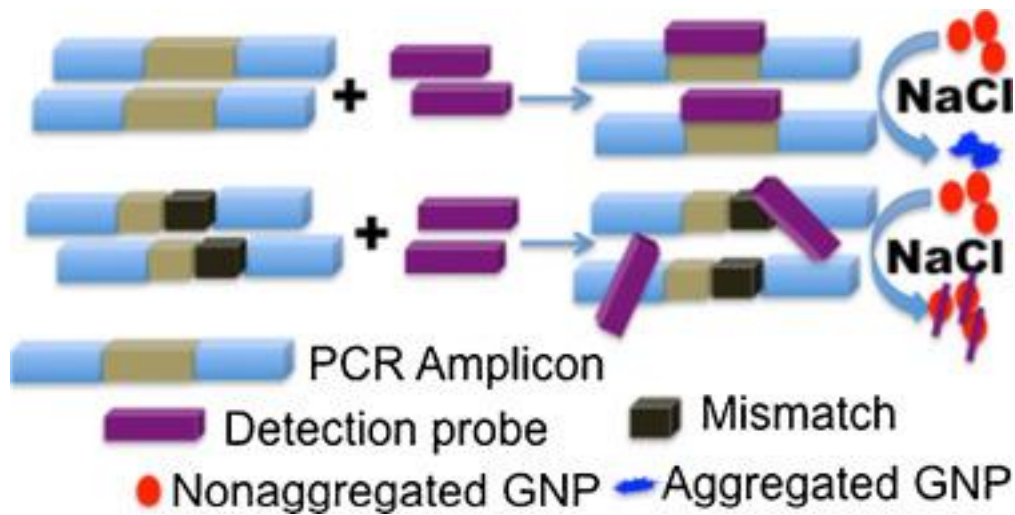
**Tabla 3. Detección de ADN de *L. major* usando *quantum dots* de ferrita de cobalto y zinc.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de ADN de <i>L. major</i>	En esta técnica se utilizaron <i>quantum dots</i> de ferrita de cobalto y zinc, que presentan una ventaja muy importante ya que son capaces de inmovilizar el ADN diana y actuar como un genosensor electroquímico. Estas nanopartículas inmovilizan el ADN diana y posteriormente se añade la sonda de ADN monocatenario produciéndose la hibridación. Dicha hibridación se detecta gracias al cambio electroquímico producido.	[22]

En otro estudio de nanodiagnóstico se utilizó nanopartículas de oro conjugadas con una sonda de oligonucleótidos como sensor para detectar ADN de *L. donovani* de una manera rápida, sencilla y que se puede interpretar a simple vista (Tabla 4). Este método cuenta con una alta sensibilidad y especificidad [23].

**Tabla 4. Detección de ADN kinetoplasto de *L. donovani*.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de ADN de <i>L. donovani</i>	Esta técnica permite detectar la presencia de un fragmento de ADN kinetoplasto específico de <i>L. donovani</i> . El ADN se ha amplificado mediante PCR. Las nanopartículas de oro han sido sometidas a una coloración roja y luego se conjugan con una sonda de oligonucleótidos específica. Una vez producida la hibridación entre ambos fragmentos de ADN complementarios, se añade NaCl, de manera que las nanopartículas se agregan formando un color azul, lo que nos indica la hibridación y la presencia del fragmento de ADN de <i>L. donovani</i> . En ausencia de ADN del parásito, no se produce la hibridación, por lo que se mantiene el color rojo (Figura 3).	[23]

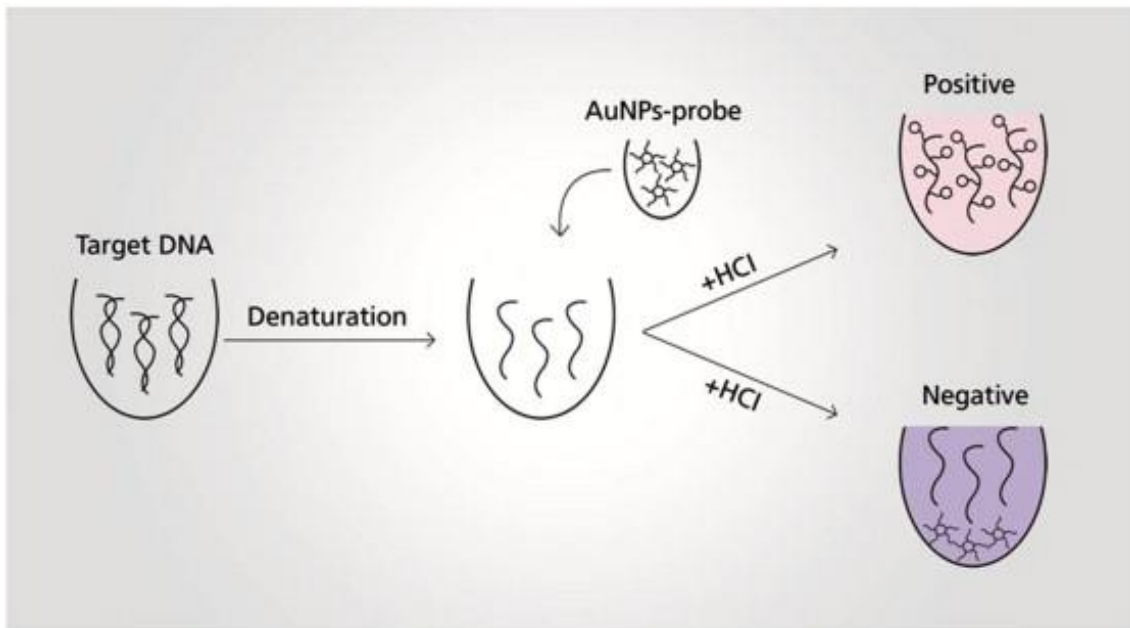


**Figura 3.** Detección de ADN de *L. donovani* utilizando ADN amplificado, nanopartículas de oro, y una sonda de oligonucleótidos. En presencia de ADN del parásito, se produce la hibridación con la sonda de oligonucleótidos. Posteriormente se añade sal, lo que permite la agregación de las nanopartículas de oro y la formación de un color azul. En ausencia de hibridación, al añadir sal no se produce la agregación de las nanopartículas, lo que mantiene un color rojo, indicando la ausencia de ADN de *L. donovani*. [23]

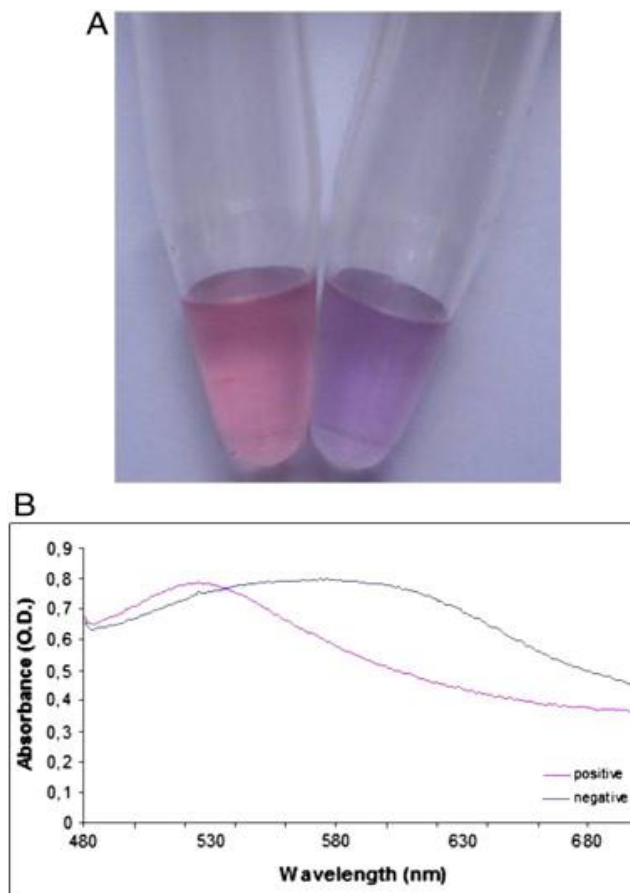
La siguiente técnica de nanodiagnóstico incorporó 4 sondas de oligonucleótidos conjugadas con las nanopartículas de oro. El ADN del kinetoplasto de *Leishmania* es muy particular ya que está compuesto por maxi círculos y mini círculos. Estas nanopartículas conjugadas permitían detectar el ADN del mini círculo del kinetoplasto de *Leishmania*, con la particularidad de que no es una técnica de amplificación, sino que se considera una técnica únicamente de detección (Tabla 5). Los resultados obtenidos fueron esperanzadores ya que mostraron una sensibilidad y especificidad alta, 92% y 100% respectivamente. El límite de detección para esta técnica fue de 11,5 ng/ µl [24]

**Tabla 5. Detección de ADN de *L. infantum* sin amplificación por PCR.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de ADN de <i>L. infantum</i>	En esta técnica se usaron 4 sondas de oligonucleótidos que se conjugaron con las nanopartículas de oro. En presencia de ADN de <i>L. infantum</i> se produce la hibridación de las hebras de ADN. Posteriormente se añade HCL (Figura 4). En ausencia de ADN diana y debido a un ambiente ácido las nanopartículas conjugadas precipitan, produciendo un cambio de color de rojo a púrpura, detectable de forma visual (Figura 5). En cambio, en presencia de ADN mini círculo, no hay precipitación y el color de la solución permanece rojo. El pico de absorción óptica de la solución en la que las sondas se han hibridado con el ADN diana es de 520 nm. Esto cambia a 575 nm cuando no se produce la hibridación.	[24]



**Figura 4.** Proceso de detección de ADN kinetoplasto de *Leishmania infantum*, usando nanopartículas de oro, 4 sondas de oligonucleótidos y un medio ácido. En ausencia de ADN y en un ambiente ácido, las nanopartículas precipitan produciéndose un color violeta-púrpura. En presencia de ADN del parásito, el color se mantiene rojo-rosa [24].



**Figura 5.** A. Tubos de ensayo con muestras clínicas positivas (color rojo) y negativas (color púrpura). B. Pico de absorción de una muestra positiva y una negativa [24].

En la siguiente tabla se resumen los principales métodos de nanodiagnóstico de la leishmaniasis basados en la detección de ADN (Tabla 6).

**Tabla 6. Resumen de los métodos de nanodiagnóstico basados en ADN.**

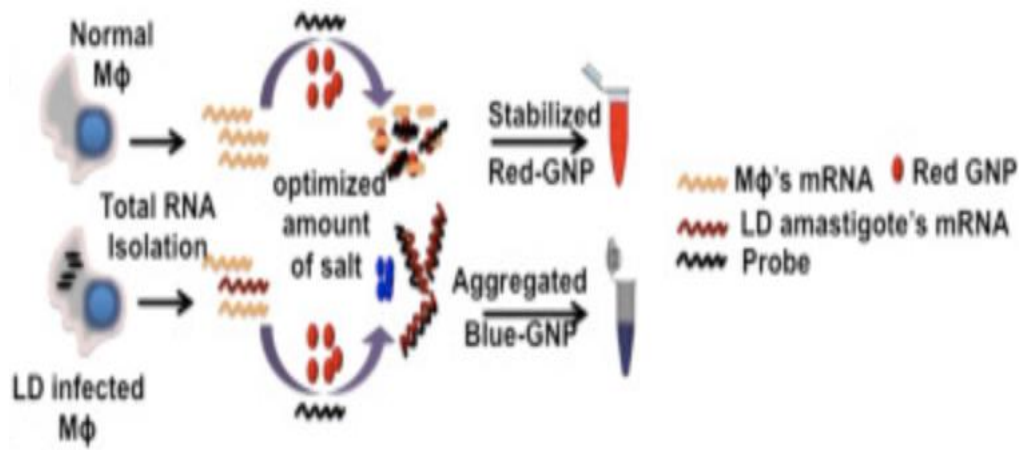
Nanopartícula utilizada	Sonda de detección utilizada	Especie de <i>Leishmania</i> /leishmaniasis	Referencia
Nanopartículas de oro	Biosensor de flujo lateral	<i>L. infantum</i> /leishmaniasis canina	[21]
<i>Quantum dots</i> de ferrita de cobalto y zinc	Genosensor electroquímico	<i>L. major</i>	[22]
Nanopartículas de oro	Sonda de oligonucleótidos	<i>L. donovani</i>	[23]
Nanopartículas de oro	Sonda de oligonucleótidos	<i>L. infantum</i>	[24]

b) Nanodiagnóstico basado en ARN

Esta técnica de nanodiagnóstico de *Leishmania* consistió en detectar ARN ribosómico de amastigotes de *Leishmania*. Las ventajas de esta técnica son numerosas y entre ellas tenemos el alto rendimiento que ofrece, su bajo coste, no usa gel ni necesita de una PCR para la detección, y permite una detección rápida y un seguimiento de la enfermedad, ya que nos permite saber la carga parasitaria presente en los macrófagos (Tabla 7) [25].

**Tabla 7. Detección de ARN de amastigotes en los macrófagos.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de ARN ribosómico, subunidad pequeña, de <i>L. donovani</i>	Para esta técnica se usó el ARN ribosómico, en concreto de la subunidad pequeña. Para detectar el ARN se utilizaron nanopartículas de oro y una sonda de ADN monocatenario. El ARN se aisló de los macrófagos infectados. En presencia de la sonda de oligonucleótidos conjugados con las nanopartículas de oro, se produce la hibridación, formándose un híbrido estable ARN: ADN (Figura 6). Posteriormente se añade NaCl para desencadenar la agregación de las nanopartículas y el cambio de color de rojo a azul, indicando la presencia de ARN diana. En ausencia de hibridación, la sonda de oligonucleótidos protege a las nanopartículas de la agregación, por lo que se mantiene el color rojo inicial, concluyendo la ausencia de ARN diana en el ARN total del macrófago. El límite de detección fue de 0,25 µg de ARN total.	[25]



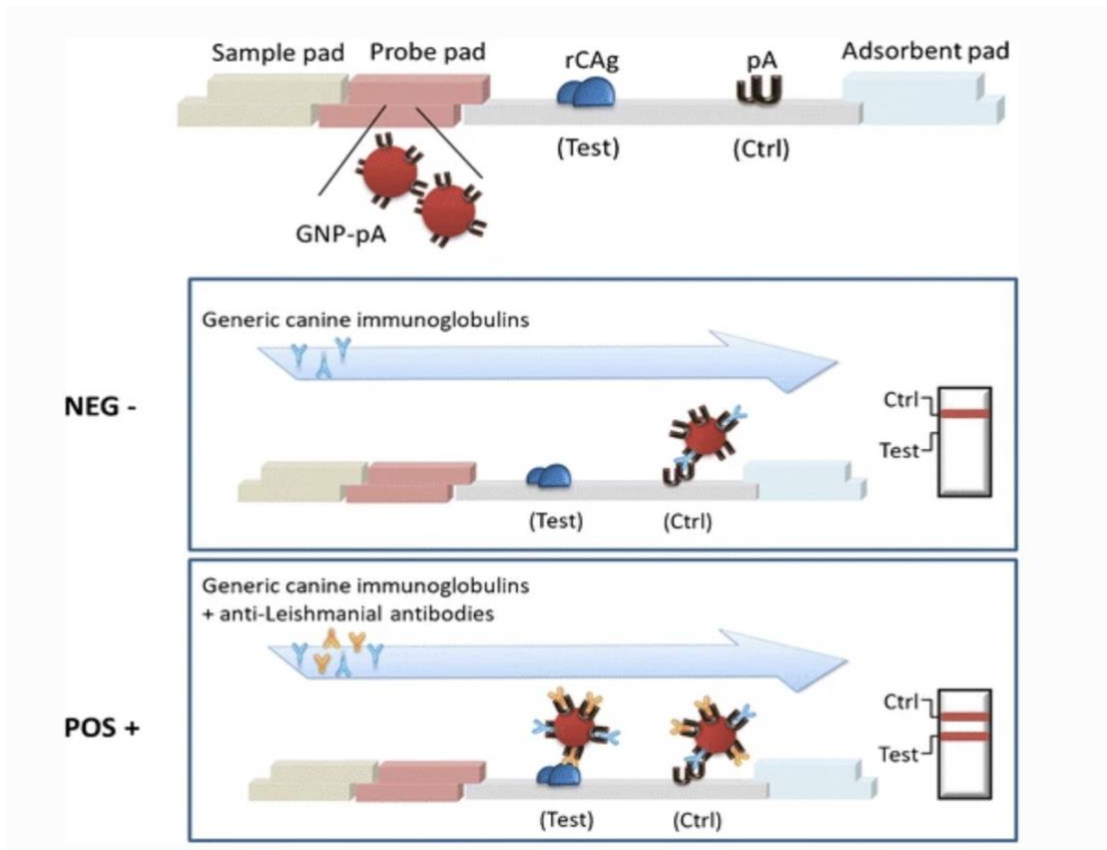
**Figura 6.** Método de detección de ARN mensajero (ARNm) de *L. donovani* usando nanopartículas de oro activadas por NaCl. En ausencia de ARN diana no se produce hibridación con la sonda de oligonucleótidos específica, por lo que, al añadir sal, no se produce la agregación de las nanopartículas y se mantiene el color rojo inicial. En presencia de ARN diana se produce el híbrido ARN-ADN y al añadir sal, las nanopartículas se agregan y se produce un cambio de color, dando como resultado la presencia del ARN diana. [25]

c) Nanodiagnóstico basados en proteínas

En el caso del nanodiagnóstico basado en proteínas, se desarrolló un método para la detección de leishmaniasis visceral canina (Tabla 8). La técnica presentó una sensibilidad del 98,4% y una especificidad del 98,9%, lo que la convierte en una técnica aplicable a los perros y otros mamíferos con el objetivo de eliminar la enfermedad [26].

**Tabla 8. Detección de leishmaniasis canina mediante inmunoensayo de flujo lateral.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de leishmaniasis canina producida por <i>L. infantum</i>	En esta técnica se usó un antígeno quimérico altamente específico y nanopartículas de oro, que en este caso incluían una proteína A. En el ensayo se observó que dicho antígeno formaba un complejo con los anticuerpos de <i>Leishmania</i> , generándose una señal gracias a la proteína A unida a las NPs de oro. La proteína A, se encarga de capturar los anticuerpos y la unión de la proteína A con las nanopartículas permiten la formación de una línea roja en la zona de prueba, cuando hay presencia de anticuerpos frente a <i>Leishmania</i> y otra línea roja en la zona de control que confirma el funcionamiento correcto de la prueba (Figura 7).	[26]



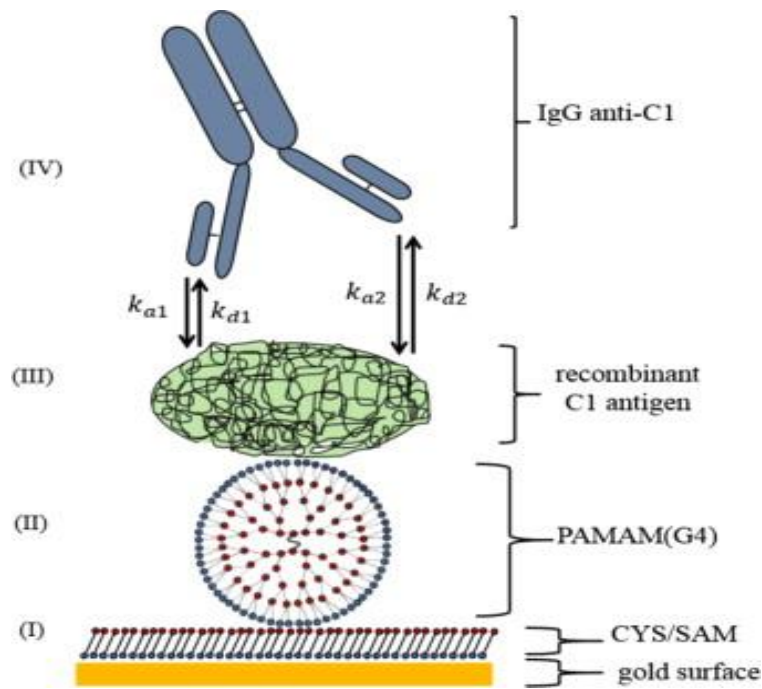
**Figura 7.** Inmunoensayo de flujo lateral para diagnosticar leishmaniasis canina. En ausencia de anticuerpos frente a la leishmaniasis canina, las nanopartículas marcadas con proteína A, solo se unirán a las inmunoglobulinas del perro y estos anticuerpos serán captados por la proteína A fijada en la zona control. En presencia de anticuerpos frente a la leishmaniasis, estos se unirán a su antígeno quimérico, produciendo una señal en la zona de pruebas gracias a las nanopartículas de oro y también se unirán a la proteína A de la zona control para validar la prueba.[26]

En otro estudio se desarrolló un inmunosensor , el cual permite detectar anticuerpos usando una proteína denominada hipotética C1 característica de *Leishmania infantum* (Tabla 9) [27].

**Tabla 9. Detección de anticuerpos frente a *L. infantum*.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de anticuerpos frente a <i>L. infantum</i> .	En esta técnica se creó un inmunosensor, capa a capa utilizando para ello una superficie de oro, seguida de una capa de cisteamida y luego la adicción de un dendrímero con el fin de inmovilizar la proteína hipotética C1 (Figura 8). Por último, se produce la adicción de la muestra, que en presencia de anticuerpos se unirán al antígeno C1 con gran afinidad. El límite inferior de detección fue de 7,37nmol/L y el límite de cuantificación fue de 7,83nmol/L. Esto le confiere una alta sensibilidad y especificidad al método.	[27]



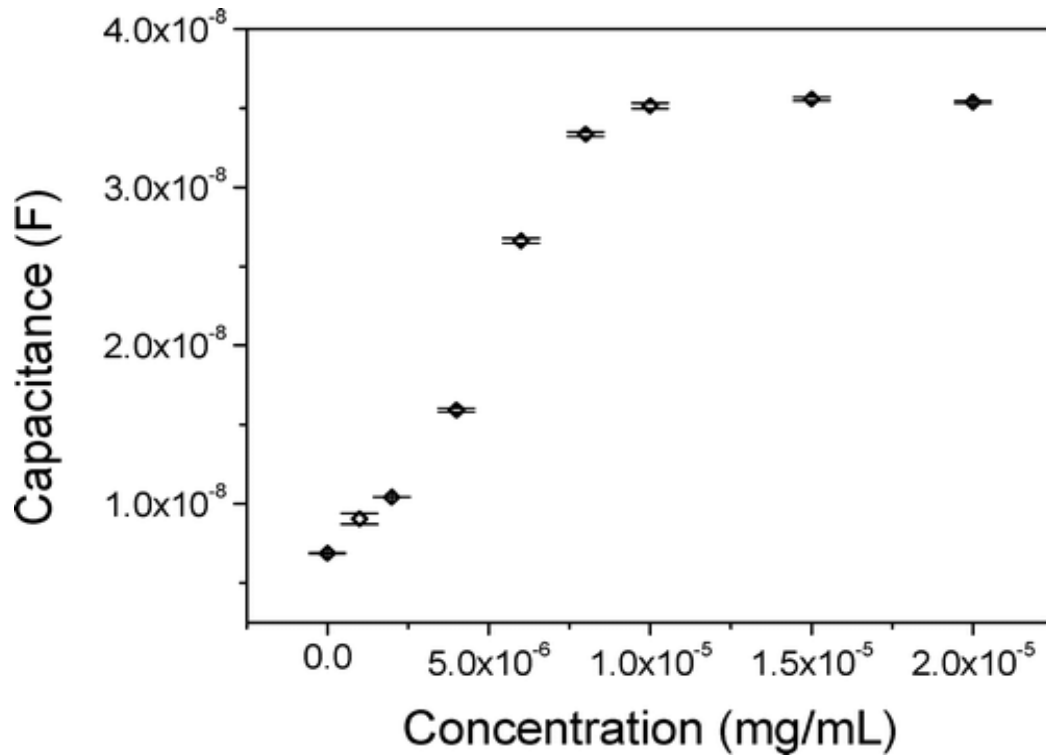


**Figura 8.** Inmunosensor utilizado en la detección de anticuerpos, usando la proteína C1, una superficie de oro, una capa de cisteamida y un dendrímero que permitía inmovilizar el antígeno C1[27].

También se han usado nanoestructuras con película que contienen antígenos específicos de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi* (Tabla 10). Esta técnica presentó alta sensibilidad y especificidad [28].

**Tabla 10. Detección de anticuerpos frente a *L. amazonensis* usando antígenos específicos.**

	Procedimiento	Referencia
Detección de anticuerpos frente a <i>L. amazonensis</i> y <i>T. cruzi</i> .	Esta técnica es muy importante ya que las reacciones cruzadas entre ambas especies producen falsos negativos para <i>L. amazonensis</i> . Para detectar anticuerpos frente a esta especie se utilizó dendrímeros de oro, capaces de inmovilizar a los péptidos antigénicos. El biosensor está formado por los péptidos antigénicos, los dendrímeros de oro y los electrodos de oro. En los electrodos de oro se depositaban capa a capa los péptidos antigénicos y los dendrímeros de oro, formando así el biosensor. El biosensor se introduce en diferentes soluciones de anticuerpos frente a <i>L. amazonensis</i> , <i>T. cruzi</i> y anticuerpos negativos. Al producirse la unión con los antígenos se produce un cambio en la capacitancia que puede ser medido. A medida que aumenta la cantidad de IgG diana en las muestras, aumenta la capacitancia de forma casi lineal (Figura 9). En las soluciones con anticuerpos frente a <i>T. cruzi</i> y anticuerpos negativos no se produjo cambio de capacitancia.	[28]



**Figura 9.** Gráfico que refleja la relación entre la concentración de IgG anti-*L. amazonensis* y la capacitancia. Muestra un aumento casi lineal hasta una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  mg / mL, en el cual se produce una meseta, debido a que todos los sitios de unión en el antígeno estaban ocupados.[28]

La siguiente tabla presenta un resumen de los métodos de nanodiagnóstico de leishmaniasis basados en la detección de proteínas (Tabla 11).

**Tabla 11. Resumen de los nanodiagnósticos basados en proteínas**

Nanopartícula utilizada	Método de detección utilizado	Molécula de detección	Especie de leishmania/leishmaniasis	Referencia
Nanopartículas de oro	Inmunoensayo de flujo lateral	Anticuerpo	Leishmaniasis visceral canina	[26]
Dendrímeros de oro	Inmunosensor con antígeno C1	Anticuerpo	<i>L. infantum</i>	[27]
Dendrímeros	Biosensor electrónico	Anticuerpo	<i>L. amazonensis</i>	[28]

d) Nanodiagnóstico basado en ADN y proteínas

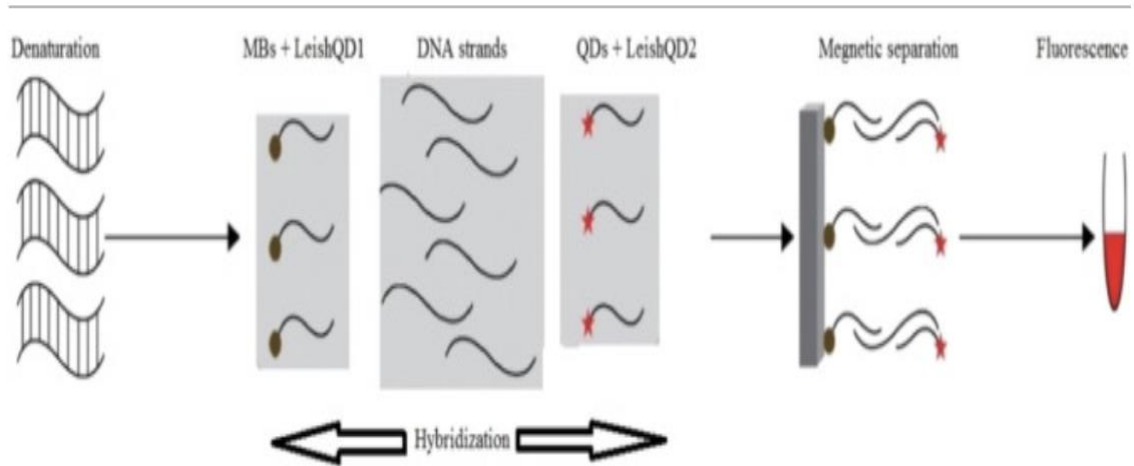
La siguiente técnica de nanodiagnóstico de *Leishmania* se desarrolló para la detección de ADN y péptidos específicos. En ella se incluye una combinación de dos nanopartículas (*quantum dots* de selenito de cadmio y perlas magnéticas) usadas como sonda (Tabla 12). En el ensayo, las perlas magnéticas se encargaban de capturar el ADN y los péptidos de antígenos de superficie específicos en la solución, mientras que los *quantum dots* de selenita de cadmio tenían la función de detectar y revelar dichas moléculas de interés (Tabla 13). Esta técnica presentó una sensibilidad y especificidad cercana al 100%. El límite inferior de detección fue de 3,125 ng / L [29].

**Tabla 12. Características generales del nanodiagnóstico basado en ADN y proteínas.**

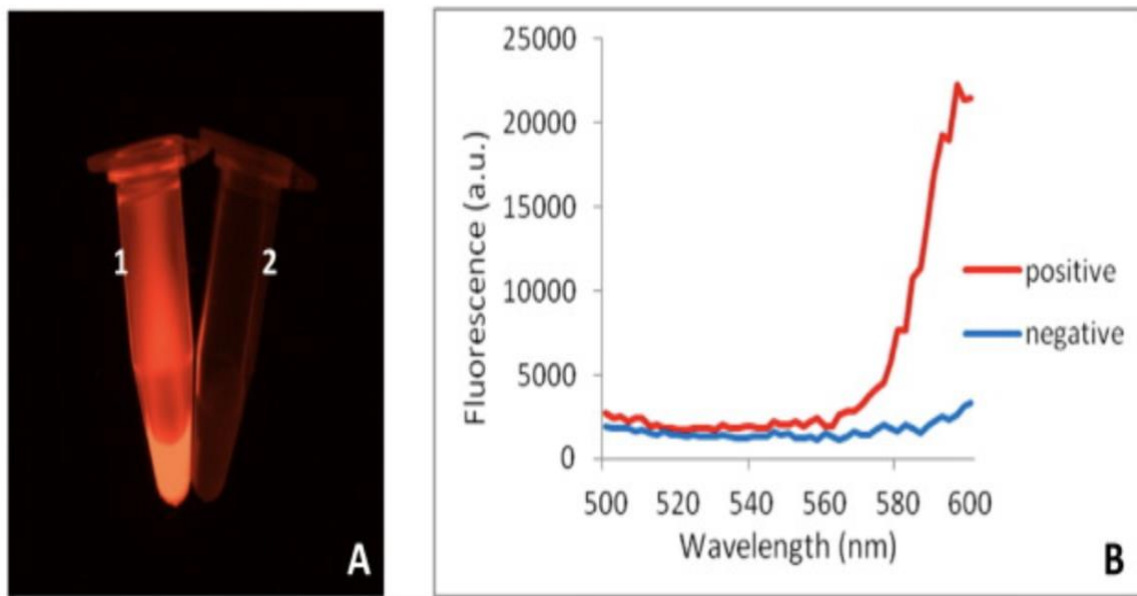
Nanopartículas utilizadas	Objetivo de detección	Método de detección utilizado	Referencia
Perlas magnéticas (MB) y <i>quantum dots</i> (QD) de selenita de cadmio	ADN específico de <i>Leishmania</i>	Dos sondas de oligonucleótidos conjugadas con MB y QD. Se denominan leishQD1 y leishQD2 respectivamente. Los oligonucleótidos están biotinilados y las nanopartículas están recubiertas con estreptavidina	[29]
	Antígenos de superficie de <i>Leishmania</i>	Dos anticuerpos monoclonales y dos policlonales. Los dos monoclonales se denominan LPG (IgM) y gp63 (IgG). Los dos policlonales están marcados con biotina (IgM e IgG)	[29]

**Tabla 13. Detección de ADN y antígenos específicos de *Leishmania* usando perlas magnéticas y *quantum dots* de selenita de cadmio.**

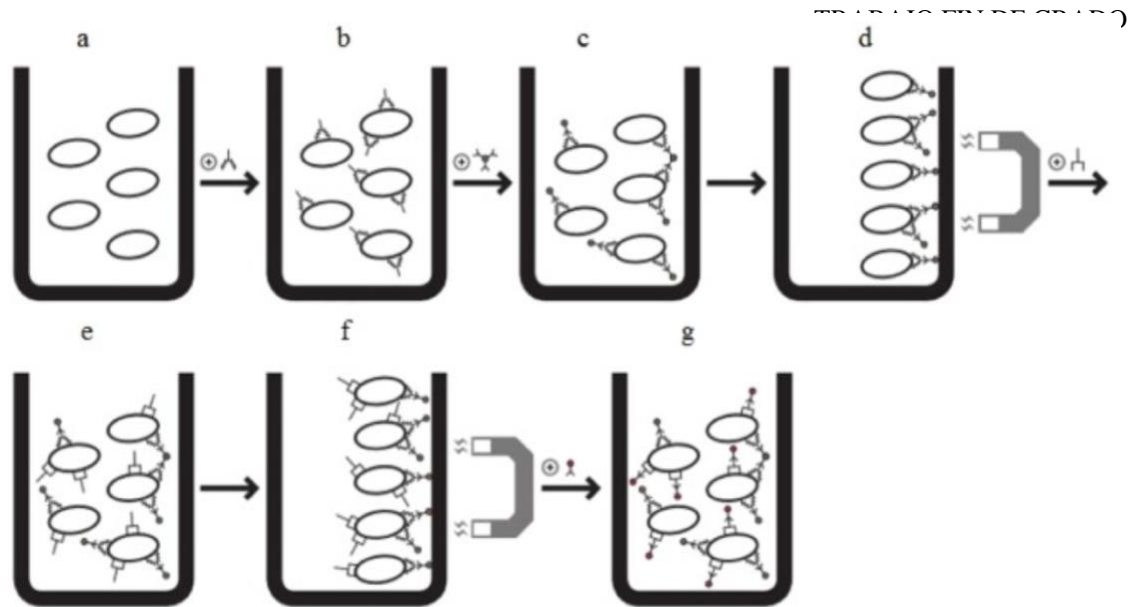
	Procedimiento	Referencia
Detección de ADN de <i>Leishmania</i>	<p>La detección de ADN se realiza en ADN aislado de varios patógenos. Para ello se usa la combinación de las nanopartículas con su respectiva sonda (MB-leishQD1 y QD-leishQD2) para la captura y detección respectivamente. Se desnaturaliza el ADN y se produce la hibridación entre los oligonucleótidos y el ADN diana. La primera sonda (MB-leishQD1) se encarga de capturar el ADN y la segunda (QD-leishQD2) se encarga de detectarlo (Figura 10). Todo este proceso se puede detectar gracias a la fluorescencia emitida por los <i>quantum dots</i> a una longitud de onda de 605nm (Figura 11).</p>	[29]
Detección de antígeno de <i>Leishmania</i>	<p>En este caso, el anticuerpo IgM monoclonal denominado LPG se une covalentemente a las células microbianas. Luego se une el anticuerpo policlonal IgM marcado con biotina. A continuación, se añaden las MB conjugadas (MB-leish1QD) que se conjugan con el anticuerpo policlonal y funciona como sonda de captura. Una vez capturado, se añade el anticuerpo monoclonal IgG denominado gp63 que se une covalentemente a las células microbianas. Luego se añade el anticuerpo policlonal IgG marcado con biotina y se conjuga con el gp63. En el siguiente paso se produce la adición de los <i>quantum dots</i> conjugados (QD-leishQD2) recubiertos con estreptavidina y se unen a los anticuerpos policlonales funcionando como sonda de detección (Figura 12).</p>	



**Figura 10.** Las etapas de la detección de dianas de ADN específicas de *Leishmania*. El ADN objetivo se desnatura para que las perlas magnéticas funcionalizadas y los *quantum dots* se hibriden con sus sitios complementarios. Los conjugados se separan de la solución con un dispositivo magnético y el resultado positivo se demuestra por fluorescencia.[29]



**Figura 11.** Resultados de la prueba indicativos registrados en muestras de ADN positivas (ADN aislado de *Leishmania* spp.) Y negativas (ADN aislado de *Toxoplasma gondii*). A) Fluorescencia generada por muestras positivas (tubo 1) pero no por muestras negativas (tubo 2); B) Solo las muestras positivas generan fluorescencia que presenta un pico de absorción a 605 nm [29].



**Figura 12.** Etapas de la detección de proteínas específicas de *Leishmania*. Las células microbianas (a) se marcan con un anticuerpo monoclonal anti- *Leishmania* LPG (b). Este último se une a una IgM anti-ratón policlonal marcada con biotina (c) y luego a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (d) y los conjugados se separan con un dispositivo magnético. El segundo anticuerpo monoclonal (anti- *Leishmania* gp63) se hibrida con las células microbianas y se une a la IgG (e) policlonal anti-ratón marcada con biotina. Los complejos se separan una vez más por la fuerza magnética (f) y se marcan con *quantum dots* recubiertos de estreptavidina (g).[29]

## 6.2. Aplicación de los nanodiagnósticos en la práctica clínica

Un avance relevante para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas mediante el uso de nanopartículas consiste en los denominados POCT (*point of care test*). Son pruebas de laboratorio en el centro de asistencia o también llamado cabecera del paciente. Tienen como finalidad conseguir un diagnóstico precoz, de fácil aplicación, mostrando resultados en corto tiempo y a un precio económico. [30,31].

Estas pruebas permiten reducir el número de visitas al médico y obtener un resultado rápido y en presencia del paciente, lo que sirve como un radar a la hora de controlar la enfermedad y sobre todo un tratamiento más adecuado en función de los resultados. Estas pruebas POC deben cumplir una serie de criterios denominados “ASSURED” (*affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable to end-users*) es decir, asequibles, sensibles, específicos, fácil de usar, rápido, sin equipo y entregable al paciente. [32, 33]

Los sistemas basados en la nanotecnología presentan un gran potencial para ser utilizados en los POC, ya que la mayoría presentan alta sensibilidad, fácil manejo y buena reproducibilidad. Sin embargo, algunos sistemas de nanodiagnóstico

necesitan recursos que no son económicos como por ejemplo la necesidad de sistemas de detección complejos lo que deriva al uso de instrumentos caros y personal cualificado [31].

Los métodos mencionados en el apartado 6.1. han sido estudiados para solventar los problemas del diagnóstico convencional de *Leishmania*. Sin embargo, solo unos pocos han llegado a la práctica clínica como son el método basado en proteínas utilizando el inmunoensayo de flujo lateral y el nanodiagnóstico basado en proteínas usando para ello la proteína C1. El primero de ellos ha conseguido ser un método con gran aplicación en el diagnóstico de campo, mayoritariamente para el control de los reservorios animales y en menor medida para la detección de *L. infantum* en humanos. Gracias a su capacidad de detección con alta sensibilidad y especificidad y de manera rápida y económica este método ha conseguido ser aplicado a la práctica clínica con el objetivo de controlar la progresión de la enfermedad. El segundo método presente en la clínica no es tan aplicable a los diagnósticos de campo ya que el coste del sensor que utilizan es alto, por lo que su aplicación en los lugares más pobres del mundo se ve limitada [26,27]

Algunos de los métodos nombrados en el apartado 6.1. cumplen con todos los criterios “ASSURED” pero no se encuentran en la clínica actualmente, como pueden ser varios de los métodos basados en ADN, el método basado en ARN y el método basado en ADN y proteínas. Estos métodos presentan un gran potencial a la hora de ser aplicados en las pruebas POC. [21, 23, 24, 25, 29]

Otros métodos de los nombrados en el apartado 6.1. no cumplen con los criterios para ser aplicados en los POC, ya que requieren de aparatos caros y personal cualificado. [22,28]

## **7. Discusión**

El nanodiagnóstico hace uso de la nanotecnología y la nanomedicina para poder ofrecer un diagnóstico con una alta sensibilidad y de manera precoz, así como la posibilidad de tratar al paciente con la mayor rapidez posible para así poder combatir las enfermedades infecciosas. La finalidad de desarrollar los métodos de nanodiagnóstico consiste en poder implementarlos en la práctica clínica. Implantar estos métodos requiere de un largo procedimiento y una serie de estudios que indiquen

y certifiquen que pueden ser aplicados a la práctica clínica de rutina, ya que las propiedades y los mecanismos de las nanopartículas no se conocen del todo bien.

Los nanodiagnósticos han evolucionado a nivel de laboratorio en su capacidad de detectar moléculas diana. Sin embargo, solo unos pocos sistemas de nanodiagnóstico ha conseguido llegar a la fase clínica. Esto se debe a la complejidad de estos sistemas y su dificultad para aplicarse en la clínica, ya que hasta los resultados de laboratorio más alentadores pueden verse frustrados al aplicarse en la práctica clínica. La dificultad para aplicarlos en la clínica radica en el tamaño de las nanopartículas ya que no existe un protocolo estandarizado para las partículas a nanoescala y su posterior incorporación a los sistemas de nanodiagnóstico. Pese a todo esto, la tecnología implicada en el nanodiagnóstico presenta un nivel adecuado para poder ser trasladado a la clínica, con el objetivo de comenzar a mejorar en el diagnóstico de muchas enfermedades [34].

El primer método basado en ADN, para la detección de leishmaniasis canina presentó una alta sensibilidad y especificidad por lo que cumple con estos dos criterios para poder aplicarse a la práctica clínica. También es una técnica rápida, fácil de usar, y económico ya que consiste simplemente en un ensayo de flujo lateral, cuya detección es visual y se produce en minutos, sin la necesidad de grandes y costosos equipos de detección y que presenta un coste de aproximadamente 3 euros. Por tanto, este método cumple con todos los criterios exigidos para poder ser aplicado en los POC, siendo una técnica muy importante para el control y vigilancia de la leishmaniasis [21].

El siguiente método basado en el ADN para detectar *L. major* no necesitaba una amplificación del ADN mediante PCR por lo que disminuye el tiempo y facilita el diagnóstico del parásito, por lo que cumple los criterios en la facilidad y la rapidez. Esta técnica presentó alta sensibilidad y especificidad por lo que también cumple con estos dos criterios. Sin embargo, a la hora de la detección, requiere de aparatos costosos y técnicos cualificados por lo que incumple el criterio económico y no se presenta libre de equipos [22].

La siguiente técnica basada en ADN presenta alta sensibilidad y especificidad, es fácil de realizar, rápida y económica. También es de fácil detección ya que es un ensayo visual por lo que cumple con los criterios “*ASSURED*”. Por tanto puede ser aplicada en los POC [23].



La última técnica basada en ADN es una técnica rápida, sencilla económica y con alta sensibilidad y especificidad. Es un ensayo colorimétrico por lo que no requiere material especializado y además presentó una alta reproducibilidad. Cumple con todos los criterios establecidos para ser aplicada a los POC y puede ser usada en zonas con recursos muy escasos.[24]

El método de nanodiagnóstico basado en ARN, se confirma como una técnica que no requiere PCR, gel y cultivo. Por tanto, es una técnica rápida, fácil de aplicar y de interpretar ya que se basa en un ensayo colorimétrico. Presenta una alta sensibilidad y especificidad y que se realiza en un corto periodo de tiempo por lo que es un método candidato a aplicarse en las pruebas POC [25].

El primer método basado en proteínas, basado en el inmunoensayo de flujo lateral cumple con todos los criterios “*ASSURED*” para poder aplicarse al diagnóstico de campo. Son dispositivos baratos, sensibles, específicos y no requieren equipamiento especial, simplemente una tira inmunocromatográfica que permite la interpretación visual del resultado. Debido a todo esto, este método ya se encuentra en la práctica clínica y ha tenido gran éxito comercial debido a su gran aplicación en el campo. Esto va a permitir controlar la enfermedad mediante el control de los reservorios, con el objetivo de disminuir la propagación de la leishmaniasis a los seres humanos. Estos dispositivos también están diseñados para detectar leishmaniasis en humanos. Sin embargo, solo ofrecen un resultado cualitativo, por lo que se necesitaría otra prueba complementaria para poder realizar un seguimiento y tratamiento adecuados a la enfermedad. En cuanto a la estabilidad térmica de estos dispositivos y a su funcionamiento a largo plazo, se realizaron una serie de estudios que indicaron que el dispositivo no se veía afectado por los cambios de temperatura que se producen en el campo concluyendo que era robusto para su aplicación en este ámbito [26].

El siguiente método basado en proteínas, en el cual se desarrolló un inmunosensor basado en dendrímeros, cumplió con los criterios de sensibilidad y especificidad. Es una técnica sencilla y presenta resultados muy rápidos. Sin embargo, aunque este dispositivo se encuentra comercializado, su precio es muy alto, por lo que su posible aplicación al diagnóstico de campo se ve frustrada [27].

Estos dos métodos comercializados se basan en el uso de antígenos con el objetivo de detectar anticuerpos. Es una buena técnica si nos basamos en los criterios

“ASSURED”, pero no todo son ventajas ya que al ser una técnica que únicamente detecta anticuerpos, solo tendrá aplicación en la leishmaniasis visceral, donde se produce un aumento de IgG. Otro inconveniente que presentan estos nanodiagnóstico basados en proteínas es que no permiten diferenciar una infección activa de una infección pasada. Esto nos indica que los diagnósticos basados en proteínas para la detección de anticuerpos están limitados y no resuelven algunas de las limitaciones ya presentes en el diagnóstico convencional.

La última técnica basada en proteínas está basada en un biosensor que tiene un precio bajo y ofrece una alta sensibilidad y especificidad por lo que cumple con los criterios de alta sensibilidad, especificidad y el criterio económico. Es una técnica rápida y que puede llegar a aplicarse a cualquier especie de *Leishmania*. Sin embargo, para medir la capacitancia se utiliza un instrumento cuyo coste no es económico por lo que este método presenta limitaciones a la hora de ser aplicado en los POC [28].

La técnica basada en ADN y proteínas se presenta como una técnica que tiene una metodología sencilla, es fácil de realizar y no requiere equipo especializado. Tampoco requiere una amplificación de ADN por lo que facilita el desarrollo de la técnica en lugares con escasos recursos. La sensibilidad y la especificidad fueron altas y en cuanto al equipo necesario para la detección se requiere un proyector ultravioleta. En este caso el aparato no es excesivamente caro por lo que podría ser una técnica que cumple con todos los requisitos para ser aplicada en el diagnóstico de campo [29].

Los métodos de nanodiagnóstico mas prometedores son los basados en ADN y ARN y que no requieren amplificación por PCR. Estos métodos cumplen con las características y los criterios necesarios para poder ser aplicados en los POC y paliar los problemas a la hora de diagnosticar la leishmaniasis.

## **8. Conclusiones**

Los métodos de nanodiagnóstico para la detección de *Leishmania* han avanzado en los últimos años con el objetivo de mejorar los métodos convencionales. Sin embargo, a pesar de sus ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad y el aspecto económico reducido en alguno de los métodos, son pocos los que han conseguido aplicarse en la práctica clínica. Los métodos que a priori parecen estar más cerca de solucionar el problema del diagnóstico de la leishmaniasis son los nanodiagnósticos basados en

ácidos nucleicos sin amplificación de ADN o ARN , ya que estos pueden ser aplicados para diagnosticar cualquier especie de *Leishmania*, son aplicables en el diagnóstico de campo y son capaces de detectar la presencia del parásito o sus restos, lo que elimina la posibilidad de diagnosticar a una persona sana con anticuerpos como enferma de leishmaniasis. A pesar de la baja aplicación clínica actual, la nanotecnología sigue evolucionando a pasos agigantados para poder ofrecer un método basado en nanopartículas que sea 100% aplicable al diagnóstico de la leishmaniasis.

## 9. Bibliografía

- [1] Tallury P, Malhotra A, Byrne LM, Santra S. (2010). Nanobioimaging and sensing of infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*,62(4-5), 424-437. Doi 10.1016/j.addr.2009.11.014
- [2] Organización Mundial de la Salud (2021) Leishmaniasis. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- [3] Singh OP, Gedda MR, Mudavath SL, Srivastava ON, Sundar S. (2019). Envisioning the innovations in nanomedicine to combat visceral leishmaniasis: for future theranostic application. *Nanomedicine (Lond)*, 14 (14), 1911-1927. doi: 10.2217 / nnm-2018-0448.
- [4] De Brito, RCF *et al*; (2020). Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104, 8105–8116. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10846-y>
- [5] Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,105, 1-6. Doi 10.1016 / j. trstmh.2010.09.006.
- [6] Gedda, M. R., Madhukar, P., Shukla, A., Mudavath, S. L., Srivastava, O. N., Singh, O. P., & Sundar, S. (2021). Nanodiagnostics in leishmaniasis: A new frontiers for early elimination. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(2), e1675. Doi 10.1002/wnan.1675.

- [7] Attar, Z. J., Chance, M. L., el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M, Hommel, M. (2001). Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, 78(1), 11–16. Doi 10.1016 / s0001-706x (00) 00155-8.
- [8] Rijal, S et al; (2004). Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 9(6), 724–729. Doi 10.1111 / j.1365-3156.2004.01251. x.
- [9] Riera, C et al; (2004). Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23(12), 899–904. Doi 10.1007 / s10096-004-1249-7.
- [10] Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(2), 1–20. Doi 10.1007 / s12639-020-01212-w.
- [11] Iqbal, J., Hira, P. R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Mada, P. J., & Sher, A. (2002). Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 475–479. Doi 10.1128 / JCM.40.3.475-479.2001.
- [12] Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). *Diagnosis of leishmaniasis. Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 961–972. Doi 10.3855 / jidc.4310.
- [13] Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., & Boelaert, M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 333(7571), 723. Doi 10.1136 / bmj.38917.503056.7C.
- [14] Boelaert, M., El Safi, S., Mousa, H., Githure, J., Mbatia, P., Gurubacharya, V. I., Van der Stuyft, P. (1999). Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 4(1), 31–37

- [15] Schallig, H. D., Schoone, G. J., Kroon, C. C., Hailu, A., Chappuis, F., & Veeken, H. (2001). Development and application of “simple” diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, *190*(1–2), 69–71. Doi 10.1007 / s004300100083.
- [16] Freire, M. L., Machado de Assis, T., Oliveira, E., Moreira de Avelar, D., Siqueira, I. C., Barral, A., Cota, G. (2019). Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(7), e0007484. Doi 10.1371 / journal.pntd.0007484.
- [17] Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M. C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E. M., Reed, S. G. (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, *173*(3), 758–761. Doi 10.1093 / infdis / 173.3.758
- [18] Ryan, J. R., Smithyman, A. M., Rajasekariah, G.-H., Hochberg, L., Stiteler, J. M., & Martin, S. K. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(3), 1037–1043. Doi 10.1128 / JCM.40.3.1037-1043.2002.
- [19] Palatnik-de-Sousa, C. B., Gomes, E. M., Paraguai-de-Souza, E., Palatnik, M., Luz, K., & Borojevic, R. (1995). *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *89*(4), 390–393. Doi 10.1016 / 0035-9203 (95) 90022-5.
- [20] Merdekios, B., Pareyn, M., Tadesse, D., Eligo, N., Kassa, M., Jacobs, B. K. M., Cnops, L. (2021). Evaluation of conventional and four real-time PCR methods for the detection of *Leishmania* on field-collected samples in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(1), e0008903. Doi 10.1371 / journal. pntd.0008903.
- [21] Toubanaki, D. K., Athanasiou, E., & Karagouni, E. (2016). Gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid visual detection of *Leishmania*-specific DNA amplification products. *Journal of Microbiological Methods*, *127*, 51–58. Doi 10.1016 / j. mimet.2016.05.027

- [22] Heli, H., Sattarahmady, N., Hatam, G., Reisi, F., & Vais, R. D. (2016). An electrochemical genosensor for *Leishmania major* detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. *Talanta*, *156*, 172–179.
- [23] Bose, P. P., Kumar, P., & Munagala, N. (2015). Concurrent visual diagnosis and susceptibility profiling of the first line drug against visceral leishmaniasis by plasmonic detection of PCR amplified genetic biomarker. *Acta Tropica*, *152*, 208–214
- [24] Andreadou, M., Liandris, E., Gazouli, M., Taka, S., Antoniou, M., Theodoropoulos, G., ... Kasampalidis, I. (2014). A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, *96*, 56–61.
- [25] Bose, P. P., & Kumar, P. (2016). Visual assessment of parasitic burden in infected macrophage by plasmonic detection of leishmania specific marker RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *480*(1), 81–86
- [26] Anfossi, L., Di Nardo, F., Profiti, M., Nogarol, C., Cavalera, S., Baggiani, C., ... Mignone, W. (2018). A versatile and sensitive lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(17), 4123–4134.
- [27] Souto, D. E., Fonseca, A. M., Barragan, J. T., de CS Luz, R., Andrade, H. M., Damos, F. S., & Kubota, L. T. (2015). SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in *Leishmania infantum* immobilised on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: A potential use in immunodiagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, *70*, 275–281.
- [28] Perinoto, A. C., Maki, R. M., Colhone, M. C., Santos, F. R., Migliaccio, V., Daghestanli, K. R., ... de Oliveira, M. C. (2010). Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: Innovations in bioanalytics for a neglected disease. *Analytical Chemistry*, *82*(23), 9763–9768.
- [29] Andreadou, M., Liandris, E., Gazouli, M., Mataragka, A., Tachtsidis, I., Goutas, N., Ikononopoulos, J. (2016). Detection of *Leishmania*-specific DNA and

surface antigens using a combination of functionalized magnetic beads and cadmium selenite quantum dots. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 62–67.

[30] Tram, D. T. N., Wang, H., Sugiarto, S., Li, T., Ang, W. H., Lee, C., & Pastorin, G. (2016). Advances in nanomaterials and their applications in point of care (POC) devices for the diagnosis of infectious diseases. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1275–1288. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127209/>.

[31] Wang, Y., Yu, L., Kong, X., & Sun, L. (2017). Application of nanodiagnostics in point-of-care tests for infectious diseases. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4789–4803. Doi 10.2147 / IJN.S137338.

[32] Chen, H., Liu, K., Li, Z., & Wang, P. (2019). Point of care testing for infectious diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 493, 138–147. Doi 10.1016 / j.cca.2019.03.008

[33] Kozel, T. R., & Burnham-Marusich, A. R. (2017). Point-of-care testing for infectious diseases: Past, present, and future. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2313–2320. doi: 10.1128 / JCM.00476-17.

[34] Baptista, P. V. (2014). Nanodiagnostics: leaving the research lab to enter the clinics? *Diagnosis (Berlin, Germany)*, 1(4), 305–309. Doi 10.1515 / dx-2014-0055.