

DISPOSITIVO PORTÁTIL PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M. Acevedo¹, M. Mass¹, M. Roberti¹, J. Marinoni¹, D. Ricalde¹, L. Fraigi¹, G. Ybarra², M. Radrizzani³
¹INTI Micro y Nanoelectrónica del Bicentenario, ²INTI Procesos Superficiales
³UNSAM Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular
mmass@inti.gov.ar

Introducción

El diagnóstico molecular procura la determinación de la causa de una enfermedad mediante la detección de secuencias específicas del código genético. En el caso de enfermedades infecciosas, por ejemplo, se busca identificar secuencias características de ciertos agentes patógenos. Una de las técnicas más empleadas para este tipo de diagnóstico es la de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con el fin de amplificar e identificar secuencias de ADN. La técnica de la PCR requiere de una serie de ciclos térmicos con cambios abruptos de temperatura, por lo que debe emplearse un equipamiento capaz de un control muy fino de la temperatura.

En contraste con la PCR, la técnica LAMP (*Loop-Mediated isothermal Amplification*) permite la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos. El proceso a temperatura constante elimina la necesidad de los ciclos térmicos y posibilita el desarrollo de dispositivos más sencillos de diagnóstico molecular con la robustez, el bajo costo y la portabilidad típicos del diagnóstico en el sitio de atención.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un dispositivo portátil para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, aprovechando la portabilidad que ofrece el método, utilizando materiales no tradicionales, obteniendo así un dispositivo innovador en el mercado local, simple de utilizar y económico.

Descripción

El equipo fue diseñado de acuerdo a los requerimientos de médicos y veterinarios para resolver la presencia o ausencia de un patógeno. La muestra se toma por hisopado de la región infectada y se agrega a un tubo de 0,5 ml de volumen que contiene la solución de reacción liofilizada.

El equipo calienta durante 60 minutos a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ y luego se eleva la temperatura a 90°C durante 5 minutos para detener la reacción. Al finalizar el ciclo, el colorante se mezcla con los productos de la reacción y se hace la lectura óptica con los LEDs incorporados (Figura 1).

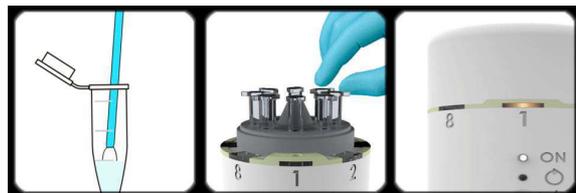


Figura 1. Secuencia del método de diagnóstico molecular LAMP en tres pasos: toma de muestra, amplificación isotérmica y detección óptica.

El diseño del equipo se basó en un sistema de distribución radial (Figura 2). La fabricación de los prototipos finales, se realizó con material de ABS (*Acrilonitrilo Butadieno Estireno*), utilizando la impresora 3D uPrint SE, instalada en los laboratorios de INTI-CMNB.

Para transferir correctamente el calor generado por el elemento calefactor hacia los tubos Eppendorf se utilizó una silicona con buena conductividad térmica, flexible y de fácil moldeo.

Una vez colocadas las muestras, el proceso de amplificación se realiza dentro del equipo y no se vuelven a tocar los tubos, lo cual disminuye la probabilidad de contaminación. Posee una tapa con ajuste magnético automático que previene el mal uso. Cada pocillo posee un LED azul y una ventanilla con un filtro naranja que permite visualizar la reacción cuando hubo amplificación. A diferencia de otros sistemas, el colorante no es tóxico y no utiliza luz ultravioleta.

Se eligió un sistema de control por lógica difusa, el cual permite el ajuste de las rampas de temperatura en rangos más acotados.



Figura 2. Render del dispositivo con diseño radial, para una mejor distribución del calor.

Resultados

Se realizaron pruebas para la detección de *Brucella abortus*. Esta bacteria, como así también el *Mycobacterium bovis*, es causante de enfermedades bovinas que se buscan erradicar, por lo cual el ensayo en los tambos sería de suma utilidad para comercializar leche segura.

Mediante electroforesis se comprobaron los controles negativos (Figura 3, calles 1-4) y el control positivo de la amplificación (Figura 3, calle 5). Además se analizaron diferentes cantidades de copias para determinar el límite de detección de la técnica (Figura 3, calles 6-11).

El procedimiento no detectó contaminaciones, respetando los límites de detección (30 copias de bacteria).

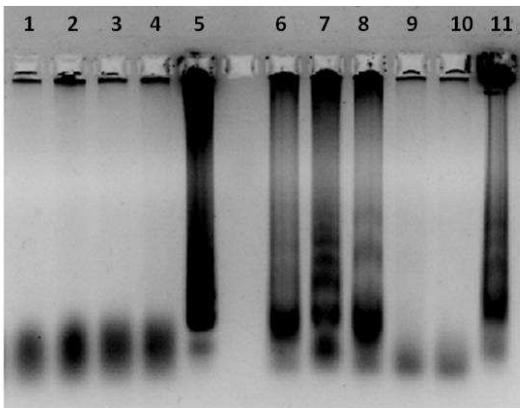


Figura 3. Electroforesis del producto de las amplificaciones LAMP obtenidas para el diagnóstico de Brucelosis bovina.

Conclusiones

Se fabricaron dos prototipos funcionales, compactos, portátiles y de bajo costo que permiten realizar el diagnóstico molecular mediante amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (Figura 4).

Se caracterizó su funcionamiento con un sistema de cebadores ya probado, obteniendo resultados comparables con los arrojados por los equipos de laboratorio comerciales.



Figura 4. Primer prototipo funcional fabricado en INTI-CMNB.