

Diseño y Puesta a Punto de Pruebas “*Point-of-Care Testing*” para el Diagnóstico de Zoonosis Locales Basadas en Partículas de Látex

V. Garcia^(a), V. Gonzalez^(a), L. Gugliotta^(a)

^(a) Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización (INTEC-CONICET-UNL), Santa Fe, Argentina

Autor principal: lgug@intec.unl.edu.ar

El uso de pruebas de diagnóstico en el punto de atención (Point-of-Care - POC) se define como la práctica de realizar ensayos a partir de especímenes clínicos al lado de o cerca del paciente, bajo la premisa que los resultados de las pruebas estarán disponibles de inmediato, o dentro de un período de tiempo muy breve (usualmente minutos), con el objetivo de proveer información útil al personal de salud en la toma de decisiones referentes al diagnóstico y tratamiento. Los inmunoensayos de flujo lateral (lateral flow immunoassays, LFIA), y los ensayos de inmunoaglutinación (IA) se encuentran entre los métodos de diagnóstico POC más establecidos que se hayan aplicado con éxito en entornos remotos con poca o ninguna infraestructura de laboratorio (zonas rurales sin conexión directa con centros médicos, zonas de emergencia o países en vías de desarrollo). Actualmente, los látex poliméricos son objeto de un interés creciente por sus aplicaciones en el campo de la biomedicina como soportes de biomoléculas, debido a la versatilidad de las polimerizaciones en medio disperso para producir partículas de látex con distribución de tamaño de partícula, tipo y densidad de grupos superficiales controlados.

La tecnología aquí presentada se basa en el diseño y puesta a punto de un dispositivo de LFIA y de un ensayo de IA a través de la utilización de proteínas antigénicas recombinantes específicas de zoonosis endémicas de la Argentina, y de partículas de látex, diseñadas, sintetizadas y caracterizadas en nuestro Grupo. El desarrollo involucra las siguientes etapas:

1) *Síntesis y caracterización de partículas de látex*: se sintetizaron y caracterizaron partículas de látex con funcionalidad carboxilo de diferentes tamaños y color (Figura 1a). La síntesis de partículas blancas con morfología “*core-shell*” se realizó mediante copolimerización en emulsión “*semibatch*” de estireno y ácido metacrílico sobre siembras monodispersas de poliestireno y en ausencia de emulsificante; mientras que para la síntesis de partículas coloreadas, primero se sintetizó el monómero coloreado a partir de fucsina básica y metacrilato de glicidilo y luego se realizó una copolimerización “*batch*” de estireno, el monómero coloreado y ácido metacrílico, empleando MA-80 como emulsificante. En todos los casos, previo al uso de los látex producidos se procedió a su caracterización: i) superficial (densidad de carga y densidad de grupos funcionales mediante titulación conductimétrica, concentración crítica de coagulación y potencial zeta); y ii) morfológica (tamaños medios y distribución por microscopia TEM y/o SEM, dispersión de luz dinámica y turbidimetría). Entre las ventajas que presentan las partículas de látex respecto a otros nanomateriales que pueden ser utilizados en el diseño de pruebas POC, se destaca la posibilidad de obtenerlas en gran cantidad, con tamaño y dispersidad deseada, en una amplia gama de colores y con la funcionalidad (aldehído; carboxilo; acetal; hidroxilo; clorometilo; amino) y carga superficial requerida.

2) *Obtención de complejos látex-proteína*: se realizó el acoplamiento covalente de la proteína recombinante específica de la zoonosis a determinar sobre los grupos carboxilos superficiales de las partículas de látex en experimentos de tipo “*batch*”, bajo agitación y a temperatura ambiente. Para este proceso, denominado sensibilización, se efectuó simultáneamente la activación de los grupos carboxilo,

utilizando una carbodiimida soluble en agua. La unión covalente, a diferencia de la adsorción física, es más fuerte, estable y se puede inducir una orientación preferencial de la proteína sobre la superficie. En consecuencia, se evitan los problemas de relajación, desorción, intercambio con otras moléculas y compromiso de los sitios biológicamente activos con la superficie, que presenta la adsorción física.

iii) *Búsqueda de las condiciones óptimas de aplicación:* la puesta a punto de un inmunoensayo es compleja debido a la gran cantidad de componentes críticos involucrados para producir un reactivo funcional. Cambiar un material o reactivo afecta el rendimiento de otros. En nuestro caso, se emplearon sueros controles y se evaluó la influencia de distintas condiciones sobre los inmunoensayos de IA y LFIA, tales como: concentración del complejo látex-proteína; dilución del suero; composición de los buffers utilizados; tiempo de lectura del resultado entre otras, hasta encontrar aquellas que permitan obtener la sensibilidad y especificidad deseadas.

iv) *Aplicación frente a un panel de sueros:* utilizando las condiciones óptimas antes estudiadas, se evaluó el desempeño de los complejos látex-proteína obtenidos en ensayos de IA y LFIA, frente a un pequeño panel de sueros previamente clasificados mediante técnicas de referencia.

El trabajo desarrollado permitió obtener partículas de tamaño, funcionalidad, estabilidad coloidal e incorporación de color adecuadas para su utilización en ensayos de diagnóstico. Sobre la base de estas partículas y de distintas proteínas antigénicas se sintetizaron complejos para una variedad de aplicaciones, que incluyeron la detección de Chagas, Toxoplasmosis, Leptospirosis, Leishmaniosis Canina y Paratuberculosis Bovina. En todos los casos, la proteína unida covalentemente representó más del 90% de la proteína unida total. En los ensayos de IA, se observó una discriminación significativa entre el suero positivo y el negativo después de 2 minutos; pudiendo extenderse la lectura hasta los 8-10 minutos. En el caso de los ensayos de LFIA, la lectura se llevó a cabo a los 10 minutos de poner en contacto la muestra con la tira reactiva. La presencia de dos líneas (línea de test "T" y línea control "C") es indicativa de que la muestra es positiva, mientras que presencia de solo la línea C es indicativa de que la muestra es negativa y de que el test funcionó correctamente. Con ambas técnicas se consiguieron valores de sensibilidad y especificidad superiores al 85%. En la Figura 1b se muestran resultados de ambos ensayos para la detección de Leishmaniosis Canina.

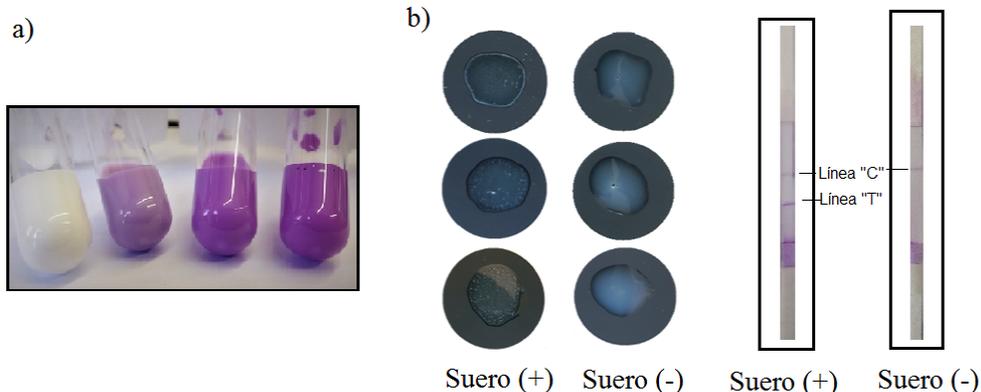


Figura 1. a) Diferentes látex obtenidos durante el desarrollo del trabajo; b) Aplicación de los complejos látex-proteínas en ensayos de IA y LFIA utilizando sueros previamente clasificados.

Los resultados obtenidos, indican que los reactivos generados a partir de las partículas de látex presentan resultados prometedores para ser aplicados en el diseño de kits de diagnóstico rápido.



**19° Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales
CONAMET-SAM**

*3-7 de noviembre de 2019
Valdivia-Chile*

Palabras claves: Inmunocromatografía de Flujo Lateral, Inmunoaglutinación, Partículas de Látex

Área de interés: 13.Biomateriales

Tipo de presentación: Oral () Poster ()