

# Advances in the development and manufacture of biophotonic devices (Point of Care) with application to molecular diagnosis

## Avances en el desarrollo y fabricación de dispositivos biofotónicos (Point of Care) con aplicación al diagnóstico molecular

Damián Presti<sup>1,\*</sup>, Julián Bergier<sup>1</sup>, Lucas Ripoll<sup>1</sup>, Cristina Borio<sup>1</sup>, Marcos Bilen<sup>1</sup>, Gustavo A. Torchia,<sup>2,3</sup>

*1. Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, Bernal, Buenos Aires, Argentina*

*2. Centro de Investigaciones Ópticas CONICET – CIC BA - UNLP, Centenario y 506, Gonnet, Argentina*

*3. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, Bernal, Buenos Aires, Argentina*

(\*)E-mail: damian.presti@unq.edu.ar

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Received: 16/02/2023

Accepted: 16/06/2023

DOI: 10.7149/OPA.56.2.51128

### ABSTRACT:

Technological developments in the area of disease diagnosis have always been key to preserving health. A very marked trend are the rapid and decentralized diagnoses, called Point of Care. This concept focuses on the idea of reducing a complete laboratory analysis in a small device without losing specificity and sensitivity. In particular, we focus on the use of photonic and engineering technologies for the development and subsequent construction of Point of Care molecular detection devices, which allow rapid, efficient and low-cost detection of high-impact pathogens in the health area. The device excites the sample to be analyzed with a semiconductor laser, thus it triggers a spontaneous emission of the fluorophore bound to the specific probe. Under these conditions, a signal is registered and depending on this level, defines the case as positive or negative. All the analysis is done autonomously inside the developed device through an integrated control system and it is connected to a portable device to show the results wirelessly. This work shows and compares advances in the process of development, calibration, tuning and validation of these molecular diagnostic device prototypes.

**Key words:** Point of care, Molecular diagnostic, Biosensing, SARS-CoV-2.

### RESUMEN:

Los desarrollos tecnológicos en el área de diagnóstico de enfermedades siempre han sido claves para la preservación de la salud. Una tendencia muy marcada son los diagnósticos rápidos y descentralizados, llamados Point of Care. Este concepto se centra en la idea de reducir un análisis de laboratorio completo en un dispositivo de pequeño tamaño sin perder especificidad y sensibilidad.

En particular, nos enfocamos en el uso de tecnologías fotónicas y de ingeniería para el desarrollo y posterior construcción de dispositivos de detección molecular Point of Care, que permiten la detección rápida, eficiente y de bajo costo de patógenos de alto impacto en el área de la salud. El dispositivo excita la muestra a analizar con un láser semiconductor, por lo que desencadena una emisión espontánea del fluoróforo unido a una sonda específica. En estas condiciones, se registra una señal y en función de este nivel, se define el caso como positivo o negativo. Todo el análisis se realiza de forma autónoma dentro del dispositivo desarrollado a través de un sistema de control integrado y se conecta a un dispositivo portátil para mostrar los resultados de forma inalámbrica. Este trabajo muestra y compara los avances en el proceso de desarrollo, calibración, puesta a punto y validación de estos prototipos de dispositivos de diagnóstico molecular.

**Palabras clave:** Point of care, Diagnóstico molecular, Biosensado, SARS-CoV-2.

## REFERENCES AND LINKS / REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] N. T. Darwish, S. D. Sekaran, and S. M. Khor, “Point-of-care tests: A review of advances in the emerging diagnostic tools for dengue virus infection,” *Sensors and Actuators B: Chemical* **255**, 3316–3331 (2018). URL <https://doi.org/10.1016%2Fj.snb.2017.09.159>.
- [2] S. Vashist, “Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends,” *Biosensors* **7**(4), 62 (2017). URL <https://doi.org/10.3390>.
- [3] J. Liu, Z. Geng, Z. Fan, J. Liu, and H. Chen, “Point-of-care testing based on smartphone: The current state-of-the-art (2017–2018),” *Biosensors and Bioelectronics* **132**, 17–37 (2019). URL <https://doi.org/10.1016%2Fj.bios.2019.01.068>.
- [4] H. Lee, Y. J. Hong, S. Baik, T. Hyeon, and D.-H. Kim, “Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device,” *Advanced Healthcare Materials* **7**(8), 1701,150 (2018). URL <https://doi.org/10.1002%2Fadhm.201701150>.
- [5] K. M. Koczula and A. Gallotta, “Lateral flow assays,” *Essays in Biochemistry* **60**(1), 111–120 (2016). URL <https://doi.org/10.1042%2Febc20150012>.
- [6] E. Engvall and P. Perlmann, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G,” *Immunochemistry* **8**(9), 871–874 (1971). URL <https://doi.org/10.1016%2F0019-2791%2871%2990454-x>.
- [7] R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, and H. Erlich, “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase,” *Science* **239**(4839), 487–491 (1988). URL <https://doi.org/10.1126%2Fscience.239.4839.487>.
- [8] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, “Real time quantitative PCR,” *Genome Research* **6**(10), 986–994 (1996). URL <https://doi.org/10.1101%2Fgr.6.10.986>.
- [9] M. A. A. Valones, R. L. Guimarães, L. A. C. Brandão, P. R. E. de Souza, A. de Albuquerque Tavares Carvalho, and S. Crovela, “Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review,” *Brazilian Journal of Microbiology* **40**(1), 1–11 (2009). URL <https://doi.org/10.1590%2Fs1517-83822009000100001>.
- [10] D. A. Presti, J. Bergier, J. M. Valdiviezo, M. Bilen, and G. A. Torchia, “Development and construction of a point of care device for application to molecular diagnostics,” in *Molecular and Nano Machines IV*, Z. Sekkat and T. Omatsu, eds., vol. 11812, pp. 18 – 25, International Society for Optics and Photonics (SPIE, 2021). URL <https://doi.org/10.1117/12.2598458>.
- [11] D. Presti, J. Bergier, L. Ripoll, C. Borio, G. A. Torchia, and M. Bilen, “Point-of-care real-time DNA detection device for SARS-CoV-2 from clinical samples,” *Journal of the Optical Society of America A* **40**(4) (2023). URL <https://doi.org/10.1364/JOSAA.479058>.
- [12] S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, and M. J. Lobo-Castañón, “Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410**(3), 679–693 (2017). URL <https://doi.org/10.1007%2Fs00216-017-0620-3>.
- [13] T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification of DNA,” *Nucleic Acids Research* **28**(12), 63e–63 (2000). URL <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F28.12.e63>.
- [14] R. Hussain, A. E. Ongaro, M. L. R. de la Concepción, E. Wajs, E. Riveira-Muñoz, E. Ballana, J. Blanco, R. Toledo, A. Chamorro, M. Massanella, L. Mateu, E. Grau, B. Clotet, J. Carrillo, and V. Pruneri, “Small form factor flow virometer for SARS-CoV-2,” *Biomedical Optics Express* **13**(3), 1609 (2022). URL <https://doi.org/10.1364%2Fboe.450212>.
- [15] J.-S. Hwang, C. Y. Park, H. J. Song, Y. S. Kim, J. Kim, and J. D. Kim, “Fluorescence detection using smartphone camera for PCR chips,” in *Biophysics, Biology and Biophotonics IV: the Crossroads*, A. Wax and V. Backman, eds. (SPIE, 2019). URL <https://doi.org/10.1117%2F12.2509285>.
- [16] N. Pires, T. Dong, U. Hanke, and N. Hoivik, “Recent Developments in Optical Detection Technologies in Lab-on-a-Chip Devices for Biosensing Applications,” *Sensors* **14**(8), 15,458–15,479 (2014). URL <https://doi.org/10.3390%2Fs140815458>.
- [17] J.-S. Hwang, J.-D. Kim, Y.-S. Kim, H.-J. Song, and C.-Y. Park, “Comparison of Real-time Polymerase Chain Reaction Results by Different Illumination Methods,” *Sensors and Materials* **1**, 397 (2018). URL <https://doi.org/10.18494%2Fsam.2018.1760>.



- [18] A. Ganguli, A. Ornob, H. Yu, G. L. Damhorst, W. Chen, F. Sun, A. Bhuiya, B. T. Cunningham, and R. Bashir, “Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care,” *Biomedical Microdevices* **19**(4) (2017). URL <https://doi.org/10.1007%2Fs10544-017-0209-9>.
- [19] M. D. Mackenzie and A. K. Kar, “Microfluidic devices and biological lasers for biophotonic applications,” *Journal of Physics: Conference Series* **1151**, 012,001 (2019). URL <https://doi.org/10.1088%2F1742-6596%2F1151%2F1%2F012001>.
- [20] S. A. E. Marras, *Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes*, pp. 3–16 (Humana Press, Totowa, NJ, 2006). URL <https://doi.org/10.1385/1-59745-069-3:3>.

## 1. Introducción

Los dispositivos para pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia, PoCT (de las siglas en inglés: Point Of Care Testing) se centran en la idea de reducir un análisis de laboratorio completo en un dispositivo de pequeño tamaño, que permita la preparación, transporte, reacción y análisis de reactivos, sin pérdida de eficiencia y precisión de medición y fundamentalmente que pueda realizarse en centros de baja complejidad [1–3]. Estos sistemas son ampliamente utilizados para el diagnóstico de diversas patologías. Las plataformas más exitosas son las basadas en reacciones electroquímicas (ej. medición de glucosa) [4] y las de flujo lateral (ej. diagnóstico de embarazo) [5]. En particular se destacan por: permitir el diagnóstico sobre una muestra directa (suero, sangre, orina, saliva), obtener resultados rápidos y no requerir de equipos adicionales para su detección/ revelado. Estos dispositivos integran múltiples áreas disciplinares en función de sus características (biotecnología, electrónica, microfluídica, fotónica, entre otras). Por lo tanto, estos sistemas poseen la particularidad de confluir múltiples áreas tecnológicas para un objetivo común, en nuestro caso: desarrollar dispositivos bio-fotónicos para el diagnóstico molecular.

Las metodologías más utilizadas para la detección de virus se basan en métodos serológicos (ELISA) [6] o de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR por sus siglas en inglés) [7–9]. Para estas metodologías, en general son necesarios laboratorios de seguridad biológica equipados con equipos de alto costo, y tomando en cuenta la toma de las muestras, el envío al centro de diagnóstico y el tiempo de análisis, los resultados pueden demorar hasta varios días. En condiciones de baja demanda y urgencia, estos métodos logran cubrir las necesidades, pero lejos están de esta perspectiva en situaciones críticas. Estas últimas, requieren métodos de testeo con la misma exactitud, que puedan ser distribuidos fácilmente en sitios estratégicos para controlar la circulación de un virus y proporcionar datos descentralizados. Estos nuevos contextos globales generan la necesidad de disponer de herramientas de diagnóstico cada vez más rápidas, manteniendo sus parámetros de sensibilidad y repetibilidad y que puedan ser fácilmente distribuidas geográficamente.

En lo que respecta a desarrollos tecnológicos en el área de diagnóstico, con la pandemia del SARS-CoV-2, los sistemas científicos lograron posicionarse a la vanguardia desarrollando test serológicos, de antígenos y moleculares. En contextos de emergencia sanitaria, además de las vacunas, el método más efectivo para disminuir la propagación de contagios lo ha proporcionado la implementación de los test rápidos. Cuanto más test un país logre proporcionar, mejor conocerá la evolución de un virus; por ende, mejores serán sus estrategias de prevención. Los dispositivos presentados en este trabajo surgen desde esta perspectiva, buscando abrir paso a mejores sistemas de diagnóstico PoCT, siendo dispositivos que permitan dar un diagnóstico inmediato en centros de baja complejidad, disminuyendo costos, agilizando el análisis, interconectando datos en tiempo real y por sobre todo aumentando considerablemente los niveles de testeo en una población.

El objetivo principal de este desarrollo es el de combinar positivamente las técnicas existentes de detección para lograr una alternativa portátil en cuanto a test rápidos. Para esto se utilizaron test moleculares ya desarrollados y validados con RT-qPCR convencionales, pero en este caso realizando su reacción interna, sensado y análisis de datos mediante técnicas opto-electrónicas en un dispositivo portátil y de bajo costo. Esta nueva alternativa permite no sólo discretizar entre muestras positivas o negativas, sino reaccionar internamente la muestra (en otro caso habría que realizarlo con un equipo externo), realizar mediciones sin abrir la muestra y cuantificar la cantidad de virus presente en el paciente. De este modo se dispone de un dispositivo PoCT cuantitativo en tiempo real capaz de realizar test moleculares, con la capacidad de analizar todos los datos que usualmente requieren un análisis de RT-qPCR convencional.

## 2. Materiales y métodos

A partir del 2020, con la pandemia del SARS-CoV-2, en el Laboratorio de Ingeniería Genética, Biología Molecular y Celular (LIGBCM) de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina) se empezaron a desarrollar dispositivos PoCT con aplicación al diagnóstico molecular. Los dispositivos de pequeñas dimensiones (cubos de 10 cm de cada lado), permiten al usuario alojar y analizar de a una muestra por vez. En esencia, tienen tres aspectos fundamentales: el sistema de control térmico, el sistema de detección óptica y el sistema de procesamiento de datos. El



control de temperatura es el necesario para un proceso de amplificación molecular exitoso, ya que el ácido desoxirribonucleico (ADN) debe someterse a procesos de desnaturalización, hibridación y extensión en un entorno con una temperatura controlada. El sistema de detección óptica es el encargado de reconocer la amplificación del ADN representado en la señal de fluorescencia recogida por el sistema de detección. Por último se cuenta con un sistema de procesamiento y análisis de datos y posterior comunicación. En la Figura 1 se puede observar el despiece esquemático del dispositivo y su diagrama de conexiones.

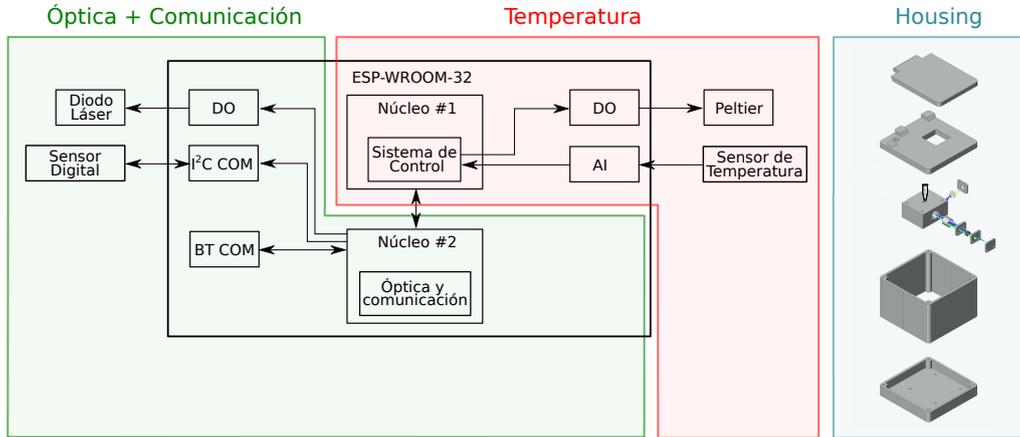


Fig. 1. Dispositivo PoCT de diagnóstico molecular por fluorescencia: Diseño esquemático de la estructura del dispositivo y diagrama de conexión electrónica: DO = salida digital, AI = entrada analógica, BT COM = comunicación Bluetooth.

Bajo la configuración mencionada, se han desarrollado al día de la fecha tres versiones de estos dispositivos llamados D<sup>3</sup> (por sus siglas en inglés: DNA Detection Device). Los dos primeros ya han sido reportados: D<sup>3</sup> versión 1 [10] y D<sup>3</sup> versión 2 [11]. El D<sup>3</sup> versión 3, presentado en este trabajo, posee una nueva configuración en el sistema de control térmico y óptico. Esta actualización genera mejoras en las lecturas de fluorescencia durante el proceso de amplificación molecular y posterior análisis de datos, que se discuten en este trabajo. En la Figura 2 pueden observarse las tres versiones de los dispositivos PoCT desarrollados.



Fig. 2. Fotografía de los dispositivos PoCT desarrollados. De izquierda a derecha: versión 1, 2 y 3.

## 2.1. Sistema de control térmico

Los dispositivos poseen un alojamiento para la muestra con un sistema de control térmico, este proporciona la temperatura de amplificación adecuada para generar su reacción interna [12, 13].

Por un lado, el sistema de control térmico está compuesto por un módulo peltier (CP18-M, CUI Devices, USA) adosado a un bloque de aluminio donde se aloja la muestra. Por otro lado, es monitoreado mediante un sensor de temperatura analógico (TMP36, Analog Devices, USA), que en su versión encapsulada TO92 permite embutirlo

dentro del bloque metálico y utilizarlo como módulo transductor de temperatura del bloque hacia el microcontrolador. Todo el conjunto es controlado mediante un sistema de control PI embebido en un microcontrolador (Huzzah32, Adafruit, USA).

## 2.2. Sistema de detección óptica

Existen numerosas plataformas para el revelado de las reacciones de amplificación molecular que pueden utilizarse en un dispositivo PoCT. Desde la tecnología de lateral flow, métodos colorimétricos, turbidimétricos, fluorescentes, luminiscentes, eléctricos, entre otros. Sin embargo, uno de los sistemas más eficientes y sensibles son sin duda los ópticos [14–17]. Estos presentan importantes ventajas sobre otros. Entre ellas cabe destacar la flexibilidad que conlleva la manipulación de la luz para obtener diversas señales en una única reacción, costos relativamente bajos, alta sensibilidad, miniaturización, cuantificación de la señal emitida y disponibilidad de diversas moléculas fluorescentes intercalantes del ADN, que en este caso, acoplados a sistemas de amplificación isotérmicos permiten detectar su presencia en una muestra y cuantificarla [18, 19]. Actualmente las técnicas de detección óptica son las más utilizadas en instrumentos comerciales.

En particular, el dispositivo PoCT de este trabajo utiliza la técnica de detección de fluorescencia inducida por láser, la cual se caracteriza por tener alta sensibilidad para su detección y un tiempo de respuesta rápido. Para esto se desarrolló un receptáculo de detección, que consta de un láser semiconductor, lentes, un filtro y un sensor óptico integrado para la detección de la banda fluorescente preestablecida. Las características ópticas de los láseres y filtros se ajustan a las propiedades de las moléculas fluorescentes utilizadas.

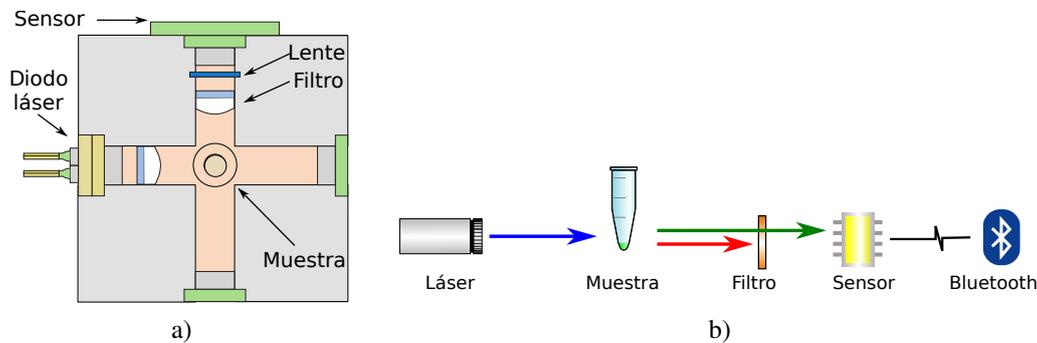


Fig. 3. Descripción esquemática de la distribución de elementos ópticos en el bloque de sensado: a) vista superior de la configuración de los elementos ópticos, b) esquemático ilustrativo del sistema de detección óptica.

Sobre la generación de la señal fluorescente, el marcador biológico utilizado es FAM (amidita de fluoresceína). Esta es una molécula fluorescente ampliamente utilizada en diagnóstico molecular, que tiene su pico de excitación y emisión a 495 nm y 520 nm, respectivamente [20]. En la Figura 3 puede verse la disposición y un esquemático de los elementos ópticos que integran el dispositivo. Se utiliza un láser semiconductor para excitar la muestra. La ventaja de usar una fuente láser en lugar de un LED u otras fuentes de luz radica en que, al ser espectralmente estrecha, evita la necesidad de utilizar filtros para eliminar las contribuciones de la fuente en la misma región de fluorescencia de la muestra. En este sentido, para desacoplar la excitación láser de la emisión de salida, una buena estrategia es utilizar un láser centrado en una longitud de onda alejada de la banda de emisión (pero dentro de la zona de excitación de la muestra). Como la fuente láser es muy energética, aún no estando cerca del máximo de excitación del fluoróforo, es suficiente para generar la excitación necesaria para producir fluorescencia. En nuestro caso usamos un diodo láser semiconductor centrado en 450 nm.

Después de excitar la muestra, en el momento de la detección es necesario filtrar la línea láser para dejar sólo la banda de emisión fluorescente. Para ello se utiliza un filtro interferométrico de alta transmisión ( $>95\%$ ). Este filtro está centrado en 525 nm con un ancho de banda espectral de 45 nm. La señal fluorescente de salida es detectada por un fotodiodo de la marca AMS de bajo costo. El módulo TSL2591 contiene dos fotodiodos y convertidores integradores analógico - digital que integran las corrientes provenientes de los fotodiodos (uno con mayor sensibilidad en el rango visible y otro en el infrarrojo). En este caso utilizamos un solo fotodiodo, que es el de mayor sensibilidad en la banda espectral de interés. Esta selección se realiza mediante software, ya que por hardware el integrado realiza las mediciones en conjunto con ambos fotodiodos, pero envía los resultados separados por cada canal. Otro parámetro fundamental a tener en cuenta es la estabilidad térmica del sensor óptico, ya que según su fabricante posee una deriva térmica de importancia en los rangos de temperatura empleados en el bloque térmico. Para evitar esta deriva, el sensor óptico se encuentra alejado del bloque térmico y aislado, esto es posible ya que la

luz se colecta mediante una lente y esta se enfoca en el sensor. La distancia focal de la lente genera la separación y aislación térmica necesaria. De este modo la diferencia térmica generada en el bloque de calentamiento no es apreciable de manera significativa para el sensor óptico.

Al momento de las mediciones se tiene en cuenta el fotoblanqueo biológico de las muestras. Por lo tanto, para cada muestra el láser se activa en una ventana de tiempo sincronizada con la apertura del sensor óptico, evitando así una sobreexposición del láser con la muestra. En este caso, el tiempo de medición es de 100 ms, que es el menor tiempo permitido por el control de fotodiodos. Para este tiempo, las lecturas de total oscuridad obtenidas con el sensor dentro del dispositivo, son en promedio de 8 cuentas. Durante todo el proceso de amplificación de la muestra, las mediciones se realizan cada 30 segundos. Toda la información es recopilada por el microprocesador y enviada a través de Bluetooth a un dispositivo inteligente o computadora.

### 2.3. Sistema de procesamiento de datos

Luego de la etapa de adquisición óptica, es necesario procesar los datos, visualizarlos, almacenarlos y realizar todo tipo de operaciones que el usuario necesite. Para esto, el dispositivo PoCT tiene la capacidad de analizar los datos ópticos colectados y conectarse vía Bluetooth a cualquier dispositivo con esta tecnología. Esta propiedad permite controlarlo íntegramente de manera portátil. De este modo la recolección y análisis de datos la realiza internamente el equipo, mientras que la visualización y recolección se lleva a cabo en el dispositivo portátil. Esta característica remarca dos ventajas esenciales, por un lado da la posibilidad de reducir las dimensiones del dispositivo mejorando su portabilidad y por otro permite independizarse de la necesidad de disponer de una computadora para la obtención de los resultados.

Adicionalmente, y en pos de mantener el dispositivo con un tamaño reducido y mayor portabilidad, se optó por utilizar una fuente de alimentación externa y de fácil acceso ante eventualidades de deterioro. Por lo tanto, el sistema utiliza una fuente comercial de un teléfono móvil de 5 VCC / 3 A con conexión microUSB. Los ensayos en este trabajo fueron realizados en condiciones de laboratorio, en particular con tendido de red eléctrica estabilizada según las reglamentaciones nacionales. Por lo tanto, en condiciones de mediciones en campo, es requisito una línea de alimentación estabilizada de similares características.

### 2.4. Muestras de pacientes y ética

Se utilizó un panel de muestras de ácido ribonucleico (ARN), purificadas a partir de hisopos nasofaríngeos y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras se obtuvieron del centro de diagnóstico COVID de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina), instituto autorizado por el Ministerio de Salud argentino para la detección del virus COVID-19 en muestras clínicas.

### 2.5. Preparación y tipo de muestras a utilizar

Un sistema de detección de ácido nucleico o molecular, requiere de tres etapas básicas. La extracción del ADN/ARN (Extracción), la multiplicación de la secuencia de ADN blanco (Amplificación), y la detección o revelado de la reacción (Detección). Con el objetivo de contar con sistemas de detección más rápidos y económicos y en formato PoCT, se han desarrollado diversos sistemas de amplificación de ácidos nucleicos que prescinden de sofisticados equipos. En este sentido, actualmente existen diversas tecnologías de amplificación isotérmica (a una única temperatura constante) de ácidos nucleicos, entre los cuales se encuentra Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), Rolling Circle Amplification (RCA), Recombinase Polymerase Amplification (RPA), Cross Priming Amplification (CPA), Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), entre otras.

El sistema de amplificación que se utilizará en nuestro dispositivo se llama ELA (Easy Loop Amplification, pendiente de patente) y es una variante mejorada de LAMP [13] desarrollado por la Universidad Nacional de Quilmes y Productos Bio-Lógicos S.A. En esta metodología se utilizan de 2 a 4 oligonucleótidos para realizar una amplificación isotérmica, con la adición de una sonda oligonucleotídica específica. En particular esta es una ventaja notable sobre otras tecnologías de amplificación isotérmica, ya que en su mayoría requieren entre 4 y 6 oligonucleótidos para su funcionamiento, complejizando la reacción y aumentando su costo de desarrollo y producción. Además, en cuanto a ELA, se destaca no sólo por ser más simple, sino por desarrollarse localmente; este es un factor fundamental en cuanto a la autonomía regional en la producción de insumos para los tests. Para establecer las condiciones de reacción necesarias, se tiene en cuenta que ELA es un sistema isotérmico, esto significa que la temperatura debe mantenerse constante durante todo el proceso, en este caso a  $63^{\circ}\text{C}$ . Para la detección fluorescente se utiliza una sonda de ADN marcada con FAM, que es específica de la secuencia objetivo (en este caso el gen E del SARS-CoV-2).

### 3. Resultados

#### 3.1. Configuración del sistema de control térmico

El sistema de control térmico es fundamental para el correcto desempeño de la amplificación molecular. Para este caso, al ser una reacción isotérmica, la temperatura del volumen de la reacción debe mantenerse constante. En versiones anteriores del dispositivo PoCT, el calentamiento de la muestra se realizaba desde una base plana en contacto con el tubo de muestra como se ve en la Figura 4 a). Este sistema genera un gradiente térmico estable, el cual se busca mejorar. Para esto, se maquinó un bloque térmico de aluminio que aloja el tubo de muestra en su interior y permite interrogarlo ópticamente desde un orificio transversal al mismo, como se puede observar en la Figura 4 b).

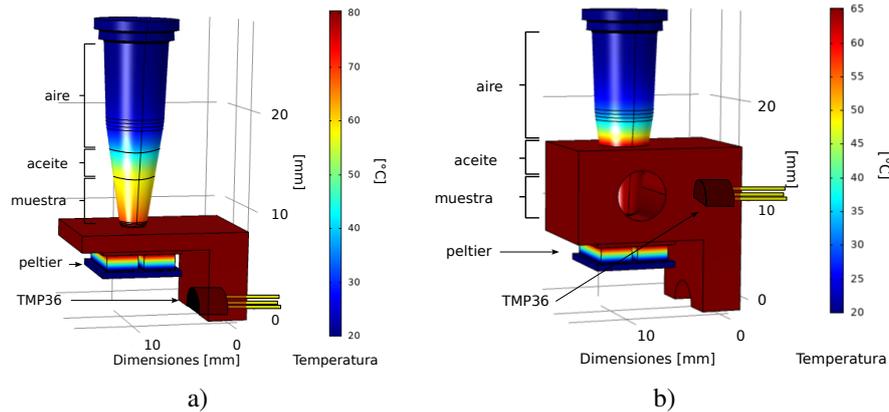


Fig. 4. Simulación de distribución térmica en tubos de muestras de 0.2 ml con placa peltier: a) D<sup>3</sup> versión 2 con base térmica, b) D<sup>3</sup> versión 3 con bloque térmico perforado. Puede observarse en cada figura las ubicaciones del sensor térmico para cada configuración.

Como puede verse, además de la disposición del sistema de calentamiento, en la figura se presenta la simulación numérica de la distribución térmica que se genera en el tubo de reacción. Para esto se tiene en cuenta la disposición y cantidad de volumen de la muestra en el tubo (30  $\mu$ l) y el aceite que se adiciona en la parte superior para evitar evaporaciones (20  $\mu$ l).

#### 3.2. Análisis de señal fluorescente con el sistema ELA

Al momento de realizar el análisis de las muestras, se utiliza FAM como marcador fluorescente, su señal luminiscente proporciona información sobre la cantidad de ácido nucleico presente durante el ciclo de amplificación. El aumento de esta señal es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de producto (amplicones), que se producen y acumulan exponencialmente durante la reacción. Las reacciones individuales se caracterizan por el ciclo o el momento en que la fluorescencia se eleva por primera vez por encima del umbral, que se denomina ciclo de umbral (CT, por sus siglas en inglés: Cycle Threshold) o tiempo de umbral (TT, por sus siglas en inglés: Time to Threshold). En el ensayo de RT-qPCR, se utiliza el valor de CT como un modo de cuantificar los ciclos térmicos transcurridos hasta el valor umbral de amplificación. Por otro lado, en la amplificación isotérmica se utiliza el valor de TT, que es el tiempo transcurrido desde el comienzo del ensayo hasta la amplificación umbral. En particular, TT incluye el tiempo de retrotranscripción (retrotranscripción + amplificación), que no está incluido en el valor de CT. Por lo tanto, el valor TT se puede usar para comparar todos los resultados de manera equitativa. Si el material de partida es abundante, se observa amplificación en tiempos más tempranos y el TT es menor. Si el material de partida es escaso, se observa amplificación en tiempos posteriores y el TT es mayor. Esta correlación entre fluorescencia, TT y cantidad de producto amplificado permite la cuantificación de muestras en un amplio rango dinámico. En un proceso de amplificación molecular, típicamente el análisis se prolonga hasta el momento donde se satura el sistema y en consecuencia la señal fluorescente deja de aumentar y se establece en cercanía a un valor fijo. Por el contrario, si no se produce una amplificación, la señal fluorescente en ningún momento se ve afectada en un aumento significativo de la señal.

En una primera instancia, se analiza el D<sup>3</sup> versión 3 con un conjunto de muestras patrón diseñadas en laboratorio. Esto quiere decir, muestras con una cantidad de virus conocido que permite analizar el desempeño de los resultados obtenidos. Los ensayos se realizaron a una temperatura promedio de 63°C constantes durante 80 minutos, con una precisión típica del sensor de  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Esta incerteza térmica, si bien es elevada en comparación con termocicladores comerciales, se encuentra dentro de los rangos comprobados de funcionamiento en la amplificación molecular de

ELA. La frecuencia de adquisición de datos es de una muestra cada 30 segundos para la señal fluorescente, con un tiempo de exposición de la muestra con la luz de excitación de 100 milisegundos por cada adquisición. En la Figura 5 pueden verse expresadas las curvas de temperatura y fluorescencia adquiridas.

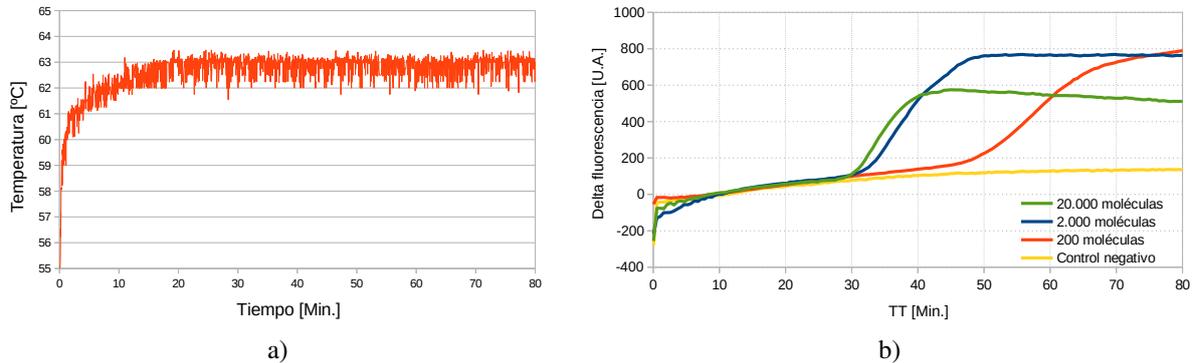


Fig. 5. Gráficos adquiridos durante el proceso de amplificación en el dispositivo D<sup>3</sup> versión 3: a) temperatura del bloque térmico, b) delta de fluorescencia de muestras.

Puede apreciarse en las curvas de fluorescencia, cómo a mayor carga viral (mayor número de moléculas) la amplificación molecular se produce antes (menor valor de TT). Por otro lado, también se introdujo un control negativo (sin carga viral) para corroborar la no amplificación molecular bajo esta circunstancia. Durante todo este proceso, el dispositivo controla la temperatura interna de reacción como se aprecia en la Figura 5 a). De estas gráficas se puede concluir el buen desempeño del dispositivo, dando como resultado curvas características de la metodología de amplificación molecular isotérmica. Dónde se puede distinguir claramente en las muestras positivas, un primer comportamiento sin amplificación, un quiebre y amplificación en cadena, y por último, una condición de saturación. Este primer ensayo, habilita a utilizar el dispositivo con muestras clínicas para una mejor evaluación de su desempeño.

### 3.3. Resultados en muestras clínicas

Se realizó un segundo análisis, donde se utilizó un conjunto de muestras de hisopados nasofaríngeos para la validación del dispositivo D<sup>3</sup> versión 3. Este conjunto de muestras se analizaron previamente con la metodología ELA en el dispositivo D<sup>3</sup> versión 2 y con la metodología de referencia RT-qPCR. La figura 6 representa los valores obtenidos para cada una de las 16 muestras en este proceso (S1-9: hisopados nasofaríngeos positivos, S10-14: hisopados nasofaríngeos negativos, CN: control negativo y CP: control positivo).

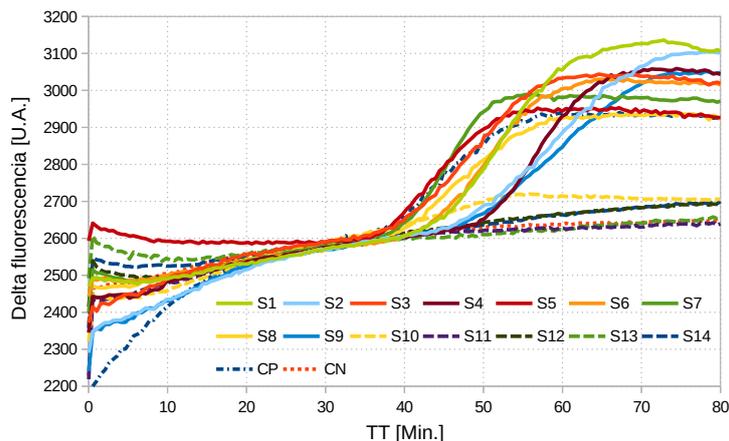


Fig. 6. Medición de señales fluorescentes en dispositivo D<sup>3</sup> versión 3 a través del tiempo. Se analizaron 16 muestras (S1-9: hisopados nasofaríngeos positivos, S10-14: hisopados nasofaríngeos negativos, CN: control negativo y CP: control positivo).

Como puede verse, todas las muestras positivas amplificaron su señal según los parámetros típicos de esta

técnica. Por el contrario, las muestras negativas continuaron con una señal sin amplificaciones espontáneas. Este resultado representa una Coincidencia de Porcentaje Positivo del 100% y una Coincidencia de Porcentaje Negativo del 100% con respecto a los resultados proporcionados por el centro de referencia que facilitó las muestras (dichos resultados obtenidos mediante RT-qPCR).

Como parámetro adicional, el progreso de las curvas de amplificación es el esperado para este tipo de ensayos, donde para las muestras positivas puede observarse una primera zona de amplificación paulatina, seguida de un cambio de pendiente espontánea y por último una zona de saturación. Esto indica una correcta amplificación molecular, por lo tanto una correcta homogeneidad de temperatura en toda la muestra. Esto último, refiere directamente al nuevo sistema térmico implementado en este dispositivo, ya que en versiones anteriores las curvas de amplificación no llegan a la zona de saturación. En particular, en éstos últimos casos donde las curvas de amplificación no llegan a una zona clara de saturación deben analizarse más en profundidad, ya que este tipo de comportamiento puede ser causa de una muestra con baja carga viral o por amplificaciones inespecíficas.

#### 4. Conclusiones

Los desarrollos tecnológicos PoCT en el área de diagnóstico de enfermedades cumplen un rol cada vez más importante en la preservación de la salud de las personas. Este concepto se centra en la idea de reducir un análisis de laboratorio completo en dispositivos de pequeño tamaño, brindando diagnósticos rápidos, descentralizados y sin perder especificidad.

En los últimos años, la pandemia del SARS-CoV-2 ha impulsado a nivel global la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico a gran escala. Si bien la RT-qPCR se ha utilizado como prueba de diagnóstico principal, la necesidad de descentralizar los centros de diagnósticos saturados ha creado la posibilidad de desarrollar dispositivos PoCT accesibles en áreas con recursos limitados.

Para lograr un dispositivo de diagnóstico molecular en una configuración PoCT, combinamos las técnicas de detección molecular existentes en una alternativa portátil. En este proceso, hemos desarrollado un dispositivo llamado D<sup>3</sup>, que utiliza el sistema de Easy Loop Amplification en una configuración de detección portátil. Este desarrollo reúne tres aspectos generales: estar dotado de un control térmico, un sistema de detección óptica de fluorescencia, y accesibilidad de control y visualización de resultados a través de un dispositivo inteligente. El funcionamiento de cada una de estas etapas brindó el correcto desempeño del dispositivo y la posibilidad de analizar las muestras de este trabajo.

En los ensayos realizados con el dispositivo D<sup>3</sup>, se analizaron 16 muestras. De los resultados se puede concluir el buen desempeño del dispositivo, logrando curvas características de la metodología de amplificación molecular isotérmica. Pudo distinguirse claramente en las muestras positivas, un primer comportamiento sin amplificación, un quiebre y amplificación en cadena, y por último, una condición de saturación. Dicho comportamiento indica una correcta amplificación molecular, por lo tanto una correcta homogeneidad de temperatura en la muestra durante todo el proceso. Este resultado se refiere directamente al nuevo sistema térmico implementado en este dispositivo, ya que en versiones anteriores del dispositivo, las curvas de amplificación no llegan a la zona de saturación. Por el contrario, los resultados de las muestras negativas continuaron con una señal sin amplificaciones espontáneas. En la versión actual del D<sup>3</sup>, los resultados encontrados representan una Coincidencia de Porcentaje Positivo del 100% y una Coincidencia de Porcentaje Negativo del 100% con respecto a los resultados proporcionados por el centro de referencia que facilitó las muestras (dichos resultados obtenidos mediante RT-qPCR).

En resumen, el dispositivo D<sup>3</sup> desarrollado en este trabajo tiene un buen parámetro de sensibilidad analítica para la metodología de amplificación molecular isotérmica, esto se refleja en la excelente correlación con el método de referencia RT-qPCR. El dispositivo fue construido principalmente con componentes simples y de bajo costo, por lo tanto, es posible construir un instrumento portátil, de alta eficiencia y bajo costo. Además, si bien en este trabajo se realizaron pruebas para detectar el SARS-CoV-2, el dispositivo es versátil para analizar otro tipo de muestras (patógenos) e incluso con otros marcadores fluorescentes. Las modificaciones necesarias para realizar la detección de otras enfermedades involucra mayoritariamente la puesta a punto de la parte biológica y no el dispositivo en sí.

Los avances en pruebas rápidas vinculadas a dispositivos PoCT conducen a mejores sistemas de diagnóstico, con dispositivos que permiten realizar diagnósticos rápidos en centros de baja complejidad, reduciendo costos, agilizando los tiempos de análisis, interconectando datos en tiempo real y aumentando el número de pruebas de diagnóstico en situaciones críticas.

#### Agradecimientos

Este proyecto fue parcialmente financiado por: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina) bajo el proyecto PICT 2018-01039, Universidad Nacional de Quilmes bajo el proyecto PUNQ ViMBA y PB-L Productos Bio-Logicos S.A.