

DETERMINACIÓN DE TRIPSINA INMUNOREACTIVA EMPLEANDO UN INMUNOSENSOR MICROFLUÍDICO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA APLICADO LA DETECCIÓN DE FIBROSIS QUÍSTICA

Marco A. Seia, Patricia W. Stege, Carlos A. Fontán, Irma E. De Vito, Julio Raba, Germán A. Messina

INQUISAL, Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera 5700, San Luis, Argentina. E-mail: maseia@unsl.edu.ar

Introducción

Durante el año 2007 el Senado sancionó la ley de pesquisa neonatal, que obliga a la detección gratuita en el recién nacido de una serie de enfermedades graves, como también su tratamiento. Se trata de enfermedades que carecen de manifestaciones clínicas durante los primeros días o meses de vida. No obstante, estas enfermedades, que pueden llegar a producir daño severo e irreversible como retraso mental, neurológico o psicomotor e incluso la muerte. La eficacia en el tratamiento depende de la implementación precoz del mismo.

Dentro de las mismas, la Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad que se caracteriza por presentar alteraciones en los pulmones y el páncreas. La causa de dicha patología es una mutación genética en el gen que codifica el Regulador del transporte transmembrana en Fibrosis Quística (CFTR), la cual trae como consecuencia la perturbación en el transporte de iones cloruro. La falla de la proteína CFTR causa discapacidad progresiva y muerte prematura mientras que su tratamiento precoz mejora la calidad y las expectativas de vida. El análisis de éstas enfermedades se realiza empleando gotas de sangre tomadas del talón del bebé entre el nacimiento y el séptimo día de vida.

Por la relevancia que la detección precoz de esta patología posee es necesario e desarrollo de tecnologías alternativas, rápidas y sensibles. En este trabajo se desarrolló un inmunosensor microfluídico, modificado con nanopartículas de sílica, acoplado a un sistema de detección de Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) mediante fibras ópticas la cuantificación rápida y sensible de anticuerpos anti-tripsina inmunoreactiva (IRT) en muestras de sangre humana.

Metodología

El Dispositivo utilizado para la determinación de Tripsina Inmuno Reactiva (IRT) consiste en un chip de vidrio con un canal central (CC), el cual ha sido modificado con partículas de sílica para la posterior inmovilización de anticuerpos monoclonales Anti-IRT (Figura 1). La tripsina presente en las muestras de suero reacciona inmunológicamente con el anticuerpo Anti-IRT inmovilizado y luego la misma es reconocida mediante el empleo de un anticuerpo secundario específico marcado con la enzima peroxidasa (HRP). HRP, en presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) cataliza la oxidación de 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina a resorufina, la cual fue determinada mediante LIF utilizando una laser de excitación de 561 nm y midiendo la emisión fluorescente a 585 nm. La Fluorescencia relativa generada por el producto de reacción es proporcional a la actividad de la enzima, y consecuentemente, a la cantidad de IRT presente en la muestra de suero.

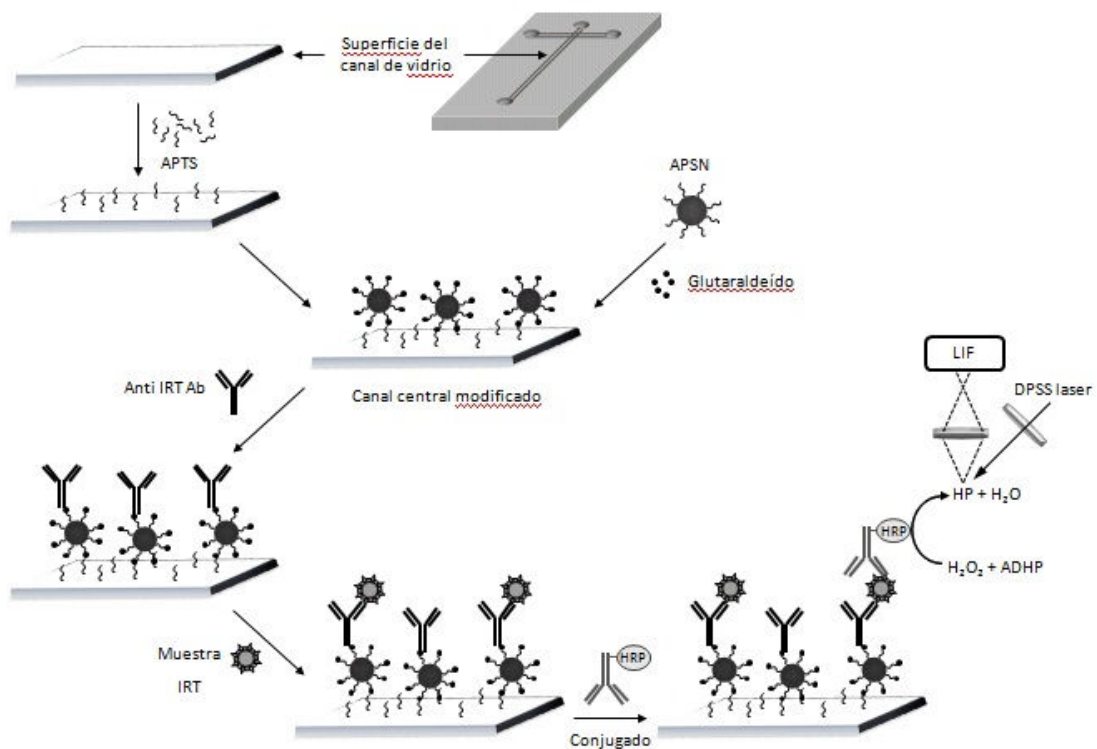


Fig 1 Representación esquemática de la modificación y la reacción inmunológica en inmunosensor microfluídico

Resultados

Diferentes parámetros fueron estudiados para el óptimo desempeño del inmunosensor microfluídico propuesto.

Se llevó a cabo un análisis de la velocidad de flujo óptima, para lo cual se evaluaron las respuestas obtenidas para un estándar de 154 ng mL^{-1} a diferentes velocidades de flujo en un rango de $1-6 \mu\text{L min}^{-1}$, la velocidad óptima resultante fue de $2 \mu\text{L min}^{-1}$.

Del modo similar se evaluó el volumen de muestra óptimo a inyectar, usando un estándar de 154 ng mL^{-1} , en un rango de $1-30 \mu\text{L min}^{-1}$. La respuesta se incrementó linealmente y la sensibilidad se cuadruplicó para el caso de volúmenes de muestra entre $1-20 \mu\text{L min}^{-1}$. Consecuentemente el volumen de muestra empleado fue de $20 \mu\text{L min}^{-1}$.

Para el método propuesto se obtuvo una curva de calibración para la detección de IRT en muestras de suero, en un rango de $0-580 \text{ ng mL}^{-1}$. La ecuación de regresión lineal fue $RF = 1.964 + 0.339 * C_{IRT}$, con un coeficiente de regresión lineal $r=0.998$. El coeficiente de variación (CV) para la determinación de 154 ng mL^{-1} de IRT fue menor del 5% ($n=6$). El límite de detección (DL) fue 0.87 ng mL^{-1} .

El inmunosensor fluorescente fue comparado con un sistema espectrofotométrico comercial para la cuantificación de IRT en 10 muestras de suero humano. La pendiente obtenida fue cercana a 1, indicando una buena correspondencia entre los dos métodos. Comparado con el ELISA, el método propuesto mostró un gran incremento de sensibilidad.

Conclusiones

En este trabajo, se desarrolló un inmunosensor microfluídico acoplado a detección LIF, para cuantificar IRT en forma rápida y selectiva en suero de pacientes con Fibrosis Quística.

Las partículas de sílica, además de ser utilizadas como soporte de inmovilización, produjeron un incremento en la superficie y consecuentemente en la sensibilidad del sistema propuesto. Otros beneficios aportados por el sensor fueron: reducidos tiempos de análisis (35 min), menor consumo de muestra y reactivos respecto al inmunoensayo convencional. Por lo antes mencionado este inmunosensor microfluídico representa una herramienta extremadamente útil para brindar un diagnóstico rápido, sensible y automatizado de la Fibrosis Quística.

Referencias

[1] de Valk HW, van der Graaf EA. Cystic fibrosis-related diabetes in adults: where can we go from here? *Rev Diabet Stud* 2007;4(1):6–12.

[2] Houwen RH, van der Doef HP, Sermet I, et al. on behalf of the ESPGHAN Cystic Fibrosis Working Group. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:38–42.

[3] Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Liver disease in Cystic Fibrosis: a prospective study on incidence, risk factors and outcome. *Hepatology* 2002;36:1374–82.

[4] European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines.

[5] Cystic Fibrosis Foundation. About cystic fibrosis: what you need to know. Bethesda, MD; [updated 2010 January 27; cited 2011]. Available from: <http://www.cff.org/AboutCF/>.