

Desarrollo de un prototipo biosensor impedanciométrico con fines diagnóstico

Irupé Bressán, Ezequiel Starecinch, Juan Cerrudo, Albano Peñalva, Leandro Peretti, Luciano Martínez Rau, Pablo Schierloh, Martín Zalazar, Matías Machtey.

Autores: Grupo de Investigación en Microfluidica (GIM-FIUNER). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11 km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: matias.machtey@uner.edu.ar

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark://80af521qi>

Resumen

En el ensayo de Látex de Inmunoaglutinación (LIA), un coloide de microesferas de látex recubiertas de antígeno se aglutina en presencia de anticuerpos específicos. El método es una herramienta de diagnóstico robusta, rápida y económica para buscar anticuerpos/antígenos específicos en estudios de detección. La detección puede hacerse visualmente (a simple vista) o por métodos instrumentales. La primera es la forma más adoptada por su simplicidad y portabilidad. Sin embargo, los resultados son subjetivos para el analista e inadecuados para la cuantificación del fenómeno. Por otro lado, las técnicas instrumentales permiten objetividad, sensibilidad y precisión, aunque involucran equipos de laboratorio y analistas expertos. En el presente trabajo diseñamos y fabricamos un transductor electroquímico capaz de monitorear el avance de reacciones provistas por un kit comercial (LIA) sobre dos electrodos coplanares interdigitados. Se evaluó la respuesta de impedancia en un rango de frecuencia de 1 kHz a 5 MHz. Además, estudiamos la evolución tiempo-impedancia (módulo y fase) de reacciones positivas y negativas en dos diseños diferentes interdigitados. Los resultados y el método de lectura propuesto promete el desarrollo de un instrumental portátil para su uso en campo que aporte objetividad, mayor sensibilidad, reducción del volumen de reactivos y detección automática de reacciones de inmunoaglutinación.

Palabra claves: Biosensores, transductor electroquímico, inmunoaglutinación, impedancia

Objetivos

Objetivos generales: Desarrollar un biosensor impedanciométrico acoplado a reacciones de inmunoaglutinación con potencial para el diagnóstico.

Objetivos particulares

- Diseñar y fabricar micro electrodos de geometría precisa para actuar en medio acuoso
- Diseñar y fabricar compartimentos microfluídicos que sirvan de soporte para la reacción de inmunoaglutinación.
- Evaluar calidad estructura, funcional y el comportamiento impedanciométrico de cada prototipo frente a reacciones de aglutinación.
- Realizar “prueba de concepto” utilizando un prototipo portable para detectar toxoplasmosis por monitoreo de reacción de inmunoaglutinación.

Objetivos cumplidos

Se logró cumplir con el objetivo general y objetivos particulares. A su vez, la propuesta demuestra que dicha plataforma posee ciertas ventajas por sobre su formato visual a ojo desnudo como: la capacidad de monitorear el fenómeno por debajo del límite de Detección (LOD), y una cuantificación del fenómeno que brindaría objetividad en la medida. La plataforma posee cierto grado de portabilidad que podría mejorarse en una etapa de rediseño futura haciéndola más compacta y automática.

Marco teórico y metodológico (síntesis)

¿Qué un biosensor?

Un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora una combinación deliberada e íntima de un elemento biológico específico (que crea un evento de reconocimiento) y un elemento físico (que transduce el evento de reconocimiento). Los biosensores, pueden clasificarse según el principio de transducción utilizado en ópticos; electroquímicos, piezoeléctricos o térmicos; como así también según los elementos de reconocimientos utilizados (inmunosensores, aptasensores, genosensores o sensores enzimáticos)^{1,2}. Los últimos desarrollos en biosensores tienen como horizonte tecnológico su integración en plataformas denominadas *Lab-on-a-Chip* (LoC) o “ μ TAS” (*Micro Total Analysis Systems*) capaces de escalar funciones de laboratorio individuales o múltiples en formato de un chip. El tamaño de este chip puede variar de milímetros a unos pocos centímetros cuadrados, integrando microfluídica, electrónica, óptica y los biosensores. Este nuevo paradigma tecnológico demanda esfuerzos interdisciplinarios, y promete generar nuevas soluciones a problemas del ámbito de la salud, el ambiente y la industria, entre otros. Entre las principales ventajas, se pueden nombrar su portabilidad (pudiendo usarse en *Point of Care*), de fabricación masiva, económicos, reproducibilidad, y económico en infraestructura, tiempo y reactivos necesarios, entre otros^{3,4}.

Biosensores impedanciométricos

Los campos eléctricos juegan un papel importante en la miniaturización en las técnicas de biodetección, ya que su aplicación a través de electrodos microfabricados reduce el tiempo y el costo del análisis, y permite la automatización, mayor sensibilidad

y capacidad de multiplexar distintas señales en un solo chip. Los métodos convencionales para medir eléctricamente las interacciones biológicas implican el seguimiento de los cambios en las propiedades eléctricas de la doble capa en la interfaz de la solución y los electrodos ⁵.

La impedancia es la relación, dependiente de la frecuencia, de dos parámetros eléctricos fundamentales (el voltaje y la corriente). Existen diversos diseños de sensores impedanciométricos. El caso más sencillo y fácil de fabricar corresponde a un par de microelectrodos coplanares separados por una distancia D , donde el campo eléctrico sobresale en dirección vertical por una distancia igual a aproximadamente D . Los fenómenos que ocurren en torno a la superficie de los electrodos (sobre o entre los electrodos) pueden estudiarse. La impedancia (Z) de un sistema generalmente se determina aplicando una perturbación de voltaje (alterno) en uno de los electrodos con una pequeña amplitud y detectando la respuesta en corriente en otro electrodo. A su vez, existe una técnica capaz de analizar la impedancia a diferentes frecuencias en lugar de a una sola, dando lugar a un espectro característico, capaz de dar información que permite la caracterización de superficies, capas o membranas, así como procesos de intercambio y difusión. Para lograr esto, el espectro de impedancia (*EIS*) a menudo se analiza utilizando un circuito equivalente. Este circuito, que comúnmente consta de resistencias y capacitancias, representa las diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema bajo investigación ^{6,7}. Alternativamente, el sistema se puede describir en función de las funciones de transferencia derivadas de las leyes básicas de los procesos involucrados, como la electrocinética, la difusión, la partición, etc. Típicamente, los sensores impedanciométricos permiten formatos de análisis libre de marcadores (*free-label*)⁸. A su vez, la potencialidad de la microfluídica, tanto en sus diseños, como estrategias de fabricación ofrecen una serie de ventajas para el desarrollo de esta tecnología. Dicha característica, puede ser explotada para poder medir fenómenos dinámicos que ocurren en torno a electrodos.

Sin embargo, no solo es posible describir un sistema de interés, sino que la técnica también puede usarse con fines analíticos. En este caso, se evalúa el cambio de un elemento de impedancia, una resistencia o una capacitancia, en función de la composición de la solución. En algunos casos, también es posible correlacionar la impedancia general con un cambio en la concentración. Esto puede simplificar las mediciones, ya que a menudo es suficiente determinar la impedancia en una sola frecuencia seleccionada o dentro de una ventana de frecuencia limitada (donde los cambios relativos son mayores) en tales casos ⁹.

Prototipado de un biosensor para detectar toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, que puede provocar serias complicaciones si es adquirida durante el embarazo ¹⁰. Por lo tanto resulta de interés contar con métodos diagnósticos que permitan detectar dicha enfermedad en su etapa aguda. Los látex de inmunodiagnóstico se han utilizado exitosamente para la detección de Artritis Reumatoidea, Toxoplasmosis, Malaria, Brucelosis, Leptospirosis, Rotavirus, Virus Influenza Aviar entre otros ¹¹⁻¹⁸. En el desarrollo de estos reactivos, partículas de látex monodispersas se sensibilizan con antígenos (o anticuerpos) de interés, de manera tal que ante la presencia de anticuerpos (o antígenos) específicos en un fluido humano, se produce la aglutinación de las mismas. La detección de la inmunoaglutinación se puede

realizar visualmente o mediante métodos instrumentales. El método visual^{11,12} es simple y rápido, y no requiere equipamiento especial. Sin embargo, éstos resultados son subjetivos e inadecuados para la cuantificación del fenómeno. Por otro lado, las técnicas instrumentales generalmente usadas para este propósito como la turbidimetría, nefelometría, y dispersión de luz dinámica permiten en general una mayor objetividad, sensibilidad y exactitud, aunque éstas varían en función del método utilizado para detectar la aglutinación¹⁹⁻²⁶.

Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para la búsqueda de Ac específicos contra agentes patógenos en estudios de tamizajes donde se debe analizar un gran número de muestras. En este contexto, queda en evidencia UNA necesidad tecnológica capaz de transducir el fenómeno de aglutinación de tal manera que pueda diseñarse un método semicuantitativo. En el presente trabajo se desarrolló una plataforma transductora impedanciométrica capaz de monitorear una reacción de aglutinación de manera objetiva, con mayor sensibilidad, y que reduce el volumen de reactivos.

Síntesis de resultados y conclusiones

En el presente proyecto, se logró construir un equipo de medición integrando equipos comerciales con adaptaciones mediante. El mismo consta de un Analog Discovery 2 (Digilent) + módulo Impedance Analyzer (Digilent) (**AD2-IA**), modificado de manera de incorporar una entrada USB-A sobre el que se conecta los electrodos interdigitados (**Fig. 1**). El mismo fue comandado, vía conexión USB, por el software del fabricante (WaveForm). De esta manera se puede analizar la respuesta impedanciométrica de electrodos interdigitados coplanares en medio acuoso utilizando voltaje constante de 10 mV (AC), para un rango de frecuencias entre 1 kHz - 5 MHz (**Fig. 1**). A su vez, dicho equipo tiene la versatilidad de utilizar distintos gabinetes y electrodos, adaptándose en un futuro a distintas aplicaciones.

Para validar su función como analizador de impedancia, se conectó dicho equipo a circuitos RC (con componentes conocidos), constatando que la respuesta en el dominio frecuencial era la esperada.

Para el caso puntual de este proyecto, los electrodos se fabricaron sobre placas PCB de FR4 con Cobre (mediante técnica litográfica blanda) y posteriormente recubiertas con Niquel-Oro mediante electrogalvanizado.



Figura 1: Equipo de medición utilizado: Analog Discovery 2 + módulo Impedance Analyzer (AD2-IA modificado) y SetUP experimental

Se evaluó la respuesta de dos Electrodo Interdigitados (**E.I.**) con geometrías distintas y adaptados para su funcionamiento con muestras acuosas para distintos volúmenes. Para poner a punto la técnica se utilizaron soluciones *buffer* a distinta concentración, para luego pasar a evaluar reacciones de inmunoaglutinación utilizando un kit comercial capaz de detectar anticuerpos para toxoplasmosis (Toxotest-Wiener lab). Las reacciones corresponden a la mezcla del reactivo de latex y los controles que vienen el kit (tanto positivos como negativos, **Fig. 2**). Las diluciones de los controles (1/5 y 1/0) se realizaron con NaCl 8,5 g/L y simulan sueros con menor carga de anticuerpos.

Se evalúa el desempeño de la reacción según propone el fabricante por el método visual (reacciones sin diluir, **Fig 2**). En este ensayo se pone a prueba la sensibilidad de la técnica por el método visual diluyendo los propios controles, no encontrando una diferencia significativa entre reacciones positivas y negativas cuando éstas se diluyen (**Fig. 2**)

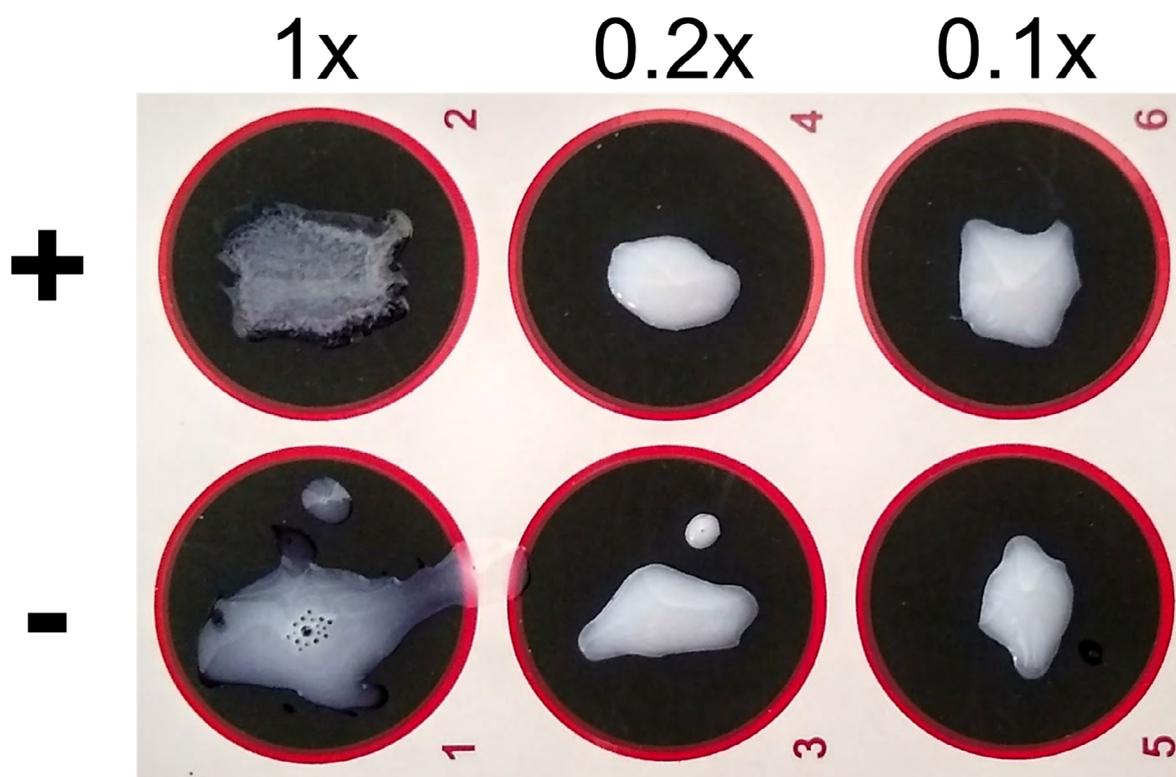


Figura 2: Reacción de inmunoaglutinación en soporte provisto por el kit comercial Toxotest siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Con fines comparativos se utilizan los controles positivos y negativos en las 3 concentraciones ensayadas (1x; 0,2X; 0,1X) . La imagen corresponde a los 20 min de iniciada la reacción.

Para evaluar el comportamiento impedanciométrico del avance de la misma reacción se mezclaron los reactivos tal cual propone el fabricante sobre los **E.I.** conectados al equipo de medición.

Así se logró caracterizar una reacción positiva, negativas, tanto puras como diluidas. Los resultados indican que se pudo monitorear la respuesta en frecuencia y en el tiempo de reacciones de inmunoaglutinación mediante un transductor electroquímico para los **E.I.** distintos, utilizando $\frac{3}{4}$ del volumen de reactivos propuesto por el fabricante (**Fig. 3**), que implica un ahorro de insumos químicos.

El análisis en el dominio frecuencial ('Bode') para ambos **E.I.** muestra que los valores de $|Z|$ son mayores para las reacciones positivas que negativas a los 20 min de reacción (para cada concentración evaluada) y que a 5 MHz resulta sensible detectar cambios en $|Z|$ y fase, para ambos **E.I.** entre reacciones + y - (**Fig. 3**). Para las 3 concentraciones estudiadas -pura (1x) y diluídas (0,2x y 0,1x)- se evidencian diferencias significativas entre los controles positivos y negativos tanto en los valores promedio de $|Z|$ como en la fase, a los 20 min de reacción empleando los dos tipos de diseño de electrodos ($p < 0.05$, t-test).

El transductor impedanciométrico muestra mayor sensibilidad que el método visual (**Fig. 2**), ya que a simple vista solo se detecta grumos en la reacción positiva 1X (y no en la 0,1 y 0,2X). Esto da pie a la hipótesis de que el límite de detección del transductor propuesto es inferior al propuesto por el método visual.

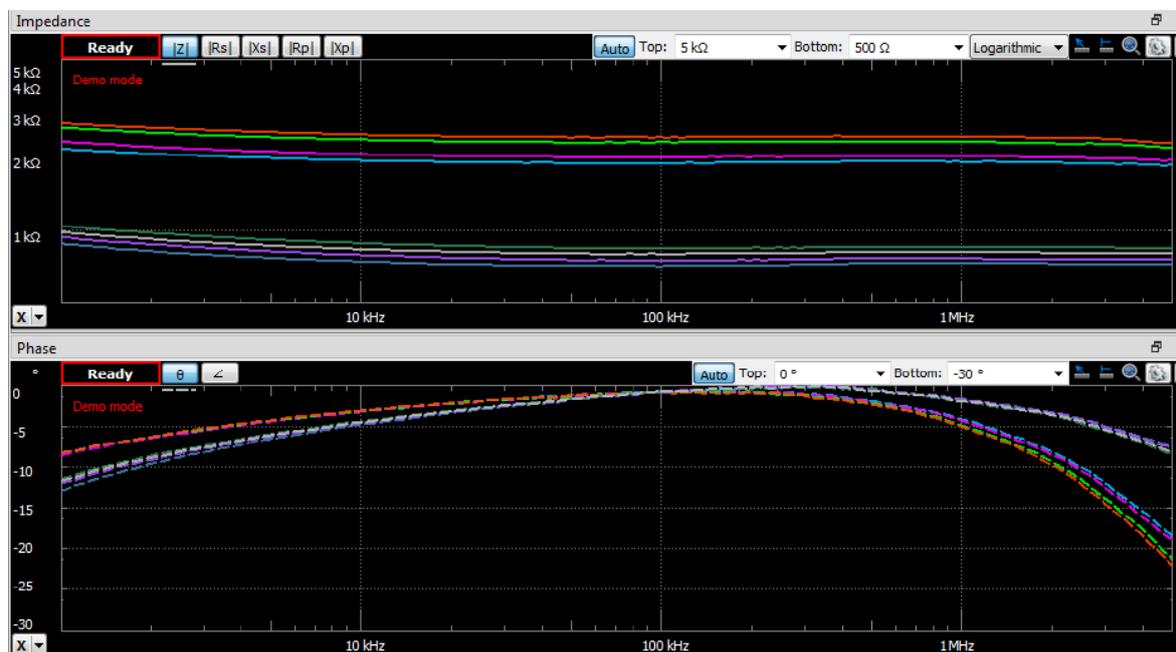


Figura 3. Respuesta en frecuencia de reacción de inmunoaglutinación positiva y negativa. Reacción positiva los trazos en orden temporal (0, 5, 16, y 20 min): celeste, fucsia, verde y rojo. Reacción negativa, los trazos en orden temporal: azul, violeta, verde oscuro y gris. Primera gráfica se muestra $|Z|$ vs frecuencia, segunda gráfica variación del fase vs frecuencia.

El presente trabajo constituye una primera aproximación de desarrollo de una herramienta probada empíricamente, que demuestra la existencia de un efecto impedanciométrico mensurable con un equipamiento mínimo, de fácil manejo y muy económico a partir de una reacción de inmunoaglutinación directa y policlonal basada en microesferas de látex, lo cual tiene relevancia para el desarrollo de futuros test portables. A su vez, se detectan ciertas ventajas como las de monitorear cuantitativamente el fenómeno de aglutinación y un límite de Detección (LOD) más bajo que la misma reacción en su formato visual a ojo desnudo. La naturaleza compleja y no lineal del sistema nos sugiere la utilidad de considerar en estudios próximos una cuidadosa selección de nuevas variables de salida que permita un abordaje estadístico multivariado para extraer mayor provecho del análisis experimental. A su vez, es necesario evaluar la dispersión impedanciométrica de reacciones con sueros reales, de personas que se sepan positivas como negativas.

Por otro lado, el desarrollo del transductor aquí planteado, presenta cierta flexibilidad para adaptarse para otro tipo de reacciones diagnósticas que serán evaluadas en un futuro cercano.

Indicadores de producción

Parte de los resultados se compartieron en el congreso *II Brazil-Argentine Microfluidics Congress (2022)*, cuyo abstract se encuentra publicado en el libro de resúmenes https://drive.google.com/file/d/1RW3pEcPcSUTK03FE8uVbqi86_bLEsUKa/view

- Impedance transduction for monitoring particle-based diagnostic reactions Irupé Bressán, Ezequiel Starecinch, Juan Cerrudo, Albano Peñalva, Leandro Peretti, Luciano Martínez Rau, Pablo Schierloh, Esteban Rossi, Martín Zalazar, Matías Machtey.

Bibliografía

- Justino, C. I. L.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors* **2017**, 17 (12).
- Pandey, C. *Biosensors: Fundamentals and Applications*; 2017.
- Geschke, O.; Klank, H.; Telleman, P. *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*; 2004; p 0. <https://doi.org/10.1002/3527601651>.
- Lab on a Chip Technology: Volume 1: Fabrication and Microfluidics Illustrated*; Herold, K. E., Rasooly, A., Eds.; Caister Academic Press, 2009.
- Gupta, S.; Kilpatrick, P. K.; Melvin, E.; Velez, O. D. On-Chip Latex Agglutination Immunoassay Readout by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Lab on a Chip* **2012**, 12 (21), 4279–4286. <https://doi.org/10.1039/C2LC40127D>.
- Krause, S. *Encyclopedia of Electrochemistry, Vol 3: Instrumentation and Electroanal Chem*; Wiley VCH, Weinheim, 2003.
- Rubinstein, I. *Physical Electrochemistry: Science and Technology*; CRC Press, 1995; Vol. 7.
- Carminati, M. Advances in High-Resolution Microscale Impedance Sensors. *Journal of Sensors* **2017**, 2017 (Article ID 7638389), 15–15.
- Lisdat, F.; Schäfer, D. The Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy for Biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391 (5), 1555–1555. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1970-7>.
- Muñiz Hernández, S.; Mondragón Flores, R. Toxoplasma Gondii, Un Patógeno Asesino Re-Emergente. *Revista de Educación Bioquímica* **2009**, 28 (2), 52–58.
- Chen, J.; Xue, C.; Zhao, Y.; Chen, D.; Wu, M.-H.; Wang, J. Microfluidic Impedance Flow Cytometry Enabling High-Throughput Single-Cell Electrical Property Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, 16 (5), 9804–9830. <https://doi.org/10.3390/ijms16059804>.
- Dey, S.; Madhan Mohan, C.; Ramadass, P.; Nachimuthu, K. Recombinant Antigen-Based Latex Agglutination Test for Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis. *Veterinary Research Communications* **2007**, 31 (1), 9–15. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3364-7>.
- Lucas, L. J.; Han, J. H.; Yoon, J. Y. Using Highly Carboxylated Microspheres to Simplify Immunoassays and Enhance Diffusional Mixing in a Microfluidic Device. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2006**, 49 (2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.008>.
- Miraballes-Martinez, I.; Martín-Rodríguez, A.; Hidalgo-Álvarez, R. Chloroactivated Latex

- Particles for Covalent Coupling of Antibodies. Application to Immunoassays. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1997**, 8 (10), 765–777. <https://doi.org/10.1163/156856297X00308>.
- Peula-García, J. M.; Molina-Bolivar, J. A.; Velasco, J.; Rojas, A.; Galisteo-González, F. Interaction of Bacterial Endotoxine (Lipopolysaccharide) with Latex Particles: Application to Latex Agglutination Immunoassays. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 245 (2), 230–236. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7958>.
- Polpanich, D.; Tangboriboonrat, P.; Elaissari, A.; Udomsangpetch, R. Detection of Malaria Infection via Latex Agglutination Assay. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (12), 4690–4695. <https://doi.org/10.1021/ac070502w>.
- Ramos, J.; Martín-Molina, A.; Sanz-Izquierdo, M. P.; Rus, A.; Borque, L.; Hidalgo-Álvarez, R.; Galisteo-González, F.; Forcada, J. Amino-Functionalized Latex Particles Obtained by a Multistep Method: Development of a New Immunoreagent. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2003**, 41 (15), 2404–2411. <https://doi.org/10.1002/pola.10782>.
- Santos, R. M.; Forcada, J. Acetal-Functionalized Polymer Particles Useful for Immunoassays. III: Preparation of Latex-Protein Complexes and Their Applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2001**, 12 (2), 173–180. <https://doi.org/10.1023/A:1008982314102>.
- Cohen, R. J.; Benedek, G. B. Immunoassay by Light Scattering Spectroscopy. *Immunochemistry* **1975**, 12 (4), 349–351. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(75\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0019-2791(75)90188-3).
- Kapmeyer, W. H.; Pauly, H.-E.; Tuengler, P. Automated Nephelometric Immunoassays with Novel Shell/Core Particles. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1988**, 2 (2), 76–83. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860020203>.
- Litchfield, W. J.; Craig, A. R.; Frey, W. A.; Leflar, C. C.; Looney, C. E.; Luddy, M. A. Novel Shell/Core Particles for Automated Turbidimetric Immunoassays. *Clinical Chemistry* **1984**, 30 (9), 1489–1493.
- Montagne, P.; Laroche, P.; Cuillière, M. L.; Varcin, P.; Pau, B.; Duheille, J. Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay for Human C-Reactive Protein. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1992**, 6 (1), 24–29. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860060106>.
- Ortega-Vinuesa, J. L.; Molina-Bolívar, J. A.; Hidalgo-Álvarez, R. Particle Enhanced Immunoaggregation of F(Ab')₂ Molecules. *Journal of Immunological Methods* **1996**, 190 (1), 29–38. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00243-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00243-X).
- Peula, J. M.; Hidalgo-Alvarez, R.; De Las Nieves, F. J. Coadsorption of IgG and BSA onto Sulfonated Polystyrene Latex: I. Sequential and Competitive Coadsorption Isotherms. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1996**, 7 (3), 231–240. <https://doi.org/10.1163/156856295X00274>.
- Sarobe, J.; Miraballes, I.; Molina, J. A.; Forcada, J.; Hidalgo-Álvarez, R. Nephelometric Assay of Immunoglobulin G Chemically Bound to Chloromethyl Styrene Beads. *Polymers for Advanced Technologies* **2018**, 7 (9), 749–753. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199609\)7:9<749::AID-PAT550>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199609)7:9<749::AID-PAT550>3.0.CO;2-0).
- Molina-Bolívar, J. A.; Galisteo-González, F. Latex Immunoagglutination Assays. *Journal of Macromolecular Science, Part C* **2005**, 45 (1), 59–98. <https://doi.org/10.1081/MC-200045819>.

PID 6195 Denominación del Proyecto

Desarrollo de un prototipo biosensor impedanciométrico con fines diagnóstico

Director

Matías Machtey

Codirector:

Martín Angel Zalazar

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Cátedra/s, área o disciplina científica

Grupo de Investigación en Microfluídica (GIM-FIUNER)

Contacto

matias.machtey@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Integrantes docentes: Capra, Emanuel Leonel; Bianchi, Mariana; Rossi, Esteban.
Estudiantes/becarios: Gutierrez Candia, Raúl Leonel; Bressan, Fabiana Irupe;
Starecinch, Ezequiel Nicolás.

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

01/02/2019 y 24/12/2022

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 130/23 (19/05/2023)