



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA - INSTRUMENTACIÓN

**SENSOR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS MEDIANTE FLUORESCENCIA Y
AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ING. VICTOR MANUEL LUGO RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ROBERTO GIOVANNI RAMÍREZ CHAVARRÍA
INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DESIGNADO

Presidente: Dra. Celia Angelina Sánchez Pérez.

Secretario: Dr. Gabriel Eduardo Sandoval Romero.

1er vocal: Dr. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría.

2do vocal: Dr. Naser Qureshi.

3er vocal: Dr. Juan Arnaldo Hernández Cordero.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Ingeniería (II). Ciudad Universitaria, UNAM.

Director de tesis:

Dr. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría

Firma

“La ciencia es una empresa que sólo puede florecer si se pone la verdad por delante de la nacionalidad, la etnia, la clase y el color...”

J. C. Polanyi

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todas las personas que me han apoyado y motivado a ser mejor a lo largo de mi vida.

A mis padres y mis hermanas,

Ser el hermano mayor siempre impuso el reto de inspirar, ser buen ejemplo y me ha traído hasta aquí. Sin su preocupación y empuje no hubiera logrado la mitad de mis metas.

A mis abuelos, tíos y primos,

No soy nada sin ustedes. Nuestra familia es mi mayor orgullo, lo que más extraño de Cuba, y a la vez, lo que me motiva a ser cada día mejor.

A mi esposa,

Porque la familia que estamos construyendo es mi mayor inspiración. Por embarcarse junto a mí en esta aventura que es la vida y caminar a mi lado siendo mi fortaleza.

A mis amigos,

Por su apoyo y empuje constante. Somos el promedio de las personas con las que más nos relacionamos, y tenerlos a mi lado aún aquellos más distantes, me ayuda a ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

Este triunfo es producto del esfuerzo, sacrificio y perseverancia de un conjunto de personas e instituciones que me brindaron su apoyo a lo largo de esta etapa. Quiero agradecer a todos ellos su aporte...

A Dios, por regalarme cada día la oportunidad de crecer junto a las personas maravillosas que pone en mi camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la oportunidad de convertirme en uno de sus alumnos, con todas las bondades que ello implica.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM, por aceptarme y permitirme realizar en esta institución mis estudios de Maestría.

Al Instituto de Ingeniería y el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM, por los servicios y la infraestructura que brindaron a lo largo de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Roberto Giovanni Ramírez, por su apoyo y disposición constante. Por aceptarme en su equipo de trabajo y estar siempre disponible para dar consejos y apoyar más allá de la dirección de tesis.

A la Dra. Elizabeth Castillo, su apoyo y aportes fueron esenciales en el desarrollo del trabajo.

A mis sinodales, Dra. Celia Sánchez, Dr. Eduardo Sandoval, Dr. Naser Qureshi y Dr. Juan Hernández, por sus valiosas aportaciones al contenido de esta tesis, así como por el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión del trabajo.

A mis profesores, con los que tuve el privilegio de tomar clases durante la maestría, por el tiempo y conocimientos compartidos.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de:

- El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías CONAHCYT brindando apoyo económico durante los 24 meses de mis estudios de posgrado (CVU: 1156699).
- El Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto UNAM-PAPIIT TA101423.
- El proyecto “Cambio de paradigma: residuos como materia prima para conciliar el eje agua-energía- ambiente-seguridad alimentaria” de los Grupos Interdisciplinarios de Investigación (GII) del Instituto de Ingeniería, UNAM.

Sinceramente,

Victor

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Por la presente declaro que, salvo que se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Victor Manuel Lugo Ramírez. México, CDMX, 2023.

RESUMEN

En el contexto actual, las infecciones por influenza y coronavirus (SARS-CoV-2) presentan síntomas similares, por lo que se necesitan diagnósticos precisos y rápidos para guiar la toma de decisiones en cuanto a la admisión hospitalaria, tratamientos con antivirales específicos y medidas de control de infecciones. Mientras que la prueba de PCR continúa siendo el estándar de oro para los ensayos moleculares, su complejidad dificulta la implementación en dispositivos que puedan emplearse fuera de los laboratorios y sin personal entrenado. El desarrollo de técnicas de amplificación isotérmica posibilita la integración de estas técnicas en microsistemas y dispositivos portátiles que permiten la realización de ensayos *in-situ*.

En este trabajo se presenta el diseño de un dispositivo para el diagnóstico simultáneo de los virus de Influenza A y SARS-CoV-2 mediante amplificación isotérmica, empleando *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*, una técnica que no ha sido reportada aún en la literatura para la discriminación entre estos virus en dispositivos portátiles. Los *primers* diseñados para cada virus son marcados con fluoróforos específicos (FAM y ROX). Durante la reacción se cuantifica la fluorescencia de cada muestra en el microcontrolador ESP32 y se transmiten los resultados a una computadora inalámbricamente mediante un servidor web y una interfaz desarrollada en Python. El dispositivo diseñado tiene costos y complejidad de producción muy bajos, presenta una alta especificidad y destaca por su versatilidad, ya que sienta las bases para ser empleado, con un correcto diseño de *primers*, en la detección de diversos patógenos en muestras virales de diferentes tipos.

ABSTRACT

At the present time, influenza, and coronavirus (SARS-CoV-2) infections present similar symptoms. For this reason, accurate and rapid diagnoses are needed to guide decision-making regarding hospital admission, specific antiviral treatments, and infection control measures. While PCR remains the gold standard for molecular assays, its complexity hinders implementation in devices usable outside laboratories and without trained personnel. Recent development of isothermal amplification techniques enables the integration of these methods into microsystems and portable devices, allowing on-site testing.

This thesis presents the design of a device for the simultaneous diagnosis of Influenza A and SARS-CoV-2 viruses using isothermal amplification, specifically Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), a technique not yet reported in the literature for discriminating between these viruses in portable devices. Primers designed for each virus are marked with specific fluorophores (FAM and ROX). During the amplification process, fluorescence of each sample is quantified by the ESP32 microcontroller, and data is transmitted wirelessly to a computer via a web server and an interface developed in Python. The designed device has low fabrication costs and complexity, exhibits high specificity, and stands out for its versatility, as it lays the groundwork to be employed, with a proper primer design, for detecting multiple pathogens in different types of viral samples.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.3 OBJETIVOS	2
1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1 MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN GENÉTICA	5
2.1.1 MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÉTICA CON CICLADO TÉRMICO	6
<i>Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR)</i>	6
<i>Reacción en cadena de ligasa (Ligase Chain Reaction - LCR)</i>	8
2.1.2 MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA	8
<i>Amplificación de círculo rodante (Rolling circle amplification - RCA)</i>	9
<i>Amplificación dependiente de helicasa (Helicase-dependent amplification - HDA)</i>	9
<i>Amplificación de desplazamiento de cadena (Strand-displacement amplification - SDA)</i>	10
<i>Amplificación de la polimerasa recombinasa (Recombinase polymerase amplification - RPA)</i>	11
<i>Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (Nucleic acid sequence-based amplification - NASBA)</i>	12
<i>Amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP)</i>	13
2.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN	15
<i>Electroforesis en gel</i>	15
<i>Detección óptica mediante turbiedad</i>	16
<i>Electroquímica</i>	16
<i>Fluorescencia</i>	17
2.3 INTEGRACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA EN DISPOSITIVOS PORTÁTILES	18
<i>Dispositivos portátiles con amplificación LAMP en el contexto del SARS-CoV-2</i>	20
<i>Dispositivos portátiles en el diagnóstico simultáneo de patógenos</i>	21
CAPÍTULO 3. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL SENSOR	23
3.1 SISTEMA DE INSTRUMENTACIÓN PROPUESTO	23
<i>Microcontrolador</i>	23
<i>Arreglo optoelectrónico</i>	24
<i>Sistema de control de temperatura</i>	26
3.2 INTEGRACIÓN DEL HARDWARE	27
3.3 SOFTWARE	28
<i>Programación del módulo ESP32 en ARDUINO IDE</i>	29
<i>Interfaz gráfica para PC</i>	30
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	33
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ÓPTICO	33
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE CONTROL DE TEMPERATURA	34
<i>Caracterización estática del calefactor</i>	34

<i>Caracterización dinámica del calefactor</i>	35
<i>Diseño del algoritmo de control</i>	36
4.3 VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS REACCIONES RT-LAMP	37
<i>Preparación de las muestras</i>	38
<i>Elementos del esquema de validación</i>	38
<i>Procedimiento</i>	39
<i>Resultados y discusión</i>	39
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 2.1: PROCESO GENERAL EN SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN GENÉTICA.	5
FIG. 2.2: ESQUEMA DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR.	7
FIG. 2.3: ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RCA.	9
FIG. 2.4: ESQUEMA DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE HDA.....	10
FIG. 2.5: ESQUEMA GENERAL DEL FUNCIONAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE SDA	11
FIG. 2.6: ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RPA.	12
FIG. 2.7: ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE NASBA.....	13
FIG. 2.8: ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO LAMP.	14
FIG. 2.9: GENERACIÓN DE CURVAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PROCESOS DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR (A, B) Y LAMP (C, D).	18
FIG. 3.1: ESQUEMA GENERAL DEL SISTEMA DE INSTRUMENTACIÓN PROPUESTO.....	23
FIG. 3.2: DIAGRAMA DE CONEXIONES AL MICROCONTROLADOR ESP32.....	24
FIG. 3.3: DISPOSICIÓN VERTICAL DE LOS COMPONENTES DEL ARREGLO OPTOELECTRÓNICO.	24
FIG. 3.4: DISEÑO DE UNO DE LOS CIRCUITOS DE CONTROL DE LEDS.	25
FIG. 3.5: DISEÑO DEL CIRCUITO DE AMPLIFICACIÓN PARA 2 FOTODIODOS.	25
FIG. 3.6: DISEÑO DEL CIRCUITO DE CONTROL DE TEMPERATURA.	26
FIG. 3.7: PROTOTIPO DEL DISPOSITIVO DISEÑADO EN FUSION 360 CON SIMULACIÓN DE MATERIALES.	28
FIG. 3.8: DIAGRAMA DE FLUJO DEL FUNCIONAMIENTO DEL SOFTWARE.	29
FIG. 3.9: CAPTURA DE LA VENTANA PRINCIPAL DE LA INTERFAZ DESARROLLADA EN PYTHON PARA PC.	30
FIG. 4.1: ESPECTROS DE LOS COMPONENTES EMPLEADOS EN LA MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA CON EL MARCADOR A) FAM Y B) ROX.....	33
FIG. 4.2: RESULTADO DEL ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN ESTÁTICA DEL CALEFACTOR.	34
FIG. 4.3: RESULTADO DEL ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DINÁMICA DEL CALEFACTOR.....	35
FIG. 4.4: DESEMPEÑO DEL SISTEMA DE CONTROL IMPLEMENTADO PARA LLEVAR A CABO LA REACCIÓN RT-LAMP.	37
FIG. 4.5: ESQUEMA Y COMPONENTES EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS DE VALIDACIÓN.....	38
FIG. 4.6: SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS DEL LED Y EL FILTRO ROJO EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS DE VALIDACIÓN.	39
FIG. 4.7: GRÁFICO DE INTENSIDAD DE LUZ VS TIEMPO EN EL ESPECTRO ENTRE 580 NM Y 600 NM.....	40
FIG. 4.8: EVOLUCIÓN DEL CAMBIO EN LA COLORACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN.....	41

ACRÓNIMOS

ADC	<i>Analog-Digital Converter.</i> Conversor análogo-digital.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
CPU	<i>Central Processing Unit.</i> Unidad de procesamiento central.
dPCR	<i>Digital Polymerase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de polimerasa digital.
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.</i> Ensayo inmunoenzimático de absorción.
FAM	<i>Fluorescein amidites.</i> Amiditas de fluoresceína.
HDA	<i>Helicase-dependent amplification.</i> Amplificación dependiente de helicasa.
I2C	<i>Inter-Integrated Circuits.</i> Circuitos Inter-Integrados.
IDE	<i>Integrated Development Environment.</i> Entorno de desarrollo integrado.
ITO	<i>Indium Tin Oxide.</i> Óxido de indio y estaño.
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification.</i> Amplificación isotérmica mediada por bucle.
LCR	<i>Ligase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de ligasa.
LED	<i>Light Emiting Diode.</i> Diodo emisor de luz.
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification.</i> Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de polimerasa.
PCUS	Proteínas de cadena de unión sencilla.
PEM	<i>Prediction Error Method.</i> Método de predicción de error.
PET	<i>Polyethylene Terephthalate.</i> Polietilentereftalato.
PID	<i>Proportional-Integral-Derivative.</i> Proporcional-Integral-Derivativo
PMMA	<i>Polymethyl Methacrylate.</i> Polimetilmetacrilato.
POC	<i>Point of Care.</i> Punto de atención.
PWM	<i>Pulse Width Modulation.</i> Modulación de ancho de pulso.

qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa.
RCA	<i>Rolling Circle Amplification.</i> Amplificación del círculo rodante.
ROX	<i>Carboxyrhodamine-X.</i> Carboxirodamina-X.
RPA	<i>Recombinase Polymerase Reaction.</i> Reacción de polimerasa recombinasa.
RT-LAMP	<i>Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification.</i> Amplificación isotérmica mediada por bucle con transcriptasa inversa.
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa.
SDA	<i>Strand-displacement amplification.</i> Amplificación por desplazamiento de cadena.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se hace una revisión al estado del arte de los dispositivos portátiles con amplificación genética isotérmica en cuanto a la fabricación e instrumentación se refiere. Se plantea el problema que se aborda en el presente trabajo, enfatizando en las contribuciones tecnológicas y de aplicaciones. Por último, se presenta la organización del manuscrito.

1.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

La realización de ensayos de detección de ácidos nucleicos en dispositivos microfluídicos posibilita el desarrollo de herramientas de diagnóstico convenientes, económicas y eficientes para aplicaciones clínicas, de seguridad alimentaria y de monitoreo ambiental [1]. Estas herramientas permiten operar en el punto de atención (POC: point-of-care) para un diagnóstico rápido y con recursos limitados [1], [2], [3].

En las últimas décadas se ha visto la adaptación generalizada de la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) para la amplificación de ácidos nucleicos, sin embargo su uso fuera del laboratorio está limitado en gran medida por la complejidad y costos de la instrumentación necesaria para el ciclado térmico [4]. Recientemente se ha explorado el empleo en dispositivos portátiles de varios métodos de amplificación isotérmica, como la amplificación del círculo rodante (RCA), la amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) [5]. Entre ellos, LAMP ha demostrado ser una alternativa poderosa al PCR debido a su mayor especificidad, alta sensibilidad y menor complejidad para la implementación [4]. Esta técnica no requiere de ciclos térmicos y se desarrolla a una temperatura constante entre 60 °C y 65 °C [3]. Los ensayos LAMP son significativamente rápidos y no requieren reactivos o instrumentos costosos, lo que ayuda a reducir los costos para la detección del virus objetivo.

Si bien esta técnica permite la amplificación exponencial de ácidos nucleicos con muestras mínimas, es necesario el empleo de técnicas de detección como colorimetría y fluorescencia para cuantificar la concentración en muestras del ácido nucleico objetivo [5]. Recientemente, numerosos esfuerzos se han dedicado a la miniaturización de dispositivos para ensayos de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos [2], [5], [6], [7], [8]. La mayoría de estos estudios emplean la detección de fluorescencia para cuantificar la amplificación en las muestras bajo análisis ya que la posibilidad de colocación de fotodetectores permite un análisis más sencillo frente a la colorimetría.

El principio de funcionamiento de esta técnica consiste en iluminar las muestras sometidas al proceso de amplificación con una fuente que contenga la parte principal del espectro de excitación del fluoróforo utilizado en los primers. Al amplificarse los genes, se liberan los fluoróforos que comienzan entonces a emitir con mayor intensidad en longitudes de onda diferentes a la de excitación. Esta luz emitida es detectada y cuantificada por el sistema mediante los fotodetectores que traducen la cantidad de fotones en cambios de voltaje, siendo esta nuestra variable de interés.

Dispositivos empleando LAMP han sido reportados para la detección de patógenos como el coronavirus [9], [10], los adenovirus [11], [12] y varios tipos de influenza [13], [14], [15], [16], [17]. También en la identificación de variedades de arroz [18], la detección simultánea de patógenos procedentes de los alimentos [19],[20], variedades de meningitis [21], por solo mencionar algunas aplicaciones.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sintomatología semejante de pacientes con COVID-19 e Influenza (fiebre, tos seca y fatigas), hace virtualmente imposible realizar un diagnóstico en etapas tempranas del COVID-19 basándose solo en los síntomas [22] y en consecuencia errores en la toma de decisiones médicas en cuanto a la hospitalización, tratamiento y control de infecciones [23], [24], [25]. Debido a la extensión de ambas enfermedades infecciosas, el desarrollo de dispositivos POC económicos para el diagnóstico resulta muy importante especialmente para las comunidades con pocos recursos [7]. La detección simultánea de SARS-CoV-2 e Influenza ha ganado el interés de la comunidad científica y se han desarrollado se han desarrollado varios estudios en aras de lograr diagnósticos cada vez más rápidos y confiables [26]. A pesar de los avances alcanzados en la amplificación isotérmica simultánea de ácidos nucleicos para la detección de patógenos, no ha sido reportado en la literatura su empleo para la discriminación entre el SARS-CoV-2 y variantes de la influenza. Se encontraron investigaciones, sin embargo, empleando el RT-PCR [27], [28] y técnicas de detección basadas en inmunoensayos [29], [30].

Dicho esto, el presente trabajo de tesis se basa en el diseño y caracterización de un dispositivo portátil para el diagnóstico simultáneo de los virus SARS-CoV-2 e Influenza A mediante la medición de fluorescencia en amplificación isotérmica LAMP.

1.3 OBJETIVOS

A partir de lo expuesto anteriormente, se propone en este trabajo:

1. Diseñar, fabricar y poner en funcionamiento un dispositivo para el diagnóstico simultáneo de influenza y SARS-CoV-2 mediante amplificación isotérmica.
2. Implementar con instrumentación sencilla la medición de fluorescencia producto de la reacción de amplificación genética.
3. Desarrollar el algoritmo de procesamiento para mejorar la resolución y sensibilidad del método.
4. Establecer la comunicación entre el dispositivo y una computadora para el manejo de los resultados.

1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS

Este trabajo se divide en cinco capítulos, incluyendo el presente, organizados de la siguiente manera:

- En el **Capítulo 1**: Introducción, se aborda la motivación y antecedentes que impulsaron al desarrollo de este trabajo. Con base en ello, se plantea la problemática a resolver y los objetivos que se pretenden cumplir.
- Posteriormente, en el **Capítulo 2**: Antecedentes, se exponen los conceptos y fundamentos necesarios para comprender el contenido del trabajo, abordando las definiciones y principios de funcionamiento de las principales técnicas de amplificación genética, así como de los mecanismos de detección y cuantificación empleados conjuntamente a las mismas.
- En el **Capítulo 3**: Diseño experimental, se presenta el diseño del prototipo propuesto, así como los componentes y materiales empleados y el procedimiento realizado. También se muestra la metodología experimental desarrollada durante las pruebas.
- En el **Capítulo 4**: Resultados, se muestra la caracterización del sistema óptico y del sistema de control de temperatura, así como la validación de la metodología mediante otras técnicas de inspección visual.
- Por último, en el **Capítulo 5**: Conclusiones y perspectivas, se muestran las conclusiones obtenidas del presente trabajo, así como posibles recomendaciones a fin de mejorar el desempeño del dispositivo para futuras aplicaciones.

Establecidos los antecedentes y motivaciones que llevaron al desarrollo de este trabajo, en el siguiente capítulo se introduce al lector a los conceptos y bases teóricas, con el fin de dar un marco de referencia que sustente la metodología empleada para el diseño de un dispositivo de detección simultánea de patógenos y el sistema de instrumentación correspondiente.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

En este capítulo se muestran los conceptos teóricos necesarios para la comprensión del trabajo. Se describen los diversos métodos de amplificación genética, así como los métodos de detección y cuantificación de esta. Además, se analizan los principales trabajos encontrados en la literatura enfocados a integrar estas técnicas en dispositivos portátiles.

2.1 MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN GENÉTICA

La amplificación de ácidos nucleicos es un método esencial involucrado en el diagnóstico molecular, la manipulación y análisis genéticos incluyendo la detección de virus, bacterias y desórdenes genéticos [31]. Recientemente se ha demostrado la relación de expresiones de microARN con ciertas enfermedades como cáncer de pulmón, algunas variantes de linfomas, glioblastomas, entre otras [32]. Estos métodos también son de interés para la evaluación de la calidad en los alimentos, las ciencias forenses y el sector agrícola [33].

De manera general, el proceso para la amplificación y análisis de ácidos nucleicos (Fig. 2.1) comienza por la recolección de muestras, seguida de unas etapas de amplificación y cuantificación, esta última se puede realizar durante o al final de la amplificación, arrojando resultados cualitativos (turbiedad), semicuantitativos (colorimetría a simple vista, electroquímica) o cuantitativos (fluorescencia en tiempo real).

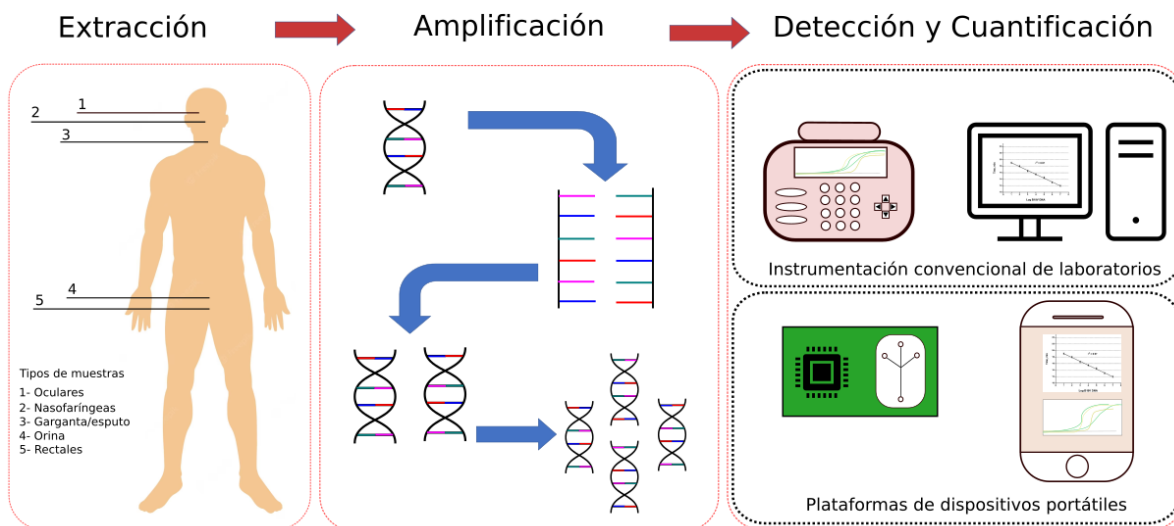


Fig. 2.1: Proceso general en sistemas de amplificación genética.

El uso de técnicas con ciclado térmico como el PCR, q-PCR y otras variantes están limitados por la infraestructura necesaria para su realización [34], hasta ahora restringida a laboratorios lejos del lugar donde se realizan las pruebas, cuestión que retrasa aún más la obtención de resultados. En este contexto, la simplicidad de técnicas de amplificación isotérmica puede resultar provechosa para el desarrollo de pruebas en el punto de atención (*POC* por sus siglas en inglés).

2.1.1 Métodos de amplificación genética con ciclado térmico

Estos métodos se basan en la realización de diferentes etapas (desnaturalización, alineación y extensión) que son realizadas a diferentes temperaturas en un proceso cíclico. De ahí la necesidad de termocicladores e instrumentación compleja y la dificultad para su implementación lejos de la infraestructura de los laboratorios.

Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR)

El RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) fue la primera prueba de diagnóstico molecular empleada para detectar SARS-CoV-2 en muestras de pacientes y es considerado el estándar de oro para el diagnóstico del COVID-19 [35]. Es uno de los diferentes tipos de PCR que han surgido desde la creación de esta prueba por Kary Mullis en 1983 que le hizo ganar el premio Nobel de Química en 1993.

La concepción del PCR originalmente, fue a partir de la unión de distintos componentes que ya existían en aquel momento: la síntesis de pequeñas piezas de ADN de cadena simple (oligonucleótidos) y su uso para la síntesis específica de nuevas copias de ADN empleando la polimerasa [36]. Lo novedoso del concepto de Mullis fue la yuxtaposición de dos oligonucleótidos, complementarios a hebras opuestas del ADN, para amplificar específicamente la región entre ellos y lograrlo de manera repetitiva de modo que el producto de una ronda de actividad polimerasa se añadiera a la reserva de plantilla para la próxima ronda, por eso su nombre de reacción en cadena [37].

La polimerasa utilizada originalmente para el PCR fue extraída de la bacteria *Escherichia coli* y a pesar de que ha sido una poderosa herramienta en un amplio rango de aplicaciones y ha posibilitado la explosión de las tecnologías de secuenciación de ADN, tiene varias desventajas en su empleo en el PCR. Para PCR, se debe realizar un calentamiento que desnaturalice la doble cadena de ADN después de cada reacción de síntesis. Este calentamiento inevitablemente desactiva también la polimerasa de ADN de *E. coli*, por ello debían agregarse manualmente nuevas enzimas al inicio de cada ciclo. La solución a este problema se encontró sustituyendo esta por la polimerasa del ADN de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que es capaz de mantenerse estable en la temperatura de 95 °C a la que se desarrolla el proceso de desnaturalización del ADN. Este cambio también permitió desarrollar el proceso de síntesis de ADN a mayores temperaturas, eliminando productos no específicos y permitiendo una amplificación más fidedigna [36].

Aún con esta mejora, resultaba un procedimiento tedioso el cambiar manualmente de un baño térmico a otro, hasta el desarrollo del primer termociclador por Cetus Corporation, con ciclos temporales. Luego surgieron otros sistemas, con tres zonas, cada una con diferentes temperaturas y las muestras moviéndose entre ellas, llamados “el sistema de dominio espacial”. Actualmente son más comunes los sistemas de dominio temporal [38].

PCR típicamente consiste en una serie de ciclos térmicos repetidos entre 20 y 40 veces, resultando de cada ciclo el doble de moléculas de ADN objetivo (Fig. 2.2). En teoría, n ciclos deben producir 2^n copias de la cantidad inicial [39]. En la práctica, el proceso de amplificación se

satura mientras se agotan los reactivos y los productos de la amplificación forman moléculas circulares, más estables térmicamente, evitando cualquier amplificación adicional. La sensibilidad de este método depende de la amplificación basta en enzimas y su especificidad en la hibridación de secuencias objetivo.

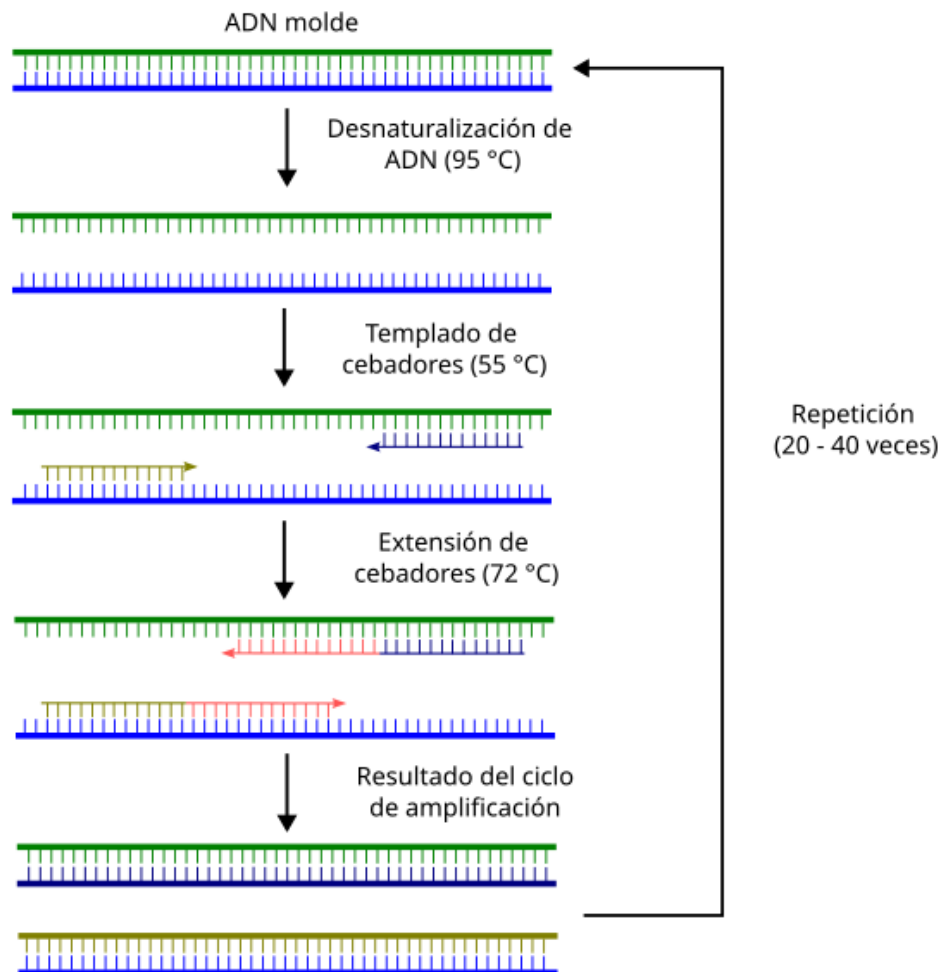


Fig. 2.2: Esquema del proceso de amplificación mediante PCR.

En el PCR convencional se analizan los productos amplificados al final de la reacción mediante la electroforesis en gel de agarosa (medición de punto final). En este método se separan los productos de la reacción basados en su tamaño y carga. Permite determinar la presencia y tamaño de los productos del PCR, con ayuda de un set de productos de ADN con tamaño conocido que se coloca simultáneamente en el gel como marcadores moleculares [40].

A partir de 1993 comienza a realizarse un análisis cuantitativo del PCR a partir de un incremento en la fluorescencia [41], surgiendo el qPCR: mientras menor cantidad de ciclos fueran necesarios para producir una fluorescencia detectable, mayor era el número de secuencias objetivo. Un PCR en tiempo real típico, con una escala de tiempo lineal, presenta una gráfica con forma sigmoideal, que incluye una fase basal, seguida de una exponencial que alcanza una meseta pasando por una

fase lineal [39]. A partir de los datos extraídos de la fase exponencial para cantidades o número de copias conocidos, se trazan curvas estándar de calibración que permiten la medición relativa del número de copias inicial en muestras desconocidas.

La incorporación de la transcripción inversa como paso inicial, previo al ciclado térmico, permitió el uso de tecnologías de PCR (RT-PCR o qRT-PCR) en el análisis de ARN [42], [43]. Estos cambios permitieron que poco a poco el PCR se convirtiera en el estándar de oro para el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos.

El término “PCR digital” o dPCR es empleado por primera vez en 1999 por Kinzler y Vogelstein [44] y se estableció rápidamente gracias a que describía la naturaleza de la reacción y el espíritu de aquellos tiempos, aunque el método descrito no era nuevo [45]. Mediante la enumeración de eventos binomiales (ausencia (0) o presencia (1) de fluorescencia en una porción diminuta de muestra)

La principal diferencia entre qPCR y dPCR yace en la forma de medir la cantidad de secuencia objetivo: mientras que en el qPCR se enfoca el análisis en la señal fluorescente en la etapa exponencial, dPCR colecta señales de fluorescencia en mediciones de punto final y utiliza la relación de particiones con amplificación positiva con el total para calcular la concentración del objetivo en la muestra.

Reacción en cadena de ligasa (*Ligase Chain Reaction - LCR*)

La reacción en cadena de ligasa es un método de amplificación de ADN que se basa en múltiples ciclos de hibridación y ligadura de oligonucleótidos para amplificar secuencias de interés [46]. Es un método similar al PCR, la principal diferencia es que el LCR amplifica la molécula de sonda en lugar de producir amplicón a través de la polimerización de nucleótidos [47]. En este proceso, dos oligonucleótidos contiguos son unidos por ligasa de ADN tras la hibridación perfecta con un ADN objetivo y luego es amplificada la sonda con oligonucleótidos complementarios [48].

Este método tiene un interés creciente por la habilidad para identificar efectivamente los pares de bases no complementarios, mayormente debidos a mutaciones mientras asegura la misma eficiencia de amplificación que el PCR [49]. Los productos de la reacción pueden ser detectados mediante electroforesis, fluorescencia, ELISA, entre otros [50]. Su desventaja fundamental es la necesidad de ciclado térmico y, en consecuencia, la dificultad para realizarlo en dispositivos portátiles.

2.1.2 Métodos de amplificación isotérmica

El uso comercial del PCR fue limitado por varios años por la protección de la patente de Cetus Corporation, por ello los investigadores se dedicaron a superar los problemas relacionados con el enfriamiento y la creación de nuevos métodos de amplificación de ácidos nucleicos [38]. Varias técnicas han sido desarrolladas basadas en la amplificación isotérmica, de esta manera no se requiere el ciclado térmico y tiene ventajas en cuanto a simplicidad de diseño y consumo energético.

Amplificación de círculo rodante (*Rolling circle amplification - RCA*)

Siendo el único método de amplificación isotérmica que emplea una plantilla circular, presenta oportunidades y aplicaciones únicas [51]. Este método utiliza la actividad de desplazamiento de cadena la polimerasa de ADN del bacteriófago Phi29 en ADN circulares [52]. La polimerasa extiende un primer en una plantilla circular (Fig. 2.3), generando copias enlazadas en tándem de la secuencia complementaria de la plantilla [53]. De forma natural este proceso ocurre en múltiples plásmidos y virus. Los productos de la reacción pueden ser detectados utilizando electroforesis en gel de agarosa, microscopía y citometría de flujo [54].

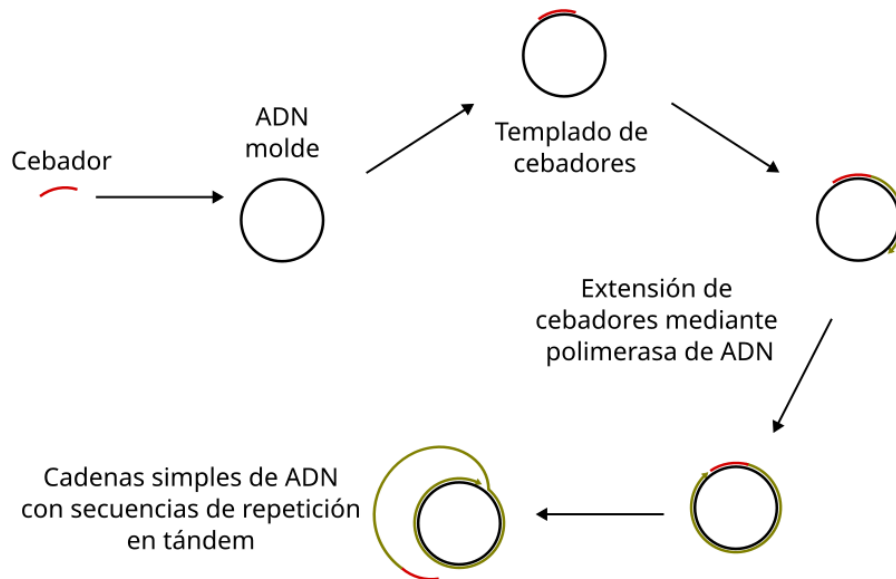


Fig. 2.3: Esquema de funcionamiento de la amplificación mediante RCA.

El proceso normalmente se realiza a una temperatura constante en el rango de 30-60 °C [32] y tiene una duración entre 30 y 90 minutos, comenzando con cantidades tan bajas como 10 copias de ADN [52]. Como beneficio tiene la simplicidad del mecanismo de reacción, requiriendo solo un primer y una enzima [55], así como la facilidad y precisión en sistemas de cuantificación [56]. Tiene la desventaja de que presenta una amplificación lineal en el tiempo [55].

Amplificación dependiente de helicasa (*Helicase-dependent amplification - HDA*)

Este es un método análogo al PCR, donde la doble cadena de ADN es disociada por la helicasa en lugar de por el incremento de la temperatura [32], dejando libres las proteínas de cadena de unión sencilla (PCUS). De forma natural ocurre en los organismos vivos en procesos celulares como la replicación, reparación y recombinación [57]. Estas cadenas simples de ADN son empleadas como plantillas para la hibridación de primers y posterior extensión [58]. De esta forma (Fig. 2.4), se pueden omitir los pasos de desnaturalización y termociclado que requiere el PCR, realizando todo el proceso a una temperatura de incubación constante [53]. Los amplicones resultantes pueden detectarse en tiempo real y se han creado dispositivos portátiles de flujo lateral, biochips y sensores electroquímicos basados en este método [32], [59].

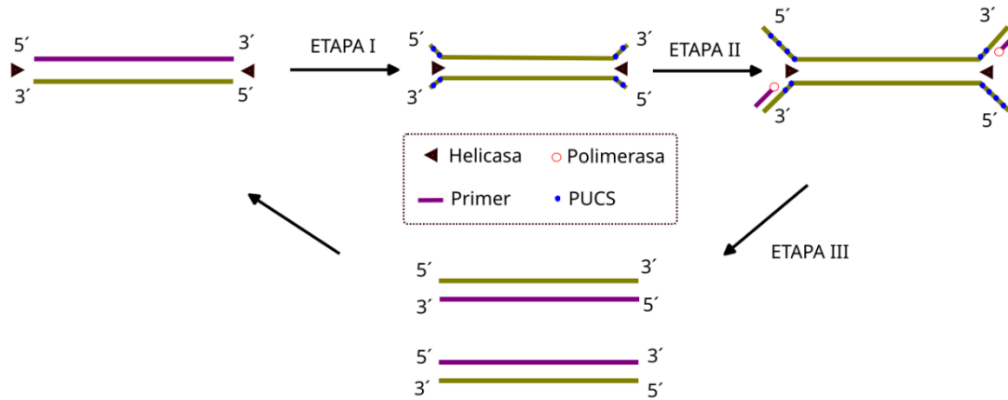


Fig. 2.4: Esquema del proceso de amplificación mediante HDA.

Entre sus desventajas están los falsos positivos o negativos a consecuencia del alto ruido, pérdida de señal, baja sensibilidad que pueden causar las muestras con altas concentraciones de primers en presencia de polimerasas y trifosfatos, especialmente cuando la reacción se realiza a temperaturas menores a 60 °C. Un cuidadoso diseño de los primers puede atenuar algunos de estos problemas [59]. Diferentes helicatas han sido empleadas, creando formas mesofílicas y termofílicas de este método (mHDA y tHDA), simplificando los componentes de la reacción e influyendo en la eficiencia y selectividad de la misma [60].

Amplificación de desplazamiento de cadena (*Strand-displacement amplification - SDA*)

Este método es descrito por primera vez en 1992, basándose en una reacción cíclica que involucra polimerización, ruptura y desplazamiento [61]. SDA combina la capacidad de una endonucleasa de restricción para cortar la cadena no modificada de su ADN objetivo y la acción de una polimerasa de ADN deficiente en exonucleasa para extender el extremo 3' en ese corte y desplazar la cadena de ADN a continuación [53].

En la primera etapa (Fig. 2.5), el ADN de doble cadena es desnaturalizado a 95 °C, mientras que el resto de las etapas se realizan a 37 °C [32]. En una reacción se pueden producir 10^9 copias de ADN objetivo en menos de una hora [52]. Los resultados de la amplificación pueden ser detectados por electroforesis en gel, métodos que involucran la fluorescencia o tecnologías basadas en hibridación [55]. Tecnologías basadas en este método han sido empleadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas como clamidia o gonorrea [53], también para la detección de tuberculosis con una sensibilidad de 10 copias de ADN objetivo [54].

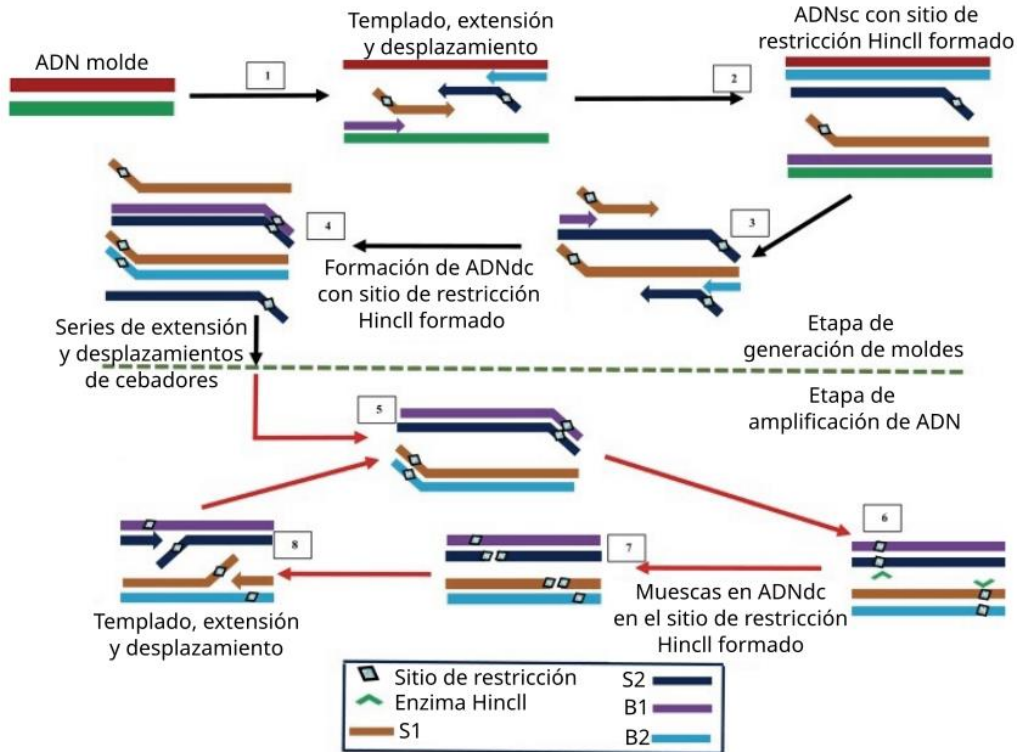


Fig. 2.5: Esquema general del funcionamiento de la amplificación mediante SDA

Por su alta sensibilidad y características intrínsecas como reacciones enzimáticas en una solución homogénea, bajo condiciones isotérmicas, este método ha captado un interés creciente de la comunidad científica [62]. Una de las limitaciones de este método es la baja eficiencia para amplificar secuencias objetivo largas [47].

Amplificación de la polimerasa recombinasa (*Recombinase polymerase amplification - RPA*)

Este método (Fig. 2.6) es descrito por primera vez en 2006 por Pipienburg et al. [63]. Es similar al HDA porque emplea una enzima para realizar la separación de la doble cadena de ADN. En organismos vivos, las enzimas recombinasa y ADN polimerasa participan en la síntesis, recombinación y reparación de ADN [54]. El primer paso en la amplificación involucra la formación de complejos entre la recombinasa y alguno o ambos primers empleados [32]. Cuando este complejo encuentra una secuencia complementaria con el primer, la recombinasa separa la doble cadena, permitiendo la interacción del primer con el analito. La polimerasa de ADN presente en el proceso disocia el complejo con recombinasa y enlaza la nueva doble cadena con los primers que funciona como plantilla para el nuevo ciclo [52].

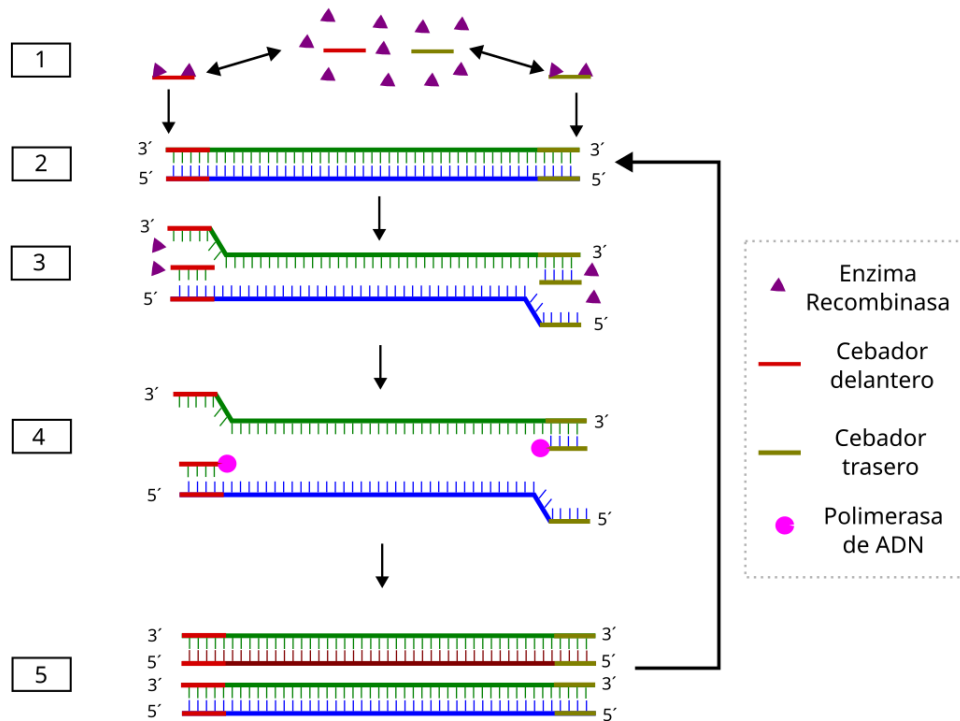


Fig. 2.6: Esquema de funcionamiento de la amplificación mediante RPA.

Es un método muy eficiente, ya que pueden obtenerse billones de copias de ADN en un intervalo de 40-60 minutos a temperaturas de incubación constantes entre 37 °C y 42 °C [55], aunque frecuentemente pueden obtenerse resultados en menos de 10 minutos [64]. Los bajos requerimientos de temperatura, la simpleza del procedimiento y la gran eficiencia del método permite su uso para el diagnóstico de enfermedades en dispositivos POC [54]. Sin embargo puede producirse amplificación no específica inherente al método, reportada por varios autores incluyendo los creadores del método [63], [65], [66].

Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (Nucleic acid sequence-based amplification - NASBA)

Es un sistema de amplificación basado en transcripción sensible especialmente diseñado para la detección de ARN, aunque puede ser empleada con ADN siendo mucho menos eficiente [67]. En esta reacción participan tres enzimas: la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT), RNasa H y T7 polimerasa de ARN dependiente de ADN. La amplificación ocurre a una temperatura de 41 °C posterior a un paso inicial de desnaturalización y separación de cadenas a 95 °C en el caso del ADN y a 65 °C para la amplificación de ARN [52].

El proceso (Fig. 2.7) es mucho más eficiente que el PCR y cualquier otro método limitado a un incremento binario en cada ciclo [68]. Es un método robusto que requiere menos ciclos para producir la amplificación deseada, por tanto se reducen errores acumulativos inherentes, como los provocados por la transcriptasa inversa, así como el tiempo de incubación [69]. Por estas razones, NASBA ha sido empleado como el método más poderoso para la detección de muestras objetivos de ARN bajo condiciones isotérmicas y extensamente aplicada para el diagnóstico de

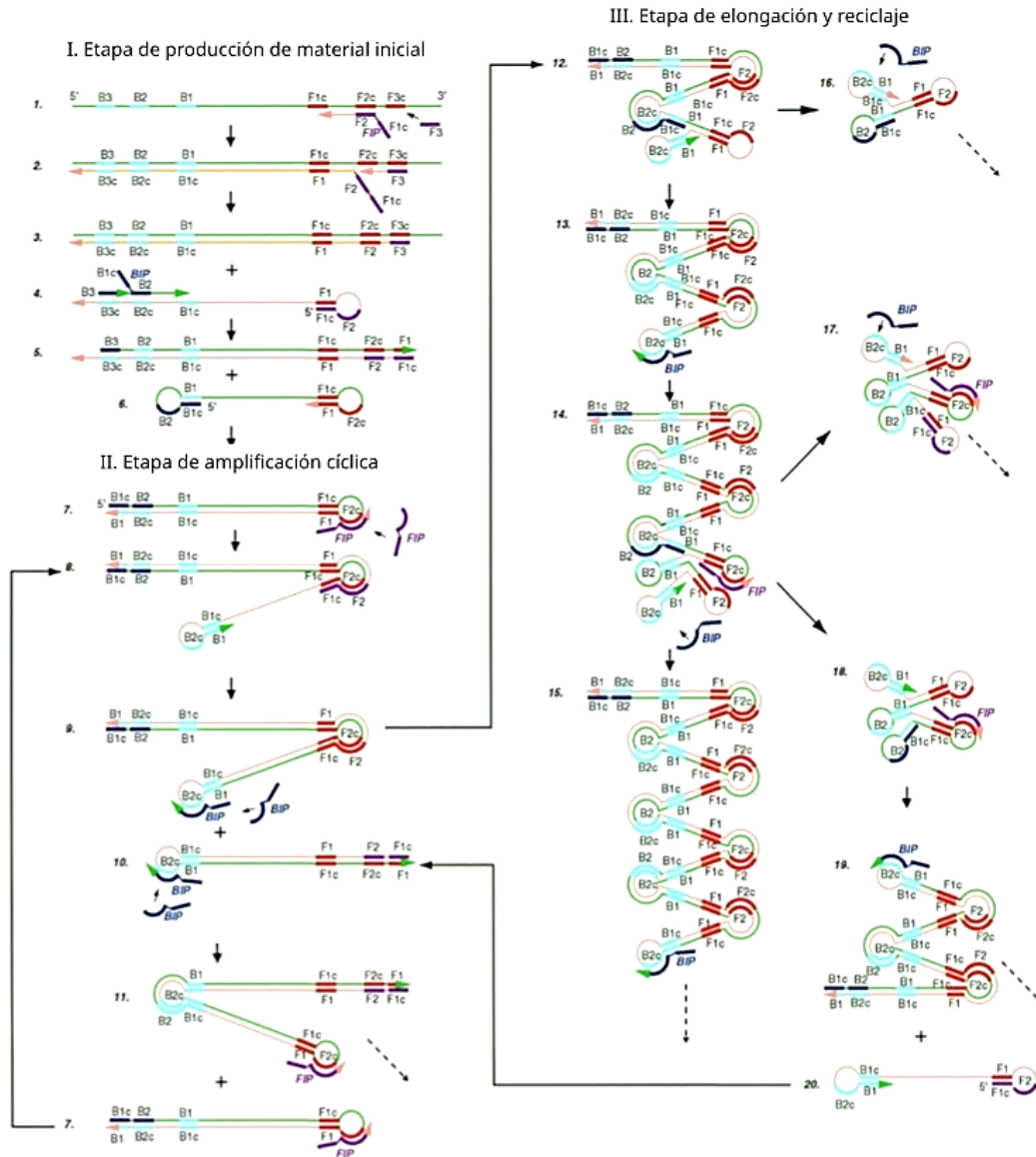


Fig. 2.8: Esquema general del proceso LAMP.

Como técnicas de detección para los productos de amplificación son empleados frecuentemente la electroforesis en gel, la detección de fluorescencia o directamente por la turbiedad producida por la acumulación de pirofosfatos de magnesio como productos finales [74], [75]. A menudo son intercalados marcadores fluorescentes como Pico, SYBR Green y ROX para mejorar la detección visual directa de los productos de amplificación [54] y posibilitar medir en tiempo real la cantidad de amplicones formados [76].

Una parte muy importante para el correcto desarrollo de la reacción LAMP es el diseño de los primers, teniendo en cuenta factores como la concentración, localización de los pares de nucleótidos y distancia entre las regiones de ADN [77]. Esta tarea se puede llevar a cabo mediante softwares como LAMP Designer (OptiGene, Horsham, Reino Unido) [78], PrimerExplorer (Eiken Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japón) [79] o LAMP Designer (Premier Biosoft,

San Francisco, USA) [80].

Con el tiempo han sido implementadas variantes de LAMP como RT-LAMP o M-LAMP empleando transcriptasa inversa junto a la polimerasa de ADN, o empleando primers que producen señales diferentes para la identificación de múltiples patógenos respectivamente [77].

Los resultados del empleo de LAMP en ensayos para detección de bacterias, virus, hongos y parásitos han mostrado un desempeño igual o mejor que técnicas como PCR, inmunoensayos y otros métodos [72]. Es un método muy eficiente para la amplificación de grandes cantidades de ADN en cortos períodos de tiempo [53], además el empleo de varios primers hace del LAMP un método muy específico. Mientras que no es esencial realizar un paso de separación inicial a 95 °C, se ha demostrado que produce un aumento en la sensibilidad analítica [81], [82].

2.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

Electroforesis en gel

La electroforesis es un método empleado para la separación de moléculas debido al movimiento diferencial de iones con diferente carga y forma en un campo eléctrico [83]. Cuando una partícula cargada se coloca en un campo eléctrico, se acelera y su velocidad aumenta hasta que su resistencia se vuelve igual a la fuerza eléctrica [84]. Es una técnica clásica utilizada frecuentemente para la identificación y purificación de fragmentos de ADN, separándolos de manera efectiva de acuerdo a su tamaño, desde 100 bp hasta 25 kb [85].

Las moléculas de ADN están cargadas negativamente debido al ácido fosfórico en la estructura azúcar-fosfato en el ADN. Por esta razón, el ADN se mueve en un campo eléctrico de cátodo a ánodo, como anión [86]. Parámetros como el medio de tamizado, voltaje aplicado y el tiempo de duración de la prueba, pueden cambiarse para maximizar la resolución de esta técnica [87].

El protocolo para el desarrollo de esta técnica se puede dividir en tres etapas [88]:

1. Se prepara el gel con concentración de agarosa de acuerdo con el tamaño de los fragmentos de ADN a separar.
2. Las muestras de ADN se colocan en los pozos de muestra y se coloca el gel a un voltaje y por un período de tiempo que permita una separación óptima.
3. Se tiñe el gel o, si se incorporó bromuro de etidio u otro marcador y el tampón de electroforesis, se visualiza directamente bajo luz ultravioleta.

Una ventaja de este método es la posibilidad de detectar pequeñas concentraciones de ADN empleando intercaladores fluorescentes. Sin embargo, el correcto desempeño depende de la sustancia empleada, por ejemplo, la tinción con nitrato de plata ha demostrado ser adecuada para ácidos nucleicos, no así con glicoproteínas [89]. También de acuerdo a estas sustancias es recomendable el empleo de filtros en el espectro de emisión, como filtros naranjas para el bromuro de etidio, de forma que las bandas de ADN aparecen blancas sobre un fondo negro [90]. Otra desventaja de este método es la extensión en tiempo de la prueba, llegando a tardar hasta 20 horas en muestras de longitudes entre 2.5 kb y 6.5 kb [91].

Es destacable que esta técnica se emplea como medición de punto final en la amplificación de ácidos nucleicos, no para mediciones en tiempo real. En dispositivos portátiles se ha utilizado esta técnica empleando altos campos eléctricos para ahorrar tiempo y consumo, pero la baja disipación térmica de los materiales de fabricación de los chips ha contribuido a una dispersión extra e incluso descomposición del analito, reduciendo la eficiencia de estos dispositivos [92].

Detección óptica mediante turbiedad

La turbiedad es una medida de grado de transparencia en líquidos. Es una medición óptica que indica la presencia de partículas suspendidas a partir de la dispersión de la luz. Esta dispersión se produce por la interacción entre la radiación electromagnética con dichas partículas, induciendo oscilaciones que resultan en un patrón de radiación secundario [93].

Para partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda del haz incidente se aplica la teoría de Rayleigh, que manifiesta que esta dispersión depende del tamaño de las partículas, el índice de refracción y la longitud de onda de la luz incidente [94]. Se ha observado que cuando se amplifican ácidos nucleicos, específicamente por reacciones LAMP, se produce la precipitación de pirofosfato de magnesio en correspondencia con el avance de la reacción [75]. Al no depender de la secuencia del producto amplificado, no es posible el empleo de esta forma de cuantificación en detecciones multiplex [95].

Este método de cuantificación es susceptible a la amplificación de ADN no específica producida por el método de amplificación empleado, es por ello que, siendo LAMP un método con mayor especificidad respecto a otros, la cuantificación por turbiedad en este método ofrece más confianza para mediciones de punto final o en tiempo real [74], [96]. Otro aspecto a considerar es que no es posible su uso con muestras que contienen materiales que absorben luz en el espectro a medir [74].

Electroquímica

Los biosensores electroquímicos se basan en la modificación de un electrodo de trabajo con una biomolécula (anticuerpos, ADN, receptores, etc.) que interactúa con un analito objetivo específico presente en un electrolito acuoso y genera una señal eléctrica correspondiente a su concentración [35] en respuesta a impulsos eléctricos como voltaje o corriente. De acuerdo a la naturaleza del proceso de detección, estos biosensores se pueden clasificar en dos categorías [97]: biosensores electroquímicos catalíticos (enzimáticos), cuyo componente biológico es una enzima, una célula o un tejido; o biosensores de propensión, en los que se fijan anticuerpos, receptores de membrana o ácidos nucleicos en el electrodo.

Los métodos de análisis se subdividen en dos categorías [97]: estáticos (con corriente nula) y dinámicos (con paso de corriente). Los biosensores electroquímicos son capaces de emplear el electrodo como amperímetro, potenciómetro, conversor de conductividad e impedancia para convertir la señal química en una señal eléctrica cuantificable [98].

La potenciometría se basa en la medición de diferencia de potencial entre dos electrodos inmersos en una solución, mientras casi no fluye corriente por el circuito. Esta medida proporciona datos sobre la estructura de la muestra (concentración de iones) [97].

La amperometría es uno de los métodos de transducción más comunes en el desarrollo de biosensores. Su funcionamiento está basado en la aplicación de un voltaje constante y el monitoreo de la corriente asociada con la oxidación o reducción de elementos electroactivos en el proceso [99]. Estos sensores son más sensibles que los potenciométricos [97].

La detección electroquímica de ácidos nucleicos de virus ofrece ventajas en cuanto a facilidad de implementación, portabilidad del detector, alta selectividad y la posibilidad de detectar ácidos nucleicos objetivos en el rango fM [100]. Sin embargo, el desarrollo de este método conlleva a gastos significativos determinados por los materiales empleados en la producción de los electrodos: oro [101], [102], grafeno [103], [104], carbono [105], [106]; además del equipamiento empleado para la caracterización y medición. Los dispositivos desarrollados basándose en este método para la detección de ácidos nucleicos aún no alcanza el desempeño analítico de métodos ópticos como la fluorescencia [4].

Fluorescencia

La aplicación de técnicas de espectroscopía moderna a la detección de ácidos nucleicos permite realizar un seguimiento de los objetivos de detección. Una de las estrategias empleadas en biosensores ópticos es amplificar la señal por hibridación de los ácidos nucleicos con tintes y la otra es depender de las propiedades ópticas de la hibridación de ácidos nucleicos [33].

A menudo son utilizados los llamados faros moleculares o *molecular beacons* que están constituidos por cadenas simples de oligonucleótidos, de los que la zona del lazo se une al ADN objetivo, mientras que en los extremos están el fluoróforo y el extintor (*quencher*) [107]. Al unirse a una secuencia de ADN perfectamente complementaria, se extiende y causa la distancia entre el fluoróforo y el *quencher* liberando la señal fluorescente. En ausencia de ADN objetivo, la estructura de tallo y lazo mantiene el fluoróforo atrapado y la energía de excitación se transfiere al *quencher* y se libera como calor [108].

La cuantificación de fluorescencia para monitorear en tiempo real la amplificación ha sido reportada en la literatura con instrumentos de detección variados: desde la cámara de un celular [109], [110], fotodiodos [18], [19], fototransistores [6], [111] y cámaras CCD [112]. En el trabajo de Quyen *et al.*[113] se muestra la importancia de emplear una concentración óptima de los fluoróforos para la detección en tiempo real, aumentando además para dispositivos POC donde por lo general se emplean detectores pequeños, sencillos y más baratos que los utilizados en equipos de laboratorio.

Contrario a la forma en que sucede en el PCR en tiempo real (Fig. 2.9A), la curva de amplificación en LAMP no es sigmoidal (Fig. 2.9C), pues presenta una atenuación en la fluorescencia luego de la etapa de amplificación causada por el aumento de la turbiedad que produce la precipitación de pirofosfatos de magnesio [114]. La otra diferencia entre ambos procesos de amplificación radica en que en PCR se determinan las curvas características a partir de la cantidad de ciclos para pasar el umbral (Fig. 2.9B) y en LAMP (Fig. 2.9D) es el tiempo cuantificado en minutos.

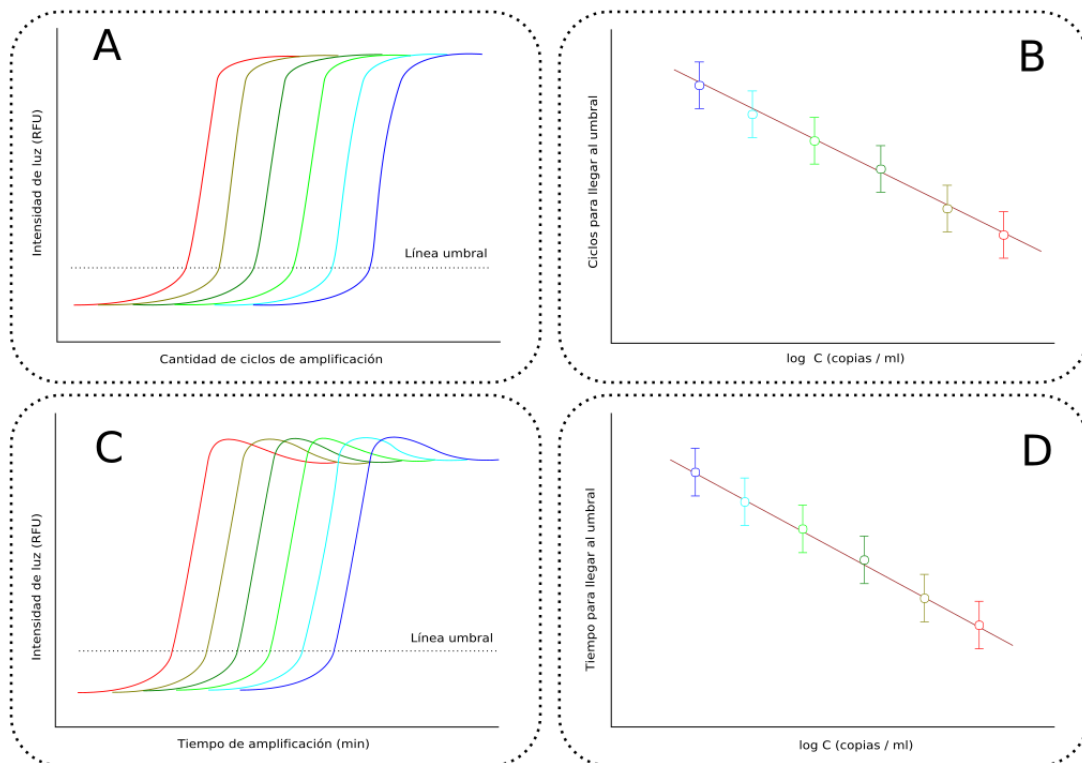


Fig. 2.9: Generación de curvas características de los procesos de amplificación mediante PCR (A, B) y LAMP (C, D).

Aunque la inspección visual pudiera resultar más simple al no requerir un dispositivo de detección, el resultado obtenido, sería semi-cuantitativo [18], mientras que el monitoreo en tiempo real de la fluorescencia en la reacción permite detectar anomalías en su desarrollo debidas a la contaminación, además de la cuantificación de los ácidos nucleicos amplificados. Un sistema de distribución de energía eléctrica está formado por el conjunto de elementos encargados de conducir la energía de una subestación de potencia hasta el usuario. Básicamente, la distribución de energía eléctrica comprende las líneas primarias de distribución, los transformadores de distribución, las líneas secundarias de distribución, las acometidas y medidores [28]. De acuerdo con el nivel de voltaje se pueden dividir en: redes de distribución de alto, medio y bajo voltaje [29]; de acuerdo con su construcción en: aéreas y soterradas; según la ubicación geográfica en: urbanas, rurales, suburbanas y turísticas; de acuerdo con el tipo de cargas en: residenciales, comerciales, industriales, de alumbrado público y mixtas y de acuerdo con la confiabilidad en: primera, segunda y tercera categoría [30].

2.3 INTEGRACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA EN DISPOSITIVOS PORTÁTILES

Las técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos a menudo se integran con dispositivos miniaturizados y/o portátiles, incluidos chips microfluídicos, plataformas capilares y tiras reactivas; posibilitan así la creación de dispositivos comerciales y los kits de diagnóstico disponibles para el análisis POC [115].

Como la mayoría de estos métodos dependen de la actividad enzimática y no del ciclado térmico como el PCR, los dispositivos de amplificación isotérmica en miniatura emplean micro cámaras sin movimiento de fluidos durante la reacción [116]. En esta sección, discutiremos los éxitos en la integración de varios componentes con amplificación isotérmica.

En el trabajo de Mori *et al.* [74] se desarrolla un dispositivo integrado para la cuantificación de turbiedad en tiempo real, durante 60 minutos de una reacción LAMP. Empleando fotodiodos para medir la intensidad de luminiscencia y diodos LED, calculan la turbiedad en una computadora mediante la Ecuación 1, donde T es la turbiedad, I_{PD} es la intensidad de luz recibida por el fotodiodo e I_{LED} es la intensidad de luz emitida por el LED.

$$T = \ln(I_{PD}/I_{LED}) \quad (1)$$

En esta investigación se pudo demostrar una relación lineal entre la turbiedad medida y la cantidad de ADN sintetizada. También demostró que existe una relación lineal entre la cantidad de ADN objetivo al inicio de la reacción y el tiempo necesario para llegar a un nivel determinado de turbiedad. Sin embargo, a causa del relativamente pequeño tamaño del camino óptico y que la sensibilidad del turbidímetro no es muy alta, sólo pudieron detectar incrementos en la turbiedad con una relación de aproximadamente 1/3 entre la cantidad de ADN sintetizado y el volumen total de la muestra (25 μ l para este caso).

En el estudio de Hu *et al.* [117] desarrollan un dispositivo que integra la extracción rápida de ácidos nucleicos basado en filtración de fase inmiscible asistida por tensión superficial. En primer lugar, desarrollan un método de detección de alta sensibilidad basado en microgotas. Además, fabrican un microchip POC que incluye la filtración, mezcla, generación de microgotas y su colocación para la posterior detección. La detección de fluorescencia se realiza con un teléfono inteligente Huawei Mate 20, un lente microscópico 10X, un filtro de excitación y uno de detección, un espejo dicróico y una linterna de luz azul. Luego de realizar la amplificación isotérmica, se toma una fotografía con el celular y la imagen es subida al servidor en la nube, se analiza con el software Image-J y devuelven los resultados del conteo. Con un tiempo de detección de 60 minutos, este dispositivo logra resultados de detección favorables en muestras con bajas concentraciones de ácidos nucleicos.

Un dispositivo microfluídico digital de detección de ADN mediante LAMP fue desarrollado por Wan *et al.* [5], en un sistema que integra la manipulación de las gotas y el control de temperatura en tiempo real. También desarrollaron un software que puede instalarse en cualquier Tablet y comunicarse con el dispositivo vía Bluetooth. Las muestras utilizadas para el análisis son de 2 μ l, reduciendo considerablemente el consumo de reactivos. El dispositivo logró detectar hasta cuarenta copias de ADN por reacción, resultados comparables a dispositivos comerciales.

Ishii *et al.* [18] en su trabajo desarrollan un lector de fluorescencia en microplacas basado en LAMP. Es un dispositivo portátil que permite el desarrollo de ensayos LAMP en el punto de interés, funcionando con baterías. Para el calentamiento emplean una lámina de óxido de indio y estaño (ITO), que permite establecer la temperatura deseada mientras se monitorea la

fluorescencia en los nueve depósitos a través de arreglos de fotodiodos. Las pruebas realizadas demostraron la capacidad del dispositivo para discriminar variedades de arroz. El empleo de filtros para la excitación y la emisión evita la interferencia de señales en el dispositivo. El sistema funciona con una CPU Arduino Nano 3.0, realizando una medición por segundo y transmite los datos vía Bluetooth a una laptop.

Dispositivos portátiles con amplificación LAMP en el contexto del SARS-CoV-2

Con la situación global generada por el COVID-19, se hizo necesario el desarrollo de mecanismos de detección rápidos y precisos para contener la rápida expansión. Desde el surgimiento de la enfermedad, varios investigadores han demostrado la pertinencia de LAMP como el método más efectivo para el diagnóstico de la infección de coronavirus [9], [10]. También se ha mostrado el potencial de esta técnica en la detección de otros virus como los adenovirus [11], [12] y varios tipos de influenza [13], [14], [15], [16], [17].

La amplificación y detección de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 mediante LAMP ha sido empleada en muestras provenientes de fluidos corporales, evidentemente para el diagnóstico de la enfermedad, pero también en muestras de aguas residuales como herramienta de vigilancia y gestión para evitar la dispersión del virus.

Un ejemplo de esto es el realizado por Ramírez-Chavarría *et al.* [118] empleando un sensor electroquímico. Este dispositivo funciona mediante tiras reactivas desechables con electrodos serigrafiados y agregando azul de metileno como intercalante electroactivo. La estrategia de detección consiste en medir el cambio en la corriente de Faraday causada porque el azul de metileno se vuelve menos activo en el intercambio de electrones en la medida en que se forman los amplicones productos de la reacción LAMP. Las mediciones se desarrollan en un rango de 0 V a 0.5 V, con una amplitud de pasos de 5 mV y una frecuencia 15 Hz. El dispositivo mostró una precisión del 90 % y en la relación de tiempo al umbral se muestra una linealidad de aproximadamente el 99 %, aunque el tiempo se extiende bastante para muestras muy diluidas.

El trabajo de Torezin Mendonça *et al.* [119] describe el funcionamiento de un dispositivo LOC para el diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante RT-LAMP. El hardware está formado por una computadora Raspberry Pi, una cámara de video, un microcontrolador Arduino Nano, una placa de circuito impreso como calentador y la cubierta impresa en 3D. Los chips fueron fabricados con PMMA. La temperatura es controlada por un algoritmo PID, manteniéndola a (65.0 ± 0.1) °C por 25 minutos y luego 5 minutos de enfriamiento, para un tiempo de reacción total de 10 minutos. El mecanismo de detección es colorimétrico, a partir del cambio de pH, empleando Rojo Fenol como indicador y la librería de visión por computadora OpenCV para el reconocimiento de color y diagnóstico, demorando menos de un segundo en este paso. El dispositivo muestra un asertividad del 86 % en el análisis de 22 muestras obtenidas de pacientes sintomáticos de un hospital local. Comparado a resultados de RT-LAMP convencionales, muestra una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 77 %.

El dispositivo POC desarrollado por Colbert *et al.* [120] combina el RT-LAMP con la técnica de difusometría de partículas para la detección del coronavirus en 35 minutos en un chip portátil con calentamiento integrado. Se emplea un teléfono para capturar imágenes de las muestras

conteniendo partículas fluorescentes luego de la realización de RT-LAMP y correlacionar el descenso en la difusividad en muestras positivas. El calentador se fabrica con tereftalato de polietileno (PET) recubierto de óxido de indio y estaño (ITO) y se emplea un termopar para el monitoreo de la temperatura. Las muestras se colocan en los chips y se calientan por 35 minutos para luego dejar enfriar y posteriormente utilizar el teléfono para la detección y diagnóstico. Este equipo logró detectar hasta 50 partículas virales por reacción a partir de muestras de saliva.

Dispositivos portátiles en el diagnóstico simultáneo de patógenos

Una de las dificultades constantes reportadas en la literatura, es la complejidad para el desarrollo de dispositivos que permitan la detección simultánea de diversos patógenos.

En el trabajo de Trinh *et al.* [121] se realiza todo el proceso de amplificación y detección en un dispositivo, ofreciendo una herramienta rápida, sensible y precisa para el diagnóstico multiplex de patógenos, empleando detección colorimétrica con nitrato de plata. El diseño compuesto de 3 capas, la primera contiene reactivos de PCR, la segunda tiene las cámaras principales de reacción y la última capa es para sellar por debajo el chip. A pesar de las grandes ventajas que ofrece este chip, todavía depende de un termociclador comercial, lo que aumenta su costo y también complejiza las condiciones para la portabilidad del método de diagnóstico. El tiempo total para la detección de patógenos transmitidos por la comida, con 40 minutos para la extracción de ADN, 75 minutos para la amplificación utilizando un termociclador comercial y 45 segundos para la detección asistida por radiación ultravioleta.

Un dispositivo para detectar rápidamente cuatro patógenos procedentes de los alimentos fue desarrollado por Xie *et al.* [19]. El dispositivo consiste en un chip microfluídico digital que contiene diez cámaras de reacción con *primers* deshidratados para la amplificación en paralelo de varios genes. El tiempo total de detección es de cincuenta minutos desde la extracción hasta el resultado. La operación es controlada por electrónica de control automático, que integra un controlador PID junto a un amplificador de potencia para el control de temperatura. El chip demostró estabilidad y repetibilidad en los resultados por 106 días a temperatura ambiente.

El dispositivo desarrollado por Seok *et al.* [21], basado en papel, permite el desarrollo de LAMP para la detección simultánea de múltiples ADN objetivos. En este estudio pudieron detectar tres diferentes muestras de ADN de meningitis, cuantificando en tiempo real la amplificación de muestras en un rango desde 10^2 hasta 10^5 copias del ADN objetivo. Colocando el dispositivo dentro de un disco de Petri, se realizó la reacción LAMP a 63 °C durante 60 minutos. La fluorescencia se midió cada 10 minutos, retirando el dispositivo de papel de la incubadora, y regresándolo rápidamente para minimizar la variación de temperatura. Un aspecto por trabajar, señalado también por los autores, es la integración de los procesos de calentamiento y cuantificación, ya que el cambio de temperatura puede afectar la eficiencia de la amplificación genética.

Un dispositivo más completo fue desarrollado por Zhou *et al.* [20], compuesto por un chip basado en papel y PDMS en el que se realiza la amplificación vía LAMP para detección simultánea de diferentes patógenos transmitidos por alimentos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*; y además un dispositivo autónomo basado en un teléfono

inteligente capaz de controlar la temperatura de la reacción y recopilar y analizar las señales de fluorescencia generadas. En el encapsulado, además del lugar para fijar el teléfono, se encuentran también dos lámparas UV (300 – 310 nm) que funcionan como fuente de luz de excitación, una placa de calentamiento y el módulo de control de temperatura, donde se implementa un lazo cerrado de control PID para mantener la temperatura de la placa en un rango entre 64.7 – 65.5 °C. El dispositivo alcanzó un límite de detección de $2.8 \cdot 10^{-5}$ ng/ml.

A pesar de los avances alcanzados en la amplificación isotérmica simultánea de ácidos nucleicos para la detección de patógenos, no ha sido reportado en la literatura su empleo para la discriminación entre el SARS-CoV-2 y variantes de la influenza. Se encontraron investigaciones, sin embargo, empleando el RT-PCR [27], [28] y técnicas de detección basadas en inmunoensayos [29], [30].

En este capítulo se presentaron los conceptos más importantes sobre la amplificación genética, a fin de mostrar el marco de referencia para el lector. Desde un punto de vista ingenieril, se han mencionado aplicaciones, describiendo las técnicas e instrumentación utilizadas en la detección de patógenos en dispositivos portátiles mencionando brevemente sus ventajas y desventajas. A partir de ello, en el siguiente capítulo se presenta el diseño del dispositivo portátil para la detección de SARS-CoV-2 e influenza y de su sistema de instrumentación, así como la preparación de muestras usadas para las mediciones de fluorescencia desarrolladas para determinar la carga viral.

CAPÍTULO 3. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL SENSOR

En este capítulo se presenta el diseño del dispositivo POC para realizar amplificación genética mediante LAMP y su sistema de medición. Se muestra la validación del principio de funcionamiento, las partes fundamentales que conforman el dispositivo, así como la metodología de preparación de las muestras empleadas para amplificación genética, detección y cuantificación de patógenos como el SARS-CoV-2 y la influenza A.

3.1 SISTEMA DE INSTRUMENTACIÓN PROPUESTO

En esta sección se describen los principales componentes que conforman el sistema de instrumentación propuesto (Fig. 3.1) para el dispositivo portátil. Para la iluminación, control de temperatura y medición de fluorescencia, se diseñó un arreglo vertical de elementos como LED, filtros, una placa de vidrio recubierta de óxido de indio y estaño (ITO) y los fotodetectores.

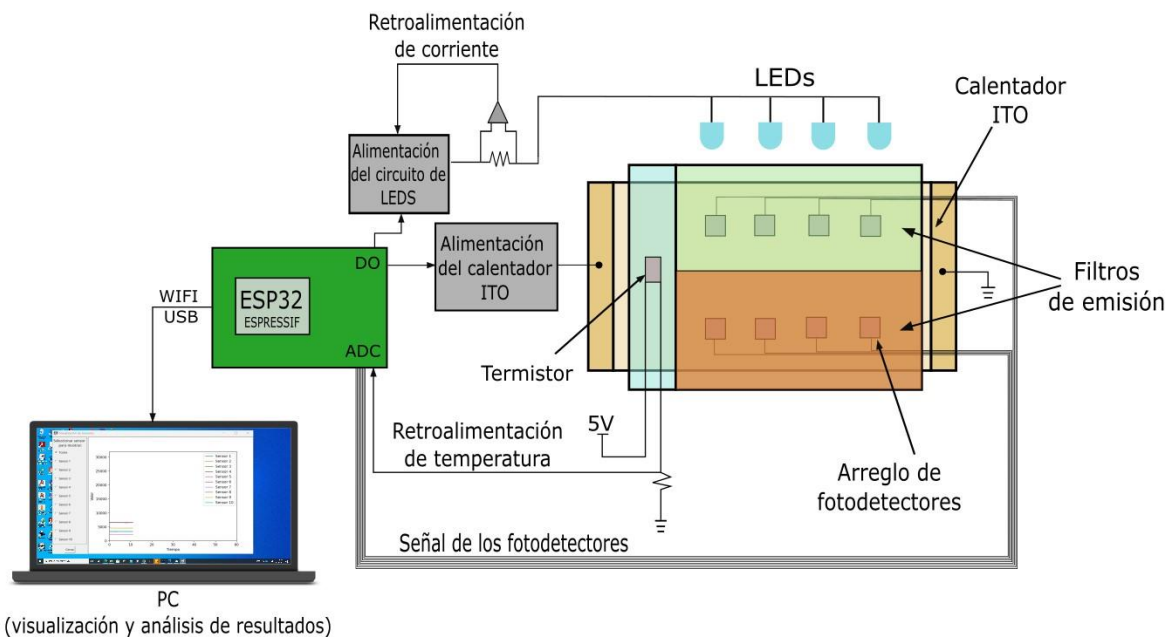


Fig. 3.1: Esquema general del sistema de instrumentación propuesto.

Microcontrolador

Para este dispositivo fue seleccionado como microcontrolador un Módulo de Desarrollo ESP32 [122] por sus características de comunicación inalámbrica, bajos requerimientos de alimentación, facilidad de programación empleando el IDE de Arduino, comunicación I2C, pequeño formato y bajo costo.

Este dispositivo (Fig. 3.2) está diseñado para alcanzar la mejor potencia y desempeño, mostrando robustez en una gran variedad de aplicaciones y escenarios [122].

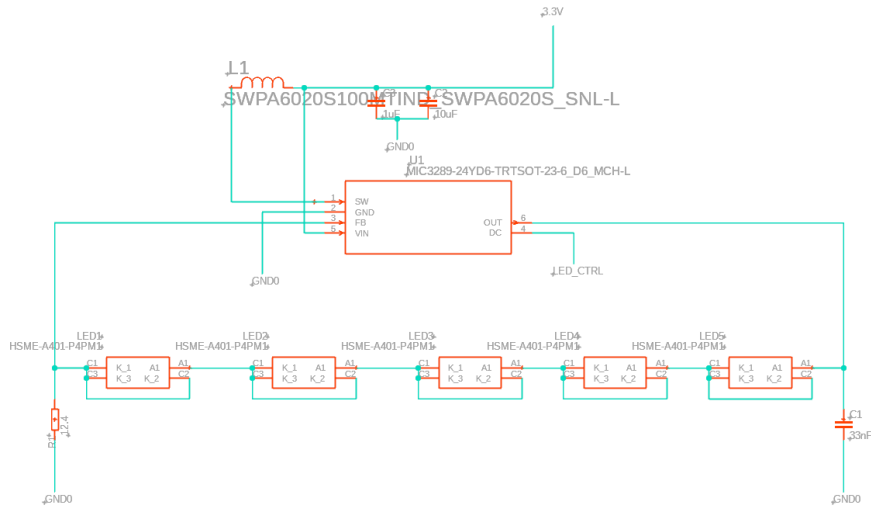


Fig. 3.4: Diseño de uno de los circuitos de control de LEDs.

Los fotodiodos seleccionados para el dispositivo también centran su sensibilidad espectral en las bandas de emisión del FAM y el ROX. En el caso de los MTD5052N (Marktech Optoelectronics, New York, USA), tienen su pico de sensibilidad en los 525 nm, por otra parte, los SFH 2711 A01 (OSRAM, Premstaetten, Austria) alcanza su máximo valor de sensibilidad cerca de los 585 nm.

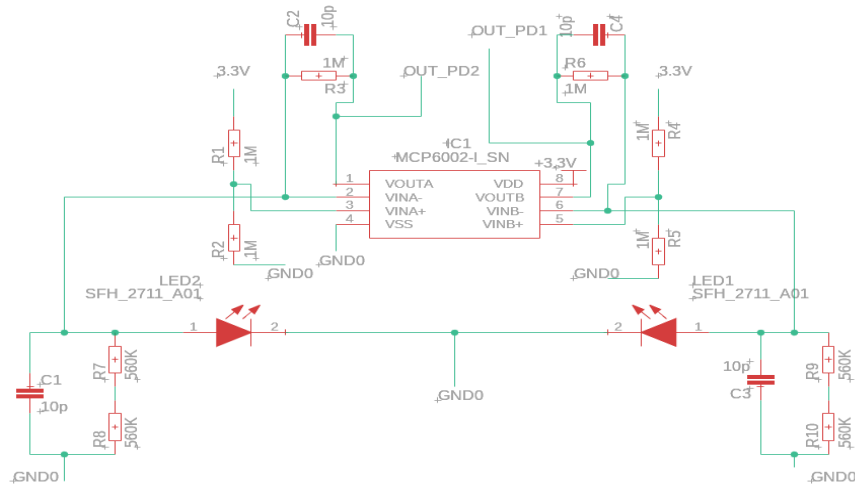


Fig. 3.5: Diseño del circuito de amplificación para 2 fotodiodos.

Para la cuantificación de la cantidad de luz recibida por los fotodiodos, se empleó un circuito con amplificadores de transimpedancia conectados a los fotodiodos, de forma que la corriente generada por los fotodiodos se convierta a un voltaje cuantificable por el ADC.

Para ello se emplean los amplificadores operacionales MCP6002 específicamente diseñados para aplicaciones de propósito general. Este amplificador cuenta con una muy baja corriente de polarización a la entrada (1.0 pA). La entrada de positiva del amplificador está conectada a un circuito divisor de voltaje para garantizar un voltaje mínimo de 1 mV, para que el amplificador no se sature y la polarización de los fotodiodos se mantenga de la manera deseada.

Empleando una resistencia de 1 MΩ para tener una alta ganancia, se determinó que el mínimo valor del capacitor en la realimentación para que el sistema sea operable sería de aproximadamente 6 pF, por ello se seleccionaron capacitores de 10 pF, que garantizan un margen de fase positivo, cercano a 45° y con ello la estabilidad del sistema.

A partir de estos valores de R_f y C_f el ancho de banda en lazo cerrado del circuito resulta:

$$BW = \frac{1}{2\pi R_f C_f} = \frac{1}{2\pi \times 1 \text{ M}\Omega \times 10 \text{ pF}} = 15.9 \text{ kHz} \quad (2)$$

Sistema de control de temperatura

El sistema de control de temperatura (Fig. 3.6) consiste en un control PID implementado en el microcontrolador ESP32, una placa de vidrio recubierta de óxido de indio y estaño (ITO: *Indium Tin Oxide*), que permite la conducción eléctrica en esa cara, con una resistencia de 10-15 Ω/in²; y un sensor TMP36 para tener la retroalimentación del valor de temperatura.

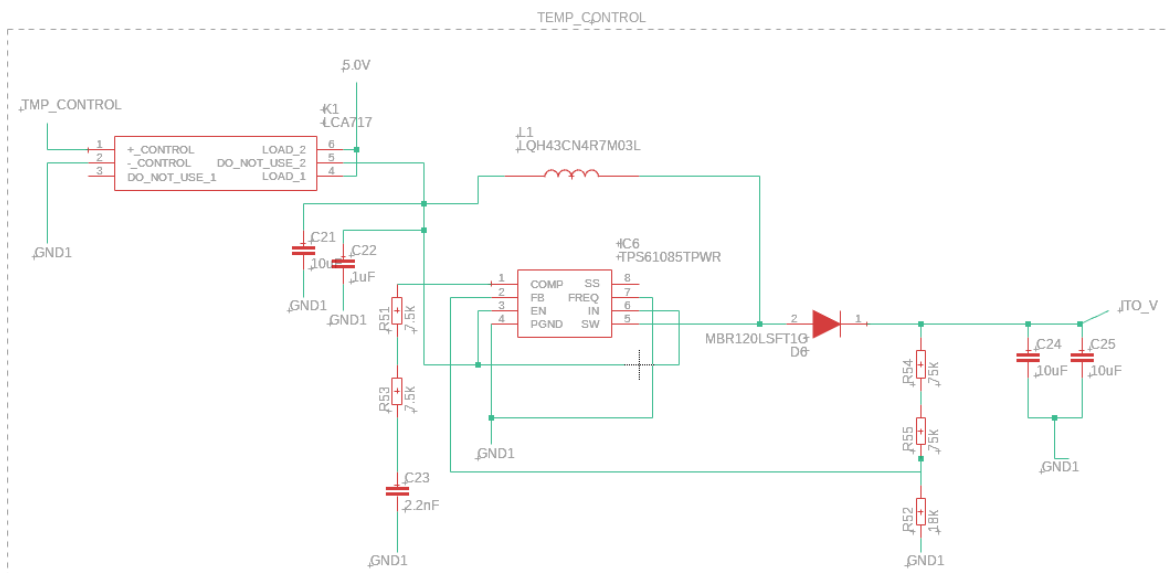


Fig. 3.6: Diseño del circuito de control de temperatura.

Una placa calentadora de vidrio recubierta de ITO ofrece ventajas en cuanto a la facilidad de fabricación a bajo costo y la posibilidad de calentar las muestras con un bajo consumo de potencia eléctrica [123]. Sin embargo, su característica más notable es la alta transmitancia en el espectro visible y el infrarrojo cercano [18] que hacen ideal su empleo para monitorear sustancias calentadas mediante el uso de métodos de detección ópticos. Para este diseño se utilizaron dos placas de 32 × 34 mm conectadas en serie, de forma tal que quedarán centradas sobre las muestras, garantizando un calentamiento uniforme de las mismas.

La salida de control del PID modula, mediante uno de los canales PWM del microcontrolador, los pulsos que recibe la placa de ITO para calentar las muestras. Gracias a los 8 bits de resolución en el PWM, la salida se encontrará en el intervalo entre 0 y 255.

Siendo 63 °C el valor al que se desea establecer la temperatura, se puede calcular el voltaje de salida del sensor de temperatura a partir de la Ecuación 1 que describe el comportamiento lineal del sensor en el intervalo de -40 °C a 125 °C:

$$V[mV] = 10.0 \frac{mV}{^{\circ}C} * T[^{\circ}C] + 500 mV \quad (3)$$

Sustituyendo por 63 °C el valor de T, encontramos que el voltaje deseado será de 1130.0 mV. Este valor es recibido en el microcontrolador después de ser digitalizado en el módulo ADS1115, que tiene una resolución de 16 bits, pero utiliza uno para el signo y una ganancia programable ajustada para medir hasta 2048 mV. Por ello, se puede determinar el valor digitalizado de acuerdo con la proporción expresada en la Ecuación 2:

$$\frac{N}{2^{15}} = \frac{V[mV]}{2048 mV} \quad (4)$$

donde N es el valor digitalizado.

El valor digitalizado del voltaje del sensor de temperatura, para establecer 63.0 °C, debe ser entonces 18080. Este será el valor de referencia establecido para el control PID.

3.2 INTEGRACIÓN DEL HARDWARE

Una vez diseñados los principales circuitos del dispositivo y seleccionados los componentes, se pasó a crear el diseño del exterior del prototipo, de forma que todos los componentes quedaran contenidos en un diseño compacto y funcional, sencillo de manipular.

El software seleccionado para llevar a cabo este diseño fue el Autodesk Fusion 360 [124] (Autodesk Inc., San Francisco, California, USA). Fusion 360 es un software de modelado paramétrico de diseño asistido por computadora (CAD) libre para el uso no comercial. Integra el diseño industrial, estructural, las simulaciones mecánicas y la manufactura asistida por computadora (CAM) en una plataforma que permite la colaboración mediante la nube [125].

Es el único software de su tipo que permite realizar el diseño de las placas de circuitos impresos y también partes mecánicas [126] posibilitando el diseño completo de un proyecto.

Las herramientas presentes en Fusion 360 permiten explorar de manera rápida y sencilla las diferentes secciones e ideas de diseño [127]. Se pueden crear por separado cada uno de los componentes y luego añadirlos para integrarlos en un mismo archivo. Además, permite crear animaciones, simular el proceso de fabricación con herramientas de maquinado e incluso modificar el aspecto con una gran variedad de materiales y así tener una idea más cercana al posible aspecto final del proyecto (Fig. 3.7).

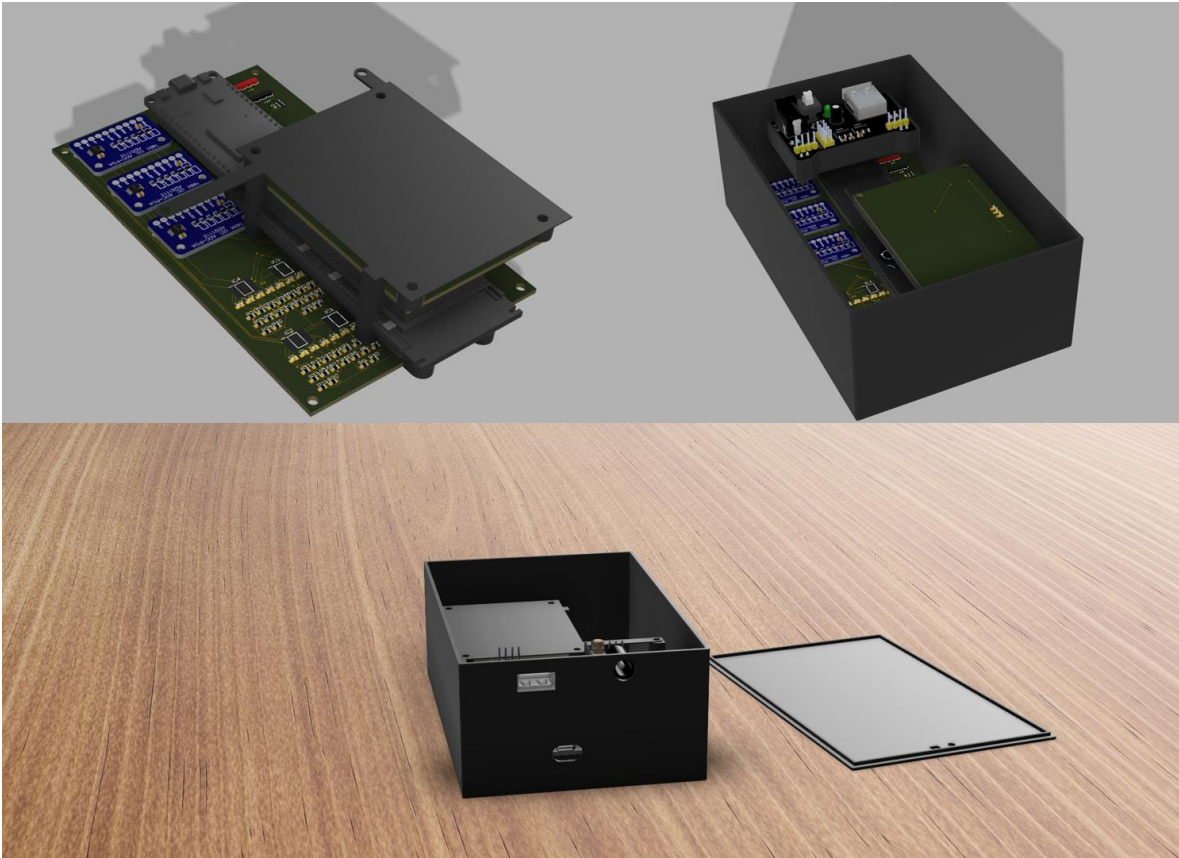


Fig. 3.7: Prototipo del dispositivo diseñado en Fusion 360 con simulación de materiales.

Una vez concluido el diseño de las piezas, Fusion 360 permite exportar los componentes a diferentes formatos de archivo que facilitan su fabricación en impresoras 3D. Para la realización de este proyecto se utilizó la impresora Artillery Genius (impresora de filamento) en las piezas de la cubierta y para las piezas internas, que requieren mayor resolución y acabado más fino, se empleó una impresora de resina Phrozen Mighty 8K.

3.3 SOFTWARE

Un componente fundamental en la implementación del dispositivo es el software. Una parte de este, que se ejecuta en el microcontrolador ESP32, se encarga de la adquisición y procesamiento de las señales del proceso. Este programa fue desarrollado en ARDUINO IDE, empleando varias bibliotecas para la correcta ejecución de los diferentes procesos.

La otra sección del software es una interfaz para mostrar los datos recibidos desde el microcontrolador, así como los resultados obtenidos una vez concluida la amplificación. Esta aplicación fue desarrollada en Python, utilizando diferentes bibliotecas para la obtención y presentación de los datos al usuario.

De forma simplificada, el funcionamiento del software se muestra en el diagrama de flujo de la Fig. 3.8.

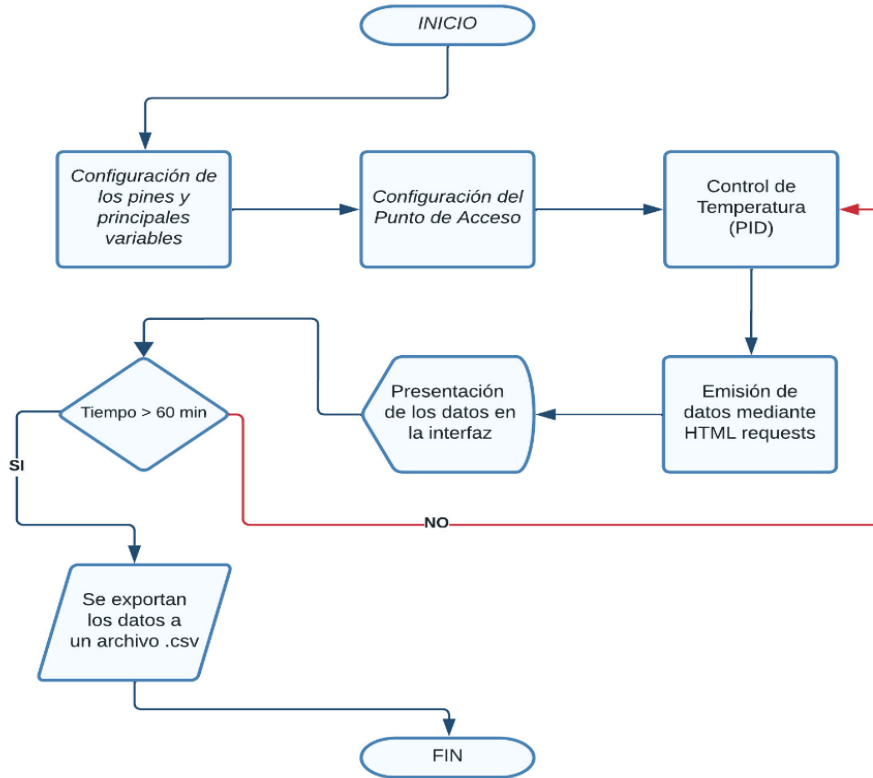


Fig. 3.8: Diagrama de flujo del funcionamiento del software.

Programación del módulo ESP32 en ARDUINO IDE

Para la programación del microcontrolador ESP32 se aprovechó la compatibilidad con el entorno de desarrollo integrado (IDE) de Arduino empleando un lenguaje de programación similar a C++.

Estos programas, también llamados *sketch* se dividen comúnmente en dos partes:

void setup {}: Contiene la inicialización de las principales variables, configurar los modos de cada pin. Se ejecuta solo una vez, después de encender o reiniciar la placa [128].

void loop {}: Es la parte del programa que se repite en bucle continuamente, permitiendo que ante cambios en los datos o condiciones el programa responda en consecuencia [129].

La programación para este dispositivo en particular tiene cuatro secciones de interés fundamentales:

- Punto de acceso Wi-Fi para la comunicación con la computadora.
- Muestreo de los datos provenientes de los módulos ADC.
- Control de temperatura (control PID).
- Servidor web para exportar los valores provenientes del ADC a la interfaz en la computadora para su almacenamiento y presentación al usuario.

En consecuencia, en la tabla a continuación se relacionan para cada una de estas secciones, las actividades que se desarrollan en las partes fundamentales del *sketch*:

Tabla 3.1: Secciones de interés y sus actividades en las diferentes secciones del sketch.

SECCIONES DE INTERÉS	void setup {}	void loop {}
Punto de acceso Wi-Fi	<ul style="list-style-type: none"> • Configuración de SSID y contraseña. • Inicio del punto de acceso. • Se muestra el IP del servidor. 	
Muestreo de los datos	<ul style="list-style-type: none"> • Inicio de la comunicación I2C con los ADS1115. • Se establecen las ganancias programables que no van a cambiar durante el proceso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adquisición periódica de los valores de los sensores.
Control de temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • Inicialización de variables involucradas en el proceso. • Configuración del pin de salida para la acción de control. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ejecución cíclica del algoritmo para calcular la acción de control.
Servidor web	<ul style="list-style-type: none"> • Inicio de la instancia del servidor con las características deseadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Manejo de las solicitudes del cliente HTML.

Interfaz gráfica para PC

Se desarrolló una aplicación empleando Python para iniciar, controlar y finalizar el proceso mientras se visualizan los datos obtenidos del dispositivo mediante el servidor web creado en Arduino IDE utilizando la biblioteca *requests* [130] para las consultas, *matplotlib* [131] para los gráficos y *tkinter* [132] para los objetos de la interfaz de usuario.

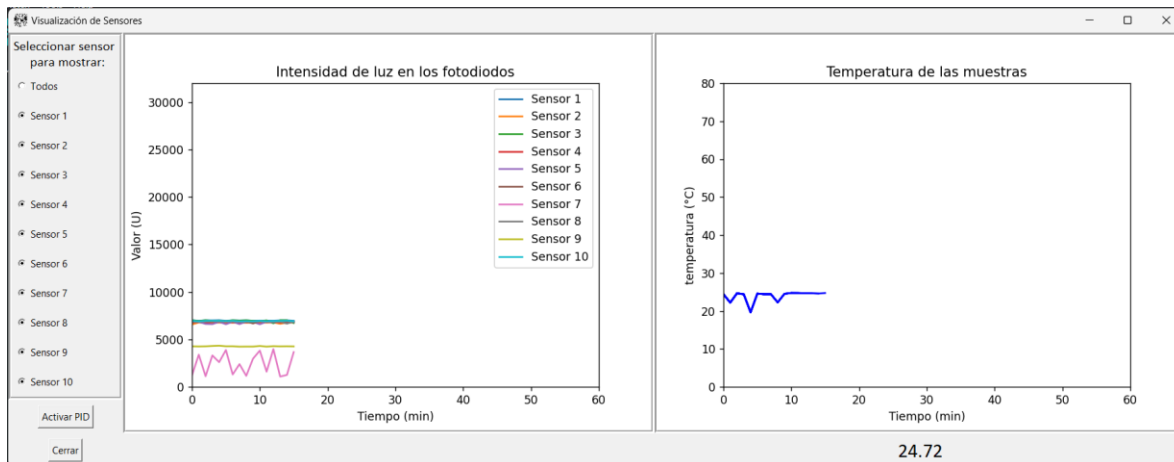


Fig. 3.9: Captura de la ventana principal de la interfaz desarrollada en Python para PC.

En la ventana principal (Fig. 3.9) se puede activar el control de temperatura y cambiar a la vista de las gráficas en tiempo real una vez iniciado el proceso. La selección de gráficas permite apreciar la evolución de todos los sensores simultáneamente o de uno en particular. A la derecha, en una gráfica independiente se muestra la temperatura a la que están expuestas las muestras.

Una vez concluido el proceso se pueden exportar los valores obtenidos en un archivo de texto y también calcular los valores de carga viral a partir de las curvas de calibración características del dispositivo.

En resumen, en este capítulo se abordó el diseño del dispositivo POC y su sistema de instrumentación, para poder realizar el proceso de amplificación isotérmica mediante RT-LAMP y la medición de la fluorescencia de las muestras. Finalmente, se presentó una descripción general del software y su integración con el hardware para la cuantificación y presentación al usuario de los resultados de estas mediciones.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ÓPTICO

Los marcadores empleados en la reacción RT-LAMP fueron el FAM y el ROX. Con el avance de la reacción, los inhibidores de fluorescencia van desapareciendo y liberando los fluoróforos que comienzan a emitir luz.

Con base en este principio de funcionamiento, se diseñó el sistema óptico de detección de fluorescencia para detectar y cuantificar la luz emitida por estos fluoróforos. Las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para el FAM son 492 nm y 517 nm; en el caso del ROX son 567 nm y 591 nm.

Debido a la disposición vertical del arreglo óptico, constituye un aspecto a tomar en cuenta el aumento de la intensidad de la señal de fondo debido a la luz proveniente de los LEDs. Para evitar esta alteración en las mediciones, se colocaron filtros paso-banda entre los LEDs y los fotodiodos, garantizando que solo llegue a las muestras la luz en el rango de excitación de los fluoróforos y a los fotodiodos, la luz en el rango de emisión de fluorescencia de estos marcadores.

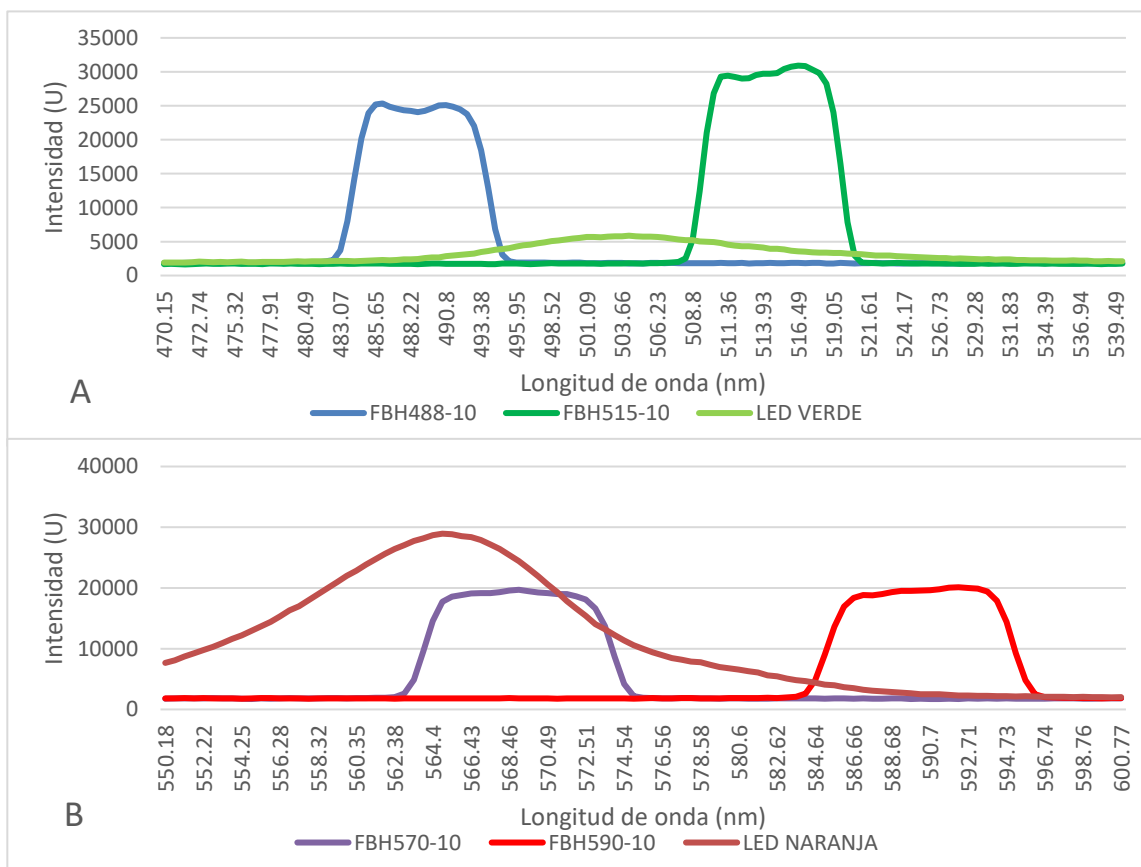


Fig. 4.1: Espectros de los componentes empleados en la generación de fluorescencia con el marcador A) FAM y B) ROX.

En la Fig. 4.1 se muestran los espectros de los elementos empleados en la generación de fluorescencia en el dispositivo. En el caso de los LED, se muestra su espectro de emisión. En el caso de los filtros, su espectro de transmisión. Estos valores se encuentran expresados en unidades arbitrarias de intensidad (U).

Los resultados obtenidos de las gráficas en la Fig. 4.1 demuestran que los filtros paso banda THORLABS seleccionados poseen espectros de transmisión excluyentes que garantizan que la luz emitida por los leds no interfiere en la señal recibida por los fotodiodos.

Específicamente para los espectros del FAM se utilizaron los filtros FBH488-10 Y FBH515-10 (Fig. 4.1A). Para el caso del ROX se emplearon los filtros FBH570-10 y FBH590-10 (Fig. 4.1B).

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE CONTROL DE TEMPERATURA

Con la intención de caracterizar el sistema de control de temperatura, se caracterizó la respuesta estática y dinámica de la placa de ITO, para luego diseñar un algoritmo de control que permitiera establecer y mantener la temperatura del sistema a 63.0 °C, requerida para desarrollar la reacción RT-LAMP.

Caracterización estática del calefactor

Para la caracterización estática del calefactor se realizó un estudio con una fuente de laboratorio Keithley 2230 [133] (Tektronix Inc., Oregon, Estados Unidos) incrementando el voltaje entre los extremos de la placa y midiendo el aumento en la corriente para calcular la resistencia nominal de la placa.

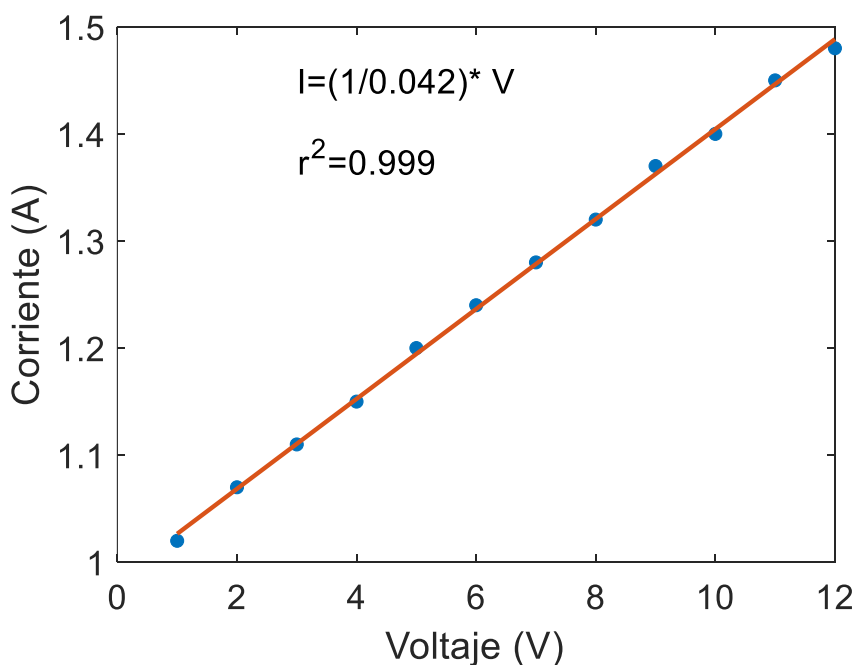


Fig. 4.2: Resultado del estudio de caracterización estática del calefactor.

A partir de estas mediciones se determinó una relación lineal entre las magnitudes de voltaje (Fig. 4.2) y corriente, que de acuerdo con la Ley de Ohm resulta en una resistencia nominal $R_N = 23.8 \Omega$.

Caracterización dinámica del calefactor

Se aplicó un escalón de voltaje con amplitud de 5 volts, y se registró el valor de temperatura usando el sensor TMP36. Posteriormente, se realizó un proceso de identificación del sistema dinámico cuyo objetivo es estimar los parámetros de la función de transferencia a partir de los datos de entrada (voltaje) y salida (temperatura) del sistema. Para ello, se empleó el método de predicción de error (PEM: *prediction error method*), dando como resultado la siguiente función de transferencia:

$$H(s) = \frac{4.32s + 0.6025}{s + 0.04123} \quad (5)$$

en donde $s \in \mathbb{C}$ es la variable de Laplace, la ganancia estática es $K = 4.32$, y la constante de tiempo es $\tau = 24.25$ s. Como resultado se tiene un sistema de primer orden con un polo y un cero, los cuales describen la dinámica del proceso térmico con una exactitud del 94.51%, como se observa en la Fig. 4.3.

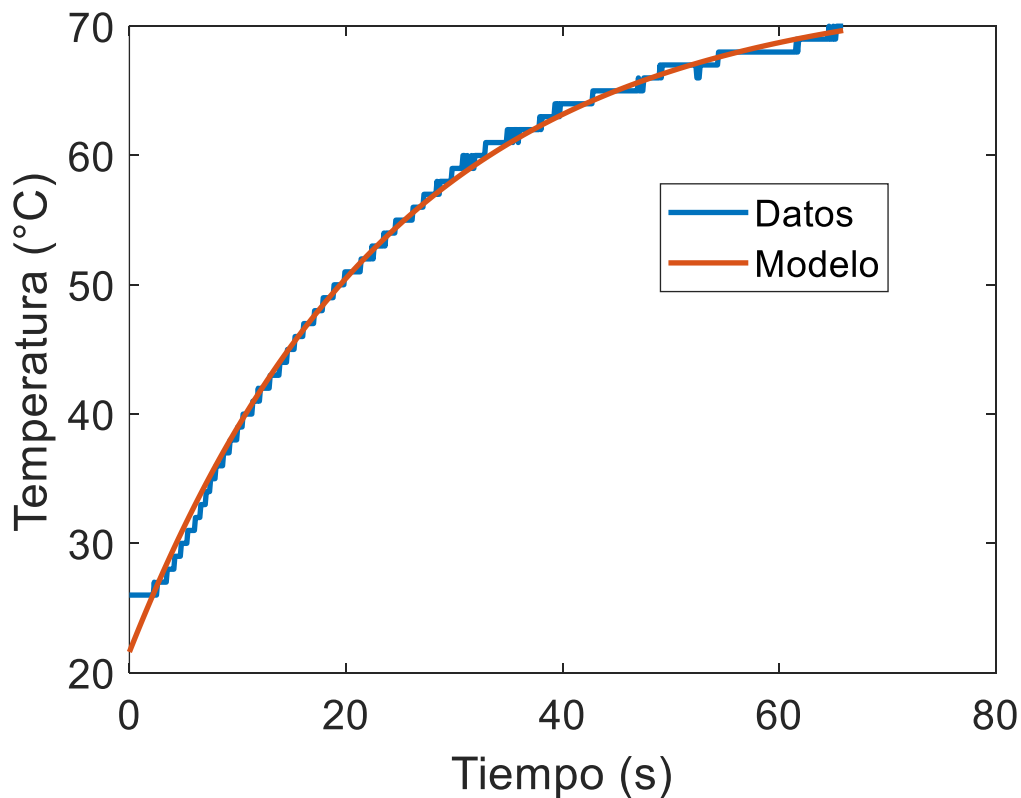


Fig. 4.3: Resultado del estudio de caracterización dinámica del calefactor.

Diseño del algoritmo de control

Una vez caracterizada la dinámica del sistema, se realizó el diseño de un algoritmo de control digital para regular la temperatura del elemento calefactor a 63.5°C, con el objetivo de llevar a cabo la reacción RT-LAMP.

Para ello, se propuso la técnica de control por asignación de polos para un controlador proporcional integral (PI), el cual permite definir el comportamiento del sistema en lazo cerrado, considerando los siguientes parámetros:

- Tiempo de establecimiento (T_{ss}) igual a 60 s.
- Factor de amortiguamiento (ζ) de 0.69.
- Frecuencia natural ($\omega_n = 4/\zeta T_{ss}$) igual a 0.0966 rad/s.

Con base en los requerimientos anteriores, se calcula el polinomio deseado con dos polos, p_1 y p_2 , para asignar al sistema. Así, usando la ecuación característica:

$$s^2 + p_1s + p_2 = s^2 + 2\zeta\omega_n s + \omega_n^2 \quad (6)$$

se tiene que:

$$p_1 = 2\zeta\omega_n = 0.1333 \quad (7)$$

$$p_2 = \omega_n^2 = 0.0091 \quad (8)$$

Posteriormente, se calcula la ganancia proporcional como:

$$k_p = \frac{p_1\tau - 1}{K} = 0.5171 \quad (9)$$

y la constante de tiempo de la acción integral como:

$$t_i = \frac{k_p K}{p_2\tau} = 9.8690 \quad (10)$$

Una vez diseñado el controlador, es necesario obtener su equivalente en tiempo discreto, dada la naturaleza del problema y su implementación digital. Para ello, se considera un tiempo de muestreo $t_s = 0.1$ s, y se calculan los coeficientes del controlador como:

$$q_0 = k_p \left(1 + \frac{t_s}{2t_i}\right) \quad (11)$$

$$q_1 = -k_p \left(1 - \frac{t_s}{2t_i}\right) \quad (12)$$

Así, la ley de control está dada por:

$$u = u_{t-1} + q_0 e + q_1 e_{t-1} \quad (13)$$

en donde la señal de error se calcula como $e = T_{ref} - T$, con $T_{ref} = 63.0 \text{ °C}$ y T el valor medido por el sensor de temperatura.

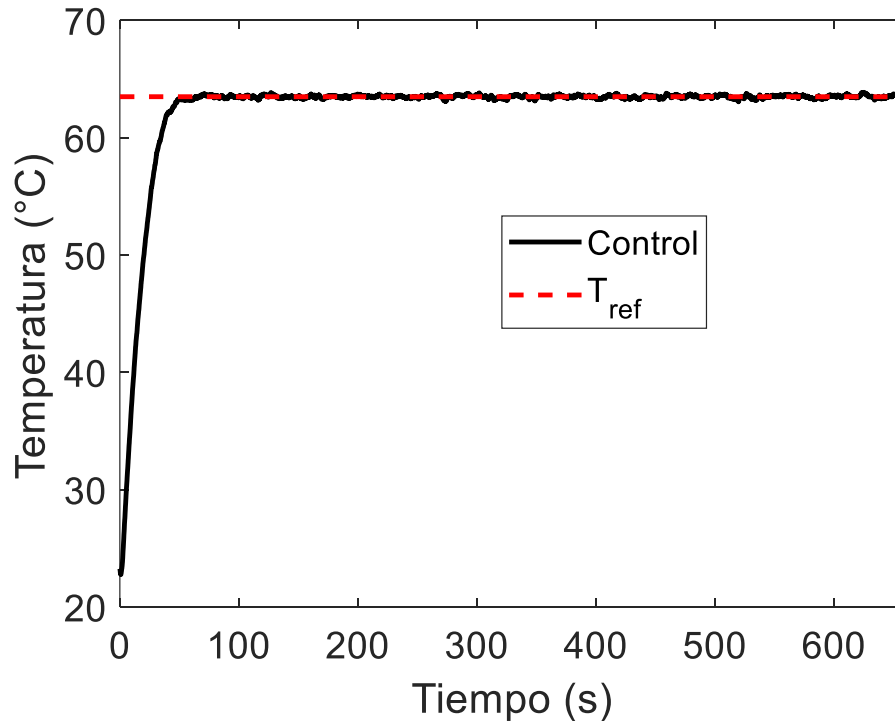


Fig. 4.4: Desempeño del sistema de control de temperatura implementado para llevar a cabo la reacción RT-LAMP.

4.3 VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS REACCIONES RT-LAMP

Este trabajo muestra el diseño de un dispositivo portátil para la amplificación genética empleando LAMP como método de amplificación y la medición de fluorescencia como forma de detección y cuantificación.

Con el objetivo de validar el principio de funcionamiento del dispositivo, se realizó un diseño experimental (Fig. 4.5) en el que se realiza la amplificación LAMP por 60 minutos a 63.0 °C en un termociclador comercial y se mide la fluorescencia con un espectrofotómetro, iluminando con un LED de espectro estrecho en intervalos de 5 minutos. En este epígrafe se describe la preparación de las muestras, así como los componentes utilizados y el procesamiento de los datos tras su adquisición y filtrado.

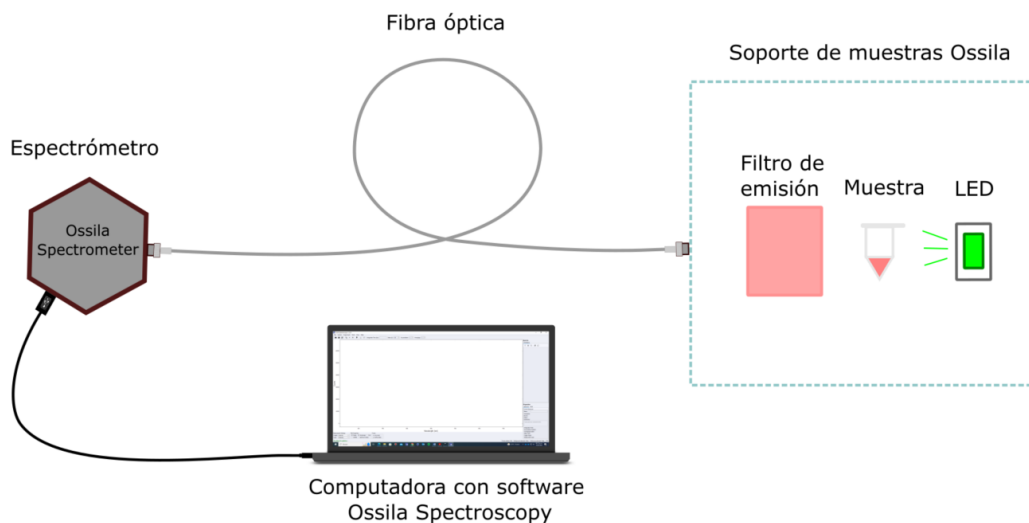


Fig. 4.5: Esquema y componentes empleados en las pruebas de validación.

Preparación de las muestras

La preparación de muestras para el desarrollo de pruebas RT-LAMP implica la extracción y purificación de ARN, siendo este un paso estándar en los protocolos de laboratorio. La extracción suele realizarse en membranas de sílice mediante un protocolo de varios pasos con reactivos que incluyen sales caotrópicas y solventes orgánicos [134]. Esta etapa mejora el rendimiento del ensayo al proporcionar una muestra de ARN libre de inhibidores. Sin embargo, en entornos de atención médica y puntos de atención (POC), donde la extracción puede ser limitada, se busca simplificar el proceso.

La RT-LAMP, como alternativa al RT-qPCR, permite la amplificación isotérmica del ARN sin necesidad de extracción en entornos de baja complejidad. Este método utiliza oligonucleótidos específicos como cebadores para iniciar la amplificación, y la reacción se lleva a cabo a una temperatura constante. La detección de la producción de ADN en los ensayos RT-LAMP se realiza mediante indicadores de pH, y se observa un cambio de color.

Para el desarrollo de esta prueba de validación, se empleó como indicador el rojo fenol. De esta manera, el avance de la reacción provoca en las muestras con carga viral una disminución en el pH, causando un cambio de coloración de rojo a amarillo. El volumen empleado para las pruebas fue de 100 μ l, colocadas en micropipetas.

Elementos del esquema de validación

Para la iluminación de excitación en las pruebas de validación se empleó un LED HSME-A401-P4PM1 [135] (Broadcom Inc., San José, CA, Estados Unidos) que tiene un espectro estrecho con pico de emisión en 568 nm.

En esta primera fase de validación se emplearon filtros de gel para limitar el espectro de la señal proveniente de las muestras, de acuerdo con el tipo de fluoróforo utilizado. En este caso, se

utilizó un filtro rojo que restringe la emisión del LED y permite una mejor transmisión de longitudes de onda superiores, coincidentes con el espectro de emisión del ROX, fluoróforo empleado en estas muestras. En la Fig. 4.6 se muestra la exclusión en los espectros de emisión del LED y de transmisión del filtro empleados para las pruebas de validación, de manera que los valores obtenidos en las pruebas de validación no fueran afectados por la emisión del LED.

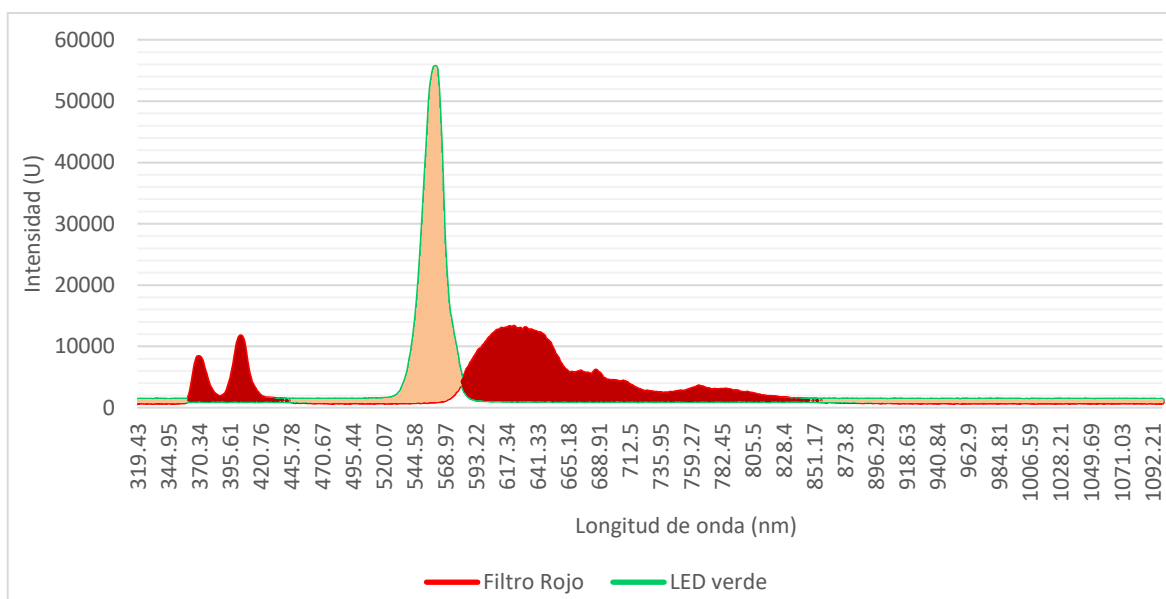


Fig. 4.6: Superposición de espectros del LED y el filtro rojo empleados en las pruebas de validación.

Para la caracterización de los diferentes elementos del arreglo óptico Fig. 4.6 y la cuantificación durante la amplificación vía LAMP, fue utilizado el espectrómetro OSSILA Optical Spectrometer [136](Ossila Ltd., Sheffield, Inglaterra).

Este instrumento tiene un rango (320 nm a 1050 nm) que abarca el espectro visible, desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano y funciona a través del software Ossila Spectroscopy que permite capturar múltiples espectros en una sola gráfica, capturar puntual o continuamente y exportar los resultados en archivos de valores separados por coma (*.csv) para su posterior análisis.

Procedimiento

Para la toma de datos se emplea como referencia un tubo Eppendorf de microcentrífuga con 100 µl de agua estéril. A continuación, se realiza la amplificación isotérmica en un termociclador comercial miniPCR mini16 [137] (Cambridge, Massachusetts, USA) para distintas muestras (un control negativo y una muestra con carga viral de influenza).

Se tomaron capturas de los espectros de transmisión cada 5 minutos para cada una de las muestras, a estos datos se les restaron los obtenidos para la muestra de agua.

Resultados y discusión

Los valores obtenidos de este espectro diferencial se restringieron en el intervalo de 580 nm a

600 nm, coincidiendo con el espectro de emisión del ROX y la banda de paso de los filtros de banda estrecha empleados en el diseño del dispositivo.

Este conjunto de valores de transmisión a través del filtro se suma para simular el funcionamiento de los fotodetectores en el dispositivo, y se trazan las curvas de intensidad de luz contra tiempo con los valores totales durante los 60 minutos (Fig. 4.7A).

Los datos obtenidos de la evolución temporal del experimento para cada longitud de onda, además, fueron filtrados mediante un filtro suavizador (medias móviles) y se realizaron el resto de las operaciones para obtener una curva intensidad de luz contra tiempo con datos suavizados (Fig. 4.7B).

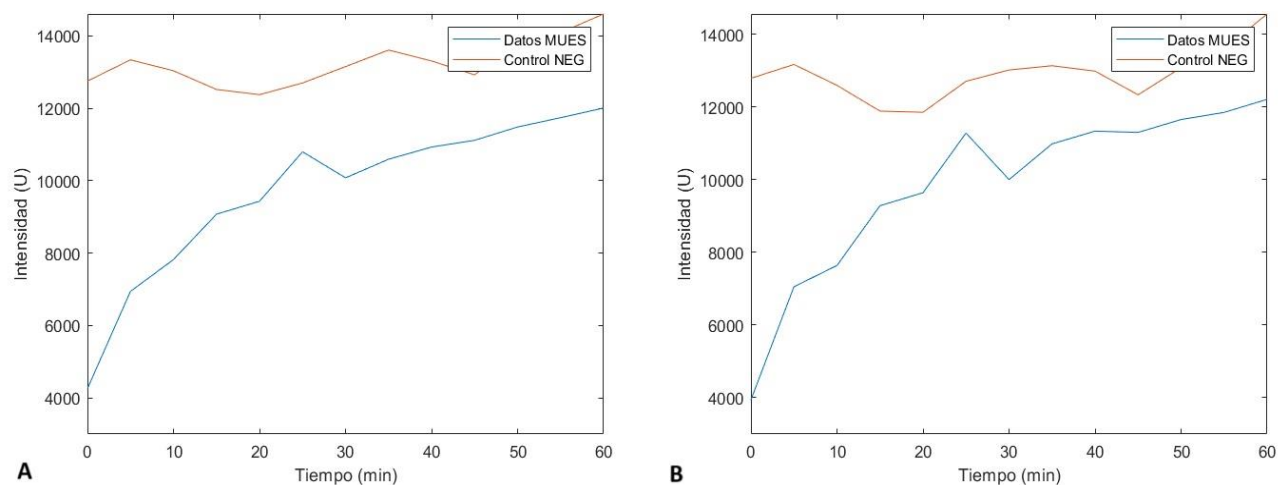


Fig. 4.7: Gráfico de intensidad de luz vs tiempo en el rango espectral entre 580 nm y 600 nm con los datos (A) Sin filtrar y (B) Filtrados.

En los gráficos mostrados se observa una tendencia creciente y un pico en la intensidad de luz antes de los 30 minutos, que está directamente relacionado a la carga viral de las muestras analizadas (MUES), como era de esperar en este tipo de ensayos [119], [120]. Sin embargo, en las muestras con control negativo (NEG), la señal es irregular, mostrando variaciones de mil unidades arbitrarias aproximadamente, lo que denota una exactitud mejorable en el experimento.

En futuras investigaciones será necesario definir este tiempo del pico para muestras con carga viral conocida, de manera que se pueda crear una curva característica del dispositivo de tiempo al pico contra carga viral de la muestra.

La amplificación se corroboró además con el cambio en la colorimetría utilizando rojo fenol. En este sentido es notable la variación desde una tonalidad rojiza hasta un tono amarillo al final de la prueba, pero con cambios evidentes en las muestras desde los primeros minutos (Fig. 4.8).

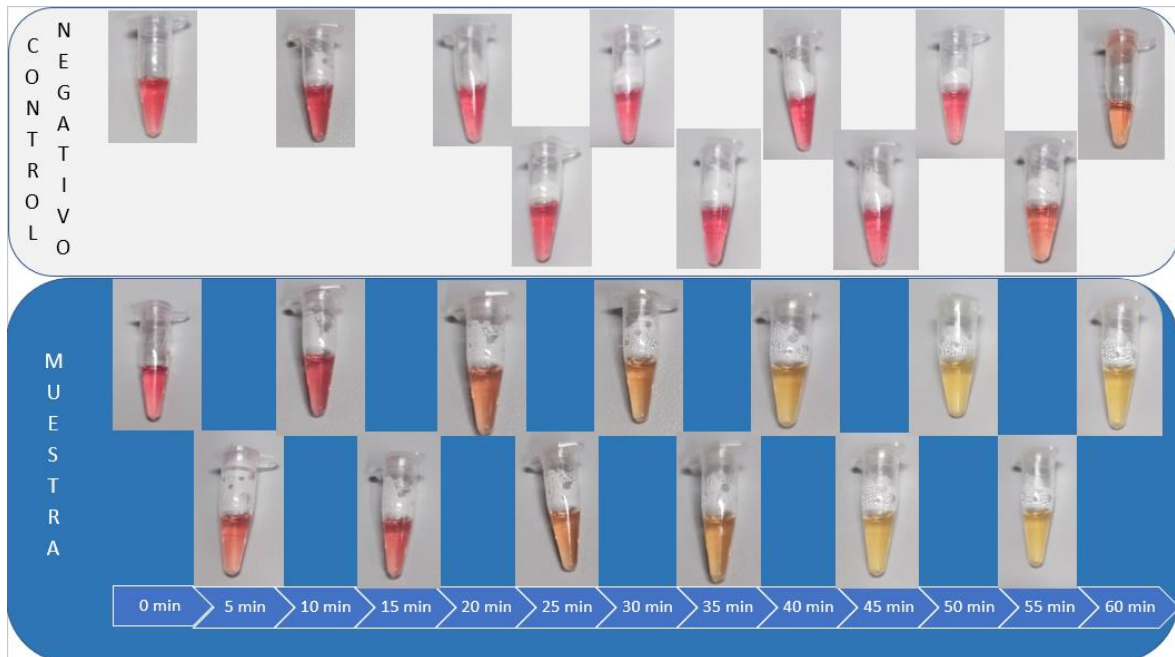


Fig. 4.8: Evolución del cambio en la coloración de las muestras en el experimento de validación.

El experimento realizado demuestra la validez del método de detección y cuantificación en muestras con cargas virales de influenza. Se espera un comportamiento similar en virus de SARS-CoV-2, lo que permitirá la detección simultánea en el dispositivo gracias al diseño presentado.

El dispositivo diseñado marca el punto de partida para un trabajo más completo que permitirá la detección simultánea de diferentes virus mediante amplificación isotérmica y detección de fluorescencia.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se desarrolló el diseño de un dispositivo portátil para la detección de patógenos mediante la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), integrando un arreglo optoelectrónico con un sistema de control de temperatura, a fin de cuantificar la fluorescencia durante el desarrollo de la amplificación. El correcto diseño de los *primers* puede permitir el empleo de este dispositivo para la detección de cualquier cadena de código genético, ampliando el espectro de aplicaciones del dispositivo más allá de la detección de patógenos.

La revisión del estado del arte señaló las ventajas del uso de la técnica RT-LAMP por su simplicidad para la instrumentación de un sistema de control de temperatura respecto al ciclo térmico necesario para el desarrollo del RT-PCR, así como la alta especificidad debido a un mayor número de *primers* diseñados para la detección de secuencias de ADN concretas. En estas reacciones LAMP, la medición en tiempo real de la fluorescencia destaca por la relación directa entre las gráficas de fluorescencia vs tiempo y la carga de material genético objetivo en las muestras, de esta manera se logran establecer curvas de calibración de los dispositivos que permiten la cuantificación de código genético objetivo en muestras desconocidas. A pesar de los avances alcanzados en la amplificación isotérmica simultánea de ácidos nucleicos para la detección de patógenos, no ha sido reportado en la literatura su empleo para la discriminación entre el SARS-CoV-2 y variantes de la influenza.

En cuanto al sistema de instrumentación, se logró implementar un diseño portátil, de un costo considerablemente menor a un termociclador comercial, que permite realizar la amplificación genética mediante LAMP a través de un control PID de temperatura, la adquisición y procesamiento de las señales de fluorescencia provenientes de las muestras, así como la comunicación inalámbrica para la transmisión y presentación de los datos al usuario en una computadora mediante una interfaz gráfica de usuario desarrollada en Python.

La presente investigación marca el punto de partida para futuros trabajos que puedan caracterizar el dispositivo en cuanto a la sensibilidad a la fluorescencia, trazar curvas características de respuesta, determinar el límite de detección, así como perfeccionar aspectos del diseño que resulten en una disminución de la incertidumbre en las mediciones y mayor comodidad para el usuario final. El carácter multidisciplinario de este trabajo posibilita la creación de equipos de trabajo de diversas áreas de conocimiento que contribuyan a la generación de un mejor producto para beneficio de la sociedad, pues el desarrollo de estos dispositivos permitiría la detección de patógenos con una mayor velocidad, a un menor costo y alejado de las condiciones de laboratorio requeridas tradicionalmente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. C. Giuffrida y G. Spoto, «Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 90, pp. 174-186, abr. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.11.045.
- [2] X. Jiang *et al.*, «High-Throughput Microfluidic Device for LAMP Analysis of Airborne Bacteria», *ACS Sens.*, vol. 1, n.º 7, pp. 958-962, jul. 2016, doi: 10.1021/acssensors.6b00282.
- [3] A. Basiri *et al.*, «Microfluidic devices for detection of RNA viruses», *Rev. Med. Virol.*, vol. 31, n.º 1, p. e2154, 2021, doi: 10.1002/rmv.2154.
- [4] A. S. Patterson, K. Hsieh, H. T. Soh, y K. W. Plaxco, «Electrochemical real-time nucleic acid amplification: towards point-of-care quantification of pathogens», *Trends Biotechnol.*, vol. 31, n.º 12, pp. 704-712, dic. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.09.005.
- [5] L. Wan *et al.*, «LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP)», *Biomed. Microdevices*, vol. 21, n.º 1, p. 9, ene. 2019, doi: 10.1007/s10544-018-0354-9.
- [6] F. B. Myers, R. H. Henrikson, J. M. Bone, y L. P. Lee, «A Handheld Point-of-Care Genomic Diagnostic System», *PLOS ONE*, vol. 8, n.º 8, p. e70266, ago. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070266.
- [7] J. Berger *et al.*, «Portable Pathogen Diagnostics Using Microfluidic Cartridges Made from Continuous Liquid Interface Production Additive Manufacturing», *Anal. Chem.*, vol. 93, n.º 29, pp. 10048-10055, jul. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00654.
- [8] Y. Bai *et al.*, «Recombinase polymerase amplification integrated with microfluidics for nucleic acid testing at point of care», *Talanta*, vol. 240, p. 123209, abr. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123209.
- [9] W. E. Huang *et al.*, «RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2», *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, n.º 4, pp. 950-961, 2020, doi: 10.1111/1751-7915.13586.
- [10] Y. Dong *et al.*, «Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2», *Sci. Rep.*, vol. 11, n.º 1, pp. 1-11, 2021.
- [11] J. S. Niczyporuk, W. Kozdruń, H. Czekaj, N. Styś-Fijoł, y K. Piekarska, «Detection of fowl adenovirus D strains in wild birds in Poland by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)», *BMC Vet. Res.*, vol. 16, n.º 1, pp. 1-12, 2020.

- [12] X.-Y. Yuan, Y.-L. Wang, K. Meng, Y.-X. Zhang, H.-Y. Xu, y W. Ai, «LAMP real-time turbidity detection for fowl adenovirus», *BMC Vet. Res.*, vol. 15, n.º 1, pp. 1-4, 2019.
- [13] S. J. Ahn *et al.*, «Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform», *BMC Infect. Dis.*, vol. 19, pp. 1-12, 2019.
- [14] Y.-D. Ma, W.-H. Chang, C.-H. Wang, H.-P. Ma, P.-C. Huang, y G.-B. Lee, «An integrated passive microfluidic device for rapid detection of influenza a (H1N1) virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)», en *2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, jun. 2017, pp. 722-725. doi: 10.1109/TRANSDUCERS.2017.7994150.
- [15] J. Mahony, S. Chong, D. Bulir, A. Ruyter, K. Mwawasi, y D. Waltho, «Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity», *J. Clin. Virol.*, vol. 58, n.º 1, pp. 127-131, 2013.
- [16] L. L. Poon *et al.*, «Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, n.º 1, pp. 427-430, 2005.
- [17] M. A. Raji *et al.*, «Development of rapid colorimetric assay for the detection of Influenza A and B viruses», *Talanta*, vol. 221, p. 121468, ene. 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121468.
- [18] R. Ishii *et al.*, «Development of Portable Fluorescence Microplate Reader Equipped with Indium Tin Oxide Glass Heater for Loop-mediated Isothermal Amplification», *Sens. Mater.*, vol. 34, n.º 3, pp. 971-985, 2022.
- [19] M. Xie, T. Chen, X. Xin, Z. Cai, C. Dong, y B. Lei, «Multiplex detection of foodborne pathogens by real-time loop-mediated isothermal amplification on a digital microfluidic chip», *Food Control*, vol. 136, p. 108824, jun. 2022, doi: 10.1016/j.foodcont.2022.108824.
- [20] Q. Zhou *et al.*, «Fluorescent on-site detection of multiple pathogens using smartphone-based portable device with paper-based isothermal amplification chip», *Microchim. Acta*, vol. 189, n.º 9, p. 333, ago. 2022, doi: 10.1007/s00604-022-05419-x.
- [21] Y. Seok *et al.*, «A Paper-Based Device for Performing Loop-Mediated Isothermal Amplification with Real-Time Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets», *Theranostics*, vol. 7, n.º 8, pp. 2220-2230, jun. 2017, doi: 10.7150/thno.18675.
- [22] T. Chotpitayasunondh *et al.*, «Influenza and COVID-19: What does co-existence mean?», *Influenza Other Respir. Viruses*, vol. 15, n.º 3, pp. 407-412, 2021, doi: 10.1111/irv.12824.
- [23] P. Das *et al.*, «COVID diagnostics by molecular methods: A systematic review of nucleic acid based testing systems», *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 39, n.º 3, pp. 271-278, jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijmmb.2021.05.012.

- [24] S. Sukhdeo y N. Lee, «Influenza: clinical aspects, diagnosis, and treatment», *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 28, n.º 3, pp. 199-204, may 2022, doi: 10.1097/MCP.0000000000000860.
- [25] J. Kashir y A. Yaqinuddin, «Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19», *Med. Hypotheses*, vol. 141, p. 109786, ago. 2020, doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
- [26] Y. Xu, B. Chen, M. He, y B. Hu, «A homogeneous nucleic acid assay for simultaneous detection of SARS-CoV-2 and influenza A (H3N2) by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1186, p. 339134, nov. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.339134.
- [27] K. Pabbaraju, A. A. Wong, R. Ma, N. Zelyas, y G. A. Tipples, «Development and validation of a multiplex reverse transcriptase-PCR assay for simultaneous testing of influenza A, influenza B and SARS-CoV-2», *J. Virol. Methods*, vol. 293, p. 114151, 2021.
- [28] R. Dumke *et al.*, «Simultaneous Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Virus in Wastewater of Two Cities in Southeastern Germany, January to May 2022», *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 19, n.º 20, Art. n.º 20, ene. 2022, doi: 10.3390/ijerph192013374.
- [29] C. Wang *et al.*, «Development of an ultrasensitive fluorescent immunochromatographic assay based on multilayer quantum dot nanobead for simultaneous detection of SARS-CoV-2 antigen and influenza A virus», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 345, p. 130372, oct. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130372.
- [30] G. Liu *et al.*, «Multiplex and Ultrasensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Influenza A/B Nucleocapsid Proteins Based on Nanometer-Sized Core-Shell Superparamagnetic Antifouling Probes», *ACS Appl. Nano Mater.*, 2023.
- [31] M. Gavrilov *et al.*, «Engineered helicase replaces thermocycler in DNA amplification while retaining desired PCR characteristics», *Nat. Commun.*, vol. 13, n.º 1, Art. n.º 1, oct. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34076-0.
- [32] O. L. Bodulev y I. Yu. Sakharov, «Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques and Their Use in Bioanalysis», *Biochem. Mosc.*, vol. 85, n.º 2, pp. 147-166, feb. 2020, doi: 10.1134/S0006297920020030.
- [33] Y. Chen *et al.*, «Nucleic acid amplification free biosensors for pathogen detection», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 153, p. 112049, abr. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112049.
- [34] S. Picot, M. Cucherat, y A.-L. Bienvenu, «Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods compared with microscopy, polymerase chain reaction and rapid diagnostic tests for malaria diagnosis», *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 98, pp. 408-419, sep. 2020, doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.009.
- [35] N. Gupta *et al.*, «Point-of-Care PCR Assays for COVID-19 Detection», *Biosensors*, vol. 11, n.º

5, Art. n.º 5, may 2021, doi: 10.3390/bios11050141.

- [36] J. M. S. Bartlett y D. Stirling, «A Short History of the Polymerase Chain Reaction», en *PCR Protocols*, J. M. S. Bartlett y D. Stirling, Eds., en *Methods in Molecular Biology*TM, Totowa, NJ: Humana Press, 2003, pp. 3-6. doi: 10.1385/1-59259-384-4:3.
- [37] P. Rabinow, *Making PCR: A Story of Biotechnology*. University of Chicago Press, 2011.
- [38] H. Zhu, H. Zhang, Y. Xu, S. Laššáková, M. Korabečná, y P. Neužil, «PCR past, present and future», *BioTechniques*, vol. 69, n.º 4, pp. 317-325, oct. 2020, doi: 10.2144/btn-2020-0057.
- [39] P.-L. Quan, M. Sauzade, y E. Brouzes, «dPCR: A Technology Review», *Sensors*, vol. 18, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2018, doi: 10.3390/s18041271.
- [40] L. Garibyan y N. Avashia, «Polymerase Chain Reaction», *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n.º 3, pp. 1-4, mar. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.
- [41] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, y R. Watson, «Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions», *Bio/Technology*, vol. 11, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- [42] M. Becker-André y K. Hahlbrock, «Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)», *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, n.º 22, pp. 9437-9446, nov. 1989, doi: 10.1093/nar/17.22.9437.
- [43] J. Chelly, J.-C. Kaplan, P. Maire, S. Gautron, y A. Kahn, «Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues», *Nature*, vol. 333, n.º 6176, Art. n.º 6176, jun. 1988, doi: 10.1038/333858a0.
- [44] B. Vogelstein y K. W. Kinzler, «Digital PCR», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n.º 16, pp. 9236-9241, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.16.9236.
- [45] A. A. Morley, «Digital PCR: A brief history», *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 1, n.º 1, pp. 1-2, sep. 2014, doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001.
- [46] J. J. Carrino y H. H. Lee, «Nucleic acid amplification methods», *J. Microbiol. Methods*, vol. 23, n.º 1, pp. 3-20, jul. 1995, doi: 10.1016/0167-7012(95)00024-F.
- [47] M. Fakruddin *et al.*, «Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction», *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 5, n.º 4, pp. 245-252, 2013, doi: 10.4103/0975-7406.120066.
- [48] B. Schweitzer y S. Kingsmore, «Combining nucleic acid amplification and detection», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, n.º 1, pp. 21-27, feb. 2001, doi: 10.1016/S0958-1669(00)00172-5.
- [49] Y. Li *et al.*, «Advances in ligase-based nucleic acid amplification technology for detecting gene mutations: a review», *Mol. Cell. Biochem.*, nov. 2022, doi: 10.1007/s11010-022-04615-

w.

- [50] G. Csako, «Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing», *Clin. Chim. Acta*, vol. 363, n.º 1-2, pp. 6-31, 2006.
- [51] M. G. Mohsen y E. T. Kool, «The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription», *Acc. Chem. Res.*, vol. 49, n.º 11, pp. 2540-2550, nov. 2016, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00417.
- [52] O. Mayboroda, I. Katakis, y C. K. O'Sullivan, «Multiplexed isothermal nucleic acid amplification», *Anal. Biochem.*, vol. 545, pp. 20-30, mar. 2018, doi: 10.1016/j.ab.2018.01.005.
- [53] A. Karami, P. Gill, M. Kalantar Motamedi, y M. Saghafinia, «A review of the current isothermal amplification techniques: applications, advantages and disadvantages», *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 3, n.º 3, pp. 293-302, 2011.
- [54] G. A. Obande y K. K. Banga Singh, «Current and Future Perspectives on Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Diagnosing Infections», *Infect. Drug Resist.*, vol. 13, pp. 455-483, abr. 2020, doi: 10.2147/IDR.S217571.
- [55] J. Li y J. Macdonald, «Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, pp. 196-211, feb. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.08.069.
- [56] V. V. Demidov, «Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity», *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 2, n.º 6, pp. 542-548, nov. 2002, doi: 10.1586/14737159.2.6.542.
- [57] L. An, W. Tang, T. A. Ranalli, H.-J. Kim, J. Wytiaz, y H. Kong, «Characterization of a Thermostable UvrD Helicase and Its Participation in Helicase-dependent Amplification *», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 32, pp. 28952-28958, ago. 2005, doi: 10.1074/jbc.M503096200.
- [58] M. Vincent, Y. Xu, y H. Kong, «Helicase-dependent isothermal DNA amplification», *EMBO Rep.*, vol. 5, n.º 8, pp. 795-800, 2004.
- [59] Z. Yang *et al.*, «Helicase-Dependent Isothermal Amplification of DNA and RNA by Using Self-Avoiding Molecular Recognition Systems», *ChemBioChem*, vol. 16, n.º 9, pp. 1365-1370, 2015, doi: 10.1002/cbic.201500135.
- [60] S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, y M. J. Lobo-Castañón, «Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, n.º 3, pp. 679-693, ene. 2018, doi: 10.1007/s00216-017-0620-3.
- [61] G. T. Walker, M. S. Fraiser, J. L. Schram, M. C. Little, J. G. Nadeau, y D. P. Malinowski,

- «Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique», *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, n.º 7, pp. 1691-1696, 1992.
- [62] H. Xu *et al.*, «Ultrasensitive assay based on a combined cascade amplification by nicking-mediated rolling circle amplification and symmetric strand-displacement amplification», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1047, pp. 172-178, 2019.
- [63] O. Piepenburg, C. H. Williams, D. L. Stemple, y N. A. Armes, «DNA detection using recombination proteins», *PLoS Biol.*, vol. 4, n.º 7, p. e204, 2006.
- [64] N. I. Vasileva Wand, L. C. Bonney, R. J. Watson, V. Graham, y R. Hewson, «Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method», *J. Gen. Virol.*, vol. 99, n.º 8, pp. 1012-1026, ago. 2018, doi: 10.1099/jgv.0.001083.
- [65] Y. Zou, M. G. Mason, y J. R. Botella, «Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics», *PLOS ONE*, vol. 15, n.º 6, p. e0235216, jun. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0235216.
- [66] A. Aebischer, K. Wernike, B. Hoffmann, y M. Beer, «Rapid genome detection of Schmallenberg virus and bovine viral diarrhoea virus by use of isothermal amplification methods and high-speed real-time reverse transcriptase PCR», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, n.º 6, pp. 1883-1892, 2014.
- [67] B. Deiman, P. van Aarle, y P. Sillekens, «Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)», *Mol. Biotechnol.*, vol. 20, n.º 2, pp. 163-179, feb. 2002, doi: 10.1385/MB:20:2:163.
- [68] R. Sooknanan y L. T. Malek, «Nasba», *Bio/Technology*, vol. 13, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 1995, doi: 10.1038/nbt0695-563.
- [69] J. Compton, «Nucleic acid sequence-based amplification», *Nature*, vol. 350, n.º 6313, Art. n.º 6313, mar. 1991, doi: 10.1038/350091a0.
- [70] Y. Ju, H. Yong Kim, J. Ki Ahn, y H. Gyu Park, «Ultrasensitive version of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) utilizing a nicking and extension chain reaction system», *Nanoscale*, vol. 13, n.º 24, pp. 10785-10791, 2021, doi: 10.1039/D1NR00564B.
- [71] T. Notomi *et al.*, «Loop-mediated isothermal amplification of DNA», *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, n.º 12, pp. e63-e63, 2000.
- [72] P. Craw y W. Balachandran, «Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review», *Lab. Chip*, vol. 12, n.º 14, pp. 2469-2486, 2012, doi: 10.1039/C2LC40100B.
- [73] N. Garg, F. J. Ahmad, y S. Kar, «Recent advances in loop-mediated isothermal amplification

- (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens», *Curr. Res. Microb. Sci.*, vol. 3, p. 100120, ene. 2022, doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100120.
- [74] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, y T. Notomi, «Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA», *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 59, n.º 2, pp. 145-157, 2004.
- [75] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, y T. Notomi, «Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 289, n.º 1, pp. 150-154, 2001.
- [76] A. S. James y J. I. Alawneh, «COVID-19 Infection Diagnosis: Potential Impact of Isothermal Amplification Technology to Reduce Community Transmission of SARS-CoV-2», *Diagnostics*, vol. 10, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2020, doi: 10.3390/diagnostics10060399.
- [77] M. Soroka, B. Wasowicz, y A. Rymaszewska, «Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?», *Cells*, vol. 10, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2021, doi: 10.3390/cells10081931.
- [78] «LAMP Designer | OptiGene». Accedido: 19 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>
- [79] «LAMP primer designing software PrimerExplorer». Accedido: 19 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://primerexplorer.jp/e/>
- [80] «LAMP :: Design primers for Loop-Mediated Isothermal Amplification». Accedido: 19 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html>
- [81] Z. K. Njiru *et al.*, «African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA», *Int. J. Parasitol.*, vol. 38, n.º 5, pp. 589-599, abr. 2008, doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.006.
- [82] R. Suzuki *et al.*, «Heat denaturation increases the sensitivity of the cytomegalovirus loop-mediated isothermal amplification method», *Microbiol. Immunol.*, vol. 54, n.º 8, pp. 466-470, 2010, doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00236.x.
- [83] C. Aaij y P. Borst, «The gel electrophoresis of DNA», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.*, vol. 269, n.º 2, pp. 192-200, may 1972, doi: 10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- [84] K. Hanada, «Introduction and Perspectives of DNA Electrophoresis», en *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, K. Hanada, Ed., en *Methods in Molecular Biology*, New York, NY: Springer US, 2020, pp. 1-13. doi: 10.1007/978-1-0716-0323-9_1.
- [85] «Agarose Gel Electrophoresis For The Separation Of Dna Fragments - Video». Accedido: 26 de enero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.jove.com/t/3923/agarose-gel->

electrophoresis-for-the-separation-of-dna-fragments?list=mJZr5IO7&

- [86] S. Makovets, «Basic DNA Electrophoresis in Molecular Cloning: A Comprehensive Guide for Beginners», en *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, S. Makovets, Ed., en *Methods in Molecular Biology*. , Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 11-43. doi: 10.1007/978-1-62703-565-1_2.
- [87] G. A. Roberts y D. T. F. Dryden, «DNA Electrophoresis: Historical and Theoretical Perspectives», en *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, S. Makovets, Ed., en *Methods in Molecular Biology*. , Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 1-9. doi: 10.1007/978-1-62703-565-1_1.
- [88] D. Voytas, «Agarose Gel Electrophoresis», *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 51, n.º 1, p. 2.5A.1-2.5A.9, 2000, doi: 10.1002/0471142727.mb0205as51.
- [89] M. Nakagawa *et al.*, «Optimization and application of silver staining of non-glycosylated and glycosylated proteins and nucleic acids for agarose native gel electrophoresis», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 189, pp. 869-878, oct. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.142.
- [90] E. G. Gibson, A. A. Oviatt, y N. Osheroff, «Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Resolve DNA Topoisomers», en *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, K. Hanada, Ed., en *Methods in Molecular Biology*. , New York, NY: Springer US, 2020, pp. 15-24. doi: 10.1007/978-1-0716-0323-9_2.
- [91] L. Zardoni, E. Nardini, y G. Liberi, «2D Gel Electrophoresis to Detect DNA Replication and Recombination Intermediates in Budding Yeast», en *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, K. Hanada, Ed., en *Methods in Molecular Biology*. , New York, NY: Springer US, 2020, pp. 43-59. doi: 10.1007/978-1-0716-0323-9_4.
- [92] J. Xue *et al.*, «Gel Electrophoresis Chip Using Joule Heat Self-Dissipation, Short Run Time, and Online Dynamic Imaging», *Anal. Chem.*, vol. 94, n.º 4, pp. 2007-2015, feb. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c03635.
- [93] J. Gregory, «Turbidity and beyond», *Filtr. Sep.*, vol. 35, n.º 1, pp. 63-67, ene. 1998, doi: 10.1016/S0015-1882(97)83117-5.
- [94] B. G. Kitchener, J. Wainwright, y A. J. Parsons, «A review of the principles of turbidity measurement», *Prog. Phys. Geogr. Earth Environ.*, vol. 41, n.º 5, pp. 620-642, oct. 2017, doi: 10.1177/0309133317726540.
- [95] M. C. Edwards y R. A. Gibbs, «Multiplex PCR: advantages, development, and applications.», *Genome Res.*, vol. 3, n.º 4, pp. S65-S75, ene. 1994.
- [96] S.-Y. Lee *et al.*, «Compact optical diagnostic device for isothermal nucleic acids amplification», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 133, n.º 2, pp. 493-501, ago. 2008, doi: 10.1016/j.snb.2008.03.008.

- [97] X. Huang, Y. Zhu, y E. Kianfar, «Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques», *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 12, pp. 1649-1672, may 2021, doi: 10.1016/j.jmrt.2021.03.048.
- [98] J. L. Hammond, N. Formisano, P. Estrela, S. Carrara, y J. Tkac, «Electrochemical biosensors and nanobiosensors», *Essays Biochem.*, vol. 60, n.º 1, pp. 69-80, jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150008.
- [99] O. A. Sadik, A. O. Aluoch, y A. Zhou, «Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n.º 9, pp. 2749-2765, may 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.10.003.
- [100] C. A. I. Lynch *et al.*, «Selective Determination of Isothermally Amplified Zika Virus RNA Using a Universal DNA-Hairpin Probe in Less than 1 Hour», *Anal. Chem.*, vol. 91, n.º 21, pp. 13458-13464, nov. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02455.
- [101] S. Jebri, L. Cubillana-Aguilera, J. M. Palacios-Santander, y C. Dridi, «A novel electrochemical sensor modified with green gold sononanoparticles and carbon black nanocomposite for bisphenol A detection», *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 264, p. 114951, 2021.
- [102] C. W. Bae *et al.*, «Fully Stretchable Capillary Microfluidics-Integrated Nanoporous Gold Electrochemical Sensor for Wearable Continuous Glucose Monitoring», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, n.º 16, pp. 14567-14575, abr. 2019, doi: 10.1021/acsami.9b00848.
- [103] A. U. Alam y M. J. Deen, «Bisphenol A electrochemical sensor using graphene oxide and β -cyclodextrin-functionalized multi-walled carbon nanotubes», *Anal. Chem.*, vol. 92, n.º 7, pp. 5532-5539, 2020.
- [104] S. Kumar *et al.*, «Electrochemical sensors and biosensors based on graphene functionalized with metal oxide nanostructures for healthcare applications», *ChemistrySelect*, vol. 4, n.º 18, pp. 5322-5337, 2019.
- [105] H. Huang, Y. Chen, Z. Chen, J. Chen, Y. Hu, y J.-J. Zhu, «Electrochemical sensor based on Ce-MOF/carbon nanotube composite for the simultaneous discrimination of hydroquinone and catechol», *J. Hazard. Mater.*, vol. 416, p. 125895, 2021.
- [106] L. Liu, L. Lei, K. Zeng, K. Wu, y N. Yang, «Surface Chemistry Determined Electrochemical Sensing Performance of Red Phosphorus and Single Walled Carbon Nanotube Composites», *Adv. Funct. Mater.*, p. 2211335, 2022.
- [107] Y. Mori, T. Hirano, y T. Notomi, «Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers», *BMC Biotechnol.*, vol. 6, n.º 1, p. 3, ene. 2006, doi: 10.1186/1472-6750-6-3.
- [108] S. H. Lee, S. Park, B. N. Kim, O. S. Kwon, W.-Y. Rho, y B.-H. Jun, «Emerging ultrafast nucleic acid amplification technologies for next-generation molecular diagnostics», *Biosens.*

Bioelectron., vol. 141, p. 111448, sep. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111448.

- [109] I. Choopara *et al.*, «Fluorometric Paper-Based, Loop-Mediated Isothermal Amplification Devices for Quantitative Point-of-Care Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)», *ACS Sens.*, vol. 6, n.º 3, pp. 742-751, mar. 2021, doi: 10.1021/acssensors.0c01405.
- [110] L.-X. Wang *et al.*, «On-chip RT-LAMP and colorimetric detection of the prostate cancer 3 biomarker with an integrated thermal and imaging box», *Talanta*, vol. 208, p. 120407, feb. 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120407.
- [111] X. Fang, Y. Liu, J. Kong, y X. Jiang, «Loop-Mediated Isothermal Amplification Integrated on Microfluidic Chips for Point-of-Care Quantitative Detection of Pathogens», *Anal. Chem.*, vol. 82, n.º 7, pp. 3002-3006, abr. 2010, doi: 10.1021/ac1000652.
- [112] F. Ahmad, G. Seyrig, D. M. Turlousse, R. D. Stedtfeld, J. M. Tiedje, y S. A. Hashsham, «A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips», *Biomed. Microdevices*, vol. 13, n.º 5, pp. 929-937, oct. 2011, doi: 10.1007/s10544-011-9562-2.
- [113] T. L. Quyen, T. A. Ngo, D. D. Bang, M. Madsen, y A. Wolff, «Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting», *Front. Microbiol.*, vol. 10, 2019, Accedido: 1 de febrero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02234>
- [114] S. Panno *et al.*, «Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology», *Plants*, vol. 9, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2020, doi: 10.3390/plants9040461.
- [115] Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, y C. Fan, «Isothermal Amplification of Nucleic Acids», *Chem. Rev.*, vol. 115, n.º 22, pp. 12491-12545, nov. 2015, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00428.
- [116] P. J. Asiello y A. J. Baemner, «Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review», *Lab. Chip*, vol. 11, n.º 8, pp. 1420-1430, 2011, doi: 10.1039/C0LC00666A.
- [117] F. Hu *et al.*, «Smartphone-Based Droplet Digital LAMP Device with Rapid Nucleic Acid Isolation for Highly Sensitive Point-of-Care Detection», *Anal. Chem.*, vol. 92, n.º 2, pp. 2258-2265, ene. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04967.
- [118] R. G. Ramírez-Chavarría *et al.*, «Loop-mediated isothermal amplification-based electrochemical sensor for detecting SARS-CoV-2 in wastewater samples», *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 10, n.º 3, p. 107488, jun. 2022, doi: 10.1016/j.jece.2022.107488.
- [119] G. Torezin Mendonça *et al.*, «A new RT-LAMP-on-a-Chip Instrument for SARS-CoV-2 diagnostics», *Microchem. J.*, vol. 180, p. 107600, sep. 2022, doi:

10.1016/j.microc.2022.107600.

- [120] A. J. Colbert, D. H. Lee, K. N. Clayton, S. T. Wereley, J. C. Linnes, y T. L. Kinzer-Ursem, «PD-LAMP smartphone detection of SARS-CoV-2 on chip», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1203, p. 339702, abr. 2022, doi: 10.1016/j.aca.2022.339702.
- [121] K. T. L. Trinh, R. A. Stabler, y N. Y. Lee, «Fabrication of a foldable all-in-one point-of-care molecular diagnostic microdevice for the facile identification of multiple pathogens», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 314, p. 128057, jul. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.128057.
- [122] Espressif Systems, «esp32_datasheet_en.pdf». Accedido: 27 de abril de 2022. [En línea]. Disponible en: https://www.espressif.com/sites/default/files/documentation/esp32_datasheet_en.pdf
- [123] K. Yang, K. Cho, K. Im, y S. Kim, «Temperature Maintenance of an ITO Nanoparticle Film Heater», *J. IKEEE*, vol. 20, n.º 2, pp. 171-173, 2016, doi: 10.7471/ikeee.2016.20.2.171.
- [124] «Fusion 360 | Software CAD, CAM, CAE y de circuitos impresos 3D basado en la nube | Autodesk». Accedido: 22 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.autodesk.mx/products/fusion-360/overview>
- [125] P. P. Song, Y. M. Qi, y D. C. Cai, «Research and Application of Autodesk Fusion360 in Industrial Design», *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 359, n.º 1, p. 012037, may 2018, doi: 10.1088/1757-899X/359/1/012037.
- [126] R. Sreedhar, R. Mahato, A. Chaturvedi, y P. K. Jaiswal, «3D PCB Designing of Protecting Circuit Using Fusion 360», *Asian J. Conver. Technol. AJCT ISSN -2350-1146*, vol. 7, n.º 1, Art. n.º 1, abr. 2021, doi: 10.33130/AJCT.2021v07i01.014.
- [127] «AUTODESK FUSION 360 BLACK BOOK - Gaurav Verma - Google Libros». Accedido: 23 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=BYxjDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=fusion+360+autodesk&ots=KX_6L59nUI&sig=PovMzN470zvKAZiyiPSMREy1j-E&redir_esc=y#v=onepage&q=fusion%20360%20autodesk&f=false
- [128] «setup() - Arduino Reference». Accedido: 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.arduino.cc/reference/en/language/structure/sketch/setup/>
- [129] «loop() - Arduino Reference». Accedido: 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.arduino.cc/reference/en/language/structure/sketch/loop/>
- [130] «Requests: HTTP for Humans™ — Requests 2.31.0 documentation». Accedido: 7 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://requests.readthedocs.io/en/latest/>
- [131] «Matplotlib — Visualization with Python». Accedido: 7 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://matplotlib.org/>

- [132] «tkinter — Interface de Python para Tcl/Tk», Python documentation. Accedido: 7 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://docs.python.org/3/library/tkinter.html>
- [133] «2230 High Power Programmable Power Supplies». Accedido: 12 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.tek.com/en/products/keithley/dc-power-supplies/2230-series>
- [134] G. Choi, T. J. Moehling, y R. J. Meagher, «Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis», *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 23, n.º 1, pp. 9-28, ene. 2023, doi: 10.1080/14737159.2023.2169071.
- [135] «HSME-A401-P4PM1 Broadcom / Avago | Mouser», Mouser Electronics. Accedido: 17 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.mouser.mx/ProductDetail/630-HSME-A401-P4PM1>
- [136] «Optical Spectrometer | UV-Vis Range, Low Price, USB», Ossila. Accedido: 17 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.ossila.com/products/optical-spectrometer>
- [137] miniPCR Team, «miniPCR® mini16», miniPCR. Accedido: 17 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.minipcr.com/products/minipcr-mini16-thermal-cycler/>