



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Monterrey

**Prueba serológica microfluídica para la detección de
anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 empleando
nanopartículas magnéticas**

Tesis que presenta:

José Antonio Hernández Ortiz

para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis

Dr. Gabriel Arturo Caballero Robledo

Apodaca, Nuevo León

Junio, 2024

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la beca 312231 del «Programa de Apoyos para Actividades Científicas, Tecnológicas y de Innovación», Conacyt, México; beca “Prueba serológica rápida, barata y de alta sensibilidad para SARS-CoV-2” de la AMEXCID y la Secretaría de Relaciones Exteriores de México (SRE); beca del Scottish Funding Council Global Challenge Research Fund, Universidad de Edimburgo (SFC-GCRF covid-19 Fund).

Agradezco ampliamente al Conahcyt por la beca otorgada durante cuatro años (2019-2023) para realizar mis estudios de Doctorado. Asimismo, al CINVESTAV por el apoyo proporcionado en el programa de becas “Elisa Acuña” durante las convocatorias 2023 y 2024 en las modalidades de “Apoyo Extraordinario” y “Apoyo para obtención de grado”, respectivamente.

A mis papás, por todo el esfuerzo que han hecho para que hoy en día me encuentre en esta etapa. Cada logro ha sido gracias a ustedes.

A mi tutor, el Dr. Gabriel Caballero, mi más sincero y profundo agradecimiento por recibirme como parte de su grupo de trabajo. Por haberme adoptado a la mitad del camino y depositar en mí la confianza para desarrollar este proyecto de investigación.

A todos los integrantes del laboratorio de Fenómenos, por todo el apoyo brindado, la calidez y los buenos momentos compartidos. Especialmente a mis amigos Josué Amador, por su amistad, compañerismo y apoyo durante todo el proceso de doctorado y a Alberto Gamboa, por su ayuda en el término de este proyecto y siempre hacer ameno el trabajo en el laboratorio.

A mis sinodales, las Dras. Marion Brunk y Roxana Gutiérrez y los Dres. Mauricio Carrillo y Jesús Santana, por todas las atenciones recibidas, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por las observaciones y sugerencias realizadas para mejorarlo.

Al Laboratorio de la Diversidad Biomolecular por permitirme utilizar sus instalaciones para algunos de los experimentos realizados. A Martha e Itzia por su disposición para apoyarme y especialmente Mariana por instruirme y por todos los conocimientos brindados al inicio del proyecto.

A toda la comunidad del Cinvestav Monterrey, compañeros estudiantes, doctores, administrativos y todo el personal, con los que a lo largo de más de 6 años he compartido gratas experiencias y han influido para que mi estancia siempre fuera acogedora y digna de recordar con alegría.

Muy especialmente a Jade, por siempre estar conmigo, por todo su apoyo, comprensión e incondicional cariño. Gracias por acompañarme desde el inicio en este camino. Sé que sin su apoyo hubiera sido mucho más difícil.

Resumen

En este trabajo, desarrollamos un dispositivo microfluídico acrílico para realizar ensayos de ELISA cuantitativos usando nanopartículas magnéticas (NPMs). Conjugamos la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2 en NPMs de 100 nm para capturar y cuantificar anticuerpos IgG anti-S1 en muestras de suero humano.

El sistema integra una trampa magnética microfluídica con micropartículas ferromagnéticas (MPFMs) de 7 μm empaquetadas en una constricción de 5 μm . Utilizando un imán externo, se preconcentraron las nanopartículas en la matriz porosa de MPFMs. Se utilizó un sistema de amplificación de señal de flujo continuo a través de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) acoplada a un anticuerpo secundario, formando así el inmunocomplejo NPM-Ag-Ab1-Ab2-HRP. Se empleó AmpliFlu Red como sustrato fluorogénico para la detección mediante microscopía de fluorescencia. Evaluamos la influencia del flujo del sustrato (1 $\mu\text{L h}^{-1}$ a 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) y la concentración del anticuerpo sobre la intensidad de la señal de fluorescencia.

Optimizamos nuestro protocolo para realizar todo el ELISA dentro del chip, con tiempos de detección de tan solo 6 min, obteniendo un límite de detección (LOD) de 823 fg mL^{-1} para anticuerpos IgG anti-S1.

Abstract

In this work, we developed an acrylic microfluidic device to perform quantitative ELISA assays using magnetic nanoparticles (MNPs). We conjugated the SARS-CoV-2 S1 subunit onto 100 nm MNPs to capture and quantify anti-S1 IgG antibodies in human serum samples.

The system integrates a microfluidic magnetic trap with 7 μm ferromagnetic microparticles (FMMPs) packed into a 5 μm constriction. Using an external magnet, the nanoparticles were preconcentrated in the porous matrix of the FMMPs. A continuous flow signal amplification system was used through horseradish peroxidase (HRP) enzyme conjugated to a secondary antibody, forming the MNP-Ag-Ab1-Ab2-HRP immunocomplex. AmpliFlu Red was used as a fluorogenic substrate for detection via fluorescence microscopy. We evaluated the influence of substrate flow rate (1 $\mu\text{L h}^{-1}$ to 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) and antibody concentration on the fluorescence signal intensity.

We optimized our protocol to perform the entire ELISA within the chip, achieving detection times as short as 6 minutes and a limit of detection (LOD) of 823 fg mL^{-1} for anti-S1 IgG antibodies.

Índice General

Resumen	3
Abstract	3
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas	10
Abreviaturas	11
Introducción.....	13
Antecedentes	16
Capítulo I. El virus SARS-CoV-2.....	16
Estructura del virus SARS-CoV-2.....	17
Variantes del SARS-CoV-2.....	17
Desarrollo de la pandemia en México.....	18
Mecanismo de infección del SARS-CoV-2.....	19
Desarrollo de la enfermedad de COVID-19	20
Diagnóstico de COVID-19	21
a. Pruebas moleculares	21
b. Pruebas serológicas	22
Pruebas en el punto de atención (POCT)	23
Comparativa entre pruebas diagnósticas.....	25
Capítulo II. Inmunoensayos	28
ELISA.....	30
ELISA directo.....	30
ELISA indirecto.....	31
ELISA tipo sándwich	32
ELISA competitivo	33
Ventajas y desventajas del ELISA.....	35
Capítulo III. ELISA en microfluídica	36
Sustratos para microfabricación.....	36
Silicio y vidrio.....	36
Polímeros	37
PDMS	37
Termoplásticos	37
Formatos de ELISA en dispositivos microfluídicos	38
ELISA microfluídico en superficie	39
Inmunoensayos microfluídicos basados en papel	40

ELISAs microfluídicos en suspensión	42
Nanopartículas magnéticas	43
Justificación.....	46
Hipótesis.....	47
Objetivos	47
Resultados	48
Capítulo IV. Fabricación de microdispositivos	48
Materiales y métodos.....	48
1. Diseño del dispositivo microfluídico acrílico.....	48
2. Fabricación del dispositivo microfluídico acrílico	49
a. Micromaquinado.....	49
b. Sellado de microcanales.....	53
3. Trampa magnética y configuración del dispositivo	55
4. Configuración del dispositivo microfluídico	56
Resultados	56
1. Formación de la trampa microfluídica	56
Discusión.....	57
Capítulo V. Conjugación de nanopartículas.....	60
Material y métodos	60
1. Conjugación de nanopartículas.....	60
2. Concentración de proteínas	61
4. Ensayo Dot blot.....	62
5. Análisis densitométrico.....	62
Resultados	63
1. Conjugación de NPMs	63
2. Eficiencia de la conjugación	67
Discusión.....	68
Capítulo VI. Caracterización del ELISA en el dispositivo microfluídico.....	71
Material y métodos	71
1. ELISA en el dispositivo microfluídico.....	71
a. Protocolo extenso de ELISA microfluídico	71
b. Protocolo reducido de ELISA microfluídico	72
c. Protocolo de ELISA microfluídico mixto.....	72
2. Medición de la señal de fluorescencia	74
Resultados	75
1. Curva de calibración para lisozima	75
2. Diferentes tamaños de la trampa en el inmunoensayo	78

3. Diferentes concentraciones de NPMs en el inmunoensayo	79
Discusión.....	81
Capítulo VII. Análisis de muestras serológicas en el dispositivo microfluídico	84
Material y métodos	84
1. Conjugación de NPMs de 100 nm a S1	84
2. ELISA microfluídico para Abs anti-S1	84
3. Obtención de muestras de suero	84
Resultados	85
1. Conjugación de NPMs a S1	85
2. Curva de calibración para S1	86
3. Dilución de muestras de suero.....	88
4. Curso temporal de IgG anti-S1 mediante el dispositivo.....	89
5. Análisis cuantitativo de las muestras	91
Discusión.....	91
Capítulo VIII. Inmunoensayo en placa de micropozos	95
Material y métodos	95
1. Prueba de ELISA comercial.....	95
Resultados	96
1. Curva estándar para IgG anti-S1 en kit comercial de ELISA	96
2. Curso temporal de IgG anti S1 en ELISA comercial.....	98
3. Análisis cuantitativo de las muestras mediante el kit de ELISA	98
4. Curva estándar para IgG anti-S1 en ELISA de laboratorio en microplaca	99
Discusión.....	102
Conclusiones.....	106
Perspectivas.....	107
Referencias	108
Material suplementario.....	114
Apéndice I	130
Apéndice II	131

Índice de Figuras

Figura 1. Taxonomía de la familia Coronaviridae.	16
Figura 2. Estructura esquemática del virión del SARS-CoV-2.	17
Figura 3. Mecanismo de entrada viral del SARS-CoV-2 a la célula hospedera.	20
Figura 4. Métodos de detección de COVID-19.	21
Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR).	23
Figura 6. Funciones complementarias de las pruebas PCR, de antígenos y de anticuerpos en la detección del SARS-CoV-2 y el diagnóstico de COVID-19.	27
Figura 7. Diagrama esquemático y estructura tridimensional de la estructura de un anticuerpo.	28
Figura 8. Pasos de un ELISA directo.	31
Figura 9. Pasos de un ELISA indirecto.	32
Figura 10. Pasos de un ELISA tipo sándwich.	32
Figura 11. Pasos de un ELISA competitivo.	33
Figura 12. Orientación de los anticuerpos, dimensiones y especies químicas importantes para la orientación.	40
Figura 13. Ilustración esquemática de una prueba LFIA basada en la detección de antígenos.	42
Figura 14. ELISA basado en micropartículas.	42
Figura 15. Separación magnética convencional de micropartículas magnéticas.	43
Figura 16. El aumento constante de la investigación sobre MNPs combinados con microfluídica en total desde 2012 hasta diciembre de 2022.	44
Figura 17. Diseño del dispositivo microfluídico.	48
Figura 18. Brocas empleadas para el micromaquinado del dispositivo microfluídico montadas sobre adaptador para la fresadora.	49
Figura 19. Diseño de la plataforma piezoeléctrica.	50
Figura 20. Maquinado de la constricción.	51
Figura 21. Cara maquinada del chip microfluídico.	52
Figura 22. Pocillos y pilares de alineación.	52
Figura 23. Entrada y salidas del chip.	53
Figura 24. Lavado de microcanales.	54
Figura 25. Exposición a vapor de cloroformo.	54
Figura 26. Sellado de canales.	54
Figura 27. Dispositivo microfluídico ensamblado.	55
Figura 28. Formación de la trampa magnética.	55

Figura 29. Arreglo experimental.....	56
Figura 30. Formación de trampas de diferentes tamaños.	57
Figura 31. Conjugación de proteína (Ag) sobre la superficie de NPMs.....	61
Figura 32. Cuantificación de la conjugación de un paso de lisozima a NPMs de 30 nm mediante dot blot.	64
Figura 33. Cuantificación de la conjugación de 2 pasos de lisozima a NPMs de 30 nm mediante dot blot.	65
Figura 34. Estandarización de protocolo de un paso y dos paso con diferentes tamaños de NPMs.....	67
Figura 36. Zonas de medición de la fluorescencia.....	74
Figura 37. Evaluación del cambio en la intensidad de fluorescencia para cuantificar la interacción del complejo antígeno-anticuerpo.....	75
Figura 38. Curvas de calibración para Ab anti-lisozima.	77
Figura 39. Efecto del tamaño de trampa sobre el inmunoensayo.	78
Figura 40. Estimación de la concentración de NPMs con S1 conjugada.	79
Figura 41. Efecto de la concentración de NPMs sobre el rendimiento del inmunoensayo.....	80
Figura 42. Efecto de la variabilidad en el proceso de conjugación de lisozima.	80
Figura 43. Evaluación de la conjugación de la subunidad S1 a las NPMs de 100 nm por dot blot.	85
Figura 44. Estimación de la concentración de NPMs con S1 conjugada.	86
Figura 45. Curva de calibración para la cuantificación del anticuerpo anti-S1.....	87
Figura 46. Curva estándar para NPMs de 100 nm con la subunidad S1 conjugada.	88
Figura 47. Optimización del inmunoensayo en el chip utilizando diferentes diluciones de suero humano positivo a la infección de SARS-CoV-2.	89
Figura 48. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 mediante ELISA en el dispositivo.....	90
Figura 49. Evaluación del control negativo en ELISA en el dispositivo.	90
Figura 50. Kit comercial de ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2.....	97
Figura 51. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 en microplaca comercial.	98
Figura 52. ELISA de laboratorio en microplaca para la detección de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2.....	100
Figura 53. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 mediante ELISA de laboratorio en microplaca.....	101
Figura Suplementaria 1. Tamaño de PMNPs utilizadas para diferentes tipos de inmunoensayos y tiempos de detección obtenidos.....	114
Figura Suplementaria 2. Reacción de conjugación mediante EDC/Sulfo-NHS... ..	115
Figura Suplementaria 3. Dot blot para la conjugación de NPMs-lisozima de 1 paso sin Ab1.....	116

Figura Suplementaria 4. Separación magnética de sobrenadante para NPMs de 30 nm.....	117
Figura Suplementaria 5. DLS de NPMs de 100 nm.....	118
Figura Suplementaria 6. Protocolo de inmunoensayo extendido.....	119
Figura Suplementaria 7. Protocolo de inmunoensayo reducido.....	120
Figura Suplementaria 8. Protocolo de inmunoensayo mixto.....	121
Figura Suplementaria 9. Flujo de lavado en el dispositivo.....	122
Figura Suplementaria 10. Oxidación gradual del AmpliFlu Red.....	123
Figura Suplementaria 11. Optimización de la concentración de Ab2 para el inmunoensayo completo dentro del chip.....	124
Figura Suplementaria 12. Dot blot para S1 conjugada a NPMs.....	125
Figura Suplementaria 13. Curso temporal para los niveles de IgG en muestras de suero correspondientes a cada una de las tasas de flujo probadas (3-20 $\mu\text{L h}^{-1}$)...	126
Figura Suplementaria 14. Dot blot para NPMs con Proteína N conjugada.....	127
Figura Suplementaria 15. Inmunoensayo extenso para NPMs de 100 nm con la subunidad S1 conjugada.....	128
Figura Suplementaria 16. Dispositivo microfluídico con múltiples trampas.....	129

Índice de Tablas

Tabla 1. Fases del desarrollo de la pandemia de COVID-19 en México.	18
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de COVID-19.	26
Tabla 3. Características de los diferentes tipos de ELISA.....	34
Tabla 4. Eficiencia de conjugación para lisozima a NPMs de 100 nm.....	68
Tabla 5. Diferencias entre los 3 enfoques del ELISA en el dispositivo microfluídico.	73
Tabla 6. Eficiencia de conjugación de S1 a NPMs de 100 nm.....	85
Tabla 7. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el ELISA en chip.....	91
Tabla 8. Valores de límite de detección (LOD) obtenidos mediante los diferentes sistemas de ELISA para las curvas de calibración de IgG anti-lisozima y anti-S1 monoclonal y policlonal, respectivamente.....	94
Tabla 9. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el kit comercial de ELISA.....	99
Tabla 10. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el ELISA de laboratorio.	102
Tabla 11. Límite de detección (LOD) obtenido mediante el dispositivo microfluídico, ELISA comercial y ELISA de laboratorio.	105

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μPADs	Dispositivos analíticos microfluídicos basados en papel
μTAS	Sistemas de análisis total miniaturizados
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APTES	3-aminopropiltrietoxilsilano
ARN/ADN	Ácido Ribonucleico/ Ácido Desoxirribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CNC	Control numérico computarizado
DLS	Dispersión dinámica de luz
ECA2	Enzima convertidora de angiotensina 2
EDC	Hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
h	Hora
HRP	Peroxidasa de rábano
I/I_{sat}	Intensidad de fluorescencia/Intensidad de saturación
IgG/IgM	Inmunoglobulina G/Inmunoglobulina M
IPA	Alcohol isopropílico
KDa	Kilodaltones
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LFAs	Ensayos de flujo lateral
LOD	Límite de detección
M/mM	Molar/milimolar
MERS	Síndrome Respiratorio de Medio Oriente
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico

min	Minuto
MITOMI	Atrapamiento Mecánicamente Inducido de Interacciones Moleculares
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPFMs	Micropartículas ferromagnéticas
Na₂CO₃	Carbonato sódico
NaHCO₃	Bicarbonato sódico
nm	Nanómetro
NPPM	Nanopartículas magnéticas
p/v	Relación peso/volumen
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PES	Polietersulfona
pg	Picogramos
pH	Potencial de Hidrógeno
PMMA	Polimetacrilato de metilo
POCT	Pruebas en el punto de atención (Point-of-Care Testing)
RBD	Dominio de unión a receptor
RDTs	Pruebas de diagnóstico rápido
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa
S1	Subunidad 1 de la proteína Espiga (S)
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SPR	Resonancia de plasmón superficial
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
TBST	Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween-20
TMB	3,3',5,5' – tetrametilbencidina
v/v	Relación volumen/volumen

Introducción

Las vacunas han tenido un impacto significativo en el combate contra la emergencia sanitaria internacional causada por el virus SARS-CoV-2¹. No obstante, según lo informó la Organización Mundial de la Salud, no significa que la enfermedad de COVID-19 haya dejado de ser una amenaza para la salud mundial. Además, enfrentamos la posibilidad de que sigan surgiendo variantes del virus con resistencia a las vacunas existentes². La duración de la infección y la inmunidad proporcionada por las vacunas es variable en distintas poblaciones y sigue siendo un tema de estudio³. Todo ello, aunado a la limitada disponibilidad de dichas vacunas en algunos países y regiones, así como la demora o rechazo a la vacunación por parte de algunas personas, hace que las pruebas de diagnóstico mantengan su relevancia como una primera línea de defensa contra la emergencia mediante la detección temprana.

El diagnóstico oportuno y preciso de las enfermedades infecciosas es un problema de vital importancia en todo el mundo⁴. Cada vez es más necesario disponer de métodos de detección rápidos y de alta sensibilidad para mejorar la asistencia sanitaria en el punto de atención, prevenir la transmisión de infecciones y reducir la mortalidad en zonas con recursos limitados⁵⁻⁷. Debido a la reciente pandemia de COVID-19, se desarrollaron pruebas de diagnóstico rápido (RDT) basadas en inmunoensayos para la detección en el punto de atención del SARS-CoV-2, enfocadas principalmente en la detección de las proteínas de la espiga (S) y de la nucleocápside (N)^{6,8}. La sensibilidad de este tipo de pruebas rápidas puede variar según el tipo de prueba, la marca específica, la población objetivo y las condiciones de uso. La sensibilidad de una prueba diagnóstica proporciona información sobre su precisión para detectar correctamente los casos positivos de una enfermedad o condición específica.

Matemáticamente, la sensibilidad se calcula dividiendo el número de verdaderos positivos (personas con la enfermedad que dan positivo en la prueba) entre la suma de verdaderos positivos y falsos negativos (personas con la enfermedad que dan negativo en la prueba). La sensibilidad de las pruebas RDT para el diagnóstico de COVID-19 generalmente oscila entre el 50% y el 80%⁹. No obstante, diversos estudios recientes han mostrado una disminución significativa en la sensibilidad de las pruebas rápidas de antígenos en el caso de las variantes ómicron en comparación con variantes anteriores del virus SARS-CoV-2⁹. Por tanto, en muchos de los casos se requiere un método de confirmación adicional como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), una prueba altamente sensible (superando el 90% en la mayoría de los casos) pero que conlleva un mayor tiempo y un costo elevado^{10,11}.

Por otro lado, algunos enfoques se han dirigido a la detección de anticuerpos (IgG e IgM) frente al virus^{8,12-14}. La detección de anticuerpos circulantes en muestras de suero permite la identificación de casos

asintomáticos, el estudio de la propagación de la enfermedad y la determinación de la población más vulnerable a la infección^{11,15}. Además, la cuantificación de los niveles de anticuerpos en suero proporciona información valiosa sobre la adquisición y la dinámica de la inmunidad a largo plazo, tras la vacunación o la infección por SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes, evitando así cuarentenas innecesarias¹⁶⁻¹⁹. Sin embargo, las pruebas rápidas de flujo lateral (LFAs) disponibles para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 tienen una sensibilidad escasa a bajas concentraciones, que oscila entre el ~20% (para IgG) y el ~80% (para IgG/IgM)^{12,13}. Los LFAs también presentan un rango dinámico más estrecho en comparación con las técnicas de laboratorio, el cual corresponde al intervalo de concentraciones del analito en el que la prueba puede proporcionar resultados precisos y fiables. Además, los resultados suelen ser únicamente cualitativos por lo que los LFAs carecen de capacidad de cuantificación¹⁰.

La demanda de métodos de detección de anticuerpos que sean suficientemente sensibles, robustos, rápidos y fáciles de usar ha llevado a la exploración de enfoques alternativos, incluida la microfluídica basada en chips¹⁰. Sin embargo, los dispositivos típicos basados en PDMS presentan importantes inconvenientes, como el requisito de disponer de instalaciones de cuarto limpio, con equipos especializados y caros para la fabricación de moldes^{20,21}. Además, el proceso de fabricación y manipulación suele ser laborioso y tardado, y requiere personal altamente capacitado²².

Por otra parte, las nanopartículas magnéticas (NPMs) se han considerado atractivas para inmunoensayos debido a sus propiedades brownianas y magnéticas, mejorando la cinética de reacción y facilitando su manipulación, respectivamente^{6,23}. En enfoques recientes, antígenos específicos o anticuerpos diseñados por ingeniería se inmovilizan primero en la superficie de las NPMs, creando un complejo capaz de interactuar con las especies diana⁶.

Anteriormente, en nuestro grupo de investigación, se desarrolló un modelo de inmunoensayo basado en un ELISA indirecto, el cual empleó NPMs biotinizadas comerciales de 30 nm de diámetro, las cuales se emplearon como soporte para detectar anticuerpos anti-biotina. Se desarrolló un dispositivo que integraba una trampa magnética microfluídica compuesta por micropartículas ferromagnéticas (MPFMs) de 7 μm en un sistema de flujo continuo y se obtuvo un tiempo total de ensayo de 40 min y un límite de detección (LOD) de 8 pg mL^{-1} , que corresponde a la mínima concentración de anticuerpos detectada con un nivel de confianza estadísticamente significativo²⁴.

Tomando como referencia este trabajo previo, en este trabajo reportamos el desarrollo de un dispositivo microfluídico acrílico basado en NPMs de 100 nm, con lo cual se reduce el tiempo de separación magnética. A su vez, logramos la conjugación de dos antígenos de interés en nuestro laboratorio: por un lado la lisozima, con la cual pudimos estandarizar nuestro ELISA en el dispositivo microfluídico, así como la subunidad S1 del virus

SARS-CoV-2, siendo posible la detección cuantitativa de anticuerpos IgG séricos específicos contra dicha subunidad S1.

Empleamos muestras de suero que fueron extraídas en diferentes puntos temporales tras la aparición de los síntomas de la enfermedad COVID-19. Nuestro dispositivo requirió una baja concentración de NPMs mediante un sistema de alta preconcentración utilizando un imán convencional externo. El ELISA en el dispositivo integró un sistema de amplificación de señal mediante un Ab2 acoplado a la enzima HRP y el uso de un sustrato fluorogénico en flujo continuo. Nuestro dispositivo permite la detección en tiempo real en tan sólo 6 min. El LOD obtenido con nuestro dispositivo microfluídico es comparable, e incluso inferior, al que obtuvimos con un kit de ELISA comercial para el ensayo del título de anticuerpos IgG anti-S1 y a un ELISA convencional de laboratorio sobre placa de micropozos.

Antecedentes

Capítulo I. El virus SARS-CoV-2

A finales de diciembre de 2019 se tuvo el primer reporte de una nueva enfermedad por coronavirus en la ciudad de Wuhan, China denominada COVID-19^{8,25}. Debido a la rápida propagación alrededor del mundo, esta enfermedad fue declarada una emergencia de salud pública de importancia internacional a finales de enero de 2020. Apenas poco más de un mes después, el 11 de marzo de 2020, la enfermedad de COVID-19 fue declarada por la OMS como una pandemia global^{8,26}. Según lo reportado por la Universidad John Hopkins en su último conteo en octubre del 2023 el número de casos registrados de COVID-19 en el mundo fue de 676,609,955, con un total de 6,881,955 decesos hasta esa fecha.

El agente causal de la COVID-19 es el virus SARS-CoV-2, el cual pertenece a una extensa familia de virus con envoltura conocidos como coronavirus, debido a su apariencia de corona por las espigas que los rodean^{26,27}. A su vez, los coronavirus son agrupados en 4 géneros: Alpha (α CoVs), Beta (β CoVs), Gamma (γ CoVs) y Delta (δ CoVs)^{8,25,26} (**Fig. 1**). Los grupos Alpha y Beta son conocidos como coronavirus humanos endémicos. Particularmente los miembros del grupo beta son denominados coronavirus zoonóticos y entre estos destacan 3 virus de importancia clínica: SARS-CoV (China, 2002), MERS-CoV (Jordania, 2012) y SARS-CoV-2 (China, 2019)^{25,27,28}.

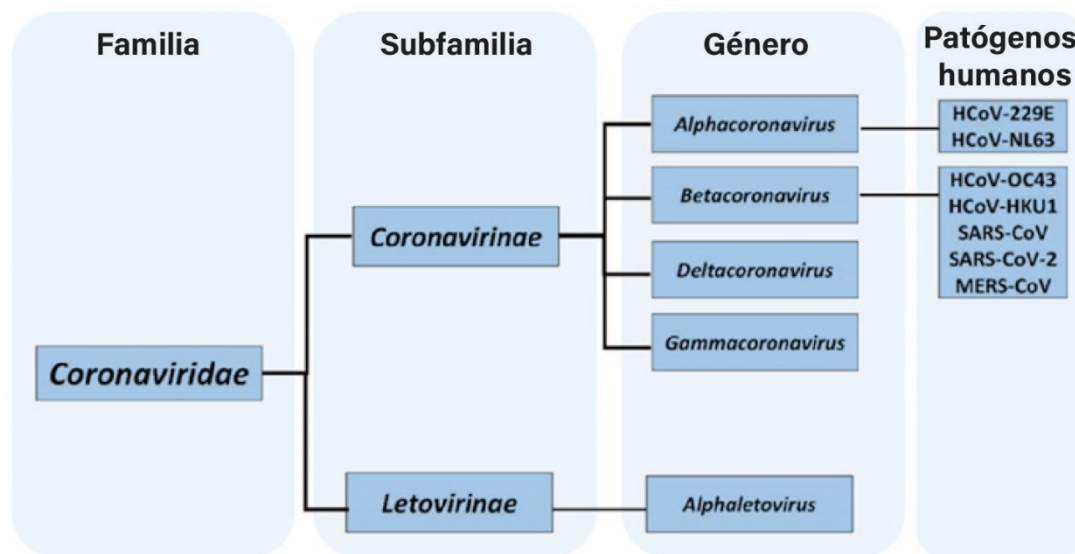


Figura 1. Taxonomía de la familia Coronaviridae. Destacan las especies conocidas como patógenas para el ser humano y causantes de enfermedades respiratorias. Tomado de Wartecki et al., 2020.

Estructura del virus SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus de tipo ARN de cadena continua (no segmentada). Posee una forma esférica, de unos 125 nm de diámetro y está conformado por 4 proteínas estructurales^{8,25,27,28} (**Fig. 2**):

- **Espiga (S)**: glicoproteína que integra las espículas características de alrededor de 12 nm de longitud y es esencial para facilitar la entrada del virus en la célula huésped. Está conformada por un trímero de dos subunidades:
S1: Contiene la región RBD (Receptor Binding Domain, en inglés, o Dominio de Unión al Receptor) y se encarga de la unión con el receptor de ACE2 (enzima convertidora de angiotensina II) de la célula huésped.
S2: Fusión de las membranas viral y celular.
- **Nucleocápside (N)**: es una fosfoproteína que forma una nucleocápside helicoidal para el ARN genómico. Implicada también en el ensamblaje, la transcripción y la replicación del virus.
- **Membrana (M)**: es una glicoproteína y es el componente más abundante de la envoltura. Contribuye al empaquetamiento del ARN genómico, el ensamblaje y la fusión del virus.
- **Envoltura (E)**: es una proteína pequeña de 8-12 kDa. Participa en el ensamblaje y morfogénesis de viriones.

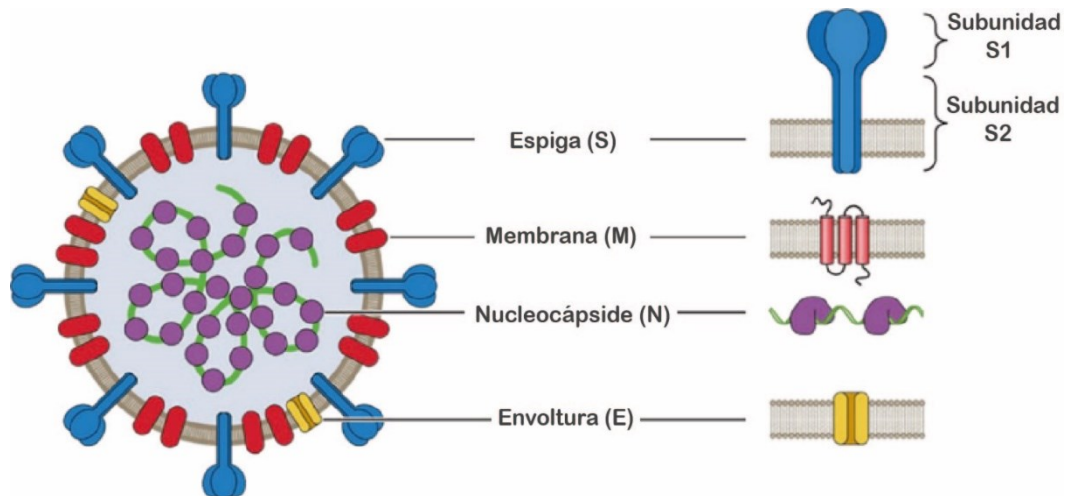


Figura 2. Estructura esquemática del virión del SARS-CoV-2. Destacan 4 principales proteínas que dan estructura al virus (S, N, M y E). Tomado y traducido de Synowiec *et al.*, 2021.

Variantes del SARS-CoV-2

La cepa inicial que desencadenó la pandemia de COVID-19 en 2020 tenía la mutación 484E, la cual se encuentra en el epítipo de la región predominante que codifica la proteína S²⁹. Durante los primeros meses de la pandemia, el SARS-CoV-2 se mantuvo genéticamente estable hasta que en febrero-marzo de 2020 surgió una variante que presentaba la mutación D614G en el gen de la espiga. Se ha demostrado que la mutación inicial D614G aumenta la infectividad del SARS-CoV-2. La difusión de esta mutación fue

extraordinariamente rápida, llegando a ser predominante a nivel mundial para junio de 2020 y se mantuvo presente en la mayoría de los genomas de SARS-CoV-2 secuenciados posteriormente³⁰.

A finales de 2020, aparecieron los linajes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) y Gamma (P1) en el Reino Unido, Sudáfrica y Brasil respectivamente, asociados con rebotes epidémicos rápidos y considerados como variantes de preocupación (VOC) debido a su aumento en transmisibilidad y capacidad de evadir la inmunidad. Se ha demostrado que varias mutaciones clave en la proteína S desempeñan un papel en el aumento de la transmisibilidad o la capacidad de escape inmunitario de las variantes de preocupación (VOC).

Otros linajes emergentes, como Kappa y Epsilon, fueron etiquetados como variantes de interés (VOI). En febrero de 2021, surgió el linaje Delta (B.1.617) en India, superando a todas las variantes preexistentes en transmisibilidad y patogenicidad. En noviembre de 2021, emergió la variante Ómicron (BA.2) en Sudáfrica, demostrando ser aún más transmisible y capaz de evadir la inmunidad, reemplazando a la variante Delta a nivel mundial para principios de 2022. Estudios recientes sugieren una menor patogenicidad de Ómicron, lo que plantea la posibilidad de una atenuación viral en la evolución del SARS-CoV-2^{30,31}.

Los análisis filogenéticos indican que cada variante de preocupación (VOC) surgió de manera independiente, en lugar de desarrollarse de forma progresiva. No obstante, resulta sorprendente que las VOC no emergieran antes del fenómeno de propagación selectiva que sustituyó la cepa original de Wuhan por la variante que llevaba la mutación D614G³⁰.

Desarrollo de la pandemia en México

A lo largo del desarrollo de la pandemia en México, se han detectado distintos olas o picos de aumento en el número de casos (**Tabla 1**). Cada uno de estos periodos han mostrado variaciones en términos de manifestaciones clínicas y patrones epidemiológicos. Se consideran 6 diferentes olas de infección desde el inicio de la pandemia hasta el 5 de mayo de 2023, cuando el Dr. Tedros Adhanom Gebreyesus, Director General de la OMS, anunció la finalización del estado de emergencia sanitaria internacional relacionado con el virus SARS-CoV-2 y la enfermedad de COVID-19³².

Olas o picos de contagio	Semana epidemiológica (SE)
1ª ola COVID-19	SE 8 a SE 39 de 2020
2ª ola COVID-19	SE 40 de 2020 a SE 15 de 2021
3ª ola COVID-19	SE 23 a SE 42 de 2021
4ª ola COVID-19	SE 51 de 2021 a la SE 9 de 2022
5ª ola COVID-19	SE 22 de 2022 a la SE 33 de 2022
6ª ola COVID-19	SE 49 de 2022 a la a la SE 4 de 2023

Tabla 1. Fases del desarrollo de la pandemia de COVID-19 en México. Se muestra el periodo comprendido para cada una de las seis olas de contagio identificadas en México desde el inicio de la pandemia en términos de la semana del año, del 2020 al 2023³².

Al comienzo de la quinta ola, la variante Ómicron se convirtió en la más prevalente entre los casos reportados hasta la fecha. Su propagación demostró una notable aceleración en la transmisión tanto en México como a nivel mundial, con un aumento exponencial de los contagios³².

Mecanismo de infección del SARS-CoV-2

La entrada del virus a la célula es un proceso multifacético que depende tanto de factores virales como celulares. Comienza con la interacción del virus con un receptor de adhesión, seguido de la unión al receptor de entrada específico de la célula. Posteriormente, se produce la internalización del virus en la célula a través de la fusión con la membrana celular o mediante un proceso de endocitosis. Una vez dentro, el virus es transportado al lugar de replicación, que puede ser tanto el citoplasma como el núcleo celular²⁷.

El virus del SARS-CoV-2 emplea receptores ECA2 para ingresar a la célula^{26,28}. La glicoproteína S es el factor determinante para el proceso de infección en la célula hospedera^{26,27}. No obstante, su acción se complementa con proteoglicanos de heparán sulfato que intervienen en la adhesión de los viriones para concentrarse en la superficie celular²⁶⁻²⁸ (**Fig. 3**). Además, algo que es común en todos los coronavirus patógenos para los humanos es que la entrada celular puede estar mediada por la serina proteasa transmembrana de tipo II (TMPRSS2), que actúa como activador de la glicoproteína S^{26,28}.

El principal punto de entrada del SARS-CoV-2 en el cuerpo humano es a través del tracto respiratorio superior. El virus se une al receptor ACE2, que se encuentra en la superficie de las células del epitelio nasal y de las vías respiratorias, incluidas las células alveolares tipo II en los pulmones. Esta interacción permite al virus entrar y replicarse en las células respiratorias, facilitando la propagación de la infección³³.

Aunque se considera que los pulmones son el órgano diana del SARS-CoV-2 y son el órgano más afectado por el virus, sólo el 2% de las células que lo integran son ECA2 positivas, mientras que algunos tipos celulares de otros órganos son también un blanco potencial y se encuentran ampliamente en el intestino delgado, la vesícula biliar, los riñones, los testículos, la tiroides, el tejido adiposo, el músculo cardíaco, los ovarios y el páncreas^{26,27,34}. Por tal razón, la disfunción multiorgánica observada en pacientes infectados con el virus puede ser atribuida a la amplia distribución de la proteína ECA2²⁸.

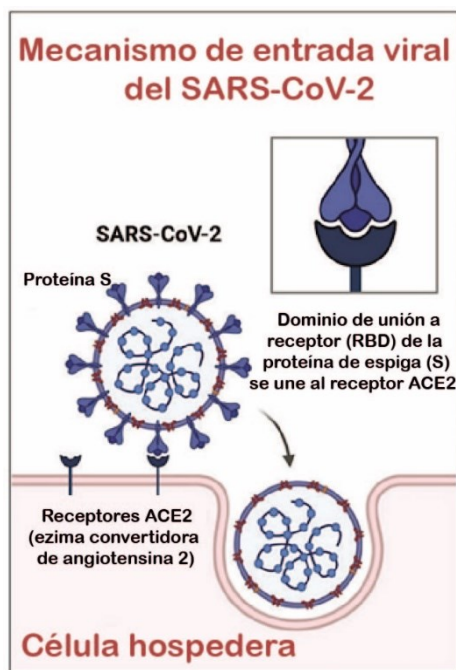


Figura 3. Mecanismo de entrada viral del SARS-CoV-2 a la célula hospedera. Se muestra una representación esquemática de la interacción proteína-proteína del complejo RBD-ECA2. Tomado y traducido de Verma *et al.*, 2021.

Desarrollo de la enfermedad de COVID-19

Al cabo de cinco días posteriores a la infección del virus aparecen los primeros síntomas de COVID-19⁸. Las manifestaciones clínicas típicas incluyen fiebre, tos seca, disnea, neumonía, mialgia o fatiga, cefalea, hemoptisis y diarrea^{8,25,26}. Son comunes también disfunciones olfativas y gustativas³⁴. También pueden aparecer signos gastrointestinales como náuseas, dolor abdominal, diarrea y vómitos²⁶. A su vez, los pacientes infectados por este virus pueden sufrir daños potenciales en órganos vitales que integran el sistema cardiaco, renal y nervioso⁸.

Las personas en grupos de alto riesgo, como son las personas de la tercera edad (mayores de 65 años), personas con obesidad, aquellos con enfermedades crónicas o inmunidad comprometida, son más susceptibles a complicaciones severas por COVID-19. Dichas complicaciones pueden desencadenar en choque séptico, fallo de varios órganos y eventualmente, la muerte²⁸.

Por otro lado, algunos individuos pueden no desarrollar los síntomas de la enfermedad (asintomáticos), pero aun así tienen la capacidad de transmitir la enfermedad a otros, además se sabe que el virus SARS-CoV-2 es transmisible incluso durante el periodo de incubación^{25,28}. Según un estudio analítico, alrededor del 50-59% de todas las infecciones fueron atribuidas a individuos asintomáticos³⁴. De hecho, se estima que los asintomáticos son responsables de propagar la enfermedad hasta un 75 % más que los casos sintomáticos²⁸.

Diagnóstico de COVID-19

La reciente pandemia de COVID-19 ha destacado la importancia de la detección rápida y precisa en las etapas iniciales de la infección. Detectar el virus de manera temprana no solo permite un tratamiento oportuno y adecuado para los pacientes, sino que también ayuda a contener la propagación del virus, reduciendo la transmisión comunitaria y permitiendo una respuesta más efectiva de salud pública. Los métodos de detección rápidos y altamente sensibles resultaron ser esenciales para gestionar adecuadamente la pandemia, con el objetivo de mejorar la atención médica en el punto de atención, prevenir la propagación de infecciones y disminuir la mortalidad, especialmente en áreas con recursos limitados⁵⁻⁷. Actualmente existen diversos enfoques para el diagnóstico de COVID-19, siendo los principales las pruebas moleculares, de antígenos virales y las pruebas serológicas (**Fig. 4**), las cuales se describen en los apartados siguientes.

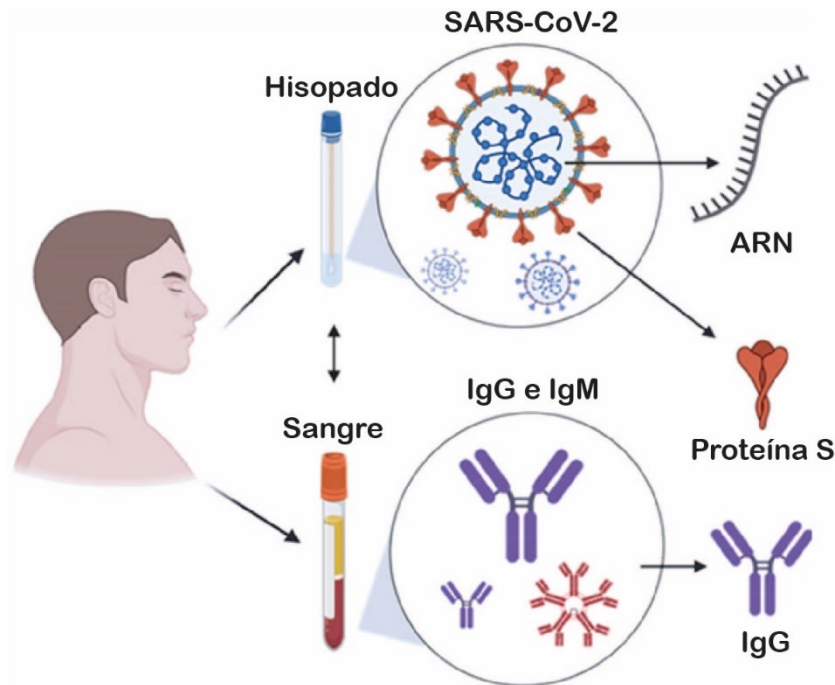


Figura 4. Métodos de detección de COVID-19. Destacan tres principales métodos de detección para el virus SARS-CoV-2. Por un lado, las pruebas moleculares, dirigidas hacia la detección del material genético del virus; las pruebas de antígenos, capaces de detectar proteínas estructurales del virus y las pruebas de anticuerpos, que miden la generación de anticuerpos circulantes en la sangre dirigidos contra el virus. Tomado y traducido de Dhamad *et al.*, 2020.

a. Pruebas moleculares

RT-PCR es esencial para el diagnóstico de infecciones virales, especialmente cuando se trata de virus de ARN, como el SARS-CoV-2, causante de la COVID-19. Esta técnica se basa en la cuantificación del material genético presente en una muestra biológica^{25,28}. La RT-PCR consiste en transcribir

inicialmente el ARN en ADN complementario (cDNA) mediante la enzima retrotranscriptasa²⁸. Posteriormente, el cDNA es amplificado mediante la enzima ADN polimerasa.

Por lo general, la amplificación se logra a través de tres etapas fundamentales: (1) desnaturalización, donde la temperatura se eleva a alrededor de 95°C a 98°C durante 20-30 segundos para romper los puentes de hidrógeno entre las bases de nucleótidos y desnaturalizar el ADN de doble cadena en ADN de cadena simple. (2) Alineación, donde la temperatura desciende para permitir que los cebadores (primers), que son un tipo específico de oligonucleótidos, se unan a las secuencias de ADN diana. La temperatura de alineación típicamente oscila entre 50°C y 65°C, dependiendo de la temperatura de fusión específica de los cebadores. Esta etapa suele durar alrededor de 20-30 segundos. (3) Extensión, donde la ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN complementarias a partir de los oligonucleótidos. La temperatura se aumenta a alrededor de 72°C, la temperatura óptima para la actividad de la ADN polimerasa. Estos tres pasos se repiten en ciclos durante varias veces (generalmente entre 20 y 40 ciclos) para amplificar exponencialmente el fragmento de ADN deseado²⁸ (**Fig. 5**).

La RT-PCR es considerada el "estándar de oro" para la detección del virus ya que posee una alta sensibilidad y especificidad^{8,28}. En general, las pruebas de detección del SARS-CoV-2 tienen menor precisión y sensibilidad que las pruebas basadas en RT-PCR debido a que no integran un paso de amplificación de señal como ocurre en esta prueba basada en la detección del ARN viral⁸. Recientemente se han desarrollado kits basados en RT-PCR para la detección cualitativa de la infección vírica en diversos fluidos biológicos, como el líquido alveolar, los hisopos nasofaríngeos, el esputo y la sangre⁸.

Por otro lado, Notomi *et al.* desarrollaron en el año 2000 el ensayo de RT-LAMP⁸. La RT-LAMP se realiza a una temperatura constante entre 60 y 65 °C por lo que, a diferencia de la PCR/RT-PCR, no requiere ciclos de temperatura. Se trata de un método sensible, rápido y de funcionamiento sencillo, por lo cual se ha utilizado recientemente para detectar infecciones patógenas como la causada por el SARS-CoV-2⁸. Esta técnica ofrece métodos de detección sencillos incluyendo colorimetría, fluorescencia, turbidimetría, entre otros²⁸. Sin embargo, debido al elevado número de primers requerido, aumenta la posibilidad de que se formen dímeros entre estos, lo que da lugar a resultados falsos positivos. Por ello, los cebadores deben estar bien diseñados para dirigirse específicamente a los genes deseados²⁸.

b. Pruebas serológicas

Por otro lado, algunos enfoques se han dirigido a la detección de anticuerpos frente al virus. Las pruebas serológicas determinan la presencia de dos tipos de anticuerpos: inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina M (IgM) en muestras de sangre, suero o plasma del paciente^{8,12-14,34}. Después de algunos días de la infección, se puede detectar IgM en el suero, que persiste durante algunas semanas hasta que se produce la seroconversión a IgG. Por lo tanto,

la presencia de IgM indica una fase temprana de la infección, mientras que la IgG puede señalar una infección previa o la existencia de inmunidad postinfección³⁴.

Hay quienes sostienen que las pruebas serológicas sólo se utilizan con fines de observación y no como herramienta de diagnóstico⁸. Sin embargo, el análisis de anticuerpos circulantes en muestras de pacientes permite la identificación de casos asintomáticos, el estudio de la propagación de la enfermedad y la determinación de la población más vulnerable a la infección^{11,15}. Además, la cuantificación de los niveles de anticuerpos en suero proporciona información valiosa sobre la adquisición y la dinámica de la inmunidad a largo plazo, tras la vacunación o la infección por SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes, evitando así cuarentenas innecesarias^{16-19,34}.

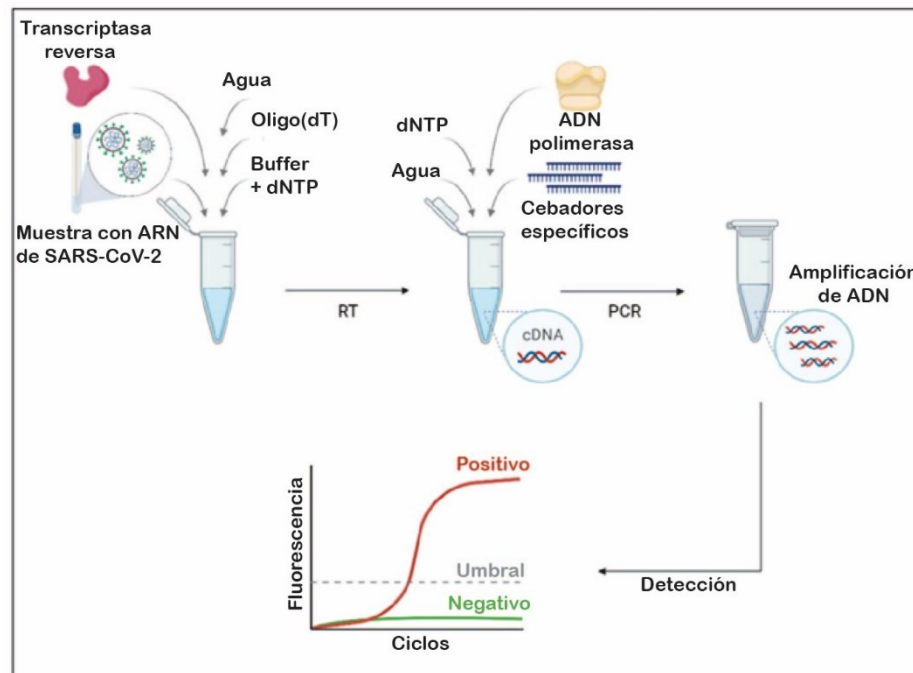


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR). Se sintetiza primero el ADN complementario (cDNA) preparando una mezcla maestra que contiene una plantilla de ARN y la enzima transcriptasa inversa. Luego, se agrega otra mezcla maestra que incluye primers específicos del gen y la enzima polimerasa de ADN para iniciar la reacción de PCR, lo que resulta en la generación de millones de copias de secuencias de ADN específicas. La detección de fluorescencia en tiempo real muestra la curva de amplificación para las muestras positivas. Tomado y traducido de Alhamid *et al.*, 2022.

Pruebas en el punto de atención (POCT)

Por el momento, muchos de los enfoques anteriormente mencionados requieren equipos especializados y costosos, junto con técnicas complicadas y procedimientos de manipulación de muestras complejos²⁸. En consecuencia, el desarrollo de pruebas en el punto de atención (POCT, por sus siglas en inglés) para el SARS-CoV-2 ha recibido una atención significativa, principalmente para países en desarrollo. Una prueba POCT bien diseñada debe cumplir con todos los criterios establecidos para ser considerada

“ASSURED” (derivado del acrónimo en inglés), es decir, Asequible, Sensible, Específica, Fácil de usar, Rápida y robusta, Libre de equipo y Portable^{8,35}, reduciendo así los gastos médicos, simplificando los procesos experimentales y utilizando la mínima cantidad de muestras biológicas⁶. Esto sin duda optimiza la toma de decisiones médicas oportunas ante una potencial emergencia sanitaria¹⁰.

Durante las últimas tres décadas, los ensayos de flujo lateral (LFAs) han sido los más utilizados como diagnóstico en el punto de atención (POCT)^{6,10}. Los LFAs proporcionan ventajas significativas debido a su simplicidad, portabilidad y bajo costo de fabricación^{10,35}. Asimismo, la lectura de los resultados de los LFAs mediante el revelado de color observable a simple vista proporciona una herramienta de detección rápida, eficaz y fácil de usar, sin necesidad de instrumentos de laboratorio ni personal experimentado^{6,11,35}.

Debido a la reciente pandemia de COVID-19, se desarrollaron pruebas de diagnóstico rápido (RDTs) basadas en inmunoensayos para la detección del SARS-CoV-2, centrándose principalmente en la detección de las proteínas de la espiga (S) y de la nucleocápside (N)^{6,8,34}. Sin embargo, con frecuencia se notificaron casos falsos negativos para las RDTs, lo que requería un método de confirmación adicional como la RT-PCR^{10,11,34}. Las pruebas RDT exhibieron sensibilidades que oscilaron entre el 24,3% y el 50% en muestras positivas según la RT-PCR, incrementándose hasta alcanzar entre el 81,8% y el 100% en muestras con cargas virales significativamente altas³⁴.

Asimismo, se han desarrollado pruebas rápidas basadas en el reconocimiento de anticuerpos. La mayoría de ellas se basan en los anticuerpos IgG e IgM presentes en la sangre del paciente. Algunos de ellos logran incluir un sencillo proceso operativo en el que se pincha el dedo del paciente y se extrae la sangre. La manipulación es bastante sencilla, basta con colocar unas gotas de sangre de un pinchazo en el dedo o bien, extraída de una vena. La muestra de sangre fluye a través de una tira y el resultado de la muestra puede interpretarse en 5-10 minutos, con un resultado similar al de una prueba de embarazo. Todo ello es compatible con cartuchos desechables de un solo uso que pueden almacenarse a temperatura ambiente⁸.

Las pruebas rápidas de reconocimiento de anticuerpos incluyen los siguientes ensayos: 1) prueba rápida de Bio-medics y cassette de prueba rápida de Sure screen, 2) kit de diagnóstico Gold site, 3) kit POCT rápido de Assay Genie y 4) Viva-Diag de anticuerpos SARS-CoV-2. DPP SARS-CoV-2 IgM/IgG es una prueba rápida POCT de tipo LFA que se basa en una lectura óptica. Esta prueba fue desarrollada por Chembio Diagnostics y aprobada por la FDA y ofrece resultados en 15 min utilizando una muestra de sangre obtenida mediante punción digital. Los kits de quimioluminiscencia de IgM y IgG Diazyme DZ-Lite SARS CoV-2 son otro kits aprobados por la FDA y con autorización de uso de emergencia basados en anticuerpos. Los kits DZ-Lite SARS CoV-2 IgM e IgG CLIA utilizan un analizador CLIA con una capacidad de 50 pruebas por hora. Varios kits de ELISA certificados han sido desarrollados por fabricantes de diagnóstico in vitro (IVD) como Euroimmun,

IBL International, DRG Diagnostics GmbH y Epitepe Diagnostics y están disponibles en el mercado⁸.

Sin embargo, los LFAs disponibles para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 tienen una sensibilidad escasa a bajas concentraciones, que oscila entre el ~20% (para IgG) y el ~80% (para IgG/IgM)^{12,13}. Los LFAs también presentan un rango analítico más estrecho en comparación con las técnicas de laboratorio, esto significa que la cantidad de analito que pueden detectar y medir con precisión es más limitada. Además los resultados obtenidos suelen ser cualitativos, indican la presencia o ausencia de anticuerpos específicos en la muestra. Estos resultados se muestran típicamente como líneas visibles en una tira reactiva, careciendo de capacidad de cuantificación¹⁰.

Comparativa entre pruebas diagnósticas

Las pruebas moleculares, como lo es la RT-PCR y RT-LAMP, son altamente precisas y constituyen la primera opción para la detección temprana. No obstante, la detección de ácidos nucleicos tiene sus limitaciones en términos de (1) facilidad de operación, ya que se requiere de laboratorios bien equipados y personal calificado, pues este tipo de pruebas requieren procedimientos de manipulación y procesamiento complejos; (2) riesgo de contaminación biológica debido a una manipulación inadecuada de las muestras, lo cual puede resultar en errores de detección; (3) eficiencia temporal, ya que se requiere de un largo tiempo para obtener los resultados esperados (3-4 h en el caso de la RT-PCR); (4) asimismo, es posible estar infectado con el SARS-CoV-2 y no tener la suficiente carga viral para la detección, normalmente durante la fase inicial de la enfermedad^{8,25,28,34}.

Por otro lado, aunque la técnica de RT-PCR se considera altamente precisa para detectar el ARN del virus, presenta una limitación importante: la presencia de ARN del SARS-CoV-2 en muestras de pacientes no garantiza la existencia de virus viables capaces de replicarse, ni indica si el individuo analizado es contagioso en el momento de la prueba³⁴.

Las pruebas de antígenos son capaces de detectar proteínas virales infecciosas, tanto en el punto de atención como en laboratorios. Las pruebas rápidas de antígenos POCT proporcionan resultados en 15-30 min y son útiles para el tratamiento de un mayor número de pacientes en un período corto, pero generalmente requieren cargas virales elevadas para identificar la infección^{8,34}. Se ha observado que la sensibilidad de las pruebas RDT es considerablemente menor en pacientes asintomáticos en comparación con pacientes sintomáticos. Para los pacientes asintomáticos, las pruebas de antígenos RDT mostraron sensibilidades que oscilaron entre el 23,3% y el 35,8%, mientras que para los pacientes sintomáticos, estas sensibilidades estuvieron entre el 64,2% y el 75,2%³⁴.

Por su parte, las pruebas de anticuerpos proporcionan información importante sobre la transmisión comunitaria y la infección previa. Además, los niveles de anticuerpos circulantes en la sangre brindan datos útiles con

respecto de la duración y la magnitud de la inmunidad tras la infección o la vacunación. . La **Tabla 2** resume los principales métodos de diagnóstico de COVID-19 que se han descrito hasta el momento. Otras pruebas, incluidas las pruebas de saliva, técnicas de tomografía computarizada o radiografía son también útiles como métodos complementarios y pueden desempeñar un papel importante en el futuro⁸.

Método	Fundamento	Muestra	Tiempo requerido	Ventajas	Desventajas
RT-PCR	Amplificación de fragmentos específicos del genoma a partir del ARN	Hisopados orofaríngeos o nasofaríngeos, esputo, aspirado de vías respiratorias, lavado bronco-alveolar	3-4 h	Estándar de oro en el diagnóstico viral. Necesita una pequeña muestra de material genético.	Requiere equipos especializados de laboratorio. Proceso complejo con alto consumo de tiempo.
RT-LAMP	Amplificación de fragmentos específicos del genoma a temperatura constante empleando más de 2 sets de cebadores	Hisopados orofaríngeos o nasofaríngeos, esputo, aspirado de vías respiratorias, lavado bronco-alveolar	1 h	Alta precisión y reproducibilidad en condiciones climáticas constantes. No se requiere de un termociclador.	La sensibilidad depende de la carga viral; algunas muestras dan falsos positivos.
Pruebas de antígenos	Unión específica antígeno-anticuerpo	Hisopados orofaríngeos o nasofaríngeos	15-30 min	Compatible para POCT	Propenso a contaminación. Baja sensibilidad.
Pruebas serológicas	Unión específica antígeno-anticuerpo	Sangre periférica, suero o plasma aislado Punción digital Saliva	4-6 h	Altamente específico y sensible	Es tardado considerando la incubación y tiempo de ensayo.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de COVID-19. Tomado y traducido de Verma *et al.*, 2021.

No obstante, la elección de la prueba de detección más adecuada debe ir de la mano con el esquema temporal del desarrollo de la enfermedad una vez dada la infección por el virus. La RT-PCR y las pruebas basados en la detección de antígenos son las mejores herramientas para detectar la infección activa¹⁶. Sin embargo, es importante tener en claro que las manifestaciones por infección del SARS-CoV-2 pueden ser leves o incluso la infección se presenta sin síntomas, por lo que muchos casos no pueden ser detectados mediante pruebas directas en la fase aguda de la enfermedad³⁶.

Por su parte, las pruebas de anticuerpos pueden ser útiles para detectar infecciones pasadas, en individuos y en comunidades¹⁶. Así, cada una de estas pruebas contribuye a obtener un panorama más completo y preciso del comportamiento individual de la infección en pacientes, así como la dinámica de la pandemia a nivel poblacional. Por tanto, el uso correcto de estas pruebas en la ventana de tiempo oportuno, garantiza una mayor sensibilidad y especificidad en los resultados obtenidos (**Fig. 6**).

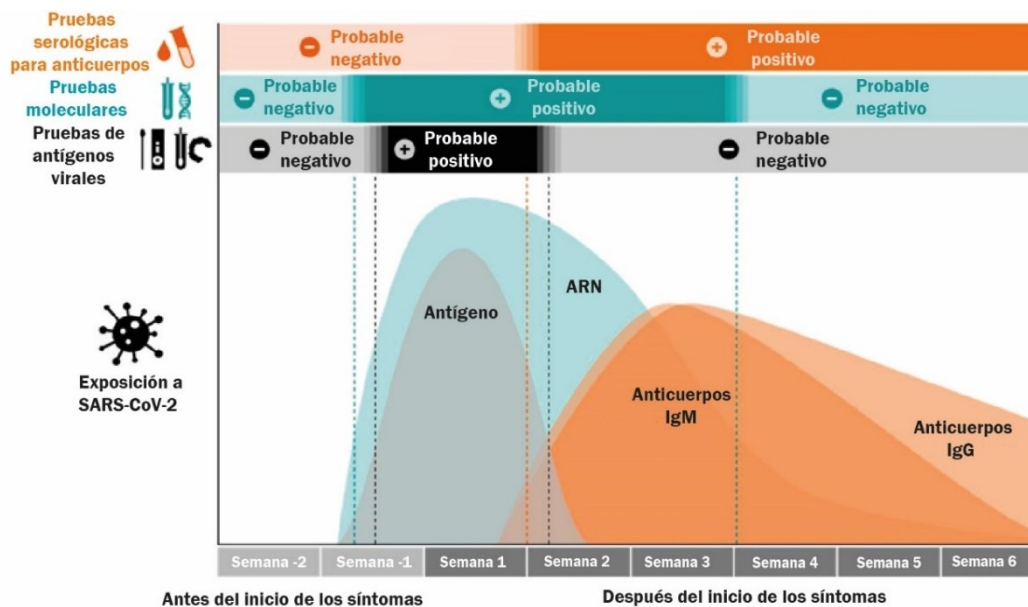


Figura 6. Funciones complementarias de las pruebas PCR, de antígenos y de anticuerpos en la detección del SARS-CoV-2 y el diagnóstico de COVID-19. Tomado y traducido de Lasalvia *et al.*, 2021.

Con la aparición de diversas variantes del SARS-CoV-2 extendiéndose a nivel global, los cambios en la estructura de los blancos antigénicos virales detectados por pruebas de antígenos o RT-PCR podrían tener un impacto negativo en la precisión y sensibilidad de dichas pruebas. Entre las variantes de interés se han identificado múltiples mutaciones, algunas de las cuales pueden interferir con la capacidad de ciertas pruebas de PCR para reconocer el gen de la espiga (gen S), lo que puede resultar en un resultado negativo en la prueba para este blanco, conocido como fallo del blanco del gen de la espiga (SGTF) o eliminación del gen S. Sin embargo, la mayoría de las pruebas de RT-PCR van dirigidas a múltiples blancos simultáneamente, lo que ha contribuido a mantener la precisión general de los resultados de las pruebas hasta el momento.

Además, las mutaciones presentes en las variantes actuales del SARS-CoV-2 también pueden ser detectadas por pruebas de diagnóstico de antígenos. Dado que estas pruebas detectan diferentes proteínas virales, como la proteína de nucleocápside o diversas proteínas de la espiga (S), las mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas pueden impactar en la precisión de las pruebas. Sin embargo, la influencia de las variantes en la sensibilidad de las pruebas sigue siendo objeto de debate y se necesita más investigación para entender completamente su impacto. Estudios clínicos han arrojado resultados contradictorios. En un primer estudio no se encontraron diferencias de sensibilidad entre las variantes alpha (B.1.1.7), delta y pre-alpha, mientras que la sensibilidad para ómicron (BA.2) fue incluso mayor. Otros estudios mostraron que las RDTs tenían una sensibilidad significativamente menor para la variante B.1.1.7³⁴.

Capítulo II. Inmunoensayos

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos que se basan en la reacción de reconocimiento entre un antígeno y un anticuerpo³⁷⁻³⁹. Los anticuerpos (Abs) son proteínas de tipo inmunoglobulinas (Ig) producidas por las células B del sistema inmune, en respuesta a la presencia de agentes extraños conocidos como antígenos (Ags), o bien pueden ser diseñados y producidos en laboratorios mediante tecnología recombinante⁴⁰. Los anticuerpos poseen una estructura única (**Fig. 7**) y exhiben una afinidad altamente específica hacia su respectivo antígeno mediante un mecanismo “llave-cerradura” de reconocimiento exclusivo, que permite la formación de un complejo antígeno-anticuerpo mediante el establecimiento de enlaces de tipo no covalente, incluyendo interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals^{41,42}.

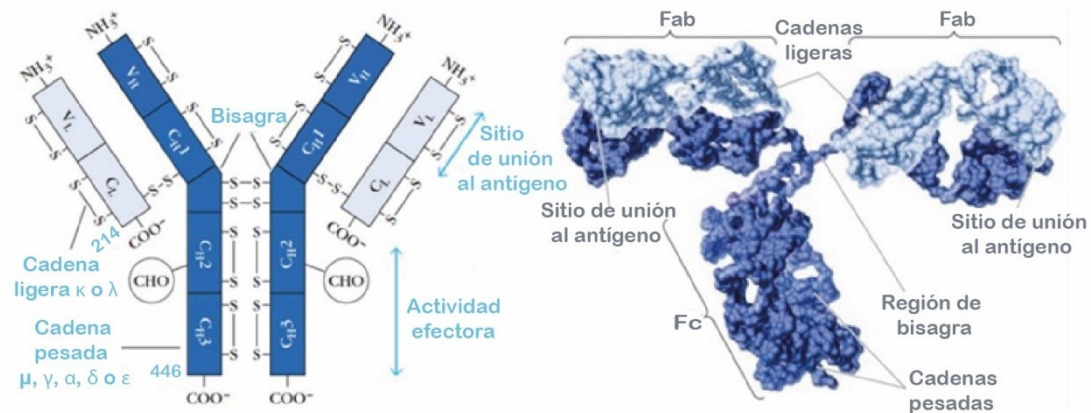


Figura 7. Diagrama esquemático y estructura tridimensional de la estructura de un anticuerpo. Tomado y traducido de Kuby, Immunology 7th edition.

Los métodos de inmunoensayo se caracterizan por su especificidad inherente, alto rendimiento y alta sensibilidad, que permiten la detección y cuantificación de una amplia gama de analitos de interés de manera relativamente sencilla^{37,38,41}. Por tanto, constituyen un método altamente versátil y pueden ser adaptados para detectar tanto Ags como Abs, dependiendo de los requerimientos y el tipo de inmunoensayo⁴¹.

En el año 1960 Yalow y Berson describieron por primera vez un método analítico para la cuantificación de insulina, el cual empleaba la detección mediada por anticuerpos vinculada a una señal radiactiva, conocido posteriormente como radioinmunoensayo. Este descubrimiento los hizo acreedores al premio Nobel de Medicina en el año 1977^{43,44}.

Se han establecido diferentes criterios para clasificar los inmunoensayos. Desde el tipo de plataforma analítica empleada, las cuales pueden ser microplacas, microcolumnas, membranas, micropartículas y sistemas de flujo⁴⁵. Dependiendo de la existencia o no de competición, los inmunoensayos se pueden clasificar como no competitivos (también

conocidos como inmunométricos) o competitivos, en los que las moléculas de analito presentes en la muestra compiten con moléculas marcadas por un número limitado de sitios de unión de los anticuerpos^{41,45}.

Otra manera de clasificar a los inmunoensayos involucra el tipo de resultado que arrojan. Existen diferentes tipos de inmunoensayos que permiten la detección cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa de analitos⁴⁶. En los primeros la concentración de analitos puede obtenerse empleando curvas de calibración de concentraciones previamente conocidas⁴⁵.

Por su parte, los inmunoensayos de tipo cualitativo solo permiten saber si el analito de interés está presente en la muestra por encima de una determinada concentración umbral. Además, en este tipo de ensayos un resultado negativo no excluye la presencia del analito, sino que más bien puede reflejar concentraciones por debajo de dicho umbral. Asimismo, las muestras cercanas al umbral pueden dar resultados positivos en función de la precisión del ensayo.

A su vez, los inmunoensayos también pueden ser clasificados en homogéneos y heterogéneos. Un inmunoensayo homogéneo es aquel donde la formación del complejo Ag-Ab tiene lugar en la fase coloidal, sin necesidad de separar el analito unido (complejo Ag-Ab) del analito libre (Ag o Ab no unido) antes de medir la señal. Por otro lado, en un inmunoensayo heterogéneo los Abs o Ags son previamente inmovilizados sobre un sustrato sólido donde se forma el complejo Ag-Ab y es necesario un paso de separación previa del analito no unido, mediante métodos físicos o químicos para poder llevar a cabo la detección^{38,41,45}.

Independientemente del tipo de inmunoensayo, la medición del analito requiere de alguna estrategia que permita distinguir entre la fracción unida (complejo Ag-Ab) y la fracción no unida (libre). Una vez que se han diferenciado ambas fracciones, se puede proceder a la detección de la etiqueta en la fracción correspondiente³⁸.

Los marcadores utilizados habitualmente en los inmunoensayos son radioisótopos, fluoróforos y enzimas. Asimismo, se ha desarrollado una amplia gama de estrategias de etiquetado y amplificación de la señal que permiten detectar la unión del ligando mediante la asociación de este con un anticuerpo de "lectura" con propiedades fluorescentes, colorimétricas, quimioluminiscentes o radiactivas particulares, o mediante cambios en la densidad o la masa^{38,39}. Los métodos de detección más comunes son la radiactividad, la colorimetría, la fluorimetría y la quimioluminimetría. Existe un grupo especial de inmunoensayos que no requieren de ninguna etiqueta específica entre los que se incluyen la inmunonefelometría la inmunoturbidimetría y la aglutinación³⁸.

Hoy en día, existen diversos formatos de inmunoensayos y los más comúnmente empleados en los laboratorios de investigación permiten la detección de analitos en diferentes tipos de muestras como puede ser (1) en solución, mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) o ensayos de quimioluminiscencia (CLIA); (2) en

cortes de tejidos, mediante inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia (IF); (3) en la superficie de las células, mediante citometría de flujo (FC); (4) en el interior de células completas, mediante inmunocitoquímica (ICC); (5) o bien de extractos celulares, mediante Inmunoblot o Western Blot (WB)³⁹.

La aplicación de los inmunoensayos se extiende en muchas áreas importantes, abarcando desde el diagnóstico clínico y monitoreo de enfermedades, a través de la medición de metabolitos y/o biomarcadores presentes en el organismo a muy bajas concentraciones mediante muestras biológicas; enfoques biofarmacéuticos, como en los estudios de farmacocinética clínica y de bioequivalencia para el desarrollo de fármacos; el monitoreo medioambiental, seguridad y análisis de alimentos, investigaciones científicas básicas, entre otras^{37,41,46}.

ELISA

Debido a los riesgos para la salud implicados en el uso de radiactividad en los primeros inmunoensayos descritos se desarrollaron métodos de detección alternativos. En 1971, dos grupos de investigación europeos describieron, de manera independiente, el protocolo completo para realizar ensayos inmunoenzimáticos (Engvall y Perlmann, Suecia⁴⁷; Van Weemen y Schuurs, Países Bajos⁴⁸). De esta manera, se implementó el uso de nuevos complejos enzima-sustrato capaces de producir cambios de coloración cuantificables que fueron empleados en la inmunodetección. Dichas enzimas, acopladas a anticuerpos específicos, permiten la detección específica de los analitos de interés.

Actualmente, el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) es el método más empleado para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra. Debido a la alta sensibilidad, especificidad y precisión de la técnica de ELISA, este formato se ha establecido en la investigación básica y el diagnóstico clínico como el estándar de oro para la detección de una gran variedad de analitos^{39,46,49}. Existen diferentes modalidades de ELISA, la diferencia entre cada formato radica en la manera en la que se inmoviliza el antígeno y la forma de detección.

ELISA directo

Este formato de ELISA es el más sencillo. Inicialmente, el antígeno se fija en la superficies de un pocillo en una microplaca empleando una solución amortiguadora de recubrimiento a base de carbonato-bicarbonato (carbonato sódico (Na_2CO_3), bicarbonato sódico (NaHCO_3)) a pH básico, lo cual garantiza que el antígeno mantenga una carga negativa, favoreciendo así la adsorción pasiva sobre la superficie de la microplaca cargada positivamente⁴³. Lo siguiente es el paso de bloqueo, el cual implica la adición de un agente bloqueante capaz de unirse en los espacios disponibles no ocupados por el antígeno inmovilizado en la fase sólida. La función principal del bloqueo es prevenir uniones no específicas de los anticuerpos empleados en el ensayo, y

así evitar falsos positivos o señales de ruido de fondo demasiado elevadas. No existe un agente bloqueante estandarizado para cada ensayo; sin embargo, un bloqueador ideal no debe tener reactividad cruzada con otros componentes del inmunoensayo. Los agentes bloqueantes pueden ser de tipo proteico como la albúmina sérica bovina (BSA), caseína, leche desnatada, etc., o bien detergentes como Tween 20, Triton X-100, entre otros.

Posteriormente, se añade un anticuerpo primario (Ab1) que estará marcado con una enzima conjugada (generalmente la peroxidasa de rábano o HRP). El Ab1 será incubado tiempo suficiente para permitir la unión al antígeno inmovilizado sobre el pocillo y formar el complejo Ag-Ab. Entre cada paso es indispensable emplear una solución de lavado en cada pocillo para eliminar el exceso de las especies que no hayan sido unidas, lo cual minimiza el ruido de fondo durante la detección y aumenta la especificidad del ensayo. Como paso final del ensayo se agrega el sustrato de la enzima, el cual es convertido en una molécula que puede ser detectada por espectroscopía UV-Vis (ultravioleta-visible), quimioluminiscencia o espectroscopía de fluorescencia. Generalmente, el sustrato empleado para la ELISA es TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) el cual es un sustrato cromogénico. Luego de unos minutos, la reacción es detenida para proporcionar un punto final fijo para el ensayo mediante una solución de parada a base de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.25 M.

La interacción enzima-sustrato produce una señal colorimétrica que indica la presencia del antígeno en la muestra (**Fig. 8**). A su vez, la medición de la densidad óptica mediante un espectrofotómetro resulta proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Para conocer la concentración del analito, se utiliza una curva estándar de un patrón a distintas concentraciones conocidas^{43,44}.

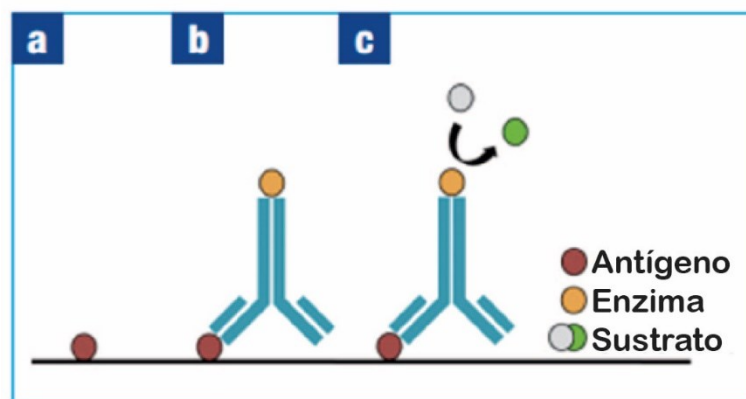


Figura 8. Pasos de un ELISA directo. Tomado y traducido de La Rica *et al.*, 2012.

ELISA indirecto

En una prueba de ELISA indirecto, después de los pasos de inmovilización del antígeno sobre la superficie, el bloqueo y el lavado, como fue descrito anteriormente, se agrega un Ab1 específico no marcado para formar el complejo Ag-Ab, el cual deberá unirse a un segundo anticuerpo marcado

denominado anticuerpo secundario (Ab2). De forma similar al ELISA directo, la placa se incuba con cada anticuerpo, se realizan los pasos de lavado después de cada incubación, se añade el sustrato de la enzima conjugada al Ab2, se detiene la reacción y se utiliza un espectrofotómetro para realizar las mediciones en cada uno de los pocillos (**Fig. 9**). De manera alternativa, el Ab2 también puede marcarse con un fluoróforo y cuantificar la señal emitida bajo luz ultravioleta con un fluorómetro. Esta matriz se conoce como ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia (FLISA, por sus siglas en inglés)^{43,44}.

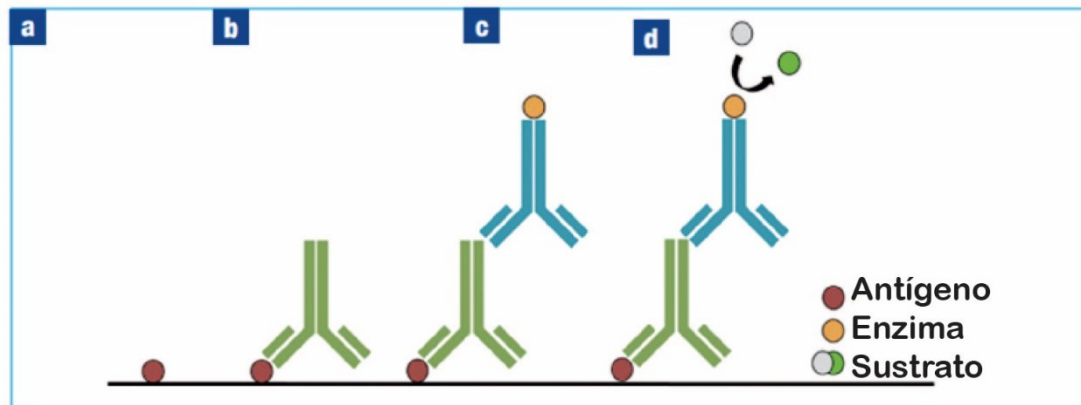


Figura 9. Pasos de un ELISA indirecto. Tomado y traducido de La Rica *et al.*, 2012.

ELISA tipo sándwich

El nombre se debe a la configuración que adopta el ensayo al intercalar un antígeno entre dos anticuerpos. El primer anticuerpo en ser inmovilizado sobre la superficie de los pocillos de la microplaca es denominado anticuerpo de captura, el cual permite la unión del antígeno de interés presente en la muestra a analizar. Los pasos de incubación, lavado y bloqueo se realizan de la misma manera que en los demás formatos de ELISA. Una vez incubada la muestra, cada pocillo es lavado nuevamente e incubado ahora con un anticuerpo de detección que bien puede ir marcado directamente o ser reconocido por un anticuerpo adicional marcado, como en los casos anteriormente descritos^{43,44} (**Fig. 10**).

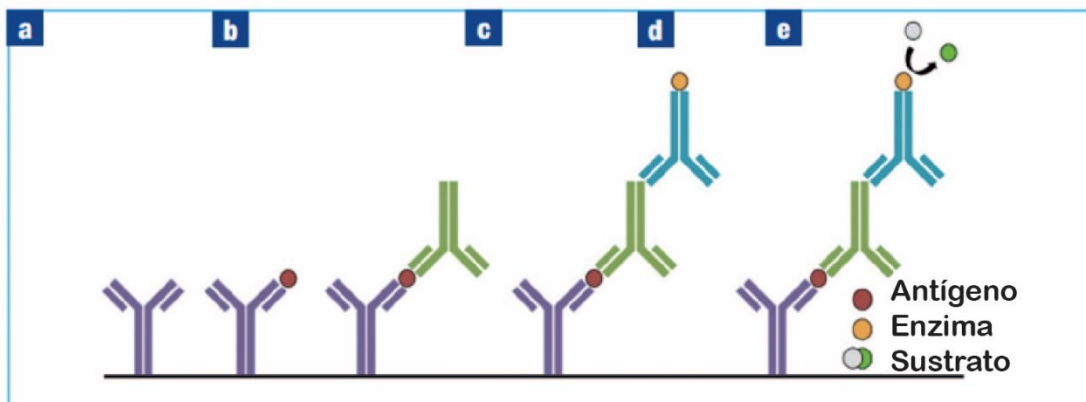


Figura 10. Pasos de un ELISA tipo sándwich. Tomado y traducido de La Rica *et al.*, 2012.

ELISA competitivo

Este tipo de ELISA se basa en un proceso de unión competitiva. Este formato de ELISA se utiliza generalmente para detectar moléculas pequeñas que no tienen múltiples epítopos e implica la competencia entre un analito específico y una forma marcada (etiquetada) del mismo analito por un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo. De manera similar, se recubre un pocillo de una microplaca con el antígeno o molécula de interés. Posteriormente, se añade una muestra que contiene el analito de interés y un marcador etiquetado con una enzima. Ambos competirán por unirse a los sitios de unión disponibles en el anticuerpo. Después de un paso de lavado, común a todos los tipos de ELISA previamente descritos, se añade un sustrato para la enzima marcada (**Fig. 11**). La cantidad de señal detectada está inversamente relacionada con la cantidad de analito presente en la muestra; es decir, a menor concentración de analito en la muestra, mayor será la señal detectada^{43,44}.

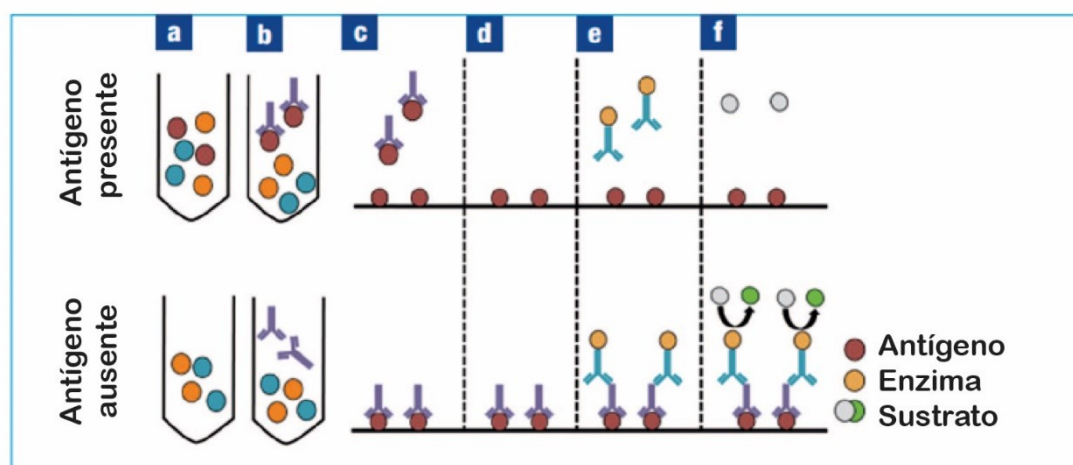


Figura 11. Pasos de un ELISA competitivo. Tomado y traducido de La Rica *et al.*, 2012.

En la **Tabla 3** se enlistan las ventajas y desventajas de los distintos tipos de ELISA.

ELISA	Ventajas	Desventajas
Directo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El protocolo es simple y rápido. ▪ No hay posibilidad de reactividad cruzada con un Ab2. ▪ Menor probabilidad de error debido al uso de un menor número de reactivos y pasos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Puede dar mayor ruido de fondo ya que otras proteínas presentes en la muestra pueden adherirse a la placa. ▪ No hay amplificación de la señal, lo que reduce la sensibilidad del ensayo. ▪ El Ab1 debe ir marcado, lo que resta flexibilidad ya que debe utilizarse un anticuerpo específico para cada ensayo. ▪ El Ab1 marcado puede alterar la reactividad con el Ag.
Indirecto	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta sensibilidad, ya que la utilización de Ab2 posibilita la amplificación de la señal. ▪ Alta flexibilidad por el hecho de que un mismo Ab2 puede emplearse con diferentes Ab1, lo que también se traduce en un beneficio económico. ▪ El Ab1 mantiene su intacta inmunoreactividad al no ir conjugado. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protocolo más complejo que incluye pasos de incubación adicionales con el Ab2. ▪ El uso de Ab2 puede dar lugar a reactividad cruzada.
Tipo sándwich	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta flexibilidad, ya que la detección puede ser de manera directa o indirecta. ▪ Alta sensibilidad y especificidad, debido al uso de dos anticuerpos frente al mismo antígeno. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El antígeno debe tener un tamaño suficientemente grande para permitir la unión de dos anticuerpos de manera simultánea. ▪ No siempre es posible contar con pares de anticuerpos que funcionen bien para este tipo de ensayo. ▪ Conlleva más tiempo y es más caro debido al empleo de más anticuerpos.
Competitivo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta flexibilidad, puede basarse en el método directo, indirecto o sándwich. ▪ Permite la detección de antígenos de tamaño pequeño y baja concentración. ▪ No requiere el procesamiento previo de las muestras a analizar. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El protocolo es relativamente complejo. ▪ Requiere el uso de antígeno de inhibición. ▪ Baja especificidad. ▪ Uso limitado para muestras muy diluidas.

Tabla 3. Características de los diferentes tipos de ELISA. Tomado y traducido de La Rica et al., 2012.

Ventajas y desventajas del ELISA

El método de ELISA es una técnica altamente específica, sensible y versátil para la detección cualitativa de antígenos o anticuerpos en una solución, mientras que permite alcanzar límites de detección (LOD) que van desde 100 ng mL^{-1} a 0.01 pg mL^{-1} para enfoques cuantitativos⁵⁰; permite alcanzar un rango dinámico de 3 logs y coeficientes de variación entre mediciones repetidas del 5-20%³⁹. No obstante, el ELISA tradicional, en sus múltiples formatos, fue diseñado para su implementación en grandes laboratorios centralizados^{51,52}. La técnica implica un protocolo laborioso que requiere de mucha manipulación y recambio de soluciones, un gran volumen de muestras y reactivos y un largo tiempo de ensayo que puede extenderse desde varias horas hasta por dos días, debido entre otras cosas a las limitaciones de transferencia de masa mediada por difusión durante cada paso de incubación^{23,41,53}. Además, el método de ELISA solo permite analizar pocas muestras a la vez, lo cual hace difícil adaptar la automatización y el alto rendimiento con volúmenes de ensayo reducidos⁴⁹. A su vez, presenta un rango dinámico relativamente estrecho que a menudo requiere probar más de una dilución de la muestra⁵⁴.

En las últimas dos décadas, ha habido una notable innovación en la tecnología de ELISA⁴⁶. Los ensayos han incorporado estaciones de trabajo automatizadas, y los lectores de placas de microtitulación (MTP) también han experimentado mejoras significativas. Por ejemplo, los formatos convencionales de 96 micropocillos han evolucionado en formatos de mayor rendimiento, con capacidades de 384 y 1,536 pocillos^{39,46}. La capacidad bioanalítica de la técnica de ELISA también ha mejorado significativamente mediante estrategias de inmovilización de anticuerpos más eficiente, el desarrollo de sustratos enzimáticos ultrasensibles, el uso de micro- y nanomateriales, entre otras⁴⁶.

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de métodos alternativos sencillos y robustos para la cuantificación de analitos en un formato de alto rendimiento. Las tecnologías avanzadas de bioingeniería han llevado al desarrollo de avanzados sistemas inmunoanalíticos, como los instrumentos BiaCore basados en resonancia de plasmón superficial (SPR) para inmunoensayos sin necesidad de etiquetas, basados en la determinación de interacciones biomoleculares⁴⁶. Asimismo, el desarrollo de formatos de ELISA homogéneos, sin necesidad de lavado como AlphaLISA de Perkin Elmer, ha reducido considerablemente la complejidad y los tiempos del ensayo⁵⁴.

Capítulo III. ELISA en microfluídica

Las tecnologías microfluídicas han generado gran interés desde su introducción en la década de 1990⁵⁵. La microfluídica es una técnica que permite la manipulación de pequeños volúmenes de fluidos, desde 1 nanolitro hasta 1 atolitro (10^{-9} – 10^{-18} L), mediante el diseño de dispositivos o chips microfluídicos, también conocidos como sistemas de análisis total miniaturizados (μ TAS) o tecnologías lab on-a-chip^{41,56}. Estos sistemas integran microcanales con dimensiones de tan solo unas decenas a cientos de micrómetros⁵². Los dispositivos microfluídicos pueden incluir sistemas como microbombas, microválvulas, microfiltros, microreactores, microseparadores, etc. A su vez, dichos dispositivos son capaces de llevar a cabo protocolos completos que tradicionalmente se realizan en un laboratorio como el pretratamiento de muestras, el transporte de reactivos, el mezclado, la reacción, la separación y la detección^{41,52}.

La miniaturización de los procesos en dispositivos microfluídicos ofrece significativos ahorros en el uso de reactivos y muestras. Debido a los pequeños volúmenes de fluido manejados, se requiere una cantidad mucho menor de reactivos en comparación con los métodos convencionales de laboratorio. Esto no solo reduce los costos asociados con los reactivos, sino que también minimiza el desperdicio y la necesidad de grandes volúmenes de muestras, lo cual es especialmente beneficioso cuando se trabaja con muestras escasas o costosas^{41,46,54}.

Sustratos para microfabricación

Los dispositivos microfluídicos pueden ser fabricados de diversos materiales. La elección viene determinada por los requisitos específicos y la aplicación prevista, ya que cada material tiene sus propias ventajas e inconvenientes. El desarrollo de técnicas de bajo coste aumentará su disponibilidad y acelerará su incorporación a diversas aplicaciones. Los materiales más utilizados son el silicio, el vidrio y los polímeros^{20,41,57}.

Silicio y vidrio

El silicio es un material resistente y resulta adecuado para aplicaciones que requieren altas temperaturas, como la PCR^{20,41}. El método de fabricación más popular para estructuras microfluídicas de silicio es el denominado “wet etching” (grabado húmedo); sin embargo, suele generar microestructuras con características de baja relación de aspecto. Además, el silicio resulta un sustrato costoso y al no ser transparente ópticamente y ser conductor de la electricidad, impide que sea un sustrato compatible con la detección óptica y electroquímica, respectivamente⁴¹.

El vidrio por su parte es un sustrato relativamente económico, es transparente y no es conductor de la electricidad, proporcionando ventajas sobre el empleo del silicio^{20,41}; sin embargo, comparte el mismo método de fabricación que resulta en estructuras de baja resolución⁴¹. Además, los chips

de vidrio o silicio requieren de un proceso químico de superficie para la fijación de las proteínas³⁹. Una de las desventajas principales de los chips de vidrio o silicio es la variabilidad de lote a lote asociada con la química de fijación y la desnaturalización de la mayor parte del agente de captura adherido^{39,58}.

Polímeros

Los polímeros han surgido como una alternativa viable para la fabricación de dispositivos microfluídicos debido a su bajo costo y métodos de fabricación sencillos. Los polímeros son clasificados en dos grandes grupos que son los termoestables y termoplásticos. Dentro del primer grupo destaca el PDMS (polidimetilsiloxano), mientras que algunos de los polímeros termoplásticos que se han empleado en sistemas microfluídicos incluyen el polimetacrilato de metilo (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PS), Tereftalato de polietileno (PET), Copolímero de olefina cíclica (COC), entre otros⁴¹.

PDMS

El PDMS es un polímero elastomérico termoestable, transparente, y es uno de los materiales más utilizados para ELISAs microfluídicos por su compatibilidad con muestras biológicas^{20,41,57}. Permite la fabricación de estructuras complejas con una alta resolución, como módulos de control de flujo (como válvulas y bombas), micropozos, etc., y la integración de estas en un único dispositivo mediante la técnica de litografía suave multicapa^{20,22}. Sin embargo, la principal limitación cuando se utiliza PDMS en ELISAs es la adsorción inespecífica de proteínas y otras moléculas así como la escasa humectabilidad con soluciones acuosas debido a su alta hidrofobicidad, por lo que también suele requerir de técnicas de funcionalización de superficie adicionales, como el uso de APTES para enriquecer la superficie con grupos amino y favorecer la inmovilización de biomoléculas^{20,41,53,57}.

Sin embargo, la mayoría de los dispositivos basados en PDMS requieren equipos especializados, caros o complicados para su fabricación. Una de las principales dificultades es el requisito de instalaciones de cuarto limpio para la fabricación de moldes y las réplicas de PDMS para evitar la contaminación con partículas. Además, un cuarto limpio permite controlar la temperatura y la humedad, lo cual es crucial para la estabilidad y reproducibilidad de los procesos de microfabricación con PDMS y asegurar la precisión y calidad de los dispositivos fabricados. Por tanto, este tipo de instalaciones requeridas vuelve a esta técnica de microfabricación costosa e inaccesible para muchos laboratorios²⁰. Además, otra desventaja importante es que, por lo general, los dispositivos microfluídicos implican una manipulación compleja y tardada que requieren de conocimientos sólidos.

Termoplásticos

Por su parte, los materiales termoplásticos ofrecen algunas ventajas destacables como lo son costos más bajos y métodos de fabricación más rápidos y sencillos que el PDMS, además de poseer propiedades de biocompatibilidad y transparencia óptica similares, lo que los convierte en una opción viable para la producción en masa^{20,57}. El poliestireno por ejemplo, por

sus excepcionales propiedades, como su elevada estabilidad mecánica y térmica, resistencia química, biocompatibilidad y transparencia óptica, es considerado un material atractivo para la fabricación de dispositivos microfluídicos. Sin embargo, puede sufrir degradación o cambios físicos y químicos importantes tras la exposición a la luz de longitudes de onda inferiores a 380 nm²⁰. El PMMA, es otro polímero termoplástico que destaca por su costo accesible, con excelentes propiedades ópticas. El PMMA también es biocompatible y puede esterilizarse fácilmente mediante inmersión en soluciones desinfectantes comunes como hipoclorito de sodio diluido al 10%, peróxido de hidrógeno (3-6%) o glutaraldehído al 2%²⁰.

Existen varias técnicas para la fabricación de dispositivos termoplásticos, como el micromaquinado, hot embossing, la impresión con disolvente, el moldeo por inyección y la ablación por láser, entre otros⁵⁷. El hot embossing y la microinyección son las técnicas más utilizadas para la producción en masa de dispositivos termoplásticos debido a su bajo costo y a su alta tasa de producción⁵⁹. El microfresado ofrece una excelente versatilidad para muchos materiales, ya sea para la fabricación de moldes o el maquinado directo de dispositivos. Este método ofrece tiempos de creación de prototipos del orden de minutos⁵⁹.

Asimismo, los métodos de unión son de igual importancia en la fabricación de microdispositivos termoplásticos. El método más utilizado es el térmico, para materiales con temperaturas de transición vítrea (T_g) que oscila entre 105-190 °C; sin embargo, en ocasiones las altas temperaturas y presiones puede provocar la deformación de los canales. Otros métodos incluyen el uso de adhesivos, solventes, microondas, modificación de la superficie, entre otros⁵⁷.

Formatos de ELISA en dispositivos microfluídicos

Se ha reportado un gran número de formatos lab-on-a-chip para el desarrollo de diversas plataformas microfluídicas de ELISA⁴⁶. La integración de la microfluídica en los inmunoensayos ha contribuido a superar las restricciones del ELISA convencional. La miniaturización es un factor clave, pues permite la reducción en el consumo de muestras y reactivos a unos cuantos microlitros, un menor consumo de energía y por ende un menor costo. La disminución de las distancias de difusión, reduce también los tiempos de incubación y la duración total del ensayo. Asimismo, la implementación de la microfluídica en el ELISA conlleva un menor riesgo de contaminación, una mayor sensibilidad, y un mejor rendimiento de ensayo, siendo posible la integración de todo el proceso de laboratorio en un chip, la multiplexación y la automatización de pasos sencillos^{23,41,49,54}. Igualmente, la portabilidad derivada de su forma compacta es un factor clave que ha convertido a los dispositivos microfluídicos en una gran promesa por sus potenciales aplicaciones como plataforma de diagnóstico biomédico POCT⁴¹, al tiempo que permiten una gran escalabilidad^{52,56}.

Sin embargo, la diversidad de las concentraciones de ciertas proteínas de interés en el organismo también supone un reto importante. Algunas proteínas séricas pueden tener una expresión en una amplia gama de concentraciones, hasta aproximadamente 10^6 veces, oscilando desde unos cuantos miligramos hasta décimas de picogramos por mL. Además, la concentración de una sola proteína en el suero puede cambiar hasta 10,000 veces bajo ciertos estímulos. Por lo tanto, es importante destacar la importancia de contar con sistemas que posean un rango dinámico amplio para la detección de proteínas. En algunos casos el pequeño volumen de muestra utilizado en los sistemas microfluídicos puede limitar el rango dinámico de detección^{39,49}.

Como ya se mencionó anteriormente, en los inmunoensayos heterogéneos la inmovilización es un paso clave, ya que tiene un gran impacto en la especificidad y la sensibilidad del ensayo⁴¹. En general, los inmunoensayos microfluídicos heterogéneos pueden clasificarse como: (1) en superficie (también denominados planares) y (2) en suspensión, basados en micro- o nanopartículas (también conocidas como perlas, debido a su forma esférica)^{41,49,60}.

ELISA microfluídico en superficie

Uno de los enfoques más comunes y sencillos para los ELISAs microfluídicos es realizar el inmunoensayo en la superficie del microcanal^{23,49}. Generalmente el formato se basa en un ELISA tipo sándwich donde primero se inmovilizan anticuerpos sobre la matriz en la que se realizará el ensayo. Estos anticuerpos, denominados anticuerpos de captura, permiten la detección del antígeno correspondiente. En el caso contrario, para la detección de anticuerpos específicos se inmovilizará el antígeno, siguiendo los pasos de una ELISA indirecta.

Algunos enfoques hacen uso de los botones MITOMI (del inglés Mechanically Induced Trapping of Molecular Interactions), los cuales permiten la inmovilización de diferentes antígenos o anticuerpos diana en sitios específicos de la matriz para un análisis multiplexado. Esto significa que se pueden detectar múltiples antígenos o anticuerpos en una sola muestra simultáneamente⁶¹. La sensibilidad en este tipo de inmunoensayos depende de varios factores, incluyendo la inmovilización óptima de los anticuerpos de captura o antígenos en la matriz sólida. Es crucial lograr una correcta orientación y una densidad suficiente de sitios de unión para mejorar la eficiencia del ensayo. Además, es importante mantener la actividad biológica de estos anticuerpos o antígenos para garantizar resultados precisos y confiables^{58,62}.

Una ventaja que presentan los sistemas de ELISA en superficie es que al fijar los Abs o Ags sobre un mismo plano focal, permite un escaneo preciso de la matriz durante la detección y un bajo nivel de ruido de fondo³⁹. Recientemente, se ha informado de análisis multiplexados y de alto rendimiento para la detección de anticuerpos IgG contra las proteínas

estructurales del SARS-CoV-2, principalmente S y/o N mediante el uso de volúmenes ultrabajos (nL) de sangre total³⁶ o de muestras de suero⁶³ con una capacidad de procesamiento de hasta 1,024 muestras en paralelo³⁶ y con valores de especificidad y sensibilidad que alcanzan el 100% cuando se evalúan las muestras de suero en la tercera semana tras la aparición de los síntomas⁶³. Sin embargo, en esta configuración la superficie de cada uno de los chips microfluídicos debe ser tratada químicamente de manera previa para que Ags o Abs puedan ser inmovilizados^{39,41,53}, lo cual conlleva pasos adicionales durante el proceso de fabricación, aumentando así el tiempo y la complejidad, además de que en algunos casos este proceso tiene una baja reproducibilidad⁴¹. Por otro lado, a pesar de la reducción a escala micrométrica con los sistemas microfluídicos, cuando el ELISA se realiza en la superficie del canal, la cinética de reacción sigue estando limitada por la difusión²³.

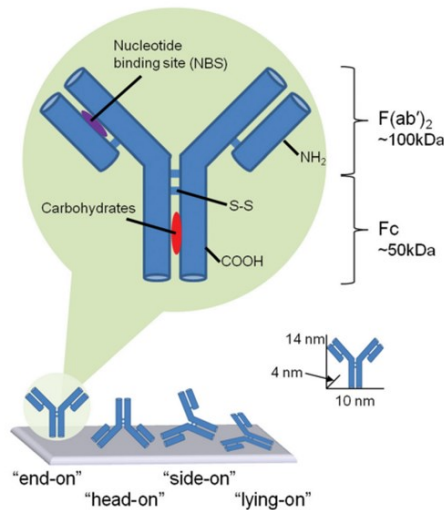


Figura 12. Orientación de los anticuerpos, dimensiones y especies químicas importantes para la orientación. Tomado de Welch *et al.*, 2017.

Inmunoensayos microfluídicos basados en papel

En los últimos años, ha aumentado considerablemente la demanda de dispositivos portátiles y sencillos para la detección de Ags y Abs de interés clínico, lo que ha llevado al desarrollo de dispositivos analíticos basados en papel (μ PADs). Sus ventajas inherentes, como el bajo costo, la facilidad de uso, la portabilidad, no requerir equipo de laboratorio adicional ni de personal capacitado, entre otras, han atraído la atención dentro de la investigación diagnóstica como una alternativa a las herramientas de diagnóstico POCT convencionales²⁸.

Los dispositivos de flujo lateral (LFD), también conocidos como RDTs (rapid diagnostic tests), son uno de los formatos más sencillos y consolidados de dispositivos basados en papel que permiten la detección de proteínas. El principio del ensayo se basa en la interacción antígeno-anticuerpo en una membrana, generalmente a base de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de

polivinilideno). El empleo de membranas combina las ventajas de los inmunoensayos sobre superficie con una mejor capacidad de unión y la estabilidad a largo plazo de las proteínas inmovilizadas. No obstante, aunque es sabido que las proteínas se unen más fuertemente a la membrana de PVDF⁶⁵, la nitrocelulosa es el material más utilizado.

En estos dispositivos, una muestra líquida se introduce en una almohadilla de muestra y se desplaza hacia una almohadilla de conjugación que contiene reactivos liofilizados, incluyendo anticuerpos marcados que se unen a los antígenos presentes. Posteriormente, los complejos antígeno-anticuerpo se desplazan a través de una membrana de nitrocelulosa hacia la línea de prueba, donde son capturados por anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Además, se incluye una línea de control en la prueba para capturar los anticuerpos marcados no específicos y confirmar que la muestra haya transitado correctamente por las almohadillas de prueba (**Fig. 13**)^{6,28,35}. La lectura se muestra normalmente en un período de 15 a 30 min mediante colorimetría o electroquimioluminiscencia, considerada una técnica muy sensible con LOD incluso más bajos que el método de detección por fluorescencia²⁸.

Las membranas de nitrocelulosa modificadas se han utilizado durante muchos años para la detección de proteínas específicas³⁹. Dichas proteínas (Ags o Abs) pueden ser inmovilizadas sobre la membrana de nitrocelulosa mediante tres métodos principalmente: (1) adsorción del reactivo, el cual es el método más empleado, a través de interacciones electrostáticas; sin embargo, la orientación aleatoria es una limitante de este método. (2) Unión covalente, mediante un paso previo de funcionalización de la membrana; sin embargo, este tipo de enlace puede inducir desnaturalización parcial o cambios conformacionales que afecten la actividad enzimática, la capacidad de unión a ligandos o la interacción con otras proteínas. (3) La inmovilización mediada por biotina-estreptavidina, es muy eficaz para orientar las proteínas inmovilizadas en la superficie de la membrana; sin embargo, el método es complejo y poco viable para la producción en masa⁶⁴.

Algunos autores no aprueban del todo el uso de esta tecnología en la detección de proteínas en suero, señalando que estos dispositivos tienen generalmente una baja sensibilidad (μM - mM), son solo cualitativos, dependen de la interpretación del usuario y no son compatibles para la detección multiplexada. Sin embargo, se han desarrollado este tipo de dispositivos con resultados muy prometedores. Se han empleado dispositivos LFA basados en papel para detectar el antígeno N del SARS-CoV-2 en muestras de pacientes, utilizando anticuerpos específicos inmovilizados en la superficie de la tira; esta prueba mostró un LOD de 0.65 ng mL^{-1} ⁶⁵. Además, las pruebas de flujo lateral se han empleado también para detectar anticuerpos en muestras clínicas, y han sido desarrolladas para detectar tanto IgG anti-SARS-CoV-2 como IgM anti-SARS-CoV-2 en un único dispositivo mediante dos líneas de prueba separadas que se unen a un antígeno de superficie del SARS-CoV-2, además de una línea de control. Mediante este enfoque se utilizó sangre total y se obtuvo una sensibilidad del 88,66 % y una especificidad del 90,63 %⁶⁶.

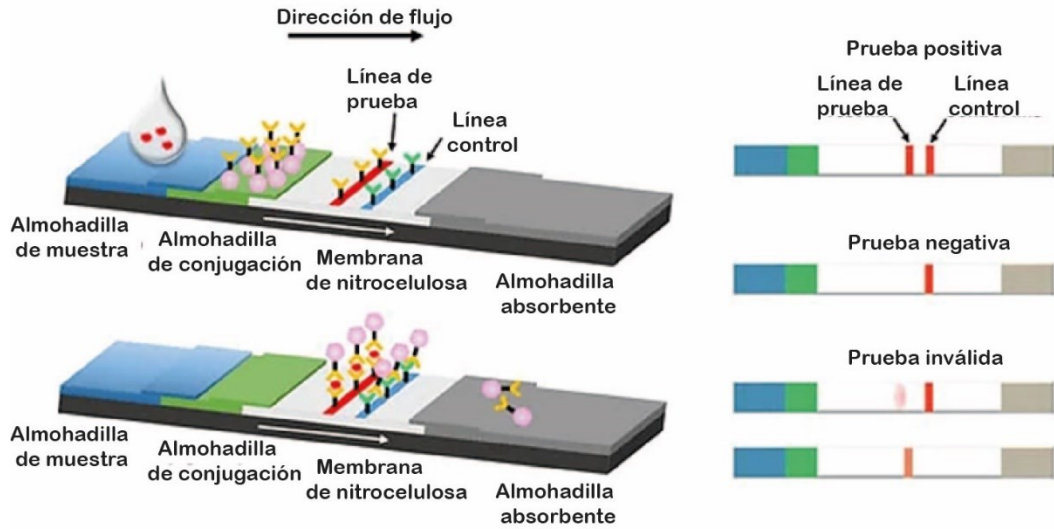


Figura 13. Ilustración esquemática de una prueba LFIA basada en la detección de antígenos. Tomado y traducido de Hsiao *et al.*, 2021.

ELISAs microfluídicos en suspensión

Algunos grupos de investigación se han enfocado en el desarrollo de mejores estrategias para aumentar la eficiencia de captura de los anticuerpos diana²³. Los ELISAs basados en suspensión de micropartículas aparecieron como una excelente opción como soporte y se han utilizado en citometría de flujo desde la década de 1980, con una sensibilidad, especificidad y un rango dinámico mejorados⁴¹. Estos sistemas implican la fijación del agente de captura de Ags a micropartículas (**Fig. 14**)³⁹. Se ha reportado ampliamente que el uso de micropartículas como soporte proporciona ventajas tales como menores tiempos de incubación en comparación con los ELISAs microfluídicos en superficie, así como una mayor sensibilidad debido a una mayor relación superficie-volumen (S/V) y a la medición de cientos de micropartículas de manera simultánea para cada analito^{23,39,49,67}.

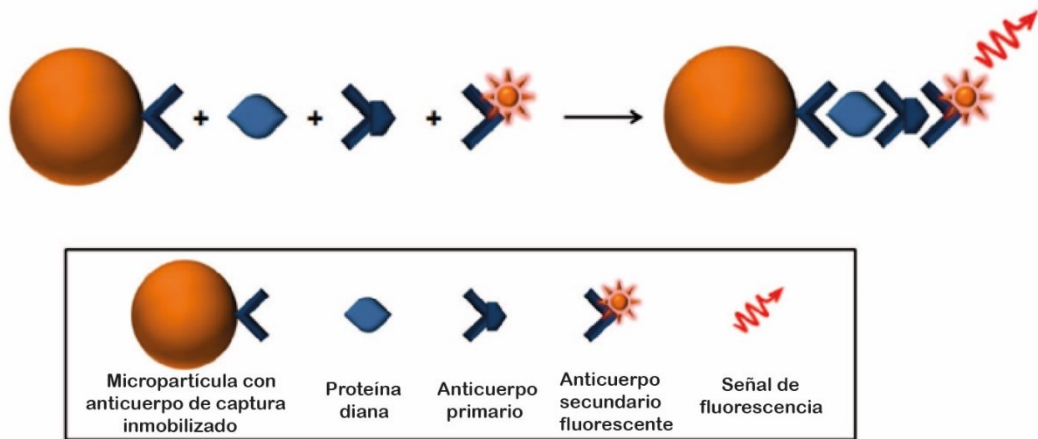


Figura 14. ELISA basado en micropartículas. Se muestra el esquema de un ELISA sobre la superficie de micropartículas para la detección de una proteína diana mediante un ELISA tipo sándwich. Tomado y traducido de Jun *et al.*, 2012.

Se han realizado ensayos ELISA sobre la superficie de micropartículas de poliestireno empaquetadas sobre una restricción, reduciendo los tiempos de ensayo a tan solo 40 min⁶⁸. Además, cuando las micropartículas incorporan propiedades magnéticas, pueden manipularse fácilmente mediante la aplicación un campo magnético externo y permiten separar fácilmente los analitos diana de la mezcla de reacción, teniendo pasos de lavado más eficientes y una mayor relación señal-ruido que en sistemas de ELISAs microfluídicos en superficie (**Fig. 15**)^{23,53,69}. A diferencia de las micropartículas no magnéticas, que suelen requerir microestructuras para retenerlas, las micropartículas magnéticas pueden ser dirigidas, orientadas y retenidas fácilmente en las zonas deseadas, lo cual es compatible para sistemas de detección totalmente automatizados^{23,41}.

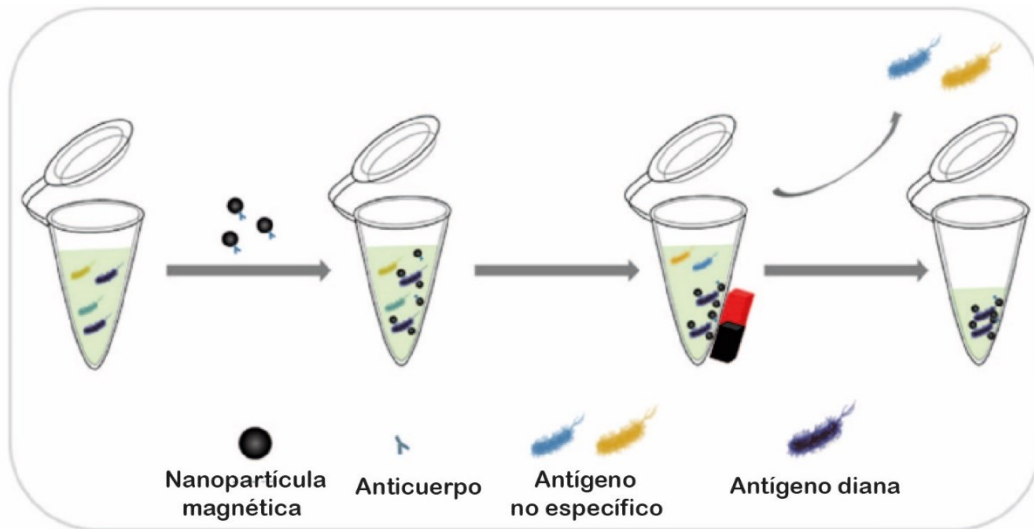


Figura 15. Separación magnética convencional de micropartículas magnéticas. Tomado y traducido de Wang *et al.*, 2020.

Actualmente existen numerosos estudios sobre ELISAs microfluídicos basados en micropartículas magnéticas⁴¹. Algunos de estos enfoques reportan el uso de micropartículas para inmunoensayos multiplexados, utilizando micropartículas que difieren en tamaño o intensidad de fluorescencia, empleando marcadores fluorescentes cuyo espectro de emisión sea diferente para cada Ag específico³⁹. Sin embargo, algunos autores reportan problemas relacionados con la sedimentación²³.

Nanopartículas magnéticas

La introducción de nanopartículas magnéticas (NPMs) ha permitido ampliar el alcance de aplicación de la microfluídica⁶⁰. Las MNPs ofrecen una gran superficie específica y propiedades magnéticas controlables, lo que permite su utilización en una variedad de aplicaciones bioanalíticas dentro de sistemas microfluídicos. Estas nanopartículas pueden ser funcionalizadas y utilizadas para la separación magnética, preconcentración y transporte de masa, así como para actuar como etiquetas de detección magnética y soportes para

sensores ópticos^{70,71}. En los últimos años, las nanopartículas magnéticas (NPMs) con diámetros de 20 a 200 nm han recibido especial atención siendo más atractivas como soporte para inmunoensayos, debido a sus propiedades únicas que les confieren ventajas sobre las micropartículas de mayor tamaño (>1 μm). La implementación de NPMs en enfoques microfluídicos ofrecen una importante reducción en los tiempos de ensayo. Esto es debido a su comportamiento Browniano, mejorando así la cinética de reacción, una relación superficie-volumen aun mayor y una distribución más homogénea^{6,23,72}.

En enfoques recientes, Ags específicos o Abs diseñados por ingeniería han sido inmovilizados primero en la superficie de las NPMs, creando un complejo capaz de interactuar con las especies diana, aprovechando sus propiedades magnéticas y coloidales⁶. La efectividad del acoplamiento de las NPMs a los ligandos objetivo aumenta agregando agentes de acoplamiento que activen los grupos carboxilo en la superficie de las NPMs. El clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, en conjunto con N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) son los agentes más utilizados⁶⁰. El acoplamiento de biomoléculas (como anticuerpos, aptámeros de ácidos nucleicos, antígenos, enzimas, etc.) a las NPMs se ha utilizado para lograr una separación simple, rápida, económica y altamente eficiente de biomoléculas específicas bajo el efecto de un campo magnético externo.

La **Fig. 16** muestra el número de publicaciones y citas sobre la aplicación de MNPs en microfluídica, revelando la creciente atención en esta área en la última década⁶⁰.

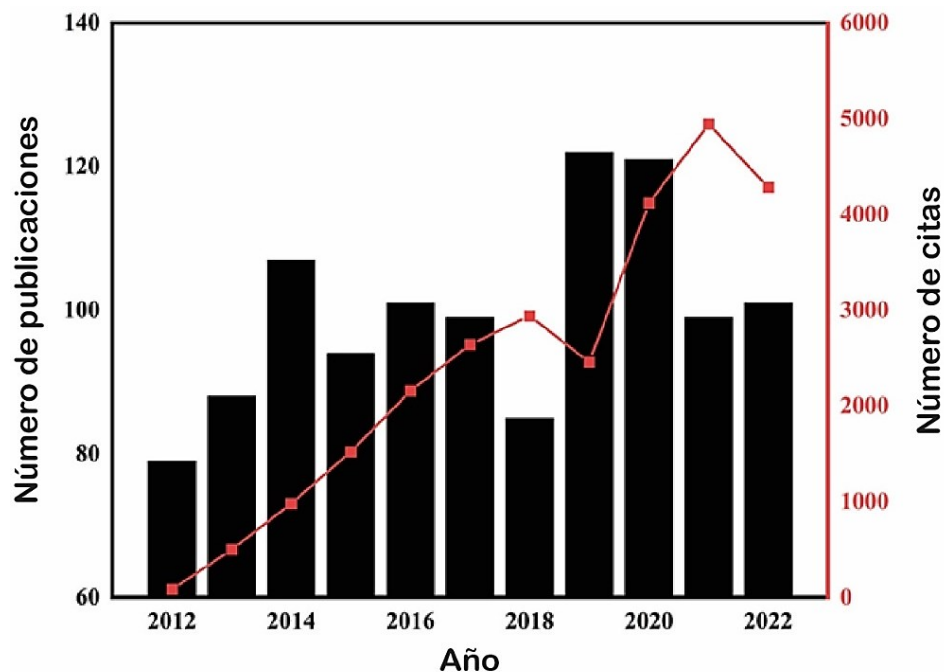


Figura 16. El aumento constante de la investigación sobre MNPs combinados con microfluídica en total desde 2012 hasta diciembre de 2022. Tomado y traducido de Wang *et al.*, 2020.

Las nanopartículas comerciales están hechas de diferentes materiales, siendo las nanopartículas magnéticas (NPMs) con núcleo de óxido de hierro (Fe_3O_4 o Fe_2O_3) las más utilizadas, ya que ofrecen alta magnetización, bajo costo, excelente biocompatibilidad y estabilidad en un amplio rango de temperaturas y pH^{6,69,72,73}. Asimismo, las propiedades magnéticas de las NPMs proporciona una ventaja sobre otras técnicas de separación (como la filtración y la centrifugación) que consumen tiempo y son laboriosas⁶⁰

La superficie de las nanopartículas magnéticas puede recubrirse con materiales inorgánicos para producir nanocomplejos magnéticos más estables y fáciles de modificar⁶⁰. Los nanocomplejos magnéticos más frecuentes son las nanopartículas de óxido férrico recubiertas de dióxido de silicio ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$). También es común el recubrimiento con oro, surfactantes como Tween-20, polímeros como polietilenglicol, ácido poliacrílico carboxilado, poliestireno, streptavidina, entre otros⁶⁰

En la actualidad se dispone de NPMs de distintos tamaños, que van de 10 a 1,000 nm, y se han utilizado en varios enfoques (**Fig. Suplementaria 1**)^{6,72}. No obstante, el tamaño de las NPMs es fundamental, ya que determina no solo su velocidad de sedimentación y movilidad en la solución, sino también la duración y la eficiencia de la separación magnética, ya que las propiedades magnéticas de las PMNPs disminuyen a medida que disminuye también su tamaño^{6,69,72,74}.

Además, las NPMs dentro de sistemas microfluídicos están sometidas a elevadas fuerzas de arrastre hidrodinámico^{21,74-76}. En consecuencia, la manipulación de NPMs con un imán convencional conlleva ciertos retos, ya que se requiere una elevada magnitud de un gradiente de flujo magnético para un atrapamiento efectivo^{21,75,77}. Asimismo, es bien sabido que el valor de la densidad de flujo magnético disminuye con el cuadrado de la distancia a la fuente magnética^{75,77}. Por lo tanto, para atrapar y concentrar de manera más eficiente las nanopartículas magnéticas, se pueden llevar a cabo diversas estrategias. Un enfoque interesante consiste en integrar estructuras magnéticas de hierro o níquel dentro del microdispositivo para aumentar localmente la fuerza magnética. Estos materiales ferromagnéticos generan un campo magnético alto cuando se aplica una excitación magnética externa y lo pierden cuando se retira el imán⁷⁷. Se han utilizado micropartículas ferromagnéticas de hierro (MPFMs) dispuestas como una red porosa que permite aumentar la densidad de flujo magnético local, siendo una estrategia útil para la captura y preconcentración de las NPMs dentro de un espacio confinado^{23,24,76-78}.

Justificación

El grupo de Teste *et al.* fue pionero en el desarrollo de un dispositivo microfluídico de PDMS basado en NPMs de 35 nm como inmunosoporte, que integra una cámara magnética compuesta por micropartículas ferromagnéticas empaquetadas en una constricción física. Dicho dispositivo permite la captura, preconcentración y detección de IgE específicos en muestras de suero de pacientes para el diagnóstico rápido y sencillo de alergias. La detección se basó en la medición de fluorescencia utilizando anti-IgE marcado con FITC, logrando un LOD de 1 ng mL^{-1} ²³.

Basados en este estudio, en nuestro grupo se desarrolló un sistema microfluídico basado en acrílico (PMMA) que logra la captura de NPMs comerciales de 30 nm mediante la integración de una trampa magnética compuesta por una columna de micropartículas ferromagnéticas (MPFMs) de $7.5 \mu\text{m}$ de diámetro y un electroimán. Se realizaron ELISAs modelo sobre la superficie de las NPMs para la detección de Abs dirigidos contra dos proteínas, la estreptavidina y la biotina. En este trabajo se reportó un LOD de 8 pg mL^{-1} para la detección de anticuerpos anti-biotina, empleando un sistema de amplificación de señal a través de un flujo a $20 \mu\text{L h}^{-1}$ de un sustrato fluorogénico (fluorosceína difosfato, FDP) y un tiempo total de ensayo de 40 min²⁴.

De este trabajo destaca la simplificación del dispositivo, empleando acrílico como sustrato mediante la técnica de micromaquinado. Asimismo, resalta el bajo LOD obtenido cuando se emplea un sistema de amplificación mediante un Ab2 ligado a una enzima (Fosfatasa alcalina) y un sustrato fluorogénico en flujo constante. No obstante, al cambiar el sistema de NPMs para la detección de anticuerpos anti-streptavidina, el LOD obtenido fue de 66 ng mL^{-1} . Esta variabilidad observada establece una pauta para profundizar en el estudio de un sistema de esta naturaleza y la optimización de un dispositivo microfluídico sencillo, fácil de usar y robusto para la realización de ELISAs, el cual sea altamente sensible y permita la detección cuantitativa de anticuerpos en muestras biológicas.

Al mismo tiempo, para maximizar la eficacia de nuestro dispositivo microfluídico es crucial desarrollar un método estandarizado para la conjugación eficiente del analito de interés sobre las MNPs. Este analito puede ser un antígeno, como una proteína viral, o un anticuerpo. Un enfoque bien definido garantizará que el dispositivo sea altamente versátil y compatible para la detección y cuantificación de una amplia gama de analitos de interés biológico, permitiendo su uso en diversos contextos diagnósticos y de investigación.

Hipótesis

El desarrollo de un ELISA cuantitativo en un dispositivo microfluídico acrílico, utilizando nanopartículas magnéticas (NPMs) como soporte de inmunocaptura, permite la detección y cuantificación de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2, alcanzando un límite de detección (LOD) comparable al de una prueba ELISA convencional en microplaca.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un ELISA cuantitativo en un dispositivo microfluídico acrílico para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2, usando nanopartículas magnéticas como soporte de inmunocaptura.

Objetivos Específicos

1. Diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico que sea adecuado para llevar a cabo un ELISA sobre la superficie de nanopartículas magnéticas.
2. Implementar un soporte para la captura de anticuerpos IgG específicos contra la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2 mediante la conjugación del antígeno correspondiente sobre la superficie de nanopartículas magnéticas.
3. Desarrollar ELISAs cuantitativos en el dispositivo microfluídico mediante la generación de curvas estándar, utilizando concentraciones conocidas de anticuerpos IgG específicos comerciales dirigidos contra la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2.
4. Calcular la concentración de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2 en muestras serológicas empleando nuestro dispositivo microfluídico para ELISAs.
5. Validar nuestro dispositivo microfluídico de ELISA frente a una prueba de ELISA convencional en placa de micropozos.

Resultados

Capítulo IV. Fabricación de microdispositivos

Materiales y métodos

1. Diseño del dispositivo microfluídico acrílico

El diseño del chip se creó en el software Dr Engrave (Roland) y consta de un canal principal con una sección transversal cuadrada de $200\ \mu\text{m}$ y un canal lateral adicional con las mismas dimensiones, el cual tiene la funcionalidad de purgar el flujo de los reactivos además de ser la entrada de las MPFMs. En la región central, el canal principal está interrumpido por una constricción física de $5\ \mu\text{m}$ de altura y $50\ \mu\text{m}$ de longitud. El extremo de cada canal se comunica hacia el exterior mediante una única entrada y dos salidas circulares de $1.5\ \text{mm}$ de diámetro. La **Figura 17** muestra el diseño del dispositivo así como los parámetros empleados para su fabricación, lo cuales se detallan en los apartados siguientes.

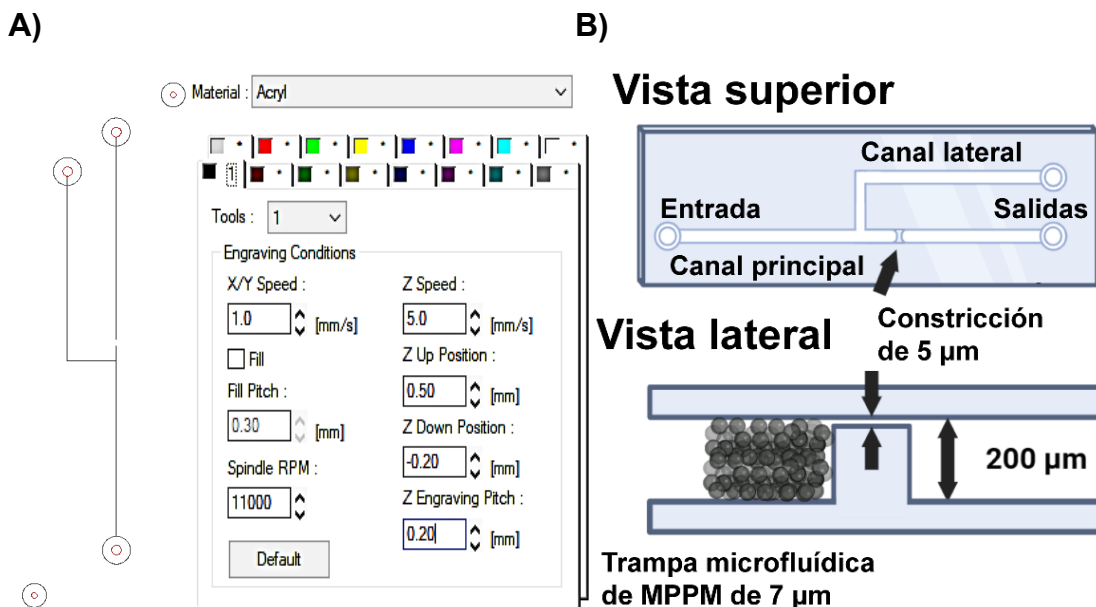


Figura 17. Diseño del dispositivo microfluídico. **A)** el diseño fue creado mediante el software Dr. Engrave. Se observa en negro el canal principal que es interrumpido en la región central y que se conecta a una única entrada (inferior) y la salida (superior) en rojo. El canal lateral con su respectiva salida surge como una ramificación justo antes de la zona de la constricción. La ventana de la derecha muestra los parámetros de fabricación para cada una de las capas del diseño correspondiente a la broca empleada, mostradas en diferentes colores. **B)** Se muestra el esquemático del chip una vez fabricado desde una vista superior con las estructuras ya descritas y en una vista lateral la constricción de $5\ \mu\text{m}$ de altura que permite capturar MPFMs de $7\ \mu\text{m}$ de diámetro para formar una trampa magnética microfluídica.

2. Fabricación del dispositivo microfluídico acrílico

El protocolo de fabricación detallado de nuestro dispositivo microfluídico ya ha sido publicado recientemente⁷⁸. La fabricación del chip consta de dos etapas principales: el micromaquinado y el sellado de los canales. El microdispositivo se fabricó utilizando la técnica de micromaquinado por CNC (Roland MDX-50) empleando únicamente dos brocas con diámetros de 200 μm y 800 μm (**Fig. 18**). Como sustrato se utilizaron rectángulos de acrílico (PMMA, Goodfellow) de 25 mm x 9 mm con un grosor de 1.3 mm.



Figura 18. Brocas empleadas para el micromaquinado del dispositivo microfluídico montadas sobre adaptador para la fresadora. La broca de la izquierda corresponde a la broca de 200 μm , con la cual se realiza el rectificado de la superficie y se maquinan la constricción de 5 μm de altura y los microcanales. La broca de la derecha corresponde a la broca de 800 μm que se emplea para el micromaquinado de la entrada única y las salidas, así como el pocillo alineador.

a. Micromaquinado

El primer paso de la fabricación consiste en un rectificado de toda la superficie del acrílico. Se creó previamente un archivo de código NC con las instrucciones de escaneo de la superficie. Se empleó la broca de 200 μm y se desgastó una profundidad aproximada de 30 μm mediante un solo paso. La velocidad de desplazamiento de la broca en eje X/Y fue constante durante todo el proceso de fabricación, con un valor de 1 mm s⁻¹. La velocidad de giro para el rectificado de la superficie fue de 14,500 rpm.

El siguiente paso consiste en el maquinado de la constricción. Para esto, el código NC de rectificado contenía como instrucción final el posicionamiento de la broca en la coordenada donde dicha constricción es maquinada. Sin embargo, debido a que el mínimo desplazamiento de nuestro equipo de microfresado sobre el eje “z” es de 10 μm , hicimos uso de un accesorio previamente desarrollado y reportado por nuestro equipo de laboratorio para lograr un desplazamiento en “z” de 5 μm ⁵⁹. Dicho accesorio consta de una plataforma de fabricación hecha mediante impresión en 3D y equipada con tres actuadores piezoeléctricos acoplados (**Fig. 19**). Esta plataforma piezoeléctrica permite la regulación fina del microfresado en el eje

“z”, con una resolución de hasta 500 nm y una precisión de $\pm 1.5 \mu\text{m}$. La velocidad de rotación de la broca fue ajustada a 11,000 rpm y, mediante una interfaz que controla esta plataforma piezoeléctrica, se elevó el acrílico 6.5 μm . Enseguida, se desplazó manualmente 500 μm a lo largo del eje “y” para luego regresar la plataforma a su valor inicial en el eje “z” mediante la interfaz controladora de la superficie piezoeléctrica (**Fig. 20**). Cabe aclarar que para obtener los canales de 5 μm es necesario sobredimensionar a 6.5 μm debido a que en el proceso de sellado la superficie del acrílico se disuelve y tiende a perder algunas micras de altura.

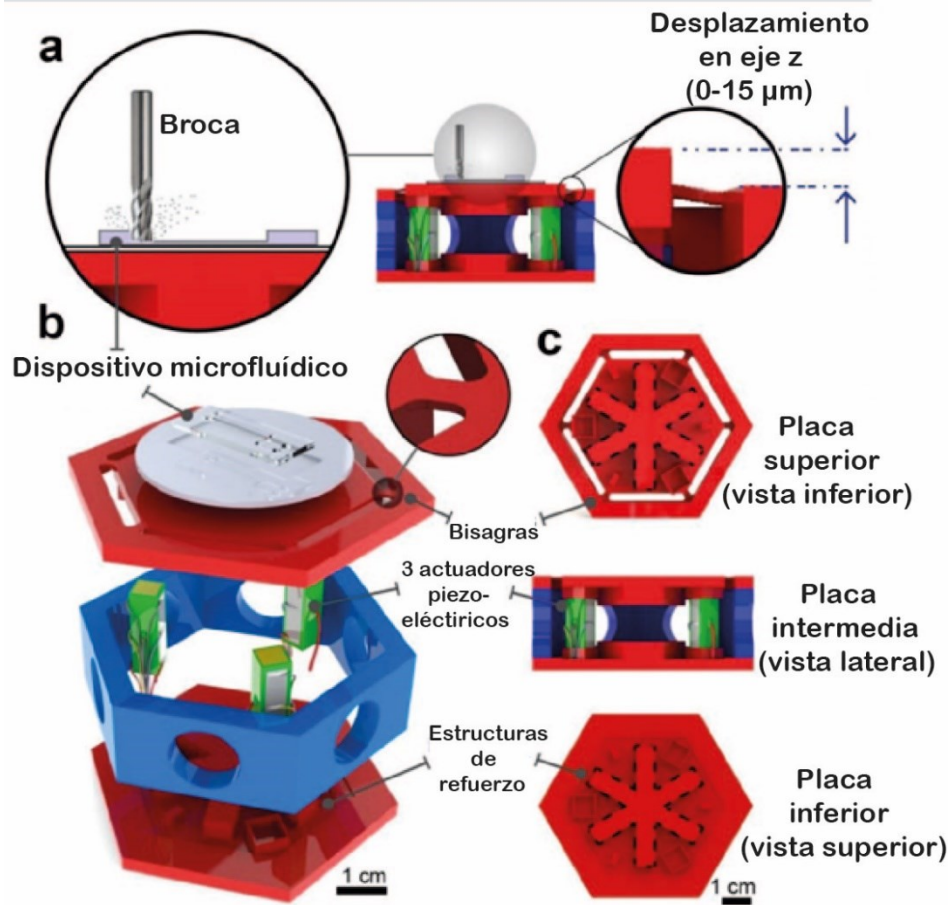


Figura 19. Diseño de la plataforma piezoeléctrica. **a)** Vista transversal de la plataforma. El mecanismo permite la elevación hasta una altura de 15 μm en activando simultáneamente 3 actuadores piezoeléctricos. **b)** Se observan las piezas impresas en 3D que componen el dispositivo. Los actuadores piezoeléctricos se muestran en el interior de color verde/blanco. El primer plano muestra el diseño de una de las bisagras flexibles. **c)** Las bases superior e inferior tienen soportes para cada uno de los tres actuadores. La base superior cuenta con seis bisagras que conectan el núcleo a un anillo exterior. Es el núcleo el que es elevado por los actuadores. Una vista transversal de la plataforma ensamblada se muestra en el centro. Tomado y traducido de Guevara-Pantoja *et al.*, 2020.

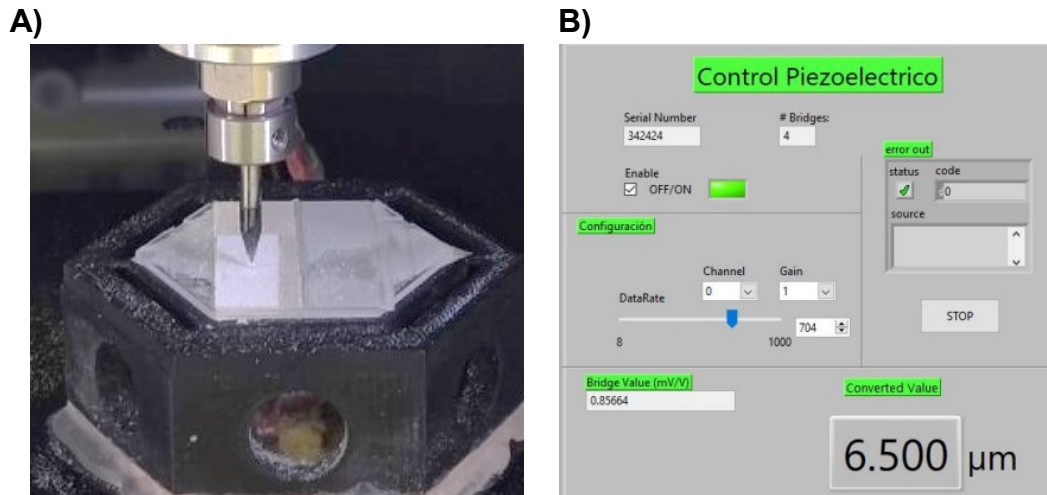


Figura 20. Maquinado de la constricción. **A)** Después del rectificado de toda la superficie, la broca es posicionada automáticamente mediante el código NC en la coordenada donde la constricción será maquinada manualmente. **B)** Interfaz controladora que permite elevar la superficie piezoeléctrica de manera controlada mediante la aplicación de voltaje. La constricción es maquinada elevando esta superficie 6.5 μm y posteriormente desplazando 500 μm la broca sobre el eje “y”. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

Los microcanales fueron maquinados empleando la broca de 200 μm , siendo este el valor de su anchura. Se empleó un valor de profundidad también de 200 μm maquinado en un único paso, con una velocidad de giro de 11,000 rpm. De esta manera, el canal principal queda interrumpido en la región central por la constricción previamente maquinada de 5 μm de altura con una longitud final de 50 μm . Posteriormente, la entrada única y las dos salidas fueron fabricadas empleando la broca de 800 μm . En un primer paso se maquinaron pozos de 1.2 mm de diámetro y 0.65 mm de profundidad (que corresponde a la mitad del grosor del acrílico). A su vez, se maquinaron también dos pequeños pocillos de alineación de 1 mm de diámetro en dos esquinas contralaterales (**Fig. 21**). Los pocillos de alineación sirven como guía para girar la cara del chip y alinearlo sobre una segunda plataforma que contiene pilares en los que embonan estos pocillos (**Fig. 22**). En un segundo paso se maquinó, en la cara opuesta, el diseño que contiene la mitad restante de la entrada y las salidas, pero con un diámetro de 1.5 mm (que corresponde al diámetro externo de la manguera utilizada). Se maquinaron a una profundidad de 0.7 mm para asegurar que el acrílico fuera perforado completamente y se comunicaran ambas caras. De este modo, la entrada y las salidas forman dos cilindros concéntricos donde el más pequeño crea una barrera física que impide que las mangueras que son posteriormente adheridas hagan contacto con el fondo y puedan bloquear el flujo hacia los canales (**Fig. 23**).

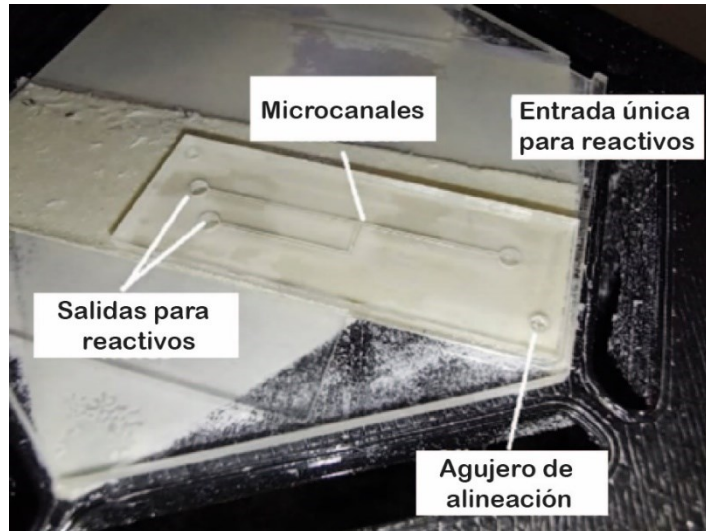


Figura 21. Cara maquinada del chip microfluídico. Se observa el acrílico sobre la plataforma piezoeléctrica previamente rectificada. Se pueden apreciar las estructuras micromaquinadas de los microcanales y la entrada y salidas parcialmente maquinadas como un pozo que alcanza la mitad del grosor del acrílico. Asimismo, se maquinaron dos pocillos de alineación en dos esquinas contralaterales. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

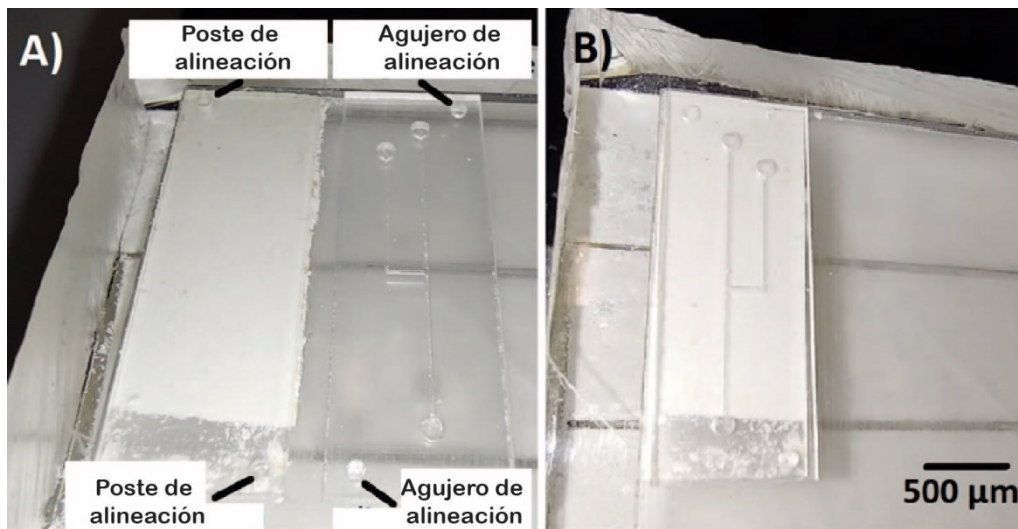


Figura 22. Pocillos y pilares de alineación. Una vez maquinada la cara del acrílico que contiene a los microcanales, el chip se despegó de la plataforma piezoeléctrica y se colocó de manera invertida (con la cara de los canales hacia abajo) sobre una nueva plataforma que contiene pilares que empujan en los pocillos de alineación de las esquinas. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

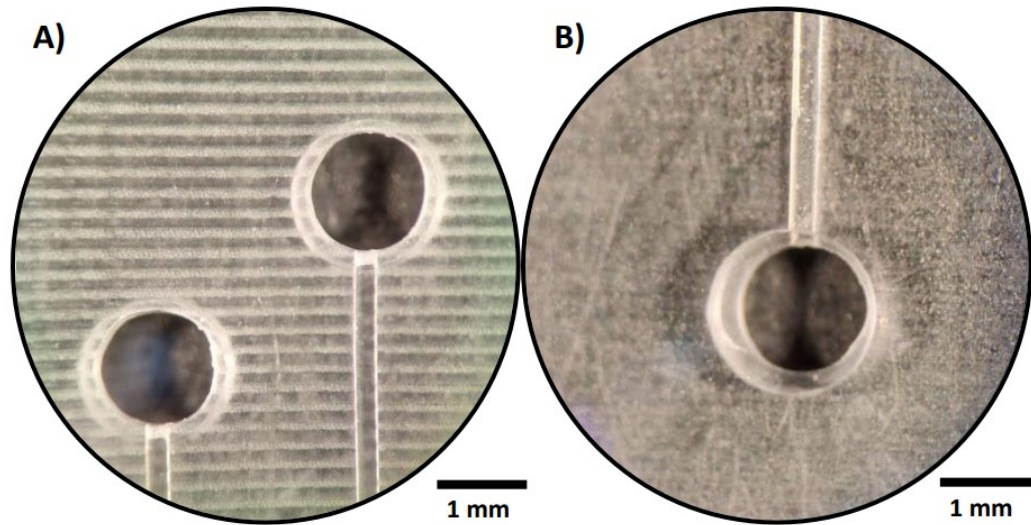


Figura 23. Entrada y salidas del chip. Vista superior de A) las salidas del canal principal (derecha) y del canal accesorio (izquierda) y B) la entrada única del dispositivo, respectivamente. Se puede apreciar que la porción superior tiene un diámetro mayor que corresponde al diámetro de las mangueras que serán empleadas. A su vez, la porción inferior crea una barrera física que impide que dicha manguera selle el flujo a través de los microcanales. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

b. Sellado de microcanales

Para sellar los microcanales se utilizó un rectángulo de acrílico no maquinado con las mismas dimensiones (2.5 mm x 9 mm y 1.3 mm de grosor). Tanto el acrílico maquinado como el no maquinado se enjuagaron con IPA y se sumergieron en baño ultrasónico durante 10 min para eliminar impurezas y restos de acrílico de los microcanales (**Fig. 24**). El procedimiento para la unión con disolvente vaporizado se adaptó de reportes publicados en la literatura^{24,57,79}. Ambas láminas acrílicas se fijaron a la cara interna de la tapa de una caja Petri de vidrio de 10 cm de diámetro con cinta adhesiva de doble cara (Tuk, 404, México) y se expusieron a gas de cloroformo durante 1 min en evaporación bajo una campana de extracción. Es esencial mantener una separación de unos 7.5 mm entre el acrílico adherido y el disolvente para asegurar que el vapor actúe efectivamente sobre la superficie sin dañarla⁵⁷ (**Fig. 25**). Inmediatamente después, ambas piezas se alinearon cara a cara en una prensa mecánica casera durante 2 min a 250 psi y 90°C (**Fig. 26**). Posteriormente, se pegaron 2-3 cm de manguera (Tygon, ND-100-80, DI 0.02", DE 0.06") a cada orificio correspondiente de la entrada y salidas empleando adhesivo líquido de secado instantáneo (Loctite, Henkel, 49503) (**Fig. 27**). Una vez ensamblado, el dispositivo se llenó de agua desionizada con una jeringa y se sometió a baño ultrasónico durante 10 minutos para eliminar los restos de acrílico o pegamento en los microcanales. Finalmente, se vaciaron los canales y el dispositivo se llenó ahora con una solución de bloqueo de BSA al 5% (p/v) durante al menos 1 h a temperatura ambiente (~25 °C) para evitar la unión no específica a las paredes.

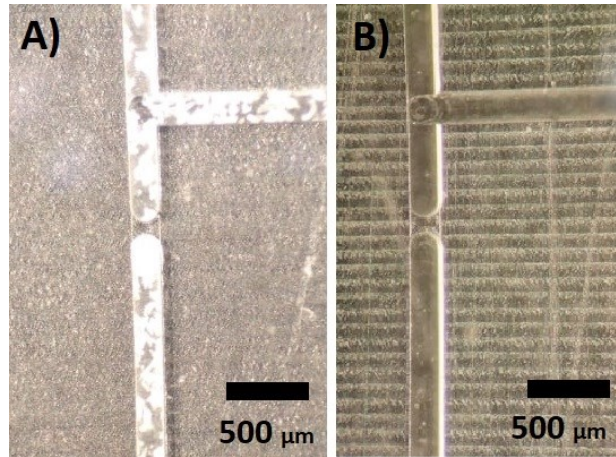


Figura 24. Lavado de microcanales. Los chips se lavaron con IPA, se cepillaron cuidadosamente y se sumergieron en baño ultrasónico por 10 min para eliminar los restos de acrílico de los canales. **A)** Muestra el canal inmediatamente después de la fabricación y en **B)** se observa el canal después del lavado. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

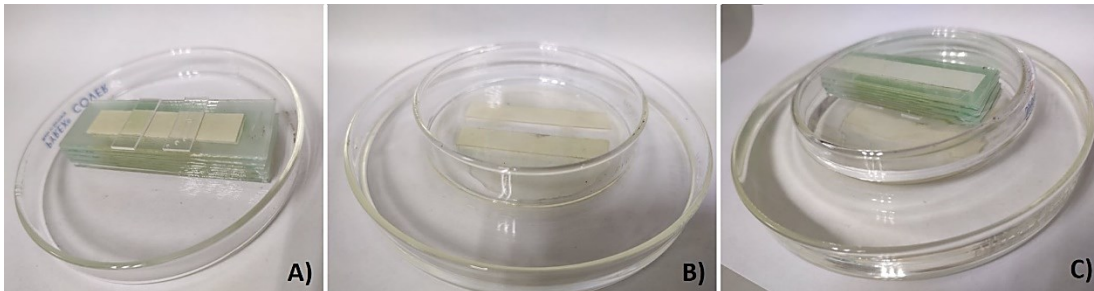


Figura 25. Exposición a vapor de cloroformo. **A)** Ambas placas de acrílico son adheridas a la tapa de una caja Petri de vidrio de 10 cm de diámetro que a su vez contiene portaobjetos adheridos para reducir la distancia con la base **B)** La base de la caja Petri es colocada dentro de una caja Petri de mayor tamaño donde se agrega agua destilada para crear un sello hermético. **C)** 0.5 mL de cloroformo líquido son agregados a la base de la caja Petri y al cerrarla, el acrílico queda expuesto a los vapores. El sello de agua formado con la tapa impide la fuga del cloroformo gaseoso hacia el exterior. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

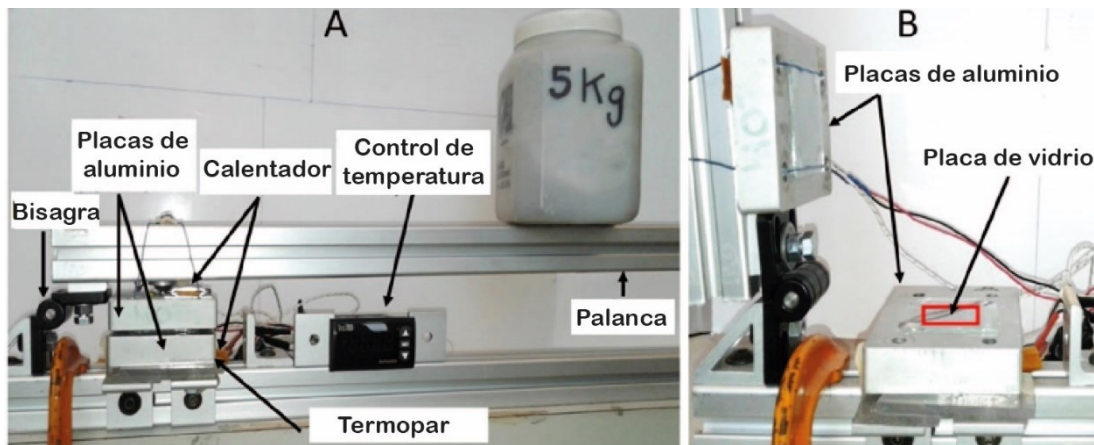


Figura 26. Sellado de canales. Inmediatamente después de la exposición con vapor de cloroformo, ambas placas de acrílico son alineadas cara a cara en una prensa hecha en casa y expuestas a una temperatura de 90 °C y una presión de 250 psi durante un par de minutos logrando un pegado irreversible. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

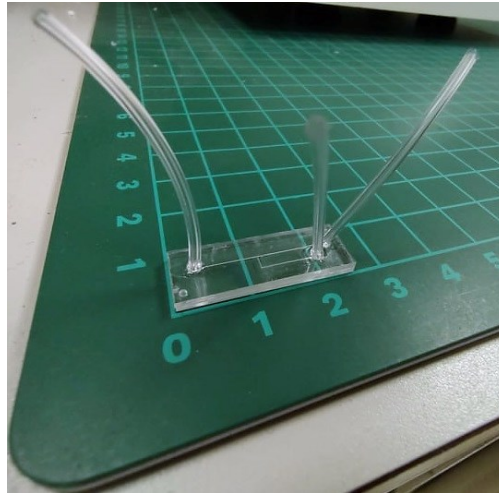


Figura 27. Dispositivo microfluídico ensamblado. Se muestra la configuración final del chip después de haber sido maquinado, lavado y sellado con una placa de acrílico no maquinada. Asimismo, en la entrada y en ambas salidas, se colocaron las mangueras correspondientes para el ingreso y salida de reactivos. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

3. Trampa magnética y configuración del dispositivo

Se formó una columna porosa dentro del canal con micropartículas magnéticas (MPFMs) de $7\ \mu\text{m}$ (± 2). Las MPFMs fueron resuspendidas en BSA al 5% y se introdujeron manualmente en el dispositivo con una aguja de jeringa a través de la manguera que conecta con el canal lateral. Mediante la rotación del chip, las micropartículas fueron arrastradas por gravedad hasta alcanzar la constricción de $5\ \mu\text{m}$ de altura (**Fig. 28**). La altura de la columna formada se controló a simple vista, manteniendo el mínimo estado de empaquetamiento^{76,80}. Las mangueras se sellaron con calor y el chip se mantuvo en posición vertical para evitar perturbar la columna de micropartículas.

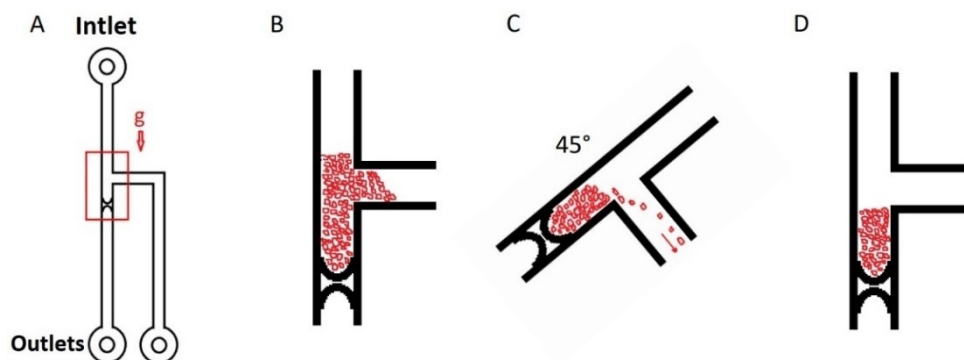


Figura 28. Formación de la trampa magnética. **A)** Las MPFMs de $7\ \mu\text{m}$ fueron ingresadas por la salida del canal lateral, evitando que lleguen a la entrada de reactivos. **B)** Las MPFMs son dirigidas manualmente hacia la constricción de $5\ \mu\text{m}$ de altura por efecto de la gravedad, donde son empaquetadas como una columna. **C)** Si la altura deseada de la columna de MPFMs es excedida, basta con rotar el dispositivo para favorecer su salida. **D)** La altura de la columna de MPFMs es calculada a simple vista. Tomada de Hernández-Ortiz *et al.*, 2022.

4. Configuración del dispositivo microfluídico

Para el arreglo experimental, se cortó la manguera de entrada y se conectó una aguja dispensadora, que funciona como reservorio para la entrada de reactivos al dispositivo. Es sumamente importante evitar una interfaz líquido-aire dentro de los microcanales. Se llenaron dos jeringas de vidrio de 100 μL (Hamilton 1710RNR) con agua destilada, se montaron en una bomba de jeringa (Kdscientific KDS-230). Las jeringas se llevaron a su mínima capacidad para un modo de succión y se conectaron a las mangueras de salida del dispositivo. Se activó un flujo de 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ y el dispositivo se acercó lateralmente a un imán convencional de 1 T previamente fijado a un portaobjetos de vidrio, y montado sobre un microscopio de fluorescencia, manteniendo la columna de MPFMs lo más cercana al imán (**Fig. 29**).

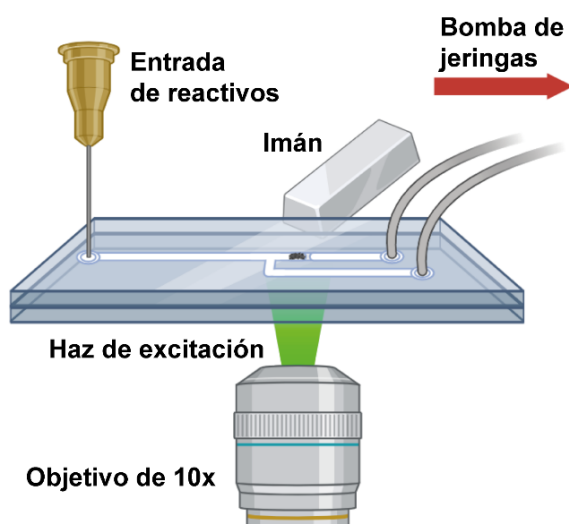


Figura 29. Arreglo experimental. El dispositivo utiliza una única entrada de reactivos y ambas salidas se conectaron a una bomba de jeringa de flujo de eyección. Se creó un gradiente de campo magnético en la matriz porosa de MPFMs utilizando un imán convencional para atrapar las NPMs de 100 nm conjugadas con el Ag de interés.

Resultados

1. Formación de la trampa microfluídica

Nuestro sistema integra una trampa magnética microfluídica formada por MPFMs empaquetadas sobre una constricción física donde un campo magnético es generado por un imán convencional externo para la captura de partículas de tamaño nanométrico. Sin embargo, una limitante ha sido el hecho de no contar con un control fino sobre la formación de la columna de MPFMs, ya que este proceso es llevado a cabo manualmente y la longitud de dicha columna se determina a simple vista. Por lo tanto, quisimos poner a prueba la reproducibilidad del proceso de formación de la trampa creando columnas de diferente longitud. Los resultados sugirieron una baja variabilidad para la formación de trampas de diferente tamaño, aun cuando el proceso es llevado a cabo de manera manual (**Fig. 30**).

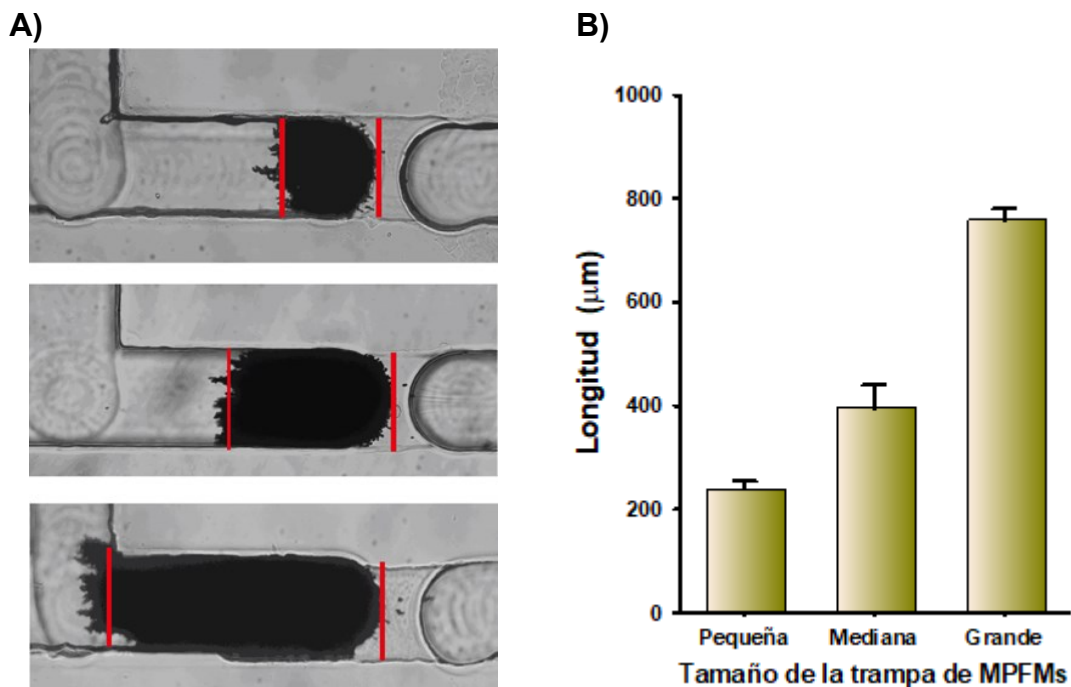


Figura 30. Formación de trampas de diferentes tamaños. **A)** Se fabricaron trampas de tres tamaños diferentes en varios dispositivos. La columna de MPFMs de $7\mu\text{m}$ (± 2) es formada en el espacio comprendido entre el inicio del canal lateral y la constricción de $5\mu\text{m}$ de altura. **B)** La grafica muestra el tamaño en μm para cada trampa formada con una óptima reproducibilidad. Las barras indican la desviación estándar de 4 repeticiones.

Discusión

Mostramos el desarrollo de un dispositivo acrílico altamente reproducible, diseñado para la realización de ELISAs microfluídicos basados en nanopartículas magnéticas. Este dispositivo combina diferentes características que lo hacen único: un diseño simple que consta únicamente de un canal principal y un canal accesorio; asimismo, el hecho de contar con una única entrada para todos los reactivos elimina la necesidad de válvulas u otras estructuras de mayor complejidad, lo cual se ve reflejado en una fácil manipulación.

En el desarrollo del dispositivo microfluídico, una de las limitaciones identificadas fue la necesidad de utilizar un componente piezoeléctrico para la fabricación de la constricción en el microcanal. Este paso de la fabricación es crítico para el correcto funcionamiento del dispositivo, ya que una constricción de mayor tamaño impide la formación de la columna de micropartículas ferromagnéticas (MPFM). A su vez, una constricción de menor tamaño restringe el flujo de reactivos por la trampa al aumentar la resistencia hidrodinámica y afecta el control preciso de los flujos que el dispositivo requiere. Por tanto, el requerimiento del piezoeléctrico puede aumentar tanto el costo como la complejidad del proceso de fabricación, lo cual puede ser desafiante en entornos clínicos o de campo.

No obstante, aunque no se presentan resultados detallados al respecto, adicionalmente se llevaron a cabo pruebas preliminares explorando diferentes dimensiones de canal y constricciones. Estas pruebas mostraron resultados favorables en el desarrollo de ELISAs en dispositivos de acrílico y trampas microfluídicas, lo que sugiere que es posible omitir el uso del componente piezoeléctrico. Este enfoque podría simplificar el dispositivo, reduciendo costos y facilitando su uso en el desarrollo de ELISAs microfluídicas.

Por otro lado, el uso de un material termoplástico como sustrato permite escalar el proceso de fabricación hacia otros métodos que sean incluso más compatibles con la producción en masa a bajo costo como el hot embossing. Además, al tratarse de un sustrato sólido no se requieren medidas de cuidado especiales para evitar daños durante su manipulación, transporte o almacenamiento, convirtiéndose en un excelente candidato para el potencial desarrollo de sistemas POCT.

Adicionalmente, encontramos un protocolo de sellado de canales óptimo de acuerdo a las dimensiones de nuestro dispositivo. Si bien puede parecer una técnica delicada y algo laboriosa, fue la que nos dio mejores resultados. Aunque no se presentan más resultados al respecto, también se probaron otros métodos reportados en la literatura que son más rápidos y emplean solventes más asequibles como etanol, isopropanol⁸¹; sin embargo es difícil evitar una absorción excesiva de disolvente que provoca el colapso de los microcanales y la constricción. Por el contrario, la unión con disolvente vaporizado permite una cantidad controlada de deposición para evitar un exceso de disolvente, a la vez que el sellado de los canales mediante la evaporación de cloroformo garantiza un pegado irreversible, a la vez que mantiene la transparencia y las propiedades ópticas del material. No obstante, la duración del pegado dependerá de varios factores, incluyendo la calidad del proceso de unión, la limpieza de las superficies, la presión aplicada durante el proceso de unión y las condiciones ambientales, pero en general, una unión bien hecha utilizando cloroformo puede ser bastante resistente y durar por muchos años.

Sin embargo, para escalar este protocolo a métodos más amigables y sencillos, se podrían considerar alternativas como el pegado térmico o el uso de solventes menos tóxicos que el cloroformo. Estos métodos podrían ser más seguros y fáciles de implementar en entornos de producción en masa. Además, el desarrollo de técnicas automatizadas para el pegado y ensamblaje podría aumentar la eficiencia y reproducibilidad del proceso, facilitando la producción a gran escala de estos dispositivos microfluídicos. Esto no solo mejoraría la escalabilidad del dispositivo, sino que también contribuiría a su adopción en una variedad de aplicaciones diagnósticas y de investigación.

Finalmente, la estrategia de maquinado por ambas caras permite generar la entrada y salidas para reactivos garantizando que el flujo dentro del canal nunca se vea afectado por un posible bloqueo de las mangueras que son adheridas para conectar el dispositivo a la bomba de jeringas. Si bien el

pegado de estas mangueras se realiza con un adhesivo de alta resistencia y secado instantáneo, aun comprende un proceso muy artesanal, susceptible a errores que pueden dañar irreversiblemente el funcionamiento del dispositivo al filtrarse hacia el interior de los microcanales. Por tanto, la optimización hacia un mejor sistema de conexiones es necesaria para un mejor rendimiento en la fabricación y optimizar el uso de los materiales y tiempos invertidos en la fabricación.

Por otro lado, y en términos generales, es sabido que el dispositivo de acrílico es potencialmente más barato de fabricar que los dispositivos de vidrio, silicio o PDMS, reduciendo el costo total. Asimismo, el uso de una bomba de doble jeringa y el diseño simple de única entrada de reactivos simplifican la manipulación del dispositivo.

Capítulo V. Conjugación de nanopartículas

Material y métodos

1. Conjugación de nanopartículas

El método de conjugación más utilizado en la superficie de las nanopartículas magnéticas (NPMs) implica la unión covalente entre aminas primarias y grupos carboxilo, es decir, un enlace amida mediante la química de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS)^{69,72,82}. Nosotros empleamos este método de conjugación covalente entre los grupos carboxilo de las NPMs comerciales y los grupos amino primarios expuestos en la proteína diana, mediado por el agente entrecruzador EDC/sulfo-NHS. Se utilizaron NPMs de varios tamaños (30, 50 y 100 nm) (SuperMag Carboxyl Beads, Ocean Nanotech, ICK30-05, SC0050-02, y SC0100-02). Se emplearon dos variantes descritas de la reacción de conjugación denominadas de 1 y 2 pasos. La **Figura Suplementaria 2** esquematiza los pasos de la reacción de la conjugación mediada por EDC/Sulfo-NHS para ambos protocolos.

El protocolo de 2 pasos implica un paso previo de activación de las NPMs, seguido de la adición de la especie diana a conjugar. Inicialmente, se activaron las NPMs funcionalizadas con grupos carboxilo, las cuales se encuentran a una concentración de 10 mg mL⁻¹. Para esto, se mezclaron con 50 µL de EDC (Ocean Nanotech's) a 10 mg mL⁻¹, 50 µL de Sulfo-NHS (Thermo Scientific, 24510) a 10 mg mL⁻¹ y 50 µL de buffer de activación (buffer MES 50 mM a pH 6) en un microtubo de reacción de 1.5 mL. La mezcla se agitó gentilmente a temperatura ambiente durante 40 min. Tras el paso de activación, las NPMs se separaron magnéticamente colocando el tubo durante 15 min en la gradilla de separación MagJET (Thermo Scientific, MR02). El líquido se desechó cuidadosamente con una micropipeta, evitando perturbar el pellet de NPMs formado en la pared del tubo. Se añadieron 200 µL de buffer de reacción (buffer potásico 100 nM a pH 7,4). Se añadieron también 50 µL de cada proteína una concentración de 1 mg mL⁻¹: Lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich Co., 89833) o Proteína recombinante SARS-CoV-2 Spike S1-His (Sino Biological Inc., 40591-V08H3). Cada tubo de reacción se agitó gentilmente a temperatura ambiente durante 2.5 h (**Fig. 31**).

A diferencia de la conjugación de proteína mediante 2 pasos, en el protocolo de un paso todos los reactivos se mezclan con la proteína sin activación previa de las nanopartículas. Tras la reacción de la proteína, se añadieron 5 µL de Quenching buffer (Ocean Nanotech's) a la suspensión de NPMs y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min adicionales en agitación continua. La suspensión de NPMs-antígeno se lavó 3 veces con 200 µL de buffer de lavado (buffer potásico 100 nM a pH 7,4, Triton X-100 0.1 % v/v) utilizando la gradilla de separación MagJET. El pellet se solubilizó en 100 µL de 1X PBS 100 mM (Thermo Scientific, 003002) y se sumergió en baño ultrasónico durante 30 s para evitar la formación de aglomerados. La

suspensión se dejó a 4 °C durante ~5 días para permitir la separación de los aglomerados mayores de 100 nm por sedimentación. Por último, se colectó y separó el sobrenadante en un nuevo microtubo de reacción de 200 µL.

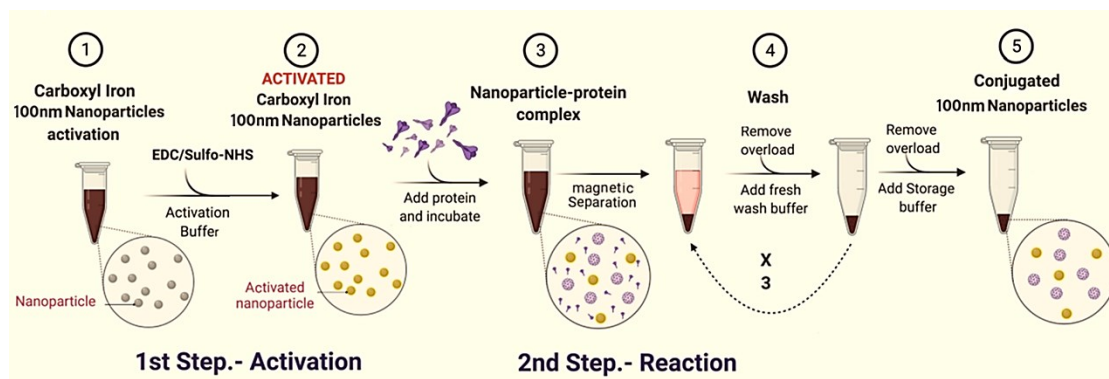


Figura 31. Conjugación de proteína (Ag) sobre la superficie de NPMs. Se esquematizan los pasos del protocolo de conjugación de 2 pasos de la proteína de interés sobre la superficie de las NPMs. A diferencia del protocolo de un único paso, los grupos carboxilo de las NPMs son previamente activados antes de la reacción con la proteína.

2. Concentración de proteínas

El líquido desechado de los pasos de lavado durante el protocolo de conjugación proteína-nanopartícula fue colectado y almacenado en un microtubo de reacción de 1.5 mL. La proteína no conjugada contenida en los lavados se concentró utilizando filtros de centrifugación de 0.5 mL de un punto de corte de 10 KDa (Amicon UFC501096). Primeramente, la membrana del filtro se hidrató con 400 µL de agua desionizada y se centrifugó a 13,300 rpm durante 10 min. Se desechó el agua filtrada y se añadieron las muestras hasta filtrar todo el contenido de los tubos. Cada paso de centrifugación se realizó bajo las mismas condiciones de velocidad y duración. Por último, se realizó un paso de intercambio de buffer para mantener la muestra en un volumen final de 100 µL de PBS. Cada muestra se almacenó en un microtubo de reacción de 200 µL para su posterior análisis.

3. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit de BCA (Pierce™, 23227) para estimar indirectamente la concentración de la proteína conjugada con las NPMs. Calculamos la concentración de proteína no conjugada que se reconcentró a partir de los pasos de lavado durante la reacción de conjugación. Realizamos el protocolo descrito según el proveedor. Se utilizó una solución de BSA de una concentración inicial de 2 mg mL⁻¹ la cual fue diluida para preparar la curva estándar (0, 0.125, 0.250, 0.5, 0.75 y 1 mg mL⁻¹). La solución de trabajo se preparó mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B (50:1, reactivo A:B). Se pipetearon 10 µL de cada dilución de la curva estándar y de la muestra desconocida por triplicado en placas de 96 pozos. Se añadieron 200 µL de solución de trabajo a cada pozo y se mezcló

gentilmente. Se cubrió la placa para protegerla de la luz y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 10 min más. Por último, se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas.

4. Ensayo Dot blot

Tras la conjugación de la proteína sobre la superficie de las NPMs de 100 nm de diámetro, se realizó el inmunoensayo completo con la técnica Dot Blot para corroborar la formación del inmunocomplejo. Se colocaron gotas de 1 μL de volumen de la suspensión de NPMs con la proteína conjugada en una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm (Amersham Protran, A29483962). Se utilizaron NPMs no conjugadas como control negativo y una solución proteica a una concentración de 0.1 mg mL^{-1} como control positivo.

Las membranas se bloquearon para evitar sitios de unión inespecíficos mediante inmersión en solución de bloqueo (solución salina tamponada con Tris 1X, BSA 5% (p/v), pH 7.5) a temperatura ambiente y en agitación constante durante 1 h. Las proteínas conjugadas se detectaron utilizando el respectivo Ab1 (Rabbit Polyclonal anti-Lysozyme antibody, Abcam Ab34799 para lisozima y SARS-CoV-2 Spike, Chimeric MAb, Sino Biological 40150-D003 para S1). La concentración de anticuerpo utilizada fue de 100 ng mL^{-1} , diluido en buffer de dilución de anticuerpos (1X solución salina tamponada con Tris, 0,05% de Tween-20 (v/v), 1% de BSA (p/v), pH 7.5). Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h en agitación y se lavaron 3 veces para eliminar el exceso de Ab1 no unido. En cada paso de lavado se utilizó Buffer de lavado 1X TBST. El primer paso de lavado duró 15 minutos en agitación y los dos siguientes sólo 5 minutos.

A continuación, las membranas se incubaron durante 1 h adicional y en agitación con Ab2 marcado con HRP (IgG de cabra anti-conejo H&L (HRP), Abcam AB6721). Posteriormente, se lavó nuevamente la membrana utilizando la misma solución y el procedimiento descrito anteriormente. Por último, la membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato de larga duración SuperSignal West Dura Extended (Thermo Scientific, 34075) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección, la membrana se fotografió utilizando un fotodetector (MicroChemi, 70-25-00).

5. Análisis densitométrico

Con el objetivo de reportar el resultado de las membranas de dot blot reveladas en términos semicuantitativos, se realizó el análisis densitométrico de la intensidad de las manchas obtenidas. Se empleó en software ImageJ para el procesamiento de las imágenes. Antes del análisis, se hizo una conversión a imágenes de 32 bit. Se seleccionaron las áreas por filas o columnas que contenían las manchas reveladas y se obtuvieron los gráficos de intensidad de píxeles en escala de grises. Finalmente, se obtuvo el área bajo la curva de cada trazo y se normalizó con respecto de la intensidad obtenida del control

positivo empleado en cada membrada, correspondientes a la señal de la proteína libre en solución a una concentración de 0.1 mg mL⁻¹.

Resultados

1. Conjugación de NPMs

Debido a los costos elevados que genera el uso de la proteína recombinante de la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2, así como los respectivos anticuerpos específicos, primeramente estandarizamos nuestro protocolo de conjugación con una proteína modelo, la lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich, L6876). Dado que se han descrito varias relaciones de exceso molar de Sulfo-NHS y EDC con respecto a la concentración de proteína a conjugar, evaluamos el efecto de variar la relación molar de EDC con respecto a la proteína conjugada entre 10 a 30 veces. La relación molar de Sulfo-NHS respecto a proteína se mantuvo constante en 1:1 en todos los experimentos. En primer lugar, y debido a la formación de aglomerados, filtramos la suspensión de NPMs conjugadas utilizando un filtro de jeringa PES de 0.2 µm (Thermo Scientific, 725-2520). Asimismo, probamos tanto el uso de reactivos preparados en nuestro laboratorio como el kit de conjugación adquirido (SuperMag Carboxyl Beads Conjugation Kit, Ocean Nanotech, ICK30-05, SC0050-02, y SC0100-02).

Mediante el análisis densitométrico de las manchas del dot blot no encontramos diferencias observables en la intensidad de las manchas obtenidas para la fracción filtrada de MNNPs de 30 nm conjugadas con lisozima mediante el método de un paso, independientemente (1) del exceso molar de EDC (10-, 20-, y 30 veces) con respecto de la lisozima o (2) del tipo de reactivo utilizado (de laboratorio o del kit de conjugación) (**Fig. 32**). La especificidad de los anticuerpos también se comprobó en una segunda membrana donde se incluyeron las mismas condiciones pero sin agregar Ab1. La ausencia de señal de fondo aun al máximo tiempo de exposición (10 s) cuando el Ab1 no está presente confirma la ausencia de interacciones inespecíficas del Ab2 y el bloqueo eficaz de la membrana con BSA al 5% (**Fig. Suplementaria 3**).

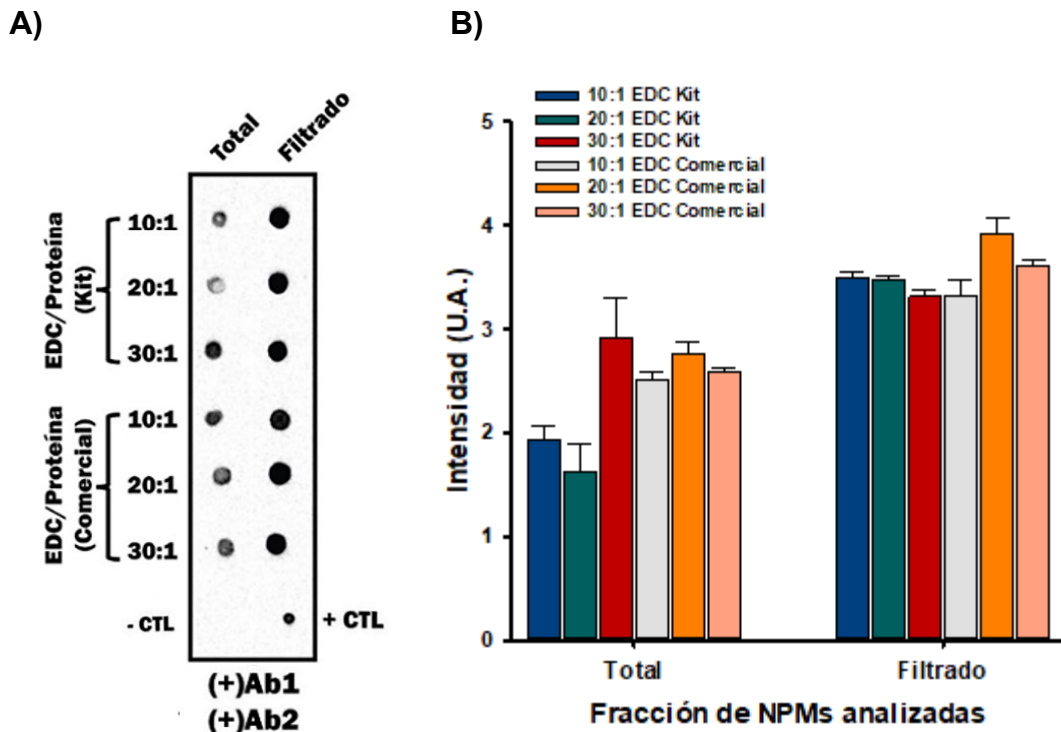


Figura 32. Cuantificación de la conjugación de un paso de lisozima a NPMs de 30 nm mediante dot blot. **A)** Se muestran las manchas obtenidas después de revelar la membrana con el sustrato quimioluminiscente con un tiempo de exposición de 5 s. Se empleó un exceso molar de 10, 20 y 30 veces de EDC sobre la proteína. La concentración de Ab1 fue de 100 ng mL⁻¹ y se usó una dilución 1:1000 de Ab2 (0.5 µg mL⁻¹). **B)** El análisis densitométrico del dot blot de lisozima no muestra diferencias en la intensidad de las manchas para las NPMs filtradas, independientemente del origen del reactivo EDC o de su proporción molar. El gráfico muestra el valor promedio de tres repeticiones (n=3) con barras de error que representan el error estándar.

A continuación, se probaron las mismas proporciones molares de EDC/NHS para el protocolo de conjugación de dos pasos con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos mediante ambos métodos de conjugación. En este caso solo se utilizaron reactivos preparados en nuestro laboratorio, no los del kit. La **Figura 33** muestra una membrana representativa del dot blot para lisozima conjugada a NPMs de 30 nm mediante el protocolo de dos pasos, así como el análisis densitométrico de 3 repeticiones independientes. Los resultados obtenidos sugieren no haber diferencia significativa en la fracción filtrada de NPMs con la proteína conjugada, independientemente de la relación EDC/proteína mediante la reacción de conjugación de dos pasos.

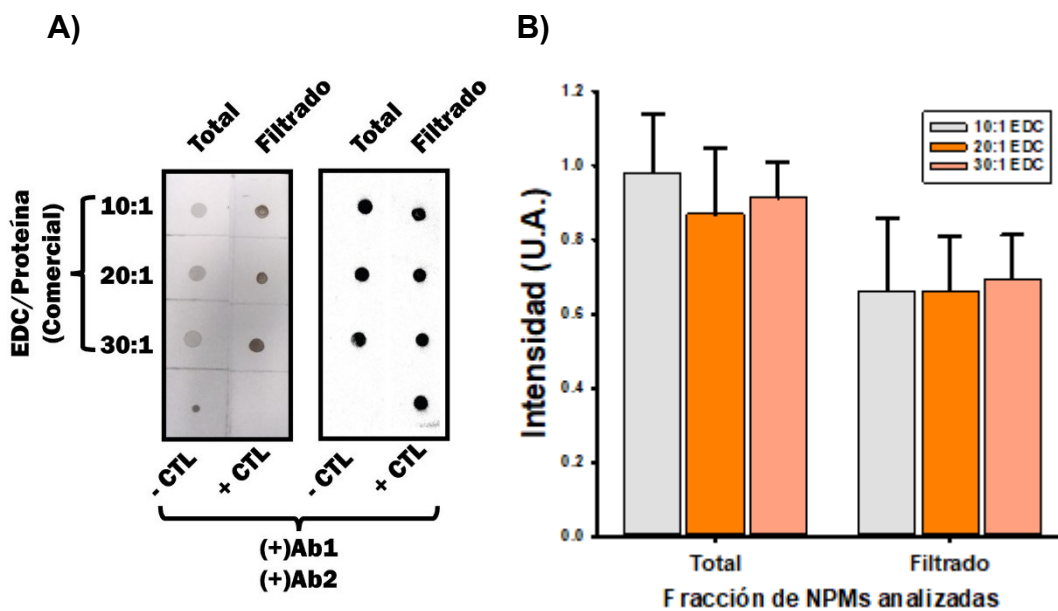


Figura 33. Cuantificación de la conjugación de 2 pasos de lisozima a NPMs de 30 nm mediante dot blot. **A)** Se muestran las manchas obtenidas después de revelar la membrana con el sustrato quimioluminiscente con un tiempo de exposición de 5 s. Se empleó un exceso molar de 10, 20 y 30 veces de EDC sobre la proteína. La concentración de Ab1 fue de 100 ng mL⁻¹ y se usó una dilución 1:1000 de Ab2 (0.5 µg mL⁻¹). **B)** El análisis por densitometría de la intensidad de estas manchas confirma que no existen diferencias significativas para la conjugación de lisozima a NPMs de 30 nm mediante 2 pasos, independientemente de la proporción molar de EDC para ambas fracciones analizadas (total y filtrado). El gráfico muestra el valor promedio de tres repeticiones (n=3) con barras de error que representan el error estándar.

No obstante, el protocolo de conjugación para PMNPs de 30 nm requiere mucho tiempo, ya que los tiempos de separación magnética requeridos en cada paso de lavado son muy largos según lo reportado por el fabricante (más de 8 h). Por lo tanto, se evaluó la conjugación de lisozima en la superficie de NPMs de 30, 50 y 100 nm. Sin embargo, cuanto mayor es el tamaño de partícula, más ineficiente es la filtración debido a la saturación y al bloqueo del filtro. Debido a esto, establecimos un tiempo umbral de 5 días para permitir la sedimentación de los aglomerados formados durante la conjugación para cada tamaño de NPMs y recuperar el sobrenadante donde se encuentran tanto aglomerados suficientemente pequeños que no logran sedimentar, como partículas en estado individual con proteína conjugada, dado los largos tiempos de sedimentación descritos por el fabricante (incluso ~30 días para las NPMs de 100 nm). La **Figura 34** muestra el dot blot para NPMs de diferentes tamaños para (1) el producto total de la reacción de conjugación y (2) el sobrenadante colectado después de 5 días de sedimentación en reposo. Como era de esperar, en el caso de las NPMs de 30 nm, el tiempo establecido para la separación magnética no fue suficiente y la muestra se perdió a lo largo de los pasos de lavado (**Fig. Suplementaria 4**), lo que provocó la ausencia de señal en ambas fracciones analizadas (fracción total y el sobrenadante).

Por otro lado, cuando las NPMs de 100 nm se conjugaron con lisozima observamos la correspondiente señal en el dot blot para ambas fracciones analizadas. A pesar de lo que podría esperarse con las nanopartículas magnéticas (NPMs) de 50 nm, que según se reporta tienen tiempos de separación magnética prolongados (entre 2 y 8 horas), se observó una señal en el dot blot al analizar la fracción total no tratada. Sin embargo, tras 5 días de sedimentación, no se obtuvo ninguna señal en la fracción sobrenadante, lo que sugiere que la señal obtenida se debió a la formación de aglomerados lo suficientemente grandes como para separarse magnéticamente pero que se sedimentaron por completo. Asimismo, las NPMs de 100 nm también se conjugaron con el protocolo de dos pasos. Se observó una mayor intensidad de señal en la mancha del dot blot correspondiente a la fracción total de la reacción de conjugación; sin embargo no encontramos diferencias significativas en el sobrenadante comparado con el protocolo de un único paso.

Mediante la técnica de DLS corroboramos que las NPMs sobre las cuales se conjugó la lisozima que se recuperaron del sobrenadante tras 5 días de sedimentación poseen un tamaño promedio de 150 nm (**Fig. 35**) que no difiere con la medición obtenida para NPMs sin proteína conjugada (**Fig. Suplementaria 5A**). Esto sugiere que en la fracción del sobrenadante las NPMs se encuentran en un estado individual, con la proteína de interés conjugadas satisfactoriamente sobre su superficie y sin aglomerados de gran tamaño.

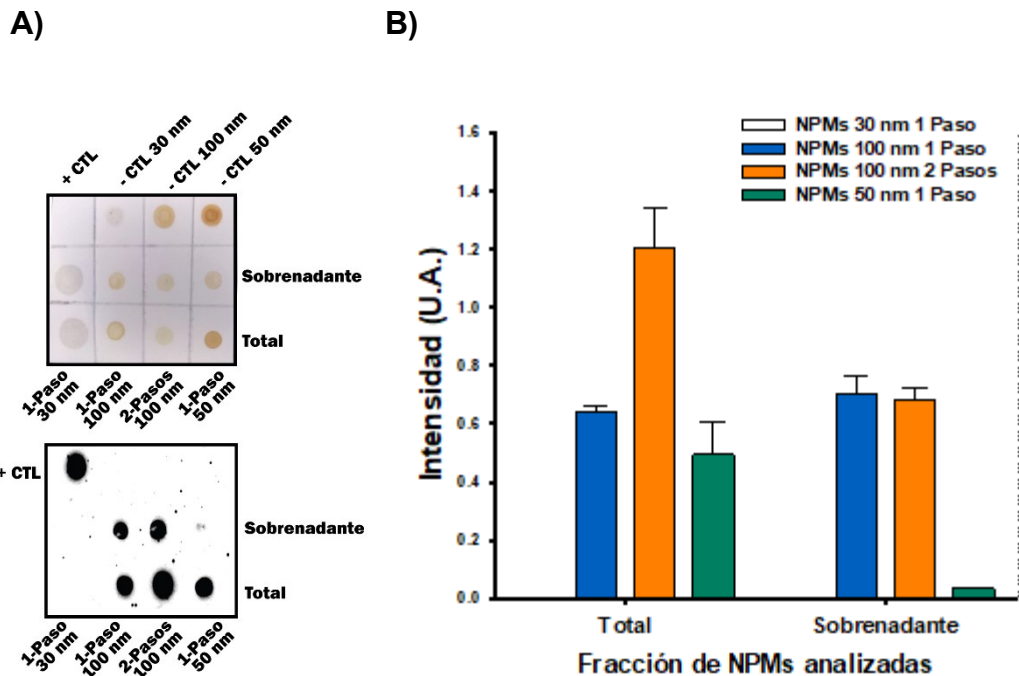


Figura 34. Estandarización de protocolo de un paso y dos pasos con diferentes tamaños de NPMs. Se conjugaron NPMs de diferentes tamaños con lisozima y se separó el sobrenadante por sedimentación tras 5 días en reposo. **A)** Arriba se muestra la fotografía de la membrana con los diferentes muestras y abajo, después del revelado con un tiempo de exposición de 5 s. **B)** El análisis densitométrico confirma una mayor señal para la conjugación mediante el protocolo de 2 pasos cuando se utilizaron NPMs de 100 nm solo para la fracción total. Para el tiempo establecido en la separación magnética (15 min) se perdió la muestra de MNPs de 30 nm. n=3.

Distribución de tamaños por intensidad

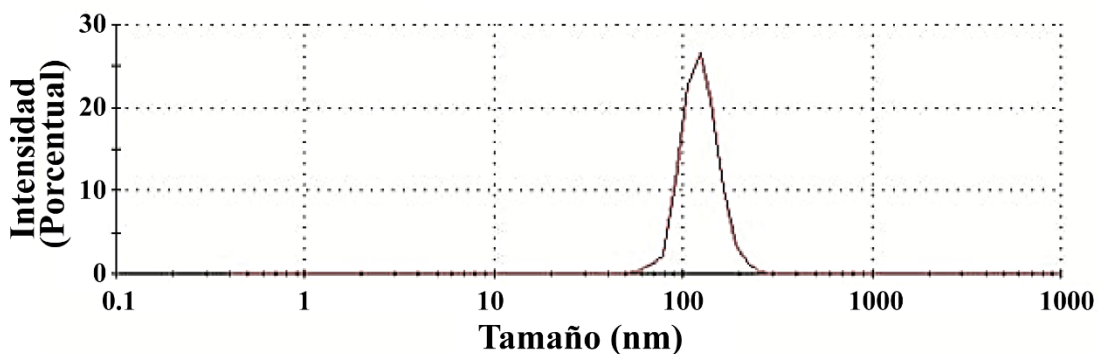


Figura 35. Cuantificación de la distribución de tamaños por DLS de las NPMs con lisozima conjugada mediante el protocolo de 2 pasos. La distribución de tamaños confirma que las NPMs de 100 nm con la proteína conjugada y que se ubican en la fracción del sobrenadante se encuentran cercanas al estado de partícula única con la proteína conjugada.

2. Eficiencia de la conjugación

Evaluamos la eficiencia y variabilidad de cada conjugación realizada mediante una medición indirecta. Colectamos las soluciones obtenidas de los lavados realizados durante la conjugación para el protocolo de 2 pasos en NPMs de

100 nm. En seguida, se concentró la proteína contenida mediante el empleo de filtros con un punto de corte de 10 KDa en un volumen final de 100 μ L de PBS. Realizamos la cuantificación de la proteína contenida mediante el método de BCA como se describe en la metodología. Finalmente, conociendo la concentración inicial de proteína agregada al vial para la reacción de conjugación que fue de 1 mg mL⁻¹, pudimos obtener la concentración de proteína que fue conjugada sobre la superficie de las NPMs que corresponde a la diferencia que hubo entre la concentración de proteína inicial y la concentración de proteína no conjugada de los lavados. Asimismo, calculamos la eficiencia para cada reacción de conjugación realizada expresada de manera porcentual (**Tabla 4**) mediante la expresión:

$$\text{Eficiencia de conjugación} = ([\text{Proteína inicial}] - [\text{Proteína no conjugada}]) * 100$$

No. de reacción	[Proteína inicial] (mg mL ⁻¹)	[Proteína no conjugada] (mg mL ⁻¹)	[Proteína conjugada] (mg mL ⁻¹)	Eficiencia de conjugación (%)
1	1	0.658	0.342	34.2
2	1	0.622	0.378	37.8
3	1	0.138	0.862	86.2
4	1	0.124	0.876	87.6
5	1	0.122	0.878	87.8

Tabla 4. Eficiencia de conjugación para lisozima a NPMs de 100 nm. Se calculó la eficiencia de conjugación de 5 reacciones independientes mediante el cálculo indirecto de la concentración de proteína no conjugada mediante el método de BCA.

Discusión

Adaptamos un protocolo de conjugación de proteína en la superficie de NPMs de diferentes tamaños empleando reactivos preparados en nuestro laboratorio. Esto nos ha permitido evitar la dependencia de kits comerciales, los cuales no solo suelen ser costosos, sino que además no proporcionan la información detallada sobre sus componentes. Esta falta de información dificulta su empleo en el desarrollo de nuevas plataformas de ELISA, a la vez que resta reproducibilidad si no se emplean kits del mismo fabricante. Empleamos el método de conjugación mediante EDC/NHS (carbodiimida/N-hidroxisuccinimida). Se trata de un método comúnmente utilizado, el cual se basa en la formación de un enlace covalente altamente estable entre el grupo carboxilo de las NPMs comerciales y los grupos amino primarios de nuestra proteína blanco (enlace peptídico).

El método de conjugación mediante EDC/NHS es un método versátil, que puede utilizarse para unir una amplia variedad de moléculas, incluyendo péptidos, proteínas, oligonucleótidos, entre otros. Asimismo, el protocolo es relativamente sencillo y eficiente. Sin embargo, la conjugación mediante este método puede dar lugar a reacciones no específicas con grupos aminos secundarios o terciarios, lo que puede conducir a la formación de agregados o la pérdida de actividad biológica. Asimismo, la eficiencia de la reacción de EDC/NHS puede depender de varios factores, como la naturaleza biológica de

la proteína, el pH, la concentración de reactivos, entre otros. Por lo tanto, la estandarización es clave para cada sistema empleado.

La conjugación de lisozima a NPMs presentó un reto mayor, ya que se observó la formación de aglomerados. Dichos aglomerados generan un bloqueo del flujo a través de la trampa magnética microfluídica (experimentos no mostrados). Debido a esto fue necesario implementar alguna alternativa de purificación adicional para poder emplear las NPMs en nuestro sistema de ELISA dentro del dispositivo. El filtrado de NPMs de 30 nm con lisozima conjugada parece ser una buena alternativa para eliminar aglomerados de mayor tamaño. De hecho, el filtrado parece mostrar un aumento significativo en la señal para NPMs de 30 nm a las cuales se les conjugó la proteína mediante el protocolo de un paso. Lo anterior, posiblemente, fue debido a que la eliminación de los aglomerados permite la exposición de más sitios disponibles para la unión del Ab1 en las NPMs filtradas que mantienen una configuración de menor tamaño.

Por otro lado, las NPMs de 30 nm con proteína conjugada mediante 2 pasos no muestran diferencias significativas al analizar ambas fracciones (total y filtrado), lo cual apoya la idea que mediante este método de conjugación la reacción es amortiguada mediante la activación previa de las NPMs por el EDC, resultando en una reacción más homogénea. El EDC funciona como un agente de acoplamiento al activar los grupos carboxilo presentes en la superficie de las NPMs formando un intermedio inestable de O-acilisourea que es reactivo hacia grupos amino. Si este intermedio no encuentra un grupo amino disponible, se hidrolizará y el grupo carboxilo se regenerará. Por el contrario si existen grupos amino disponibles se genera un enlace peptídico entre la molécula diana. Además, en presencia de N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS), este reacciona con el complejo de O-acilisourea, formando un éster de succinimida estable. Una vez formado este compuesto, la proteína de interés se adiciona a la reacción y se une covalentemente al éster de succinimida, completando así el proceso de conjugación. Este método de dos pasos aumenta la eficiencia y la selectividad de la conjugación al proporcionar una estabilización adicional del complejo activado mediante el NHS. Además, ayuda a minimizar la formación de agregados y la reactividad no específica al reducir la formación de especies reactivas intermedias.

En las primeras pruebas de conjugación para NPMs de 30 nm nosotros empleamos la centrifugación como un método de separación de las NPMs durante los lavados, ya que los tiempos de separación magnética eran en el orden de horas. No obstante, pudimos comprobar que eran necesarios varios ciclos de centrifugación, al menos 3 veces a 13,300 rpm durante 10 min, para lograr concentrar las NPMS; sin embargo, el pellet formado era disperso en un área grande del fondo del tubo y no contábamos con la seguridad de haber concentrado por completo la muestra. Esto generaba un alto riesgo de perder la muestra entre los diferentes lavados requeridos, por lo cual la centrifugación fue descartada y sustituida por la separación magnética. A pesar de la

separación magnética para NPMs de 30 nm conllevó un alto consumo de tiempo de al menos 12 h entre cada lavado, mediante este método se concentró eficientemente la muestra en un pequeño punto en la pared del tubo fácilmente distinguible a simple vista (**Fig. Suplementaria 4**).

Por tanto, si bien es cierto que el tiempo de sedimentación establecido es demasiado grande para obtener una muestra viable (~5 días), este tiempo puede reducirse al centrifugar la muestra para promover la sedimentación y separación de aglomerados de mayor tamaño en un menor tiempo. De este modo, se garantiza que las NPMs en su conformación de partícula individual y con proteína conjugada en su superficie se mantengan en el sobrenadante.

No obstante, el uso de NPMs de mayor tamaño redujo considerablemente el tiempo de conjugación debido a que el tiempo requerido para la separación magnética es menor. Las NPMs más grandes tienen una mayor magnetización intrínseca debido a una mayor masa. Esto resulta en una mejor respuesta a los campos magnéticos aplicados lo que facilita su separación en presencia de un campo magnético externo⁷⁴. Sin embargo, las nanopartículas más grandes más grandes tienden a tener un movimiento browniano más lento y menos errático, ya que su masa es mayor y la fuerza de arrastre que experimentan es menor en comparación con su masa, aumentando los tiempos de incubación requeridos. Por tanto, resulta importante considerar cuidadosamente el tamaño óptimo de las nanopartículas para maximizar la eficacia y la eficiencia de la separación magnética en una aplicación específica.

El tiempo de separación magnética para NPMs de 50 nm oscila entre 2-8 h según lo reportado por el fabricante (para NPMs de 30 nm no lo reporta), mientras que para NPMs de 100 nm este tiempo se reduce a tan solo 5-10 min. Por tanto consideramos este último tamaño de NPMs como óptimo para ser empleadas como soporte para nuestros ELISAs, con el objetivo de optimizar el tiempo de conjugación. Nuestros experimentos confirman una óptima conjugación de la proteína de interés (lisozima) para NPMs de 100 nm. Si bien para este mayor tamaño de NPMs de 100 nm el filtrado deja de ser una opción viable por la saturación del filtro empleado (resultados no mostrados), la sedimentación en reposo permite separar eficientemente los aglomerados resultantes de mayor tamaño.

Mediante la técnica de DLS observamos que el tamaño de la fracción recuperada después de la sedimentación no difiere del tamaño de las NPMs sin conjugar (**Figura Suplementaria 5B**). Además, según lo reportado por el fabricante, los tiempos de sedimentación para NPMs de 100 nm en estado de partícula única oscilan alrededor de los 30 días, lo cual garantiza una suspensión homogénea dentro de este lapso de tiempo y minimiza el pretratamiento requerido de la muestra antes de ser empleada. En caso contrario, bastará con la agitación, ya sea manualmente, en vórtex o baño ultrasónico por unos segundos para homogenizar la muestra.

Capítulo VI. Caracterización del ELISA en el dispositivo microfluídico

Material y métodos

1. ELISA en el dispositivo microfluídico

Con el objetivo de caracterizar la formación del inmunocomplejo y tener un mejor control sobre la interacción de cada una de las especies, el ELISA en el dispositivo se realizó mediante tres enfoques diferentes. En los dos primeros enfoques, tanto el complejo NPM/Ag-Ab1 como el complejo Ab1-Ab2 interactuaron respectivamente en la fase coloidal, fuera del dispositivo. En el tercer enfoque, la captura de Ab1 se produjo en la fase coloidal y la interacción Ab1-Ab2 se produjo en la fase heterogénea, es decir, con las NPMs previamente capturadas en la trampa magnética. Para esto, la suspensión colectada del sobrenadante de NPMs con proteína conjugada se homogenizó mediante baño ultrasónico. Se tomó 1 μL de dicha suspensión de NPMs a 0.5 mg mL^{-1} y se dejó incubar durante toda la noche en un microtubo de reacción de 1.5 mL con 100 μL de BSA al 5% (p/v) a 4 °C. Al día siguiente se completó a un volumen de 250 μL con solución de lavado 1X TBST y el tubo se colocó durante 15 min en la gradilla de separación magnética MagJET. Desde este paso, cada uno de los 3 enfoques del ELISA en el dispositivo implicó pasos diferentes como se describe a continuación.

a. Protocolo extenso de ELISA microfluídico

El protocolo de ELISA en extenso empleando el dispositivo microfluídico se fundamenta en la secuencia de pasos descrita para el Dot Blot. Con este protocolo empleado, cada paso de lavado consistió en desechar el líquido del tubo después de 15 minutos de separación magnética, donde las NPMs quedaron adheridas a la pared. Posteriormente y ya sin líquido, se retiró el tubo de la gradilla de separación magnética MagJET. Se añadieron 250 μL de solución de lavado 1X TBST fresco y se mantuvo en agitación durante 15 min. Esta secuencia de pasos se repitió dos veces más, pero esta vez agitando durante sólo 5 min. Cada paso de lavado se realizó después del bloqueo con BSA al 5% y tras la incubación de los anticuerpos primario y secundario (Ab1 y Ab2), respectivamente. Ambos anticuerpos, Ab1 y Ab2, se incubaron durante 30 minutos cada uno a 37°C. Para Ab1 anti-Lisozima se utilizaron concentraciones de 1 a 100 ng mL^{-1} y de 10 a 1000 pg mL^{-1} para Ab1 anti-S1. El Ab2 se utilizó a una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Una vez formado el inmunocomplejo fuera del chip, y tras el último paso de lavado, se resuspendió en 50 μL de buffer de dilución. La suspensión se hizo fluir por el microcanal del dispositivo a través de la trampa magnética durante 7 min a un flujo de 100 $\mu\text{L h}^{-1}$, esto para acelerar la llegada de la suspensión hasta la trampa, posteriormente la captura del inmunocomplejo se llevó a cabo aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ durante 15 min. Con este protocolo de captura, nos aseguramos que todo el volumen de suspensión (50 μL) ingrese al dispositivo.

Posteriormente, se cambió la aguja dispensadora y el canal se lavó haciendo fluir solución de lavado 1X TBST durante 10 min a $50 \mu\text{L h}^{-1}$ para eliminar el exceso de NPMs con el inmunocomplejo Ag-Ab1-Ab2 de los microcanales del dispositivo que no hayan sido capturadas en la trampa magnética. Por último, se añadió el sustrato fluorogénico AmpliFlu Red que es oxidado por la enzima HRP acoplada al Ab2, lo cual genera una señal fluorescente cuantificable.

b. Protocolo reducido de ELISA microfluídico

Optimizamos los pasos del protocolo de lavado para reducir el tiempo total del ensayo. En un segundo enfoque del ELISA microfluídico, aprovechamos las propiedades magnéticas de las NPMs que se capturan en la pared del tubo tras 15 min de incubación en la gradilla de separación magnética. Para realizar los 3 lavados, bastó con retirar el líquido y añadir solución de lavado 1X TBST inmediatamente, sin necesidad de despegar las NPMs de la pared del tubo entre cada lavado. El procedimiento debe realizarse gentilmente con una micropipeta, evitando crear turbulencias que pudieran desprender el pellet de NPMs adherido magnéticamente a la pared del tubo. El nuevo procedimiento de lavado se utilizó tras la incubación con la solución de bloqueo (BSA 5%), Ab1 y Ab2, respectivamente. Los pasos de captura de NPMs en el dispositivo y los siguientes pasos del ELISA fueron exactamente igual a los ya descritos.

c. Protocolo de ELISA microfluídico mixto

Implementamos un tercer enfoque que se asemeja a los pasos descritos en el ELISA modelo de Guevara et al²⁴. Mediante este protocolo, se produce la interacción del antígeno en la superficie de las NPMs con el anticuerpo diana en la fase coloidal. La reacción de reconocimiento de ambas especies ocurre después de 30 min de incubación a 37°C en un volumen de $50 \mu\text{L}$ de buffer de dilución. Inmediatamente después de la incubación, la suspensión se introdujo en el dispositivo microfluídico, el cual fue previamente bloqueado con BSA al 5% y lavado durante 10 min con un flujo de solución de lavado TBST 1X a $50 \mu\text{L h}^{-1}$. Para hacer fluir todo el volumen de muestra ($50 \mu\text{L}$) y capturar las NPMs en la trampa magnética, utilizamos un flujo de $100 \mu\text{L h}^{-1}$ por 7 min y luego cambiamos el flujo a $50 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 15 min. Se desechó la aguja dispensadora y se sustituyó por una limpia. Se realizó un nuevo paso de lavado haciendo fluir Buffer de lavado 1X TBST a $50 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 7 min. Para eliminar eficazmente las NPMs restantes y el anticuerpo no unido a lo largo del canal microfluídico y la matriz porosa de micropartículas, aumentamos el flujo de lavado a $100 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 3 min adicionales. Después de lavar el Ab1 no unido, se fluyeron $25 \mu\text{L}$ de Ab2 diluido 1:2,500 ($0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, para introducir el Ab2 se aplicó un flujo de $50 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 7 min y $20 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 15 min. En seguida, se aplicó otro paso de lavado con TBST 1X como el descrito arriba, empleando una nueva aguja dispensadora. Por último, se eliminó el exceso de solución de lavado TBST 1X de la aguja dispensadora y se añadió el sustrato fluorogénico AmpliFlu Red para la medición de la intensidad de fluorescencia.

No. de pasos	Extenso	Reducido	Mixto
1	Interacción Ag-Ab1 Fase coloidal fuera del chip 12 h (overnight)	Interacción Ag-Ab1 Fase coloidal fuera del chip a 37 °C por 30 min	Interacción Ag-Ab1 Fase coloidal fuera del chip a 37 °C por 30 min
2	Lavados Por triplicado: Separación magnética por 15 min. Cambio de buffer de lavado y agitación de balanceo por 15 min (agitación 2 y 3 solo 5 min)	Lavados Única separación magnética por 15 min. 3 cambios de buffer de lavado con el pellet de NPMs adherido en la pared del microtubo. Agitación en vórtex 10 s	Lavados Única separación magnética por 15 min. 3 cambios de buffer de lavado con el pellet de NPMs adherido en la pared del microtubo
3	Interacción Ab1-Ab2 Fase coloidal fuera del chip a 37 °C por 30 min	Interacción Ab1-Ab2 Fase coloidal fuera del chip a 37 °C por 30 min	Captura de NPMs en el dispositivo 7 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 15 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$
4	Lavados Por triplicado: Separación magnética por 15 min. Cambio de buffer de lavado y agitación de balanceo por 15 min (lavado 2 y 3 solo 5 min)	Lavados Única separación magnética por 15 min. 3 cambios de buffer de lavado con el pellet de NPMs adherido en la pared del microtubo. Agitación en vórtex 10 s	Lavados Dentro del chip con TBST 1X 7 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$
5	Captura de NPMs en el dispositivo 7 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 15 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$	Captura de NPMs en el dispositivo 7 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 15 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$	Interacción Ab1-Ab2 Fase heterogénea dentro de la trampa magnética 7 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ 15 min a 20 $\mu\text{L h}^{-1}$
6	Lavados Dentro del chip con TBST 1X 7 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$	Lavados Dentro del chip con TBST 1X 7 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$	Lavados Dentro del chip con TBST 1X 7 min a 50 $\mu\text{L h}^{-1}$ 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$
7	Ingreso de solución de AmpliFlu Red 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$	Ingreso de solución de AmpliFlu Red 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$	Ingreso de solución de AmpliFlu Red 3 min a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$
8	Mediciones Detección a los diferentes flujos (3,5,10 y 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) 6 min Lavados a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 2 min entre medición	Mediciones Detección a los diferentes flujos (3,5,10 y 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) 6 min Lavados a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 2 min entre medición	Mediciones Detección a los diferentes flujos (3,5,10 y 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) 6 min Lavados a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ 2 min entre medición
Tiempo total:	Preparación: ~15.5 h Detección: 30 min	Preparación: ~2 h Detección: 30 min	Preparación: ~2 h Detección: 30 min

Tabla 5. Diferencias entre los 3 enfoques del ELISA en el dispositivo microfluídico. Se resumen los pasos que integran los 3 diferentes enfoques del ELISA en nuestro dispositivo (extenso, reducido y mixto).

2. Medición de la señal de fluorescencia

Se aplicó una gama de flujos ($1 \mu\text{L h}^{-1}$ a $20 \mu\text{L h}^{-1}$) del sustrato fluorogénico Ampliflu Red para evaluar el efecto del flujo sobre la intensidad de fluorescencia detectada para cada muestra. Cada flujo se fijó durante 6 min. La medición de la fluorescencia en el microcanal se obtuvo tanto de la zona situada inmediatamente después de la matriz porosa donde reacciona el AmpliFlu Red que fluye, así como de la zona previa a la conversión del sustrato en la trampa magnética (**Fig. 36**). Se aplicó un flujo del mismo sustrato fluorogénico a $100 \mu\text{L h}^{-1}$ durante 2 min como paso de lavado entre cada medición para llevar la señal de fluorescencia generada a niveles basales. Se empleó un microscopio de fluorescencia invertido (Axio vert A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania) con un objetivo de 10x. Se utilizó un juego de filtros (Filter Set 43, Carl Zeiss) y una cámara monocromática (Moment, CMOS Camera Teledyne, A20K635006) para capturar la intensidad de fluorescencia en escala de grises. Para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizó un script de MATLAB. Se utilizó el valor diferencial de fluorescencia (Después-Antes) en el estado estacionario para obtener los gráficos de cambios de intensidad de fluorescencia (**Fig. 37**). Se incluyó una curva estándar empleando concentraciones conocidas de Ab1 para analizar semicuantitativamente las muestras serológicas. Los gráficos se realizaron con el programa Sigma Plot (Systat Software Inc.)

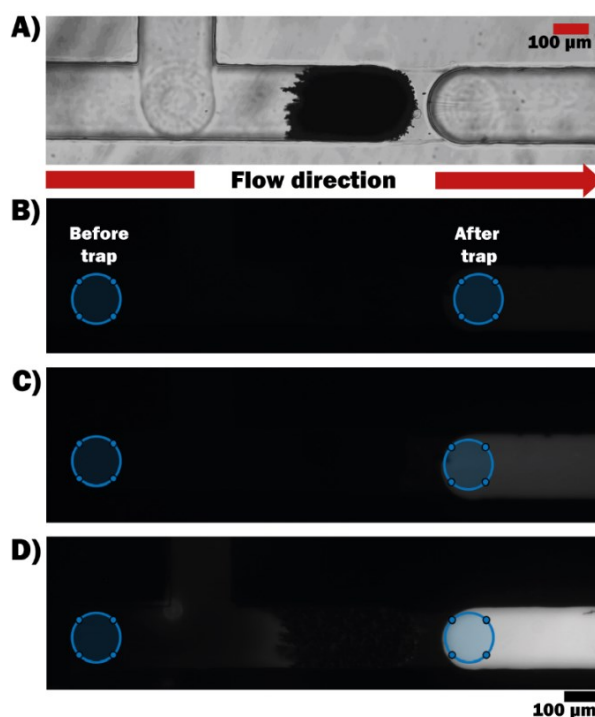


Figura 36. Zonas de medición de la fluorescencia. **A)** Trampa magnética de MPFMs de $7 \mu\text{m}$ (± 2) (campo claro). Las regiones de medición de fluorescencia se fijaron Antes (Before Trap) y Después (After Trap) de la trampa magnética microfluídica. Para cada concentración conocida de Ab1 se aplicó un rango de flujo para el sustrato fluorogénico AmpliFlu Red durante 6 min. Las imágenes de fluorescencia muestran la señal obtenida a **B)** $20 \mu\text{L h}^{-1}$, **C)** $5 \mu\text{L h}^{-1}$ y **D)** $1 \mu\text{L h}^{-1}$ para una concentración de 10 ng mL^{-1} de Ab1 anti-Lisozima.

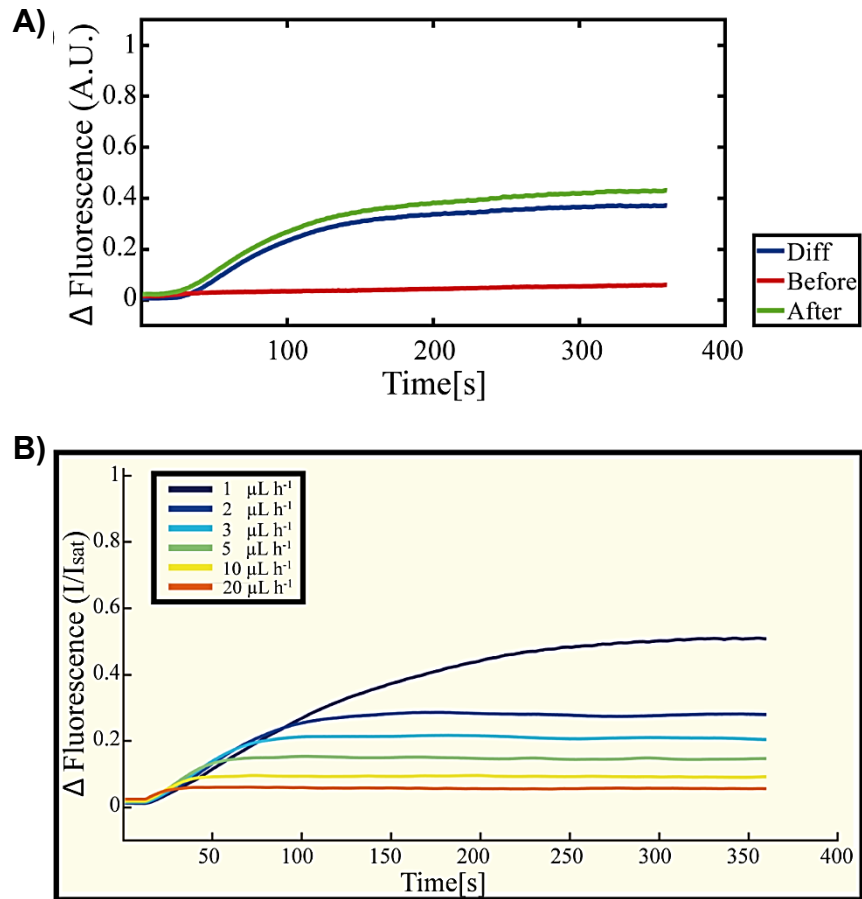


Figura 37. Evaluación del cambio en la intensidad de fluorescencia para cuantificar la interacción del complejo antígeno-anticuerpo. **A)** Se obtuvo la intensidad de fluorescencia diferencial (azul) entre ambas áreas de medición (Después (verde)-Antes (rojo)) con respecto del tiempo. La imagen muestra un gráfico representativo para una concentración de Ab1 de 10 ng mL^{-1} a un flujo de $2 \mu\text{L h}^{-1}$ de sustrato. Dicha diferencia permite eliminar la señal de fondo. La señal se normalizó con respecto de la escala de grises detectada por la cámara monocromática. **B)** Se muestra el perfil de intensidad de fluorescencia diferencial en función del tiempo para los diferentes flujos de sustrato ($1\text{-}20 \mu\text{L h}^{-1}$) a una concentración dada de anticuerpo primario (10 ng mL^{-1}). A partir de cada medición, se obtuvo el valor diferencial (Δ) de la intensidad de fluorescencia una vez alcanzado el estado estacionario.

Resultados

1. Curva de calibración para lisozima

Optimizamos el rendimiento de tres protocolos diferentes de inmunoensayo utilizando nuestro dispositivo microfluídico. Para el enfoque del inmunoensayo en extenso, el inmunocomplejo NPM-Ag-Ab1-Ab2 se formó fuera del chip y se capturó en la trampa magnética para la medición de fluorescencia. La **Figura 38A** muestra el gráfico logarítmico del valor diferencial (Δ) de la intensidad de fluorescencia normalizada para diferentes concentraciones de Ab1 anti-lisozima ($0.1\text{-}100 \text{ ng mL}^{-1}$). El mejor ajuste lineal ($R^2 = 0.99$) se obtuvo a $10 \mu\text{L h}^{-1}$ sin necesidad de un tratamiento adicional de los datos (**Fig. 38D**).

La **Figura Suplementaria 6** muestra el perfil completo de Δ de la intensidad de fluorescencia para el rango de concentraciones de Ab1 probadas, donde se observa una mejor tendencia lineal a medida que aumenta el flujo aplicado para el sustrato fluorogénico. El límite de detección (LOD) se calculó a partir de la ecuación $\text{LOD} = 3.3 \sigma/S$, donde S es la pendiente de la curva de calibración y σ es la desviación estándar del blanco⁸³. Se obtuvo un valor de 3.3 ng mL^{-1} para el LOD utilizando el protocolo extendido de inmunoensayo (**Ver Apéndice I** para el cálculo de LOD).

Posteriormente, optimizamos este protocolo aprovechando las propiedades magnéticas de las NPMs de 100 nm, disminuyendo así los tiempos de separación para los pasos de lavado (protocolo reducido). La **Figura 38B** muestra el gráfico en escala semi-logarítmica del valor Δ de intensidad de fluorescencia normalizado para las mismas concentraciones de Ab1 anti-lisozima probadas anteriormente. En este caso, el mejor ajuste lineal se obtuvo a un flujo de $20 \mu\text{L h}^{-1}$ de sustrato ($R^2 = 0.98$) (**Fig. 38E**). La **Figura Suplementaria 7** muestra el ajuste lineal completo para cada flujo aplicado. El LOD obtenido mediante este protocolo de inmunoensayo fue de 10.1 ng mL^{-1} .

Finalmente, adaptamos el protocolo implementado por Teste et al⁷⁷ y también empleado por Guevara-Pantoja et al²⁴, donde la captura del Ab1 diana ocurre en la fase coloidal (fuera del chip) y la interacción del Ab2 ocurre en la fase heterogénea, en la matriz porosa de la trampa magnética (dentro del dispositivo). La **Figura 38C** muestra el gráfico de la intensidad del valor Δ de intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones de Ab1 anti-lisozima empleadas ($1\text{-}750 \text{ ng mL}^{-1}$) utilizando el protocolo completo dentro del chip. Se observó una reducción en la intensidad de la señal debido a la incubación del Ab2 en flujo continuo en el chip ($20 \mu\text{L h}^{-1}$). Sin embargo, se logró un aumento significativo en el rango dinámico en comparación con los dos protocolos anteriores, con el mejor ajuste lineal obtenido a un flujo de $20 \mu\text{L h}^{-1}$ (**Figura 38F**). El LOD se redujo a 231 pg mL^{-1} . Como en los casos anteriores, la **Figura Suplementaria 8** muestra el perfil completo del ajuste lineal para cada flujo aplicado mediante el enfoque de ELISA microfluídico mixto.

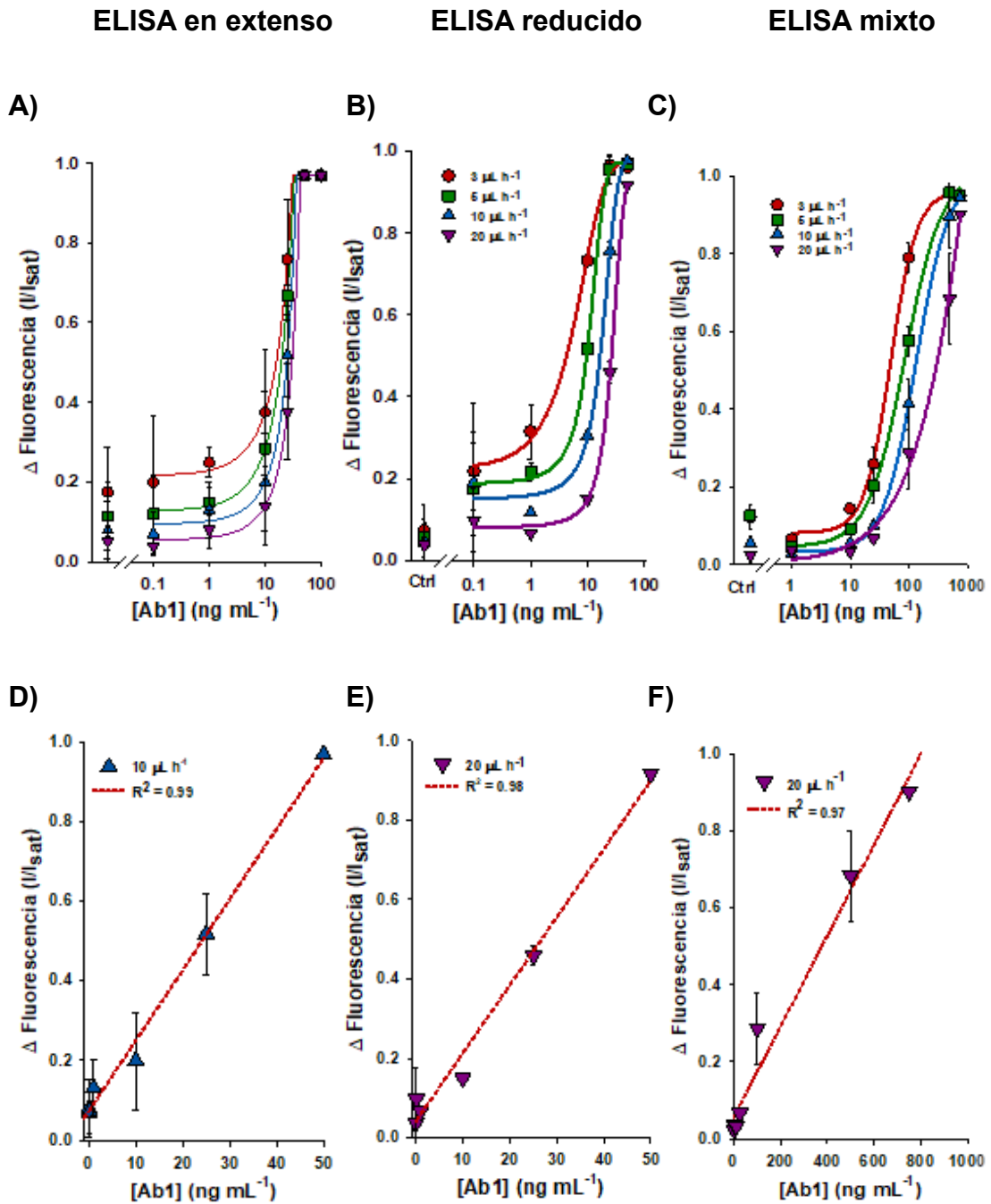


Figura 38. Curvas de calibración para Ab anti-lisozima. El valor diferencial de la intensidad de fluorescencia en el estado estacionario se graficó en escala semi-logarítmica para diferentes valores de Ab1 anti-lisozima obtenido mediante **A)** el protocolo de ELISA extendido, **B)** reducido y **C)** mixto. Se aplicaron varios flujos (3, 5, 10 y 20 μ L h⁻¹) para el sustrato fluorogénico AmpliFlu Red. El valor de fluorescencia se normalizó con respecto a los valores de intensidad de la cámara monocromática empleada. El mejor ajuste lineal se obtuvo a 10 μ L h⁻¹ para el protocolo extendido **(D)**, mientras que para el protocolo reducido y mixto, el mejor ajuste lineal se obtuvo a 20 μ L h⁻¹ **(E y F)**, respectivamente.

2. Diferentes tamaños de la trampa en el inmunoensayo

Evaluamos el efecto de tres tamaños diferentes de trampas magnéticas sobre el rendimiento del ELISA utilizando el protocolo mixto. La trampa pequeña tuvo una longitud de $\sim 200 \mu\text{m}$, la trampa mediana corresponde a la medida normalmente empleada en nuestros inmunoensayos y fue de $\sim 400 \mu\text{m}$; finalmente, la trampa grande abarcó toda el área disponible para la formación de la columna con una dimensión de $\sim 800 \mu\text{m}$. Previamente se reportó la reproducibilidad del tamaño deseado de la trampa a pesar de carecer de un control fino para su formación (**Fig. 30**).

A través del análisis de varianza de dos vías (ANOVA), analizamos la interacción entre los efectos de la tasa de flujo empleado para el sustrato AmpliFlu Red y el tamaño de la columna de MPFMs sobre el valor Δ de la señal de fluorescencia obtenida. Reynoso-Hernández et al. mostró previamente la dependencia del tamaño de la columna de MPFMs en la trampa magnética sobre la eficiencia de captura de nanopartículas, fenómeno que además describe, no depende del estado de compactación⁷⁶. Con base en estos resultados, cuando se realiza el inmunoensayo con una trampa de menor tamaño, la señal debería disminuir como resultado de una menor captura de NPMs con proteína conjugada y por ende, una menor concentración del inmunocomplejo y viceversa. Observamos una disminución en la señal de fluorescencia al reducir el tamaño de la columna de aproximadamente $400 \mu\text{m}$, que es el tamaño normalmente empleado, a una columna de MPFMs de menor tamaño, de aproximadamente $200 \mu\text{m}$. Sorprendentemente, y contrario a las expectativas, para la trampa de mayor tamaño, la señal también se redujo significativamente para los flujos de 3 y $5 \mu\text{L h}^{-1}$ (**Fig. 39**).

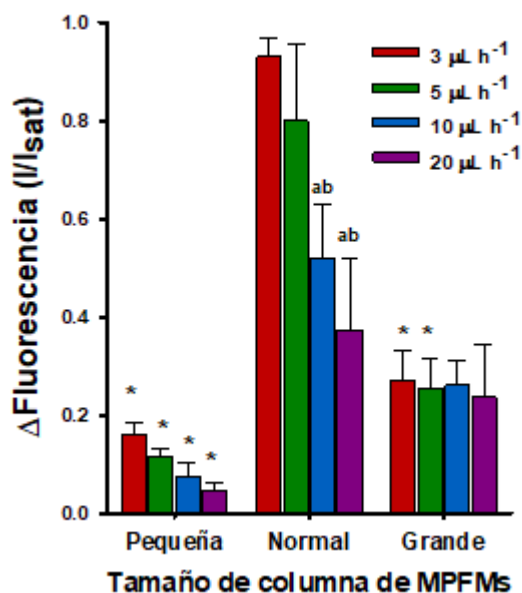


Figura 39. Efecto del tamaño de trampa sobre el inmunoensayo. La gráfica resume el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para los valores medios de Δ fluorescencia ($n = 3$). a, significancia vs. $3 \mu\text{L h}^{-1}$; b, significancia vs. $5 \mu\text{L h}^{-1}$ dentro de cada grupo; *, significancia vs. grupo Normal. $P < 0.05$ (Nota: dentro del grupo Normal $P < 0.001$).

3. Diferentes concentraciones de NPMs en el inmunoensayo

Evaluamos también el efecto de la concentración de NPMs capturadas en la trampa magnética sobre el rendimiento del inmunoensayo. Primero, a través de la absorbancia de concentraciones conocidas de NPMs de 100 nm, calculamos una concentración de 0.5 mg mL^{-1} de NPMs con la proteína lisozima conjugada localizadas en la fracción recuperada del sobrenadante empleada para los inmunoensayos (**Fig. 40**). Para nuestros experimentos, utilizamos un volumen de $2 \text{ }\mu\text{L}$ de dicha suspensión de NPMs como estándar por inmunoensayo, los cuales son diluidos en un volumen final de $50 \text{ }\mu\text{L}$ (buffer de dilución de Abs + Ab1). Por tanto, la concentración final de NPMs ingresada al dispositivo fue de $20 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. La **Figura 41** muestra que no hay diferencias significativas en el valor Δ de fluorescencia cuando variamos la concentración de NPMs en el dispositivo en un rango entre $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (la mitad de la concentración de NPMs normalmente empleada) y $40 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (el doble de la concentración de NPMs normalmente empleada). A través del análisis de varianza de dos vías (ANOVA) determinamos que no hay una interacción estadísticamente significativa entre la concentración de NPMs y la tasa de flujo aplicada ($3\text{-}20 \text{ }\mu\text{L h}^{-1}$) sobre el valor Δ de intensidad de fluorescencia ($P=0.738$).

No obstante, los resultados del inmunoensayo sí se vieron afectados cuando usamos diferentes lotes de NPMs con proteína conjugada debido a la variabilidad durante el proceso de conjugación de la proteína diana a las NPMs (**Fig. 42**). Por esta razón, optamos por realizar en triplicado (al menos) cada reacción de conjugación y mezclar el sobrenadante recuperado de cada una de ellas en un solo vial con el objetivo de aumentar el volumen de muestra obtenido y reducir la variabilidad observada en lotes independientes.

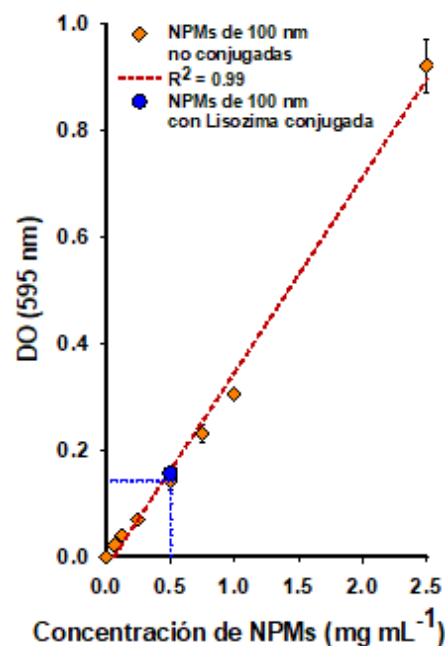


Figura 40. Estimación de la concentración de NPMs con S1 conjugada. Se determinó una concentración de 0.5 mg mL^{-1} de NPMs con lisozima conjugada para la fracción recuperada del sobrenadante mediante una curva de calibración de absorbancia a 595 nm de concentraciones conocidas de NPMs en suspensión. DO: Densidad óptica; $n=3$.

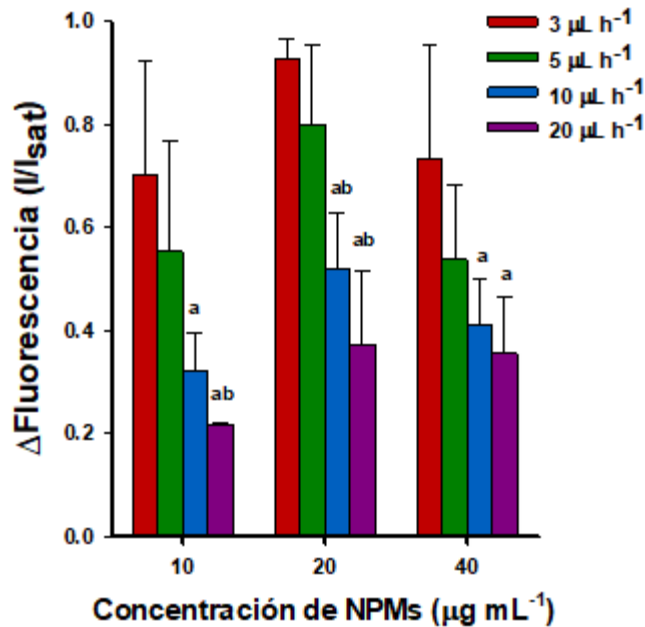


Figura 41. Efecto de la concentración de NPMs sobre el rendimiento del inmunoensayo. La gráfica muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en el Δ de la intensidad de fluorescencia con respecto de la concentración de NPMs empleadas. a, significancia vs. flujo de $3 \mu\text{L h}^{-1}$; b, significancia vs. flujo de $5 \mu\text{L h}^{-1}$ dentro de cada grupo. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre el volumen de NPMs empleado y el flujo aplicado. $P = 0.738$; $n=3$.

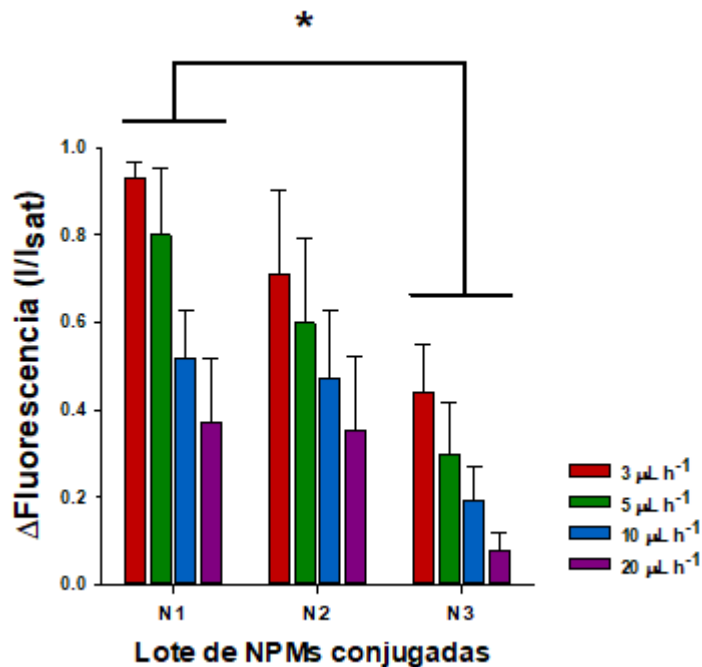


Figura 42. Efecto de la variabilidad en el proceso de conjugación de lisozima. El gráfico muestra el valor Δ de intensidad de fluorescencia mediante el ELISA mixto para tres lotes independientes de NPMs de 100 nm (N1, N2 y N3) con la proteína lisozima conjugada en su superficie. El ANOVA confirmó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos N1 y N3 para todos los flujos de sustrato empleados. *, $P < 0.05$.

Discusión

Logramos optimizar el uso de NPMs de 100 nm de diámetro como soporte para ELISAs. Adaptamos el protocolo de un ELISA indirecto para la detección cuantitativa de anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno diana inmovilizado sobre la superficie de las NPMs. Empleamos NPMs de 100 nm de diámetro a las cuales se les conjugó previamente la lisozima de clara de huevo de pollo, que sirvió como antígeno modelo para estandarizar el desarrollo del ELISA con nuestro dispositivo microfluídico.

En primer lugar, el inmunoensayo extendido está basado en los pasos típicos de un ELISA convencional en microplaca. El protocolo extendido integra 3 pasos de lavado después del bloqueo con 5% de BSA y tras la incubación de cada anticuerpo (Ab1 y Ab2). Un paso de lavado consistió en la sustitución de la solución de lavado 1X TBST, la agitación y separación magnética. Empleamos la gradilla de separación MagJET para tubos de 1.5 mL de capacidad, la cual permite la separación en tan solo 5-10 min. Nosotros establecimos un tiempo de separación de 15 min para no correr el riesgo de perder la muestra dada la baja concentración de NPMs empleadas.

En todos los experimentos de optimización se utilizaron únicamente 2 μL de la suspensión de NPMs recuperadas del sobrenadante a una concentración de 0.5 mg mL^{-1} . No obstante, decidimos mezclar el sobrenadante de 3 conjugaciones (viales de reacción no. 3, 4 y 5), con el objetivo de reducir la variabilidad existente entre lotes. Asimismo, con el objetivo de optimizar el uso de las NPMs conjugadas, evaluamos el efecto de la concentración empleada de NPMs con proteína conjugada sobre el rendimiento de la ELISA en el dispositivo. Los resultados mostraron que no existe una diferencia significativa para un rango de concentraciones entre 10 y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nuestro dispositivo incorpora un sistema de preconcentración dentro de la matriz porosa que integra la trampa magnética de micropartículas de $7 \mu\text{m}$, por tanto, consideramos que una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la suspensión de NPMs con lisozima conjugada es suficiente para saturar nuestro sistema de captura. Dicho valor corresponde a un volumen de tan solo $1 \mu\text{L}$ de la suspensión de NPMs. Con base en estos resultados, para ensayos posteriores empleamos tan solo $1 \mu\text{L}$ de la suspensión de NPMs. De hecho, en un sistema similar al nuestro previamente implementado por Teste et al. para la captura de NPMs de 35 nm reportaron que tan solo entre el 0.05 y el 7.5% del total de NPMs finalmente quedó atrapado en su cámara de captura y que este valor dependía de la concentración de NPMs empleada²³.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación reportó que cuando las MPFMs se empaquetan dentro de un microcanal formando una columna, como es el caso de la trampa magnética empleada, la captura de NPMs de 10 nm dependía de la longitud de dicha columna en lugar de su densidad dada por la compactación⁷⁶. En este caso, decidimos evaluar el efecto de la longitud de nuestra columna de MPFMs sobre el rendimiento del inmunoensayo. La región del dispositivo contemplada entre el canal lateral y la restricción de $5 \mu\text{m}$ de altura tiene una longitud de $800 \mu\text{m}$, en la cual se construye la columna de MPFMs que integra la trampa magnética al acercarse un imán externo. En la **Fig.**

39 se aprecia una disminución de la señal de fluorescencia al reducir por la mitad el tamaño de la columna normalmente empleada de MPFMs. A su vez, la señal también se redujo significativamente con los flujos de 3 y 5 $\mu\text{L h}^{-1}$ cuando el tamaño de la columna fue duplicado. No obstante, el hecho de no existir dependencia de la señal de fluorescencia con el flujo aplicado, nos hace suponer que el comportamiento observado para este caso corresponde más bien a un aumento en la resistencia al flujo a través de la constricción, algo que también se observó en algunos experimentos fallidos con la trampa de tamaño normal (No mostrado). Sin embargo, faltaría medir la resistencia generada para confirmar esta hipótesis.

Otro aspecto muy importante a caracterizar en nuestro sistema de inmunoensayo fue el protocolo de lavado. Cada una de las mediciones realizadas a los diferentes flujos del sustrato (3, 5, 10 y 20 $\mu\text{L h}^{-1}$) fueron realizadas de manera consecutiva y el sustrato siempre se mantuvo en flujo constante. Por tanto, el paso de lavado consistió en hacer fluir dicho sustrato a una velocidad tal que no permita ser convertido por la enzima inmovilizada. Esto a su vez permite llevar el sistema a un nivel de ruido basal para limpiar eficientemente la señal de fluorescencia obtenida en una medición y permitir la siguiente medición. Encontramos que hacer fluir el sustrato fluorogénico a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$ por tan solo 2 min era suficiente para limpiar la señal obtenida aun para concentraciones altas de anticuerpo (**Fig. Suplementaria 9**) lo cual elimina por completo la necesidad de emplear alguna solución de lavado adicional, simplificando enormemente nuestro sistema. Además, los niveles de fluorescencia detectados después del lavado es suficientemente baja y comparable a la señal en la zona previa a la trampa. Esto ofrece una ventaja importante, lo cual permitiría la detección de la señal en una única zona (después de la trampa) simplificando aún más la medición en nuestro sistema e incluso ser compatible con métodos de detección alternativos, por ejemplo quimioluminiscentes, electroquímicos o el uso de fibras ópticas.

No obstante, un aspecto muy importante que se tuvo en cuenta fue la vida útil de nuestro sustrato fluorogénico para la realización de las diferentes mediciones. Debido al tiempo requerido para la realización del inmunoensayo en nuestro dispositivo, nos percatamos que la oxidación del sustrato AmpliFlu Red afectaba nuestras mediciones, teniendo valores basales mayores entre diferentes experimentos (**Fig. Suplementaria 10**). Por tal motivo, fue importante la preparación del vial de sustrato 10 min antes de su uso y preparar cada vial con el volumen requerido para cada experimento.

Por otro lado, explotamos las propiedades magnéticas de las NPMs para optimizar los tiempos de lavado. En un segundo enfoque, el inmunoensayo reducido integró pasos de lavado sin tener que despegar el pellet formado en la pared del tubo una vez separadas del buffer que las contenía. El aspecto más destacado de estos dos protocolos (extendido y reducido) es que, mediante la formación del inmuno-complejo PMNPs-Ag-Ab1-Ab2 fuera del chip, una gran parte de las moléculas no unidas fue fácilmente eliminada por los pasos de lavado tras la separación magnética en la gradilla

MagJET, lo que permitió una señal de ruido bastante baja y, por lo tanto, valores bajos en el LOD (3.3 y 10.1 ng mL⁻¹, respectivamente).

No obstante, en ambos protocolos de inmunoensayo, el inmunocomplejo NPM/Ag-Ab1-Ab2 se forma previamente fuera del chip y el dispositivo se ve limitado solo para la captura y detección, interfiriendo a su vez en el desarrollo de una plataforma completamente integrada y automatizada. Por lo tanto, adaptamos el protocolo implementado en el trabajo previo de Guevara-Pantoja et al, maximizando las propiedades homogéneas del inmunoensayo mediante la formación del complejo NPPM-Ab en la fase coloidal. A su vez, la interacción del Ab2 se realizó mediante un enfoque de inmunoensayo heterogéneo, con el complejo NPM/Ag-Ab1 previamente capturado en la trampa. En este nuevo enfoque se minimiza el empleo de la gradilla de separación, ya que los lavados para eliminar el exceso de Ab1 y Ab2 se realizan dentro del dispositivo, mediante un lavado en flujo continuo.

Según lo reportó Teste *et al.*, al desarrollar un inmunoensayo de este tipo, la cuantificación de Ab1 se basa principalmente en la optimización de la captura de Ab1 por la suspensión de NPMs-Ags durante la incubación. La ventaja de las NPMs como soporte fue principalmente el comportamiento coloidal y movimiento Browniano, lo cual favorece la difusividad molecular y acelera la cinética de captura de Ab1. Nosotros empleamos un tiempo de incubación de 30 mins a 37 °C en condiciones estáticas. Por el contrario, en un ELISA convencional en placa de micropozos, los tiempos de incubación con el Ab1 ascienden a 2 horas. Intentamos reducir este tiempo a 15 min, sin embargo, no obtuvimos los mismos resultados en la detección (experimentos no mostrados).

Un aspecto muy importante en la optimización del tercer enfoque de ELISA mixto fue la reducción de 5 veces la concentración molar de Ab2 (0.2 µg mL⁻¹) en comparación con la concentración empleada en los otros dos enfoques del ELISA (1 µg mL⁻¹). La **Figura Suplementaria 11** describe la optimización de esta concentración requerida de Ab2 para este protocolo de inmunoensayo. La necesidad de optimizar esta concentración fue debido a la presencia de una zona de estancamiento dentro de la columna porosa, junto a la constricción, la cual fue reportada en un trabajo previo en nuestro laboratorio y se caracteriza por tasas de flujo extremadamente bajas⁷⁶, lo que resultó en una señal de ruido elevada, incluso después del lavado para eliminar el exceso de Ab2 no unido.

El LOD logrado con este tercer enfoque para la detección de Abs anti-lisozima fue de 231 pg mL⁻¹. Además de lograr un LOD más bajo comparado con los otros dos protocolos (extenso y reducido), este tercer enfoque mixto ofrece un rango dinámico mayor, lo que permite la construcción de curvas de calibración más útiles para analizar muestras de concentración desconocida. De este modo, el protocolo del ELISA mixto chip minimiza la manipulación de muestras, lo que es crucial para su potencial aplicación en la detección de anticuerpos en muestras infecciosas.

Capítulo VII. Análisis de muestras serológicas en el dispositivo microfluídico

Material y métodos

1. Conjugación de NPMs de 100 nm a S1

A través del protocolo de conjugación de dos pasos, conjugamos las NPMs de 100 nm con la Subunidad S1 Recombinante del SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40591-V08H3) como prueba de la versatilidad de nuestro sistema de inmunoensayos. Se mantuvieron las condiciones descritas para el protocolo de conjugación empleado para la lisozima: una concentración de 1 mg mL^{-1} de la proteína y una relación molar de 10:1 de EDC y Sulfo-NHS con respecto de la proteína. De igual manera, se recuperó el sobrenadante tras 5 días de sedimentación en reposo de 3 viales de conjugación independientes.

2. ELISA microfluídico para Abs anti-S1

Se realizaron las curvas de calibración empleando concentraciones conocidas de dos anticuerpos comerciales específicos: (1) mAb1 quimérico anti-S1 (Sino Biological, 40150-D003) y (2) Anti-SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody (Sino Biological, KIT003). Se realizó el análisis de las muestras serológicas obtenidas de un donador positivo a la infección del virus SARS-CoV-2. Se empleó el enfoque del ELISA microfluídico mixto, con los parámetros optimizados descritos en apartados anteriores para el ELISA con Abs anti-lisozima, es decir, $1 \text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión de NPMs, una dilución optimizada de 1:2,500 ($0.24 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) para el anticuerpo secundario policlonal (pAb2) de Conejo Anti-Humano IgG-Fc acoplado a HRP (Sino Biological, 10702-T16-H).

3. Obtención de muestras de suero

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por venopunción de un paciente positivo a la infección por el virus SARS-CoV-2, confirmado en un laboratorio clínico mediante la prueba de antígeno en hisopado nasofaríngeo para SARS-CoV-2. La aparición de los primeros síntomas tras la fase de infección por el virus en el paciente donador de las muestras ocurrió a finales de la semana 24 de 2022 y corresponde a la quinta ola de contagios reportada en México (SE 22 de 2022 a la SE 33 de 2022), en la que la variante Ómicron se convirtió en la más prevalente entre los casos reportados³². Las muestras de sangre se tomaron a lo largo de diferentes días tras el inicio de los síntomas de COVID-19 (Días 1, 14, 21, 28, 90, 150 y 360). La sangre se extrajo en tubos de recolección de 6 mL de capacidad con activador de coagulación (Vacutest, Kima). Las muestras colectadas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la coagulación. Posteriormente, el tubo se centrifugó a $1,600 \text{ g}$ durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante se colectó cuidadosamente con una pipeta para evitar perturbar el sedimento. Por último, el plasma separado se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso en microtubos de reacción en alícuotas de 10 y $100 \text{ }\mu\text{L}$.

Resultados

1. Conjugación de NPMs a S1

La **Figura 43** muestra la membrana revelada del dot blot para NPMs de 100 nm con la subunidad S1 conjugada. La eficiencia de la conjugación se evaluó de manera indirecta, de la misma manera que se describió para la lisozima (**Tabla 6**). De manera análoga a lo observado para la lisozima, para el caso de la subunidad S1 también se obtuvo un mejor rendimiento en la conjugación para NPMs de 100 nm con respecto de otros tamaños (**Fig. Suplementaria 12**). La **Figura 44** muestra a su vez la curva de calibración obtenida con concentraciones conocidas de NPMs de 100 nm sin conjugar. Dicha curva de calibración permitió determinar la concentración de NPMs provenientes de tres lotes de conjugación, las cuales fueron colectadas del sobrenadante tras 5 días de sedimentación y mezcladas en un único vial. La concentración calculada fue de 0.3 mg mL⁻¹.

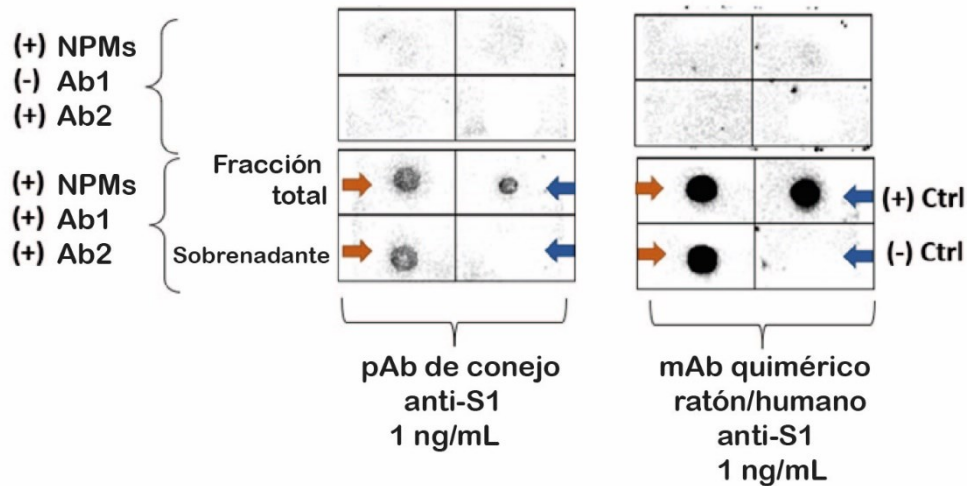


Figura 43. Evaluación de la conjugación de la subunidad S1 a las NPMs de 100 nm por dot blot. Se muestra el dot blot para NPMs de 100 nm conjugadas a S1 a través del protocolo de dos pasos. La especificidad del anticuerpo utilizado se probó con una segunda membrana (superior). La alta afinidad del anticuerpo monoclonal (mAb) (derecha) se contrastó con un anticuerpo policlonal (pAb) de conejo también dirigido contra la subunidad S1 (izquierda).

No. de reacción	[Proteína inicial] (mg mL ⁻¹)	[Proteína no conjugada] (mg mL ⁻¹)	[Proteína conjugada] (mg mL ⁻¹)	Eficiencia de conjugación (%)
1	1	0.552	0.448	44.8
2	1	0.538	0.462	46.2
3	1	0.077	0.923	92.3

Tabla 6. Eficiencia de conjugación de S1 a NPMs de 100 nm. Se calculó la eficiencia de conjugación de 3 reacciones independientes mediante el cálculo indirecto de la concentración de proteína no conjugada mediante el método de BCA.

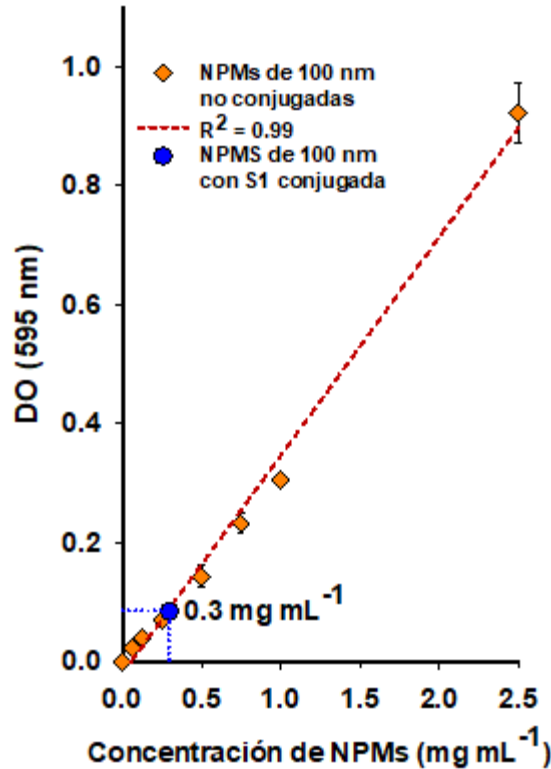


Figura 44. Estimación de la concentración de NPMs con S1 conjugada. Se determinó una concentración de 0.3 mg mL^{-1} de NPMs conjugadas con lisozima en la fracción recuperada del sobrenadante mediante una curva de calibración de absorbancia a 595 nm de concentraciones conocidas de NPMs en suspensión. DO: Densidad óptica; $n=3$.

2. Curva de calibración para S1

Realizamos inmunoensayos utilizando el enfoque de ELISA mixto según el protocolo previamente descrito y estandarizado con las NPMs conjugadas con lisozima. Para esta serie de experimentos utilizamos únicamente $1 \mu\text{L}$ de la suspensión de NPMs a una concentración de 0.3 mg mL^{-1} con S1 conjugada. La **Figura 45A** muestra la gráfica en escala semilogarítmica del valor Δ de fluorescencia para diferentes concentraciones de mAb1 anti-S1 empleadas ($100\text{-}3,000 \text{ pg mL}^{-1}$) a los flujos probados ($3\text{-}20 \mu\text{L h}^{-1}$). Es posible observar la saturación a los $1,500 \text{ pg mL}^{-1}$ para los flujos de $5, 10$ y $20 \mu\text{L h}^{-1}$. La **Figura 45B** muestra el rango lineal para cada uno de los diferentes flujos. No obstante, cuando nosotros empleamos un anticuerpo policlonal el comportamiento de esta curva se modifica. La **Figura 45C** muestra la gráfica en escala semilogarítmica del valor Δ de intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones de pAb1 anti-S1 empleadas ($100\text{-}7,500 \text{ pg mL}^{-1}$). Las curvas presentan un mayor rango dinámico independientemente del flujo empleado, con valores que alcanzan hasta los $5,000 \text{ pg mL}^{-1}$ (5 ng mL^{-1}) y niveles de intensidad de fluorescencia también superiores, lo que favorece su aplicación como curva estándar para muestras biológicas. La **Figura 45D** muestra el ajuste lineal para cada uno de los flujos aplicados.

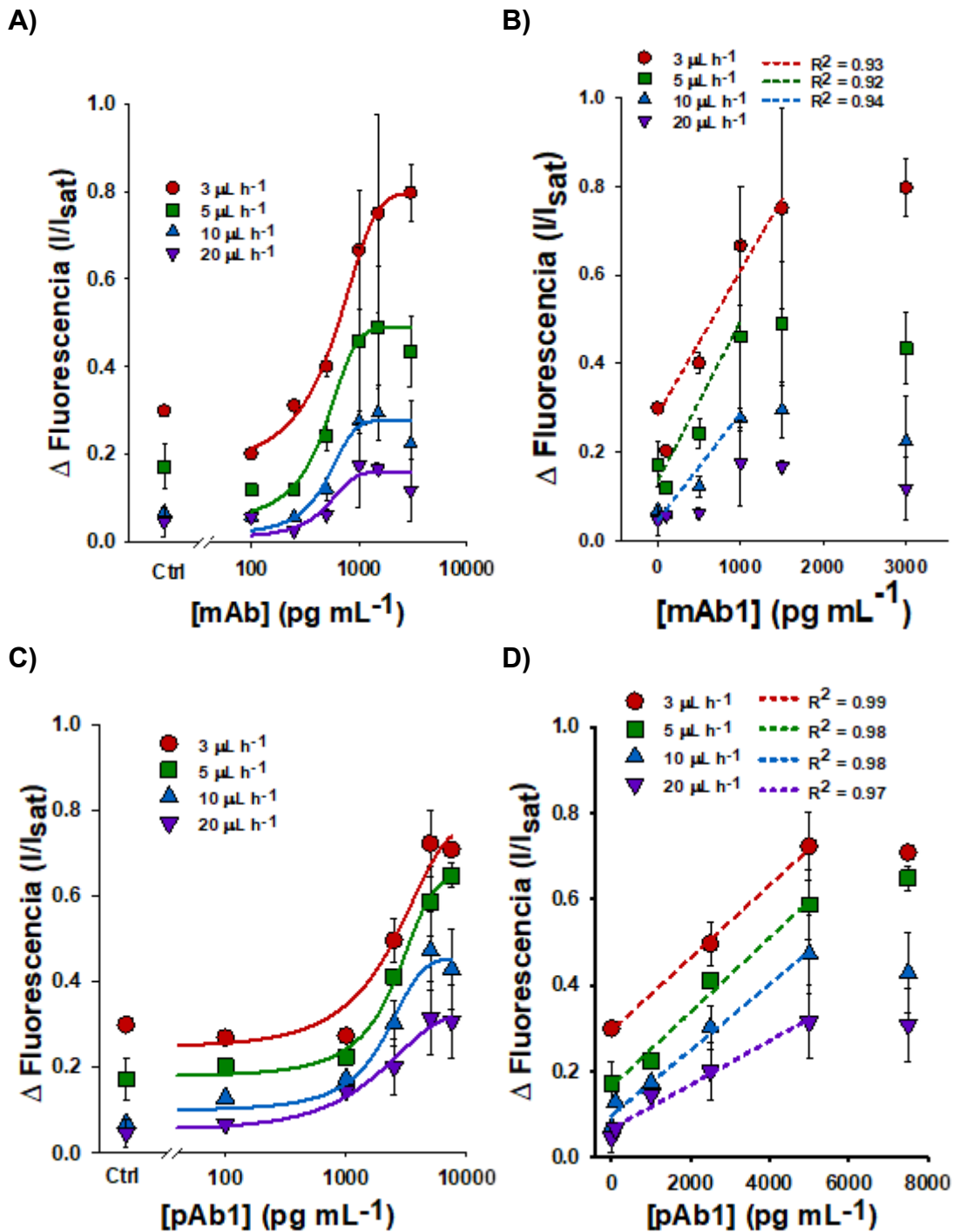


Figura 45. Curva de calibración para la cuantificación del anticuerpo anti-S1. **A)** El gráfico muestra los valores de Δ de fluorescencia en una escala semilogarítmica para diferentes concentraciones de mAb anti-S1 probadas (100-3,000 pg mL⁻¹) a tasas de flujo de 3, 5, 10 y 20 μ L h⁻¹, respectivamente mediante el ELISA mixto. **B)** La línea punteada muestra el ajuste lineal correspondiente a cada flujo aplicado. **C)** Δ de fluorescencia en escala semilogarítmica para diferentes concentraciones de pAb anti-S1 probadas (100-7,500 pg mL⁻¹). **D)** De igual manera, la línea punteada muestra el ajuste lineal correspondiente a cada flujo aplicado. n=3.

Por otro lado, el LOD calculado para la curva de calibración obtenida cuando se emplea el mAb1 fue de 823 fg mL^{-1} , mientras que el LOD obtenido para el pAb1 fue de 205.8 pg mL^{-1} . No obstante, a pesar de tener un LOD mayor, esta última curva de calibración integrada por concentraciones conocidas de anticuerpo policlonal dirigido contra S1 es la que permite el análisis cuantitativo de muestras serológicas. Esto debido a la naturaleza policlonal de los Abs IgG circulantes en la sangre que son generados durante la respuesta inmune (**Fig. 46**).

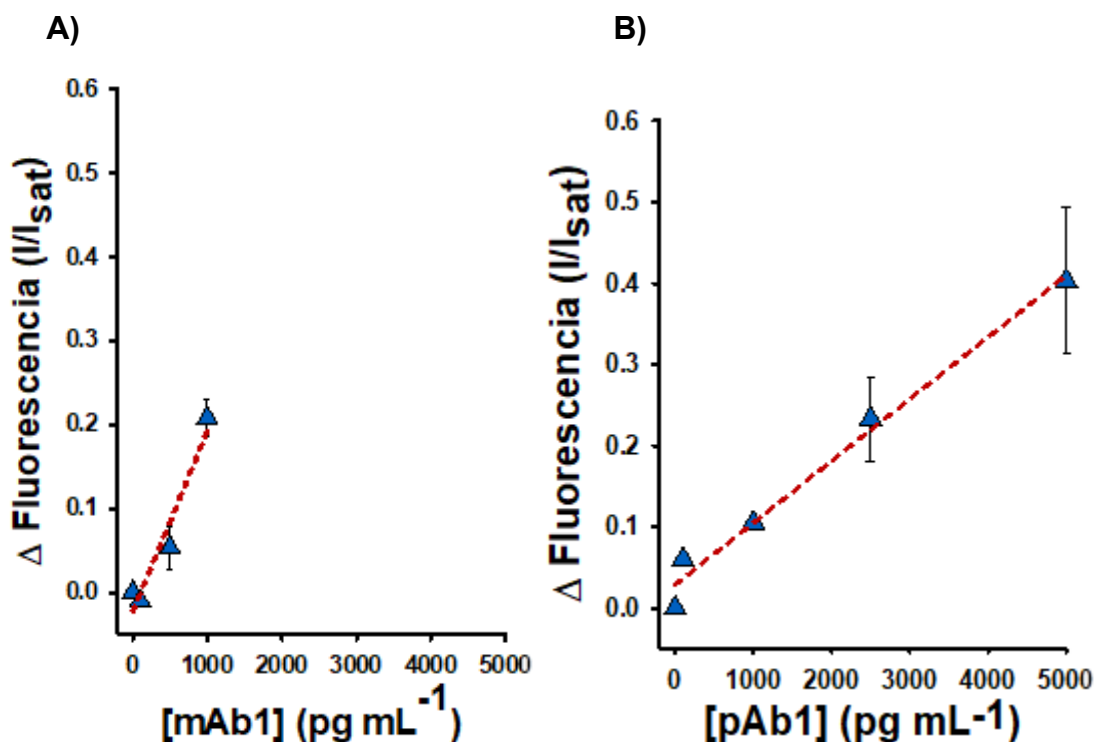


Figura 46. Curva estándar para NPMs de 100 nm con la subunidad S1 conjugada. **A)** Se muestra la curva estándar para diferentes valores de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-S1 empleando un flujo de $10 \mu\text{L h}^{-1}$ utilizando el ELISA mixto en el chip. **B)** Por su parte, se muestra la curva estándar empleando un anticuerpo policlonal (pAb) para la cuantificación de muestras serológicas empleando el mismo flujo de sustrato y el protocolo de inmunoensayo que la curva en el inciso A. LOD = 205.8 pg mL^{-1} ; n=3.

3. Dilución de muestras de suero

Se probaron diferentes diluciones de la muestra de suero tomadas el día 1 (1:5,000, 1:25,000, 1:50,000 y 1:250,000) mediante el ELISA mixto para encontrar la dilución óptima para el análisis con nuestro dispositivo microfluídico. La **Figura 47** muestra los valores saturados de Δ fluorescencia para las diluciones de suero 1:5,000 y 1:250,000. Consideramos que una dilución de 1:250,000 es óptima para modular la señal de fluorescencia detectada en nuestro dispositivo en un rango de valores cuantificables. Además, esta dilución proporciona un margen adecuado para la medición de señales tanto más bajas como más altas en comparación con la muestra utilizada inicialmente, favoreciendo la detección precisa de muestras en días posteriores.

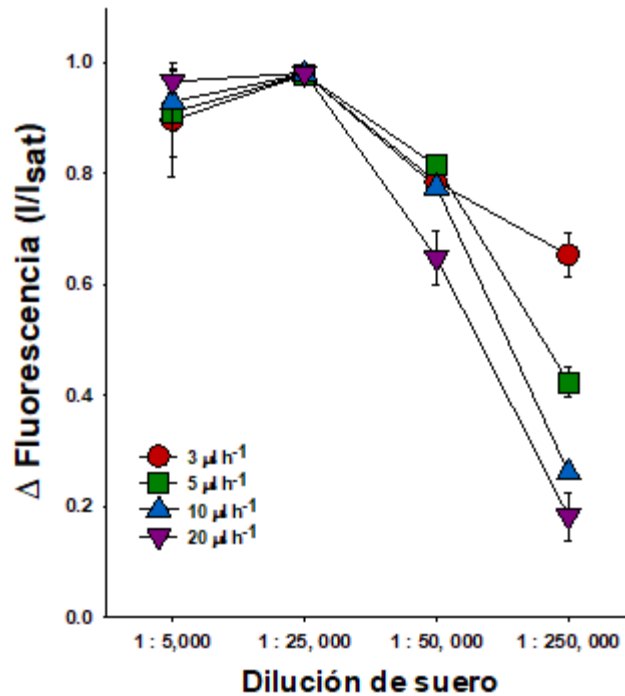


Figura 47. Optimización del inmunoensayo en el chip utilizando diferentes diluciones de suero humano positivo a la infección de SARS-CoV-2. Se utilizó una muestra de suero obtenida 1 día después del inicio de los síntomas de la enfermedad por COVID-19 para determinar la dilución del suero requerida en nuestro dispositivo. Se consideró una dilución de 1:250,000 como óptima para evaluar la intensidad de la señal de fluorescencia en un rango medible.

4. Curso temporal de IgG anti-S1 mediante el dispositivo

Las muestras de suero obtenidas de un donador seropositivo en diferentes días desde el inicio de los síntomas de COVID-19 (día 1, 14, 21, 28, 90, 150 y 360) fueron analizadas para probar la cantidad de anticuerpos IgG dirigidos a la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2. Todos los experimentos se realizaron utilizando las condiciones optimizadas del ELISA mixto en el chip (1 μL de tres lotes mezclados de la suspensión de NPMs con S1 conjugada; 1 μL de suero diluido 1:250,000; Ab2 acoplado a HRP en una proporción de dilución de 1:2,500 (0.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$)). La **Figura 48** muestra el seguimiento de la señal de Δ fluorescencia a lo largo del tiempo para las respectivas muestras de suero probadas a 10 $\mu\text{L h}^{-1}$. Obtuvimos un comportamiento típico de aumento de los niveles de anticuerpos durante los primeros días post-infección (días 1 a 21), con una disminución en el tiempo y que vuelve a los niveles basales en el día 360, lo cual es consistente con lo que se ha reportado en la literatura^{17,19}. La **Figura Suplementaria 13** muestra el seguimiento completo para cada una de los flujos probados (3-20 $\mu\text{L h}^{-1}$), donde es posible observar el mismo comportamiento descrito anteriormente. Debido a la dificultad de acceder a muestras de suero de personas antes de la pandemia, este tipo de muestra solo se utilizó en experimentos de curso temporal de IgG como control negativo; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la señal de fluorescencia basal cuando se utilizó buffer de dilución de anticuerpos (**Figura 49**).

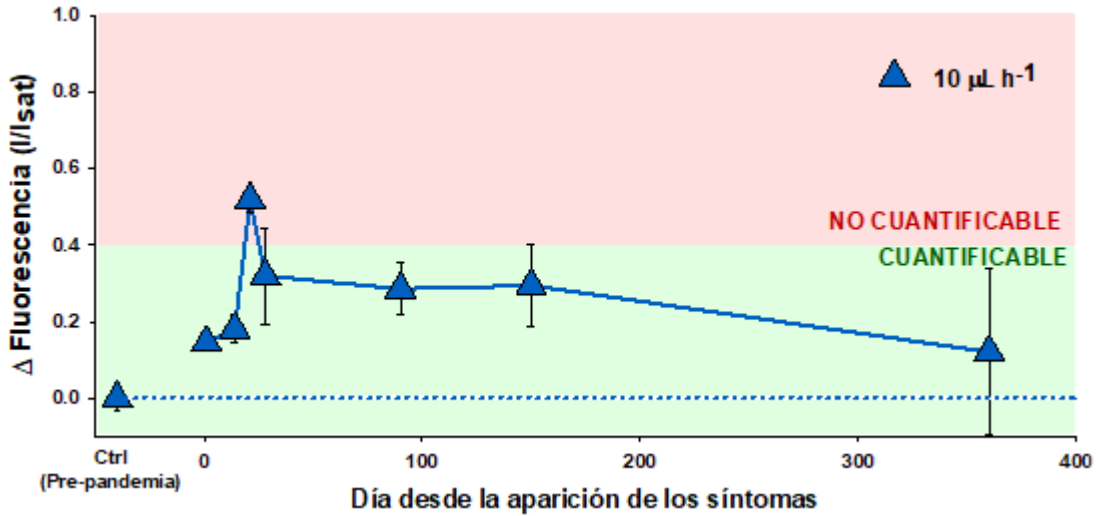


Figura 48. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 mediante ELISA en el dispositivo. Las muestras de suero fueron tomadas en diferentes días después del inicio de los síntomas de la enfermedad COVID-19. El gráfico muestra un pico en la señal de fluorescencia (valor Δ de fluorescencia) en el día 21, el cual disminuye con el tiempo. La línea punteada indica el valor Δ de fluorescencia basal correspondiente a una muestra de suero control tomada antes de la pandemia. Los datos muestran el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

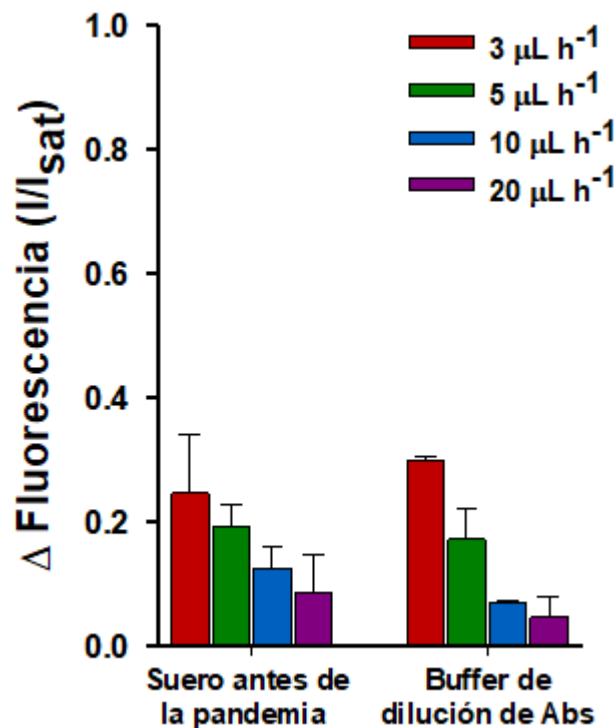


Figura 49. Evaluación del control negativo en ELISA en el dispositivo. Utilizamos una muestra de suero obtenida antes de la pandemia como control negativo, la cual no mostró diferencias significativas con respecto del uso de buffer de dilución de anticuerpos, el cual fue empleado en los experimentos, tanto para hacer la dilución de las diferentes concentraciones de Ab1 empleado, como para control negativo.

5. Análisis cuantitativo de las muestras

Finalmente, mediante la curva estándar obtenida con el uso del pAb anti-S1 empleando el ELISA mixto en el chip realizamos una estimación de la concentración de IgG para las muestras obtenidas en los diferentes días tras el inicio de la infección por SARS-CoV-2. Para el flujo empleado de $10 \mu\text{L h}^{-1}$ ($R^2=0.98$) la ecuación de la recta obtenida fue:

$$y = \left(8 \times 10^{-5} \frac{\text{U.A.}}{\text{pg mL}^{-1}}\right) (x \text{ pg mL}^{-1}) + 2.92 \times 10^{-2} \text{U. A.}, \text{ por tanto:}$$

$$x = \frac{y - 2.92 \times 10^{-2} \text{U.A.}}{8 \times 10^{-5} \frac{\text{U.A.}}{\text{pg mL}^{-1}}},$$

donde x corresponde a la concentración de IgG en la muestra en pg mL^{-1} .

La **Tabla 7** resume las concentraciones en pg mL^{-1} calculadas mediante la curva de calibración de concentraciones conocidas de pAb anti S1, así como la extrapolación considerando el factor de dilución empleado para dichas muestras (1:250,000).

Muestra	[IgG] (pg mL^{-1})	[IgG] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = [IgG] (pg mL^{-1}) * Factor de dilución (1:250,000)
Día 1	1,456.25	364.06
Día 14	1,893.75	473.44
Día 21	Fuera de rango	Fuera de rango lineal
Día 28	3,627.5	906.88
Día 90	3,205	801.25
Día 150	3,316.25	829.06
Día 360	1,143.75	285.94

Tabla 7. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el ELISA en chip. La tabla resume las concentraciones en pg mL^{-1} para cada una de las muestras analizadas a lo largo del tiempo, así como la conversión correspondiente tomando en cuenta el factor de dilución empleado para las mismas (1:250,000). Los valores de la concentración final de las muestras oscila en el orden de pg mL^{-1} .

Discusión

Logramos demostrar la versatilidad de nuestro sistema de inmunoensayo para la detección y cuantificación de anticuerpos dirigidos contra una proteína de interés. Mediante el protocolo de conjugación de dos pasos previamente descrito y optimizado para la lisozima, conjugamos la subunidad S1 del virus del SARS-CoV-2 sobre la superficie de NPMs de 100 nm. Los resultados sugieren que, para este sistema, las NPMs de 100 nm son también las más viables debido a sus propiedades previamente descritas en cuanto a la eficiencia de separación, mostrando una mejor señal de conjugación con respecto de NPMs de menor tamaño (**Fig. Suplementaria 14**).

Como mencionamos anteriormente con respecto a la lisozima, la aplicación de diferentes protocolos para el ELISA con nuestro dispositivo tuvo un impacto considerable en su rendimiento. De manera similar, al emplear NPMs con la subunidad S1 conjugada, observamos que al utilizar el protocolo mixto se obtuvo un límite de detección (LOD) significativamente menor que al emplear el protocolo en extenso en el cual el inmunocomplejo se preparó fuera del dispositivo (823 fg mL^{-1} vs 84 pg mL^{-1} , respectivamente) cuando se utilizó el mAb1 anti-S1 (**Fig. Suplementaria 15**).

No obstante, a diferencia de lo que ocurrió para el caso de la lisozima donde el rango dinámico aumentó mediante el protocolo dentro, para el caso del sistema S1 este se mantuvo constante. Sin embargo, los valores de Δ de intensidad de fluorescencia obtenidos cayeron significativamente comparado con el protocolo en extenso, siendo posible distinguir el valor de saturación de la señal cuando se empleó el protocolo dentro.

En nuestro sistema, implementamos el uso de un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos monoclonales diseñados mediante la combinación de los dominios variables de unión al antígeno de una especie, como un ratón, con los dominios constantes de otra especie, como un humano. Los anticuerpos monoclonales quiméricos son una herramienta muy valiosa tanto en el desarrollo de inmunoensayos^{84,85} como en terapéutica⁸⁶. Para ensayos ELISA por ejemplo, al cambiar las regiones constantes, se minimiza la posibilidad de reacciones cruzadas y la unión no específica del anticuerpo secundario, que puede reconocer regiones constantes comunes de anticuerpos de diferentes especies. Esto se traduce en una reducción del ruido de fondo y un aumento en la señal específica, lo que mejora la precisión del ensayo.

En el caso particular del mAb empleado en nuestro sistema se trata de un anticuerpo quimérico monoclonal de ratón (región variable) / humano (región constante kappa / IgG1). El anticuerpo se produjo utilizando tecnología de anticuerpos recombinantes. La región variable se obtuvo de un ratón inmunizado con la región RBD de la proteína purificada recombinante S del SARS-CoV. Previamente se ha reportado el uso de un anticuerpo monoclonal recombinante quimérico de ratón en el desarrollo de un ELISA cuantitativo para la detección de IgG específicos contra la proteína S del SARS-CoV-2, con un rango dinámico de $1.953\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$ ⁸⁷;

Debido a la alta diversidad de los anticuerpos IgG en el suero, que se producen en respuesta a múltiples antígenos y epítomos, es más adecuado utilizar anticuerpos policlonales para crear la curva estándar en enfoques cuantitativos con muestras serológicas. Los anticuerpos policlonales, al reconocer múltiples epítomos, ofrecen una mejor representatividad de la variedad de IgG presente en el suero. Esto los hace preferidos para la detección y cuantificación general de IgG, proporcionando mayor sensibilidad y robustez en los resultados debido a su capacidad para captar la heterogeneidad del suero.

Por tanto, pusimos a prueba nuestro sistema de inmunoensayo para la cuantificación de Abs anti-S1 mediante el empleo de un anticuerpo policlonal (Anti-SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody (Sino Biological, KIT003)). Empleamos el mismo procedimiento para el ELISA mixto en el chip anteriormente descrito, ahora para la detección y cuantificación del pAb anti-S1, empleando un volumen de NPMs de tan solo 1 μL con una concentración de 0.3 mg mL^{-1} . La curva estándar obtenida con el pAb1 posee un mayor rango dinámico con respecto de la curva estándar donde se empleó mAb1 y alcanza valores de intensidad de fluorescencia mayores debido a que este tipo de anticuerpos pueden unirse a diferentes regiones (epítomos) del Ag a diferencia del mAb que se une a un único epítipo y da como resultado una pronta saturación de los sitios de unión disponibles, con menores niveles de señal. También se obtuvieron diferencias notables en el LOD obtenido con ambos tipos de anticuerpos: mediante el ensayo para la cuantificación de mAb1 anti-S1 el LOD fue de 823 fg mL^{-1} , mientras que el LOD obtenido para el ensayo que emplea pAb1 fue de 205.8 pg mL^{-1} .

No obstante, cabe destacar la diferencia reportada en el LOD cuando se comparan ambas proteínas probadas ya que en el inmunoensayo para la detección de Ab1 anti-lisozima el valor obtenido fue del orden de nanogramos (206 ng mL^{-1}). Este comportamiento se asemeja en gran medida a los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, para un sistema microfluídico similar para la realización de inmunoensayos. Mediante este sistema desarrollado por Guevara-Pantoja et al. se realizaron inmunoensayos modelo para la detección de Abs dirigidos contra dos proteínas, la estreptavidina y la biotina. En este trabajo se reportó un LOD de 66 ng mL^{-1} para la detección de anticuerpos anti-streptavidina y un LOD de 8 pg mL^{-1} para la detección de anticuerpos anti-biotina, empleando en ambos casos un flujo de $20 \mu\text{L h}^{-1}$ para el sustrato fluorogénico y un tiempo de ensayo de 40 min.

Nosotros nos basamos en este trabajo previo para el desarrollo del ELISA mixto en el chip. Ambos trabajos poseen ciertas similitudes como las dimensiones del canal y la altura de la constricción, el tamaño de las MPFMs de $7 \mu\text{m}$ empleadas para la formación de la trampa magnética, algunos de los flujos empleados para la detección, las zonas de detección y el valor Δ de la intensidad de fluorescencia obtenido, entre otros. No obstante resaltan algunas diferencias importantes que vale la pena mencionar. En primer lugar, el tamaño de NPMs empleadas fue distinto, ya que ellos utilizaron un tamaño de 35 nm , mientras que en nuestro sistema obtuvimos un mejor rendimiento al usar NPMs de 100 nm . Asimismo, ambas NPMs que adquirieron comercialmente ya venían con las respectivas proteínas conjugadas en su superficie, mientras que nosotros llevamos a cabo la conjugación de la proteína de interés sobre la superficie de las NPMs, agregando versatilidad a nuestro sistema. Por otro lado, el complejo enzima-sustrato también fue diferente. Mientras que Guevara et al empleó Ab2 conjugados a Fosfatasa alcalina (ALP) y fluoresceína difosfato (FDP) como sustrato fluorogénico, en nuestro caso hicimos uso de la peroxidasa de rábano (HRP) y AmpliFlu Red como sustrato. Si bien la señal fluorescente de FDP es generalmente más

estable que los productos de reacciones de HRP, la ALP no tiene la misma capacidad de amplificación de señal en cascada como HRP, lo que puede hacer que en algunos casos sea ligeramente menos sensible.

La **Tabla 8** resume los resultados de nuestras ELISAs empleando los diferentes enfoques desarrollados (extenso, reducido y mixto) para ambos complejos antígeno-anticuerpo analizados (Lisozima y S1).

Anticuerpo	Protocolo extenso	Protocolo reducido	Protocolo mixto
IgG anti-lisozima	LOD = 3.3 ng mL ⁻¹	LOD = 10.1 ng mL ⁻¹	LOD = 231 pg mL ⁻¹
mAb anti-S1	LOD = 84 pg mL ⁻¹	-	LOD = 823 fg mL ⁻¹
pAb anti-S1	-	-	LOD = 205.8 pg mL ⁻¹

Tabla 8. Valores de límite de detección (LOD) obtenidos mediante los diferentes sistemas de ELISA para las curvas de calibración de IgG anti-lisozima y anti-S1 monoclonal y policlonal, respectivamente.

Para demostrar la aplicación de nuestro dispositivo microfluídico como un sistema de inmunoensayo para la detección de IgG específicos en muestras de suero, decidimos coleccionar muestras de suero de un paciente que previamente fue diagnosticado positivo para la infección del virus SARS-CoV-2 mediante una prueba de antígenos de hisopado nasofaríngeo realizada en un laboratorio clínico. Fue necesario optimizar la dilución de las muestras para poder analizarlas con nuestro sistema y fue así como nos percatamos de la alta sensibilidad alcanzada, teniendo que diluir en un factor de 1:250, 000 las muestras de suero para poder detectarlas en nuestro sistema debido a la saturación de la señal producida con diluciones menores. Esto confiere un gran potencial a nuestro sistema para la detección de anticuerpos, e incluso de otros analitos de interés o biomarcadores, presentes en muy bajas concentraciones o bien en etapas muy tempranas del desarrollo de una condición específica que otros sistemas no serían capaces de detectar.

El curso temporal del título de anticuerpos IgG presentes en las muestras de suero obtenidas muestra un comportamiento típico, con el correspondiente aumento observado en los niveles de IgG anti en los primeros días del desarrollo de la enfermedad que decae en el tiempo. El donador contaba con un esquema de vacunación contra SARS-CoV-2 de tres dosis y ninguna otra vacuna fue aplicada durante el periodo comprendido para la toma de las muestras. Finalmente, el uso de la curva de calibración previamente obtenida para el mAb anti-S1 cuando empleamos un flujo de 10 $\mu\text{L h}^{-1}$ permite llevar a cabo el análisis cuantitativo de las muestras. Las concentraciones calculadas oscilan entre los 300 y 900 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual es congruente con reportes previos¹⁷⁻¹⁹. No obstante, el pico máximo de señal obtenida, correspondiente al día 21 excede el rango lineal cuantificable a través de la curva de calibración, por lo cual no es posible conocer con certeza la concentración de anticuerpos IgG presente en esta muestra con la dilución empleada.

Capítulo VIII. Inmunoensayo en placa de micropozos

Material y métodos

1. Prueba de ELISA comercial

Se realizó una ELISA indirecta para detectar el nivel de anticuerpos anti-S1 en muestras de suero. Se empleó un kit comercial (Sino Biological, KIT003) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada una de las tiras removibles de pozos se encontraban previamente recubiertas con la subunidad S1 de la proteína de espiga recombinante del virus SARS-CoV-2 (2019-nCoV). Se realizaron cinco lavados en cada uno de los pozos con Solución de Lavado 1X (300 μ L por pozos, 1 min de inmersión) con ayuda de una micropipeta multi canal.

En cada paso, el líquido fue removido por decantación, aplicando pequeños golpes contra una toalla de papel. Posteriormente, se agregó a cada pozo 100 μ L de la muestra de suero (1:1,000), el anticuerpo control del kit (Anti-SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody) o el anticuerpo monoclonal (mAb) quimérico anti-S1 (Sino Biological, 40150-D003) a las concentraciones correspondientes (10-2,500 ng mL⁻¹). Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, el líquido fue nuevamente removido y los pozos fueron lavados siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. Se agregaron entonces 100 μ L de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humano acoplado a la enzima HRP (1:1,000) a cada pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 h adicional. Pasado este tiempo, se realizó nuevamente un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido. El sustrato TMB fue preparado 10 min antes de su uso mezclando el reactivo A con el reactivo B en partes iguales (v/v). Posteriormente, se agregaron 200 μ L de este sustrato a cada pozo y se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente, la reacción fue detenida agregando 100 μ L de la solución de parada y se realizó la medición colorimétrica a 450 nm usando un lector de microplacas (Biotek Instruments, ELx800).

2. Prueba de ELISA de laboratorio en microplaca

Se desarrolló una prueba de ELISA con materiales y reactivos preparados en nuestro laboratorio para complementar nuestros resultados y contrastarlos con los obtenidos mediante el dispositivo microfluídico y el kit comercial. El protocolo empleado se describe a continuación. Se empleó una placa de 96 pozos de alta adherencia (Corning, 9018). La proteína empleada (SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1(D614G)-His Recombinant Protein (Sino Biological, 40591-V08H3)) fue ajustada a una concentración de 200 ng mL⁻¹ en buffer de recubrimiento (0.2 M carbonato/bicarbonato de sodio) a pH de 9.4. Se agregaron 100 μ L de la solución a cada pozo de la placa y se dejó incubar 16 h a 4 °C. Pasado este tiempo se decantó y secó sobre una toalla de papel y realizaron 4 lavados con 300 μ L de solución de lavados (TBS 1X, 0.1 % Tween 20) por pocillo, manteniendo la placa en agitación durante 5 min entre cada

lavado. Posteriormente, la placa fue bloqueada con 300 μL de solución de bloqueo (TBS 1X, BSA al 1.5%) en cada pozo e incubada durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Después de repetir otro paso de 4 lavados, se agregaron 100 μL del anticuerpo específico anti-S1 a las concentraciones correspondientes ($10\text{-}2,500\text{ ng mL}^{-1}$) o bien las muestras de suero previamente diluidas 1:1,000 en Buffer de dilución de anticuerpos (TBS 1X, BSA al 0.5%, Tween 20 al 0.005%). La placa fue incubada nuevamente durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se repitieron los pasos de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido sobre la superficie y se agregó a cada pozo 100 μL del Ab2 policlonal (pAb2) de Conejo Anti-Humano IgG-Fc acoplado a HRP (Sino Biological, 10702-T16-H) a una concentración final de $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, empleado también en los inmunoensayos del dispositivo. La placa fue incubada con este último anticuerpo durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, la placa fue lavada con el mismo protocolo descrito y se agregó a cada pozo 100 μL del sustrato turbo TMB 1-step previamente temperado (Thermo Scientific, 34022). Después de 30 min de incubación se agregaron 100 μL de solución de parada o “stop” (HCl 1N). Inmediatamente después, se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm (Biotek Instruments, ELx800).

Resultados

1. Curva estándar para IgG anti-S1 en kit comercial de ELISA

Replicamos los experimentos realizados con nuestro dispositivo microfluídico utilizando un kit comercial de ELISA para la prueba de títulos de anticuerpos contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2. Para la curva de calibración utilizamos, de manera análoga que en nuestro dispositivo microfluídico, ambos anticuerpos anti-S1, es decir el mAb quimérico y el pAb del kit. La **Figura 50** muestra la comparativa de emplear ambos anticuerpos. Si bien los resultados del ELISA comercial para la curva estándar muestran un comportamiento similar en cuanto al rango dinámico obtenido para ambos anticuerpos, los niveles de lectura difieren considerablemente debido a la naturaleza de ambos anticuerpos, lo cual limita el uso de nuestro mAb para una medición cuantitativa de los anticuerpos IgG presentes en las muestras de suero. Asimismo, al realizar las respectivas curvas estándar para ambos anticuerpos empleados (**Fig. 50B y D**) calculamos el LOD para cada una de ellas, obteniendo un valor de 141 pg mL^{-1} para el mAb y 293 pg mL^{-1} para el caso del pAb.

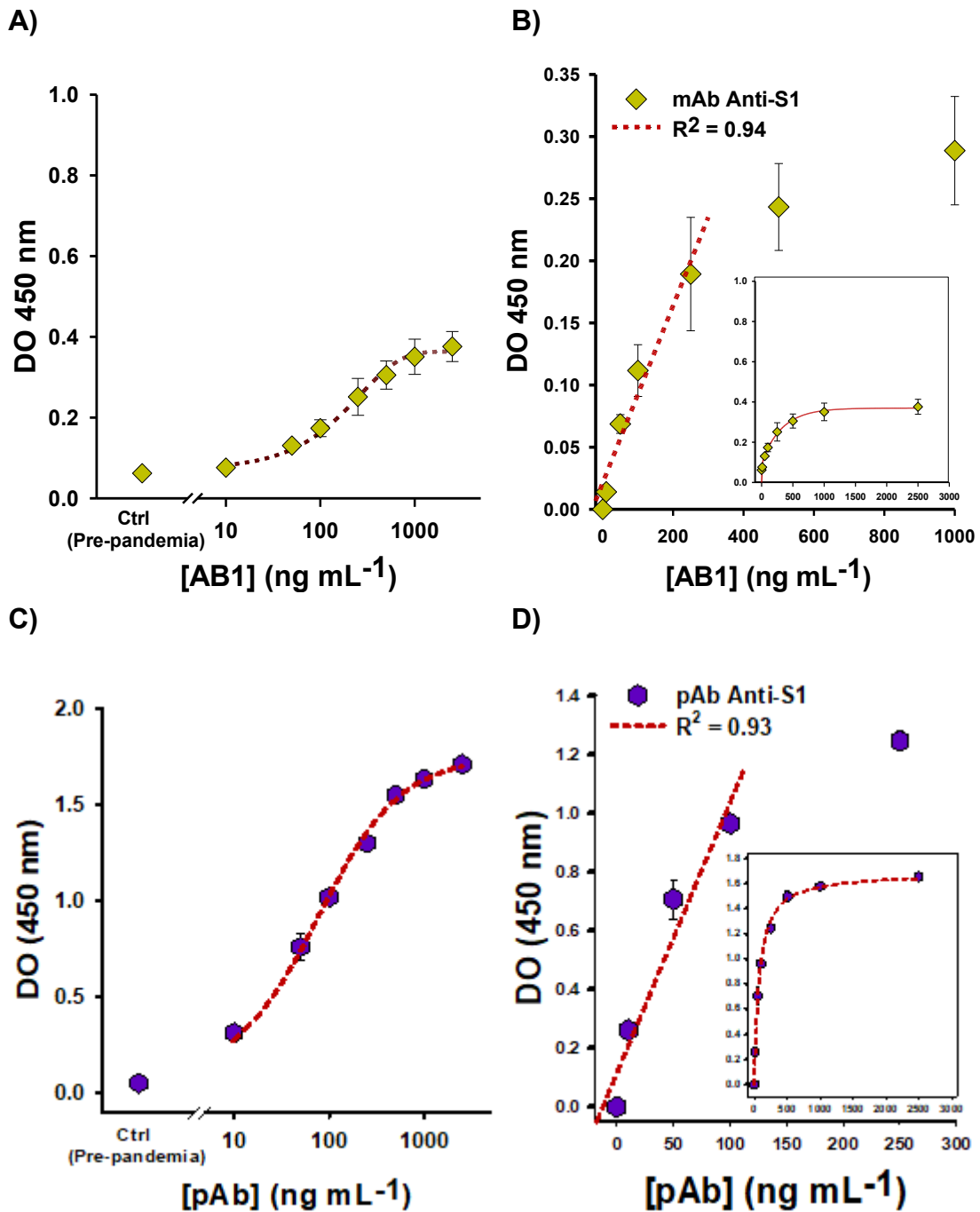


Figura 50. Kit comercial de ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2. **A)** La gráfica muestra el perfil de intensidad de densidad óptica (DO) en función de la concentración de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-S1 (10 - 2,500 ng mL⁻¹). Los datos se representan en una escala semilogarítmica. **B)** Se obtuvo la curva estándar y se observa además el rango lineal que alcanza los 250 ng mL⁻¹. **C)** El uso de un pAb ofrece valores de mayor intensidad para las mismas concentraciones de anticuerpo empleadas. **D)** La curva estándar generada a partir del pAb permite la cuantificación de las muestras séricas. El rango dinámico alcanza valores mayores al usar este anticuerpo aunque el rango lineal logrado es ligeramente menor. n=3. DO, densidad óptica.

2. Curso temporal de IgG anti S1 en ELISA comercial

El análisis de las muestras de suero se realizó en la placa de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Se utilizó una dilución de 1:1,000 para las muestras de suero según el rango sugerido por el fabricante (1:100 a 1:10,000). También se empleó una dilución de 1:1,000 para el Ab2 acoplado a HRP contenido en el kit. La **Figura 51** muestra el perfil de las muestras obtenidas que fueron analizadas mediante el kit de ELISA.

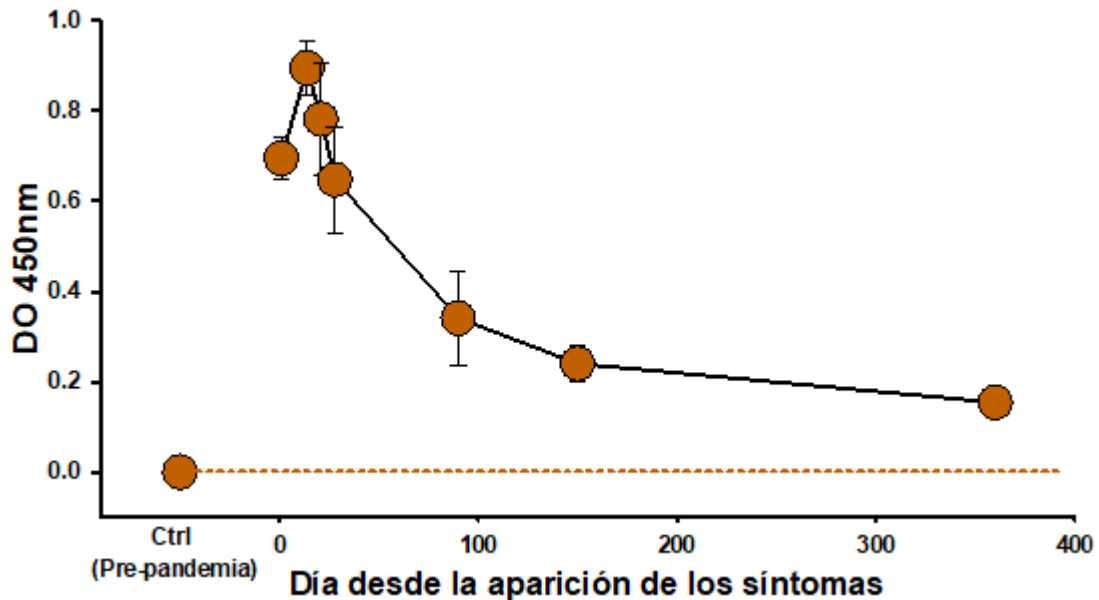


Figura 51. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 en microplaca comercial. Se analizaron las mismas muestras de suero tomadas en diferentes días después del inicio de los síntomas de la enfermedad de COVID-19, previamente probadas con nuestro sistema microfluídico. El gráfico muestra un pico de absorbancia (medido a 450 nm) en el día 14 que disminuye con el tiempo. Se observa el nivel basal correspondiente a la muestra de suero obtenida antes del inicio de la pandemia. n=3.

3. Análisis cuantitativo de las muestras mediante el kit de ELISA

Empleamos el pAb1 anti-S1 contenido en el kit de ELISA para estimar la concentración de nuestras muestras calculadas mediante el inmunoensayo en placa (**Tabla 9**). En este caso, todas las muestras caen dentro del rango cuantificable con la curva estándar obtenida con el pAb. No obstante, observamos diferencias importantes en cuanto a la concentración calculada con este kit comercial para la detección de IgG con valores entre 5 y hasta 60 veces menores que el que nosotros obtuvimos mediante nuestro dispositivo.

Muestra	[IgG] (ng mL ⁻¹)	[IgG] (µg mL ⁻¹) = [IgG] (pg mL ⁻¹) * Factor de dilución (1:1,000)	[IgG] calculada en el dispositivo (µg mL ⁻¹)
Día 1	63.1	63.1	364.06
Día 14	84.84	84.84	473.44
Día 21	72.5	72.5	Fuera de rango lineal
Día 28	57.94	57.94	906.88
Día 90	24.6	24.6	801.25
Día 150	13.64	13.64	829.06
Día 360	4.3	4.3	285.94

Tabla 8. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el kit comercial de ELISA. Se empleó el pAb1 control contenido en el kit para estimar la concentración de IgG en las muestras.

4. Curva estándar para IgG anti-S1 en ELISA de laboratorio en microplaca

Debido a las diferencias obtenidas en la cuantificación de las muestras mediante el kit comercial adquirido y los inmunoensayos realizados en el dispositivo microfluídico, decidimos realizar nuestro propio ensayo de ELISA en una microplaca. Seguimos el protocolo como se describe en el apartado correspondiente y en este caso omitimos el uso del mAb1 ya que, como se reportó tanto con el dispositivo y la ELISA comercial, este no es óptimo para cuantificar nuestras muestras. La **Figura 52** muestra la gráfica en escala semilogarítmica de la densidad óptica (DO) en las muestras séricas analizadas (**A**) y la curva estándar obtenida (**B**) para el análisis cuantitativo de las mismas. El LOD calculado fue de 29.2 ng mL⁻¹.

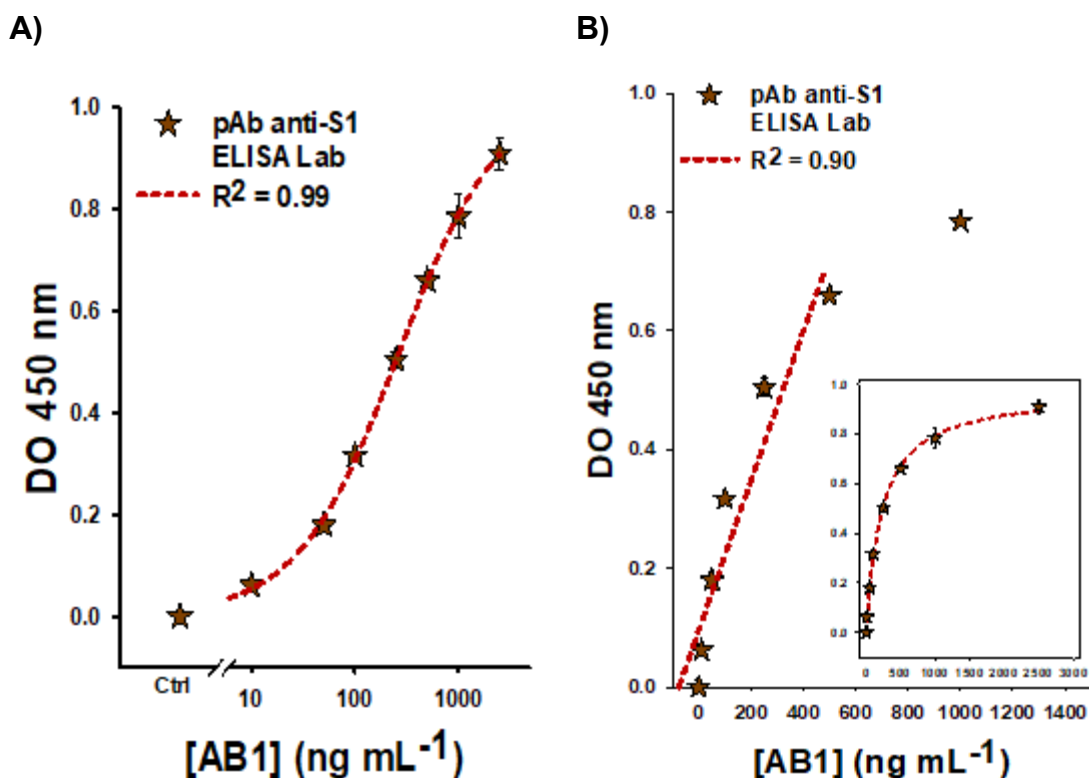


Figura 52. ELISA de laboratorio en microplaca para la detección de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2. **A)** La gráfica muestra el perfil de intensidad de densidad óptica (DO) en función de la concentración de anticuerpo policlonal (pAb) anti-S1 (10 - 2,500 ng mL⁻¹). Los datos se representan en una escala semilogarítmica. **B)** Se obtuvo la curva estándar a partir del rango lineal que alcanza los 500 ng mL⁻¹. Se observa además el rango dinámico llega a los 2,500 pg mL⁻¹. n=3. DO, densidad óptica.

5. Curso temporal de IgG anti S1 en ELISA de laboratorio en microplaca

De manera simultánea, realizamos el análisis de las muestras mediante la placa de ELISA empleando una dilución de 1:1,000. Empleamos una concentración de 0.1 µg mL⁻¹ de Ab2 policlonal (pAb2) de Conejo Anti-Humano IgG-Fc acoplado a HRP (Sino Biological, 10702-T16-H). La **Figura 53** muestra el perfil de las muestras obtenidas en los diferentes días tras la infección de SARS-CoV-2 que fueron analizadas en nuestro laboratorio mediante un ELISA en microplaca. No obstante, solo las muestras correspondientes a los días 1, 90, 150 y 360 caen dentro del rango cuantificable con la curva estándar obtenida con el pAb1 anti-S1 con la dilución empleada. Las muestras séricas correspondientes a los demás días quedan fuera del límite superior de linealidad que ofrece la curva de calibración.

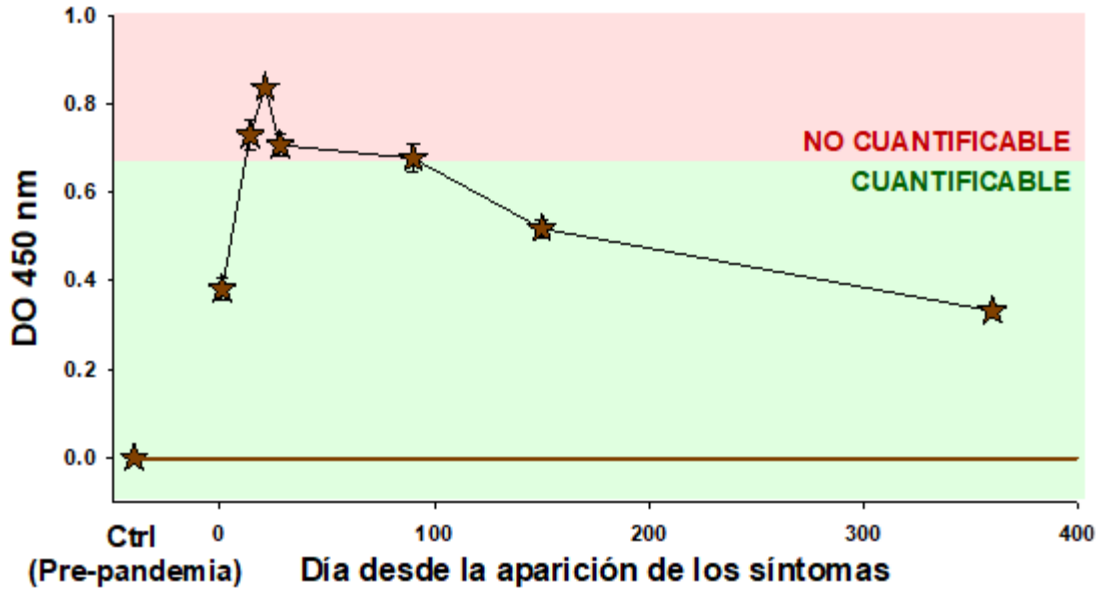


Figura 53. Curso temporal de los niveles de IgG anti-S1 mediante ELISA de laboratorio en microplaca. Se analizaron nuevamente las muestras de suero tomadas en diferentes días después del inicio de los síntomas de la enfermedad de COVID-19, previamente probadas con nuestro sistema microfluídico y con el kit comercial de ELISA. El gráfico muestra un pico de absorbancia (medido a 450 nm) en el día 21 que disminuye con el tiempo. Se observa el nivel basal correspondiente a la muestra de suero obtenida antes del inicio de la pandemia. n=3.

6. Análisis cuantitativo de las muestras mediante ELISA de laboratorio en microplaca

Empleando la curva de calibración mostrada en la **Figura 52B** realizamos el análisis cuantitativo de las muestras que quedaron dentro del rango cuantificable. Del ajuste lineal realizado ($R^2=0.90$) la ecuación de la recta obtenida fue:

$$y = \left(1.3 \times 10^{-3} \frac{\text{U.A.}}{\text{pg mL}^{-1}}\right) (x \text{ pg mL}^{-1}) + 9.58 \times 10^{-2} \text{U.A.}, \text{ por tanto:}$$

$$x = \frac{y - 9.58 \times 10^{-2} \text{U.A.}}{1.3 \times 10^{-3} \frac{\text{U.A.}}{\text{pg mL}^{-1}}},$$

donde x corresponde a la concentración de IgG contenida en la muestra analizada. La **Tabla 10** resume las concentraciones en ng mL^{-1} calculadas mediante la curva de calibración de concentraciones conocidas de pAb anti S1, tomando en cuenta el factor de dilución de dichas muestras (1:1,000). Asimismo, se muestra la comparativa de las concentraciones calculadas mediante el dispositivo microfluídico y el kit de ELISA comercial.

Muestra	[IgG] (ng mL ⁻¹)	[IgG] (μg mL ⁻¹) = [IgG] (ng mL ⁻¹) * Factor de dilución (1:1,000)	[IgG] calculada en ELISA comercial (μg mL ⁻¹)	[IgG] calculada en el dispositivo (μg mL ⁻¹)
Día 1	219.61	219.61 μg mL ⁻¹	63.1	364.06
Día 14	Fuera de rango lineal	Fuera de rango lineal	84.84	473.44
Día 21	Fuera de rango lineal	Fuera de rango lineal	72.5	Fuera de rango lineal
Día 28	Fuera de rango lineal	Fuera de rango lineal	57.94	906.88
Día 90	447.07	447.07 μg mL ⁻¹	24.6	801.25
Día 150	324.54	324.54 μg mL ⁻¹	13.64	829.06
Día 360	181.7	181.7 μg mL ⁻¹	4.3	285.94

Tabla 9. Cálculo de concentraciones de IgG para las muestras de suero mediante el ELISA de laboratorio. Se empleó el pAb1 para estimar la concentración de IgG en las muestras. Las muestras correspondientes al pico de la señal (Días 14, 21 y 28) superan el rango lineal por lo que no fue posible la cuantificación.

Discusión

Pusimos a prueba nuestro sistema de inmunoensayo basado en NPMs de 100 nm con la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2 conjugada sobre su superficie para la detección de IgG específicos en muestras de suero. Para ello empleamos primero un kit comercial para el título de anticuerpos IgG (Sino Biological, KIT003). Los resultados mostraron que el LOD obtenido con dicho kit fue de 293 pg mL⁻¹ vs un LOD de 205.8 mL⁻¹ obtenido con el dispositivo microfluídico mediante el ELISA mixto en el chip.

No obstante, debido a que se trata de un kit comercial desconocíamos la información referida a la proteína inmovilizada sobre la placa, lo cual ayudaría a comprender mejor los parámetros de interés como el LOD, los valores de saturación y el estrecho rango dinámico que fue obtenido en el ELISA y así, permitir una comparativa más robusta con nuestro sistema de inmunoensayo microfluídico. A su vez, el kit integra un Ab2 propio que fue empleado según las recomendaciones del fabricante (1:1,000); sin embargo, tampoco tuvimos conocimiento de la concentración mientras que el uso de nuestro Ab2 fue limitado debido a la necesidad de caracterizar la concentración óptima para emplearlo en este kit.

Tras contactar al proveedor de dicho kit pudimos conocer que la proteína inmovilizada no es exactamente la misma respecto de la que fue conjugada sobre la superficie de nuestras NPMs, existiendo ligeras variaciones entre ambas. Sabemos que la proteína empleada que se conjugó

sobre la superficie de las NPMs se trata de SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1(D614G)-His Recombinant Protein (Sino Biological, 40591-V08H3). Mientras que la proteína inmovilizada sobre la placa corresponde a otro número de catálogo (Sino Biological, 40591-V08H). Al comparar ambas proteínas según lo descrito por el fabricante, las dos (40591-V08H3 y 40591-V08H) son producidas mediante el sistema de expresión de células HEK293. La proteína diana se expresa con la secuencia (Val16-Arg685) de 2019-ncov Spike S1 (Accession #YP_009724390.1) fusionada con una etiqueta 6×His en el C-terminal. Ambas están conformadas por 681 aminoácidos, con mínimas diferencias en la masa molecular (76.5 y 76.41 kDa respectivamente). La concentración efectiva media (EC50) reportada mediante ELISA para la ECA2 fue de 250-650 ng mL⁻¹ para 40591-V08H3 y 200-600 ng mL⁻¹ para 40591-V08H. Sin embargo, no existen reportes de la diferencia entre 40591-V08H y 40591-V08H3 (S1(D614G)) sobre la unión a IgG. Sumado a lo anterior, tampoco conocemos la concentración a la cual dicha proteína se encuentra inmovilizada sobre la superficie de los pozos.

No obstante, el comportamiento de la curva obtenida con el kit de ELISA muestra con claridad la unión entre el anticuerpo monoclonal y policlonal y el antígeno fijado en la superficie, el cual aumenta con la concentración creciente de anticuerpo, hasta alcanzar un punto de saturación donde todos los sitios de unión del antígeno están ocupados por el anticuerpo específico. Asimismo, como ya fue descrito mediante el empleo de nuestro dispositivo microfluídico, el inmunoensayo sobre la placa confirma la limitación del uso de un mAb para la creación de una curva estándar para la cuantificación de muestras serológicas de pacientes. Cuando empleamos el pAb para la curva estándar es considerable el aumento en la señal obtenida para las diferentes concentraciones empleadas con respecto del mAb y es posible la cuantificación de todas las muestras. Sin embargo, destacan diferencias importantes con respecto del uso de nuestro dispositivo, teniendo valores de concentración menores mediante la cuantificación en la placa de ELISA comercial. Por tanto, realizamos un segundo ensayo de ELISA en nuestro laboratorio que mantuvo los mismos elementos empleados en nuestro inmunoensayo microfluídico para comparar ambos métodos de una manera más directa.

Pudimos observar un comportamiento similar en la expresión de IgG en las muestras de suero analizadas para ambos métodos (dispositivo y placa de ELISA) en los primeros días post-infección, con valores elevados entre los días 14-21. Los valores detectables en el día 1 tras la aparición de los síntomas de COVID-19 confirman la inmunidad adquirida tras la exposición previa al virus, posiblemente debida al esquema completo de vacunación, con una tercera dosis 15 semanas previas al día de inicio de la toma de muestras, ya que el donador no había sido diagnosticado con la infección previamente. Por otro lado, pudimos tener acceso a una muestra de suero obtenida antes de la pandemia. Dicha muestra no posee los IgG específicos contra el virus y fue empleada para estimar los niveles basales esperados para ambos métodos de detección. Además, esta muestra de suero permitió validar el empleo de Buffer

de dilución de Abs en nuestro sistema, ya que el acceso a este tipo de muestras de suero obtenido antes de la pandemia de COVID-19 fue complicado y su uso como control en nuestros experimentos fue limitado. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en la señal basal obtenida para el suero obtenido antes de la pandemia o el Buffer.

En cuanto al rango lineal obtenido, que permite realizar las curvas estándar, nuestro dispositivo obtuvo un valor entre 205.8 pg mL^{-1} a 5 ng mL^{-1} ; para la placa de ELISA comercial, 293 pg mL^{-1} a 100 ng mL^{-1} ; mientras que el rango lineal para el ELISA de laboratorio en microplaca oscila entre $29\text{-}250 \text{ ng mL}^{-1}$.

Por otro lado, son evidentes las discrepancias en los valores cuantitativos calculados con la ELISA en microplaca de laboratorio y el ELISA en el dispositivo microfluídico. Para evaluar la concordancia entre dos métodos de medición, se llevó a cabo un análisis de Bland-Altman. Este análisis es una técnica estadística utilizada para comparar dos métodos de medición al analizar la diferencia entre las mediciones realizadas por ambos métodos y su media (**Ver Apéndice II**).

Si bien cada nuevo método debe ser evaluado para demostrar su precisión diagnóstica, para esta evaluación, se utiliza comúnmente otra prueba diagnóstica conocida como "estándar de oro". Aunque la prueba estándar de oro se considera la referencia más confiable para evaluar la precisión de otras técnicas, es importante reconocer su naturaleza no infalible. Los resultados de la ELISA pueden estar sujetos a diversos tipos de errores, influidos por la sensibilidad y especificidad de la prueba, la calidad y dilución de la muestra utilizada y la experiencia del personal involucrado. Además, las limitaciones inherentes al diseño del ELISA, como la especificidad de los anticuerpos empleados y la selección apropiada de controles positivos y negativos, también pueden afectar la exactitud. Por lo tanto, al interpretar los resultados de cualquier prueba diagnóstica, es esencial tener en cuenta estas posibles limitaciones.

Destaca también el hecho de que para ambas placas de ELISA (kit comercial y de laboratorio), la dilución empleada para las muestras fue de 1:1,000 mientras que para el ELISA mixto en el dispositivo fue de 1:250,000. Una posible explicación de las variaciones cuantitativas reportadas con respecto del ELISA del laboratorio podría atribuirse a la necesidad de realizar diluciones significativas de las muestras para las mediciones con el dispositivo. Estas diluciones pueden introducir errores importantes en la medición de las concentraciones de los anticuerpos. Sin embargo, es importante destacar que nuestro sistema ofrece un mejor rendimiento en la detección de bajas concentraciones de anticuerpos debido al menor LOD calculado para la detección de IgG anti-S1. Dicho valor obtenido con nuestro dispositivo microfluídico fue de 205.8 pg mL^{-1} mientras que mediante el ELISA en microplaca se obtuvo un LOD de 29.2 ng mL^{-1} (dos órdenes de magnitud de diferencia). Un LOD más bajo significa que la prueba es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de la sustancia, lo cual es crucial en aplicaciones

donde se requiere una alta sensibilidad. Por tanto, nuestro sistema podría ser invaluable en la identificación temprana de enfermedades o en la monitorización de pacientes con bajos niveles de anticuerpos, ofreciendo así una herramienta más sensible y precisa en el diagnóstico clínico.

La **Tabla 11** resume los valores del LOD obtenido tanto con el inmunoensayo en nuestro dispositivo microfluídico, como con ambas placas de ELISA, lo cual posiciona a nuestro método con una mayor sensibilidad de detección.

Anticuerpo	LOD Dispositivo microfluídico	LOD Kit de ELISA comercial	LOD ELISA laboratorio
pAb anti-S1	205.8 pg mL ⁻¹	293 pg mL ⁻¹	29.2 ng mL ⁻¹

Tabla 10. Límite de detección (LOD) obtenido mediante el dispositivo microfluídico, ELISA comercial y ELISA de laboratorio.

Una ventaja importante del uso de nuestro sistema microfluídico es que, a diferencia del ELISA en microplaca, es posible modular con facilidad la capacidad de conversión de sustrato por la enzima ya que este parámetro es dependiente del flujo aplicado para dicho sustrato en un rango de entre 3-100 $\mu\text{L h}^{-1}$, siendo este último el valor empleado como flujo de lavado en el cual la capacidad de conversión de enzima es limitada y ya no es posible la detección mediante nuestro sistema. Asimismo, la reacción de conversión del sustrato por la enzima puede ser monitoreada en tiempo real mediante la visualización de la señal de fluorescencia hasta alcanzar el estado estacionario. Dependiendo de la concentración de Abs diana y el flujo aplicado para el sustrato, el tiempo para alcanzar dicho estado estacionario puede alcanzarse en apenas unos cuantos segundos. Nosotros fijamos un tiempo máximo de detección de 6 min para poder analizar la conversión en casos de bajas concentraciones de Ab1 y el máximo flujo empleado para la detección (20 $\mu\text{L h}^{-1}$), no obstante, estos parámetros deberán ser optimizados para el complejo Ag-Ab específico a analizar. Asimismo, nuestro sistema puede ser compatible con la obtención de datos y lecturas en tiempo real. Por el contrario, mediante el uso de placas multipozos la medición es típicamente realizada en punto final.

La combinación de inmunoensayos de alto rendimiento, altamente específicos y sensibles, junto con la capacidad de analizar volúmenes diminutos de muestras, ofrece un enorme potencial para el desarrollo de estudios epidemiológicos y métodos de diagnóstico en el punto de atención. Los estudios de seroprevalencia basados en la población pueden arrojar información importante, como el impacto de la enfermedad en cuestión. Además, en el caso particular del virus SARS-CoV-2, el elevado número de casos asintomáticos contribuyó a una propagación descontrolada del virus. Por tanto, la aplicación de este tipo de métodos no solo facilita la comprensión de la epidemiología y la dinámica de la enfermedad, sino que también proporciona información crucial para el diseño de intervenciones efectivas y la contención de futuras pandemias.

Conclusiones

Este estudio ha logrado desarrollar con éxito un dispositivo microfluídico de acrílico para la realización de un ELISA indirecto, utilizando nanopartículas magnéticas (NPMs) como soporte. Hemos explotado las propiedades coloidales y magnéticas de las nanopartículas para llevar a cabo un inmunoensayo innovador en un chip, orientado a la detección cuantitativa de anticuerpos de interés. El dispositivo de acrílico es fácil de manipular y tiene un diseño optimizado para la producción en masa, con el objetivo de crear una herramienta práctica para pruebas serológicas.

Mediante la conjugación de una proteína modelo, como la lisozima de clara de huevo de pollo, logramos caracterizar parámetros cruciales para el desarrollo de nuestro sistema, que resultaron fundamentales para la regulación de la señal de fluorescencia obtenida. Entre estos parámetros destacan: (1) el flujo aplicado sobre el sustrato, (2) la concentración de anticuerpo primario utilizada, (3) la dilución de la muestra con concentraciones desconocidas de anticuerpos, (4) la naturaleza policlonal o monoclonal del anticuerpo primario, (5) la concentración de anticuerpo secundario, (6) los tiempos de incubación, (7) el tamaño de la trampa de micropartículas y (8) el lote de nanopartículas con proteína conjugada. Cabe mencionar que la concentración de nanopartículas empleada no pareció tener un papel relevante, al menos dentro del rango explorado.

La comprensión y optimización de estos parámetros nos permitieron desarrollar un ELISA completo dentro de nuestro dispositivo microfluídico, superando la función de un simple dispositivo para la detección de inmunocomplejos previamente formados. De esta manera, logramos un enfoque de ELISA microfluídico mixto que combina y explota las propiedades de un inmunoensayo homogéneo, mediante las propiedades brownianas de las NPMs en suspensión, y de un inmunoensayo heterogéneo, utilizando un sistema de alta preconcentración gracias a las propiedades magnéticas de las mismas.

Además, hemos demostrado la versatilidad de nuestro sistema al poder conjugar el antígeno de interés en la superficie de las NPMs, lo que permite tanto la detección y cuantificación de anticuerpos específicos como la detección de antígenos virales o cualquier analito de importancia biológica. Esto ofrece un rendimiento comparable con los métodos tradicionales.

Como prueba de concepto, utilizamos nuestro sistema para medir el nivel de anticuerpos IgG contra la subunidad S1 del SARS-CoV-2, a partir de solo 2 μ L de muestras de suero diluidas 1:250,000, tomadas en diferentes días después del inicio de los síntomas de COVID-19. Logramos un límite de detección comparable al obtenido con un kit comercial para el título de anticuerpos e incluso con un ELISA convencional sobre microplaca desarrollado en el laboratorio.

Perspectivas

El desarrollo de este dispositivo microfluídico y su aplicación en inmunoensayos sienta las bases para ampliar el rango de aplicaciones del dispositivo, incluyendo la detección de otros tipos de biomarcadores y el uso en diferentes enfermedades además de COVID-19.

El desarrollo de sistemas multiplexados representa una gran herramienta para mejorar el diagnóstico y el desarrollo de terapias más efectivas. Mediante este tipo de enfoques es posible analizar diferentes biomarcadores de manera simultánea en una sola muestra, ofreciendo una visión más completa de la biología subyacente o el estado de la enfermedad. Además, los análisis multiplexados son más eficientes, reduciendo costos y tiempo al evitar la necesidad de realizar múltiples pruebas individuales. Por tal motivo, consideramos relevante la mejora de nuestro sistema hacia una plataforma compatible con este tipo de mediciones.

Hasta el momento, mediante el uso de nuestro método de detección basado en NPMs hemos sido capaces de la detección de anticuerpos dirigidos contra 4 proteínas diferentes (biotina, estreptavidina, lisozima y S1), siendo capaces además de conjugar dos de estas proteínas sobre la superficie de las NPMs. No obstante, aún quedan muchas variables por explorar en el método de conjugación empleado con la final de optimizar el uso de NPMs como inmunosoporte. De hecho, de manera paralela a la conjugación de la subunidad S1 intentamos conjugar también NPMs con la proteína de la nucleocápside (N); sin embargo, los resultados preliminares no fueron los esperados por lo que se sugiere la realización de más experimentos para el empleo de esta proteína (**Fig. Suplementaria 15**). Por otro lado, los reactivos requeridos pueden ser relativamente caros en comparación con otros métodos de conjugación, lo que puede aumentar el costo total del experimento, por tanto no descartamos la posibilidad de probar otros métodos de conjugación como el método por grupos SH- (tioles).

Asimismo, pruebas preliminares de fabricación sugieren que es viable el desarrollo de un dispositivo que integre trampas independientes dispuestas de manera paralela que permita generar una curva de calibración específica para cada prueba, de manera similar al funcionamiento de una prueba ELISA convencional, ofreciendo a su vez resultados cuantitativos. O bien el análisis paralelo de diferentes muestras (**Fig. Suplementaria 16**).

Por otro lado, para mejorar el potencial de nuestro sistema microfluídico como una herramienta de tipo Point of Care Testing (POCT), es posible la integración de métodos de detección alternativos como los electroquímicos o la implementación de fibras ópticas, que sustituya al empleo de microscopio de fluorescencia. Asimismo, la generación de flujos por microbombas integradas o mediante actuadores piezoeléctricos, para mover fluidos en canales microfluídicos podrían sustituir el uso de las bombas de jeringas o controladores neumáticos comúnmente empleados.

Referencias

1. Velikova T, Georgiev T. SARS-CoV-2 vaccines and autoimmune diseases amidst the COVID-19 crisis. *Rheumatol Int.* 2021;41(3):509-518. doi:10.1007/s00296-021-04792-9
2. Roknuzzaman ASM, Sarker R, Nazmunnahar, Shahriar M, Mosharrafa R AI, Islam MR. The WHO has Declared COVID-19 is No Longer a Pandemic-Level Threat: A Perspective Evaluating Potential Public Health Impacts. *Clinical Pathology.* 2024;17. doi:10.1177/2632010X241228053
3. Addo IY, Dadzie FA, Okeke SR, Boadi C, Boadu EF. Duration of immunity following full vaccination against SARS-CoV-2: a systematic review. *Archives of Public Health.* 2022;80(1). doi:10.1186/s13690-022-00935-x
4. Wang M, Jia M, Wei Z, Wang W, Shang Y, Ji H. Construction and effectiveness evaluation of a knowledge-based infectious disease monitoring and decision support system. *Sci Rep.* 2023;13(1). doi:10.1038/s41598-023-39931-8
5. Iliescu FS, Ionescu AM, Gogianu L, et al. Point-of-care testing-the key in the battle against SARS-CoV-2 pandemic. *Micromachines (Basel).* 2021;12(12). doi:10.3390/mi12121464
6. Ha Y, Kim I. Recent Developments in Innovative Magnetic Nanoparticles-Based Immunoassays: From Improvement of Conventional Immunoassays to Diagnosis of COVID-19. *Biochip J.* 2022;16(4):351-365. doi:10.1007/s13206-022-00064-1
7. Hahn A, Podbielski A, Meyer T, et al. On detection thresholds—a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* 2020;205. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105377
8. Verma MK, Sharma PK, Verma HK, et al. Rapid diagnostic methods for SARS-CoV-2 (COVID-19) detection: an evidence-based report. *J Med Life.* 2021;14(4):431-442. doi:10.25122/jml-2021-0168
9. Høeg TB, Prasad V. Rapid antigen testing for COVID-19: Decreasing diagnostic reliability, potential detrimental effects and a lack of evidence to support continued public funding of community-based testing. *Public Health in Practice.* 2023;6. doi:10.1016/j.puhip.2023.100451
10. Zhan L, Guo SZ, Song F, et al. The Role of Nanoparticle Design in Determining Analytical Performance of Lateral Flow Immunoassays. *Nano Lett.* 2017;17(12):7207-7212. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02302
11. Liu Y, Zhan L, Qin Z, Sackrison J, Bischof JC. Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis. *ACS Nano.* 2021;15(3):3593-3611. doi:10.1021/acsnano.0c10035
12. Owen SI, Williams CT, Garrod G, et al. Twelve lateral flow immunoassays (LFAs) to detect SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of Infection.* 2022;84(3):355-360. doi:10.1016/j.jinf.2021.12.007
13. Jones HE, Mulchandani R, Taylor-Phillips S, et al. Accuracy of four lateral flow immunoassays for anti SARS-CoV-2 antibodies: a head-to-head comparative study. *EBioMedicine.* 2021;68. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103414

14. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol.* 2020;154(3):293-304. doi:10.1093/AJCP/AQAA112
15. Basto-Abreu A, Carnalla M, Torres-Ibarra L, et al. Nationally representative SARS-CoV-2 antibody prevalence estimates after the first epidemic wave in Mexico. *Nat Commun.* 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-28232-9
16. Greene SE, Huang Y, Kim W, et al. A simple point-of-care assay accurately detects anti-spike antibodies after SARS-CoV-2 vaccination. *Journal of Clinical Virology Plus.* 2023;3(1). doi:10.1016/j.jcvp.2023.100135
17. Wheeler SE, Shurin G V., Yost M, et al. Differential Antibody Response to mRNA COVID-19 Vaccines in Healthy Subjects. *Microbiol Spectr.* 2021;9(1). doi:10.1128/spectrum.00341-21
18. Shi D, Weng T, Wu J, et al. Dynamic Characteristic Analysis of Antibodies in Patients With COVID-19: A 13-Month Study. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.708184
19. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol.* 2020;5(52). doi:10.1126/sciimmunol.abe0367
20. Rodríguez CF, Andrade-Pérez V, Vargas MC, et al. Breaking the clean room barrier: exploring low-cost alternatives for microfluidic devices. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11. doi:10.3389/fbioe.2023.1176557
21. Morales Navarrete P, Tjon KCE, Hosseini Z, Yuan J. High-gradient magnetophoretic bead trapping for enhanced electrochemical sensing and particle manipulation. *Lab Chip.* 2023;23(8):2016-2028. doi:10.1039/d2lc01037b
22. Miranda I, Souza A, Sousa P, et al. Properties and applications of PDMS for biomedical engineering: A review. *J Funct Biomater.* 2022;13(1). doi:10.3390/jfb13010002
23. Teste B, Malloggi F, Siaugue JM, Varenne A, Kanoufi F, Descroix S. Microchip integrating magnetic nanoparticles for allergy diagnosis. *Lab Chip.* 2011;11(24):4207-4213. doi:10.1039/c1lc20809h
24. Guevara-Pantoja PE, Sánchez-Domínguez M, Caballero-Robledo GA. Micro-nanoparticles magnetic trap: Toward high sensitivity and rapid microfluidic continuous flow enzyme immunoassay. *Biomicrofluidics.* 2020;14(1). doi:10.1063/1.5126027
25. Chathappady House NN, Palissery S, Sebastian H. Corona Viruses: A Review on SARS, MERS and COVID-19. *Microbiol Insights.* 2021;14:117863612110024. doi:10.1177/11786361211002481
26. Wartecki A, Rzymiski P. On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater. *Water (Switzerland).* 2020;12(6). doi:10.3390/W12061598
27. Synowiec A, Szczepa A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. Published online 2021. doi:10.1128/CMR

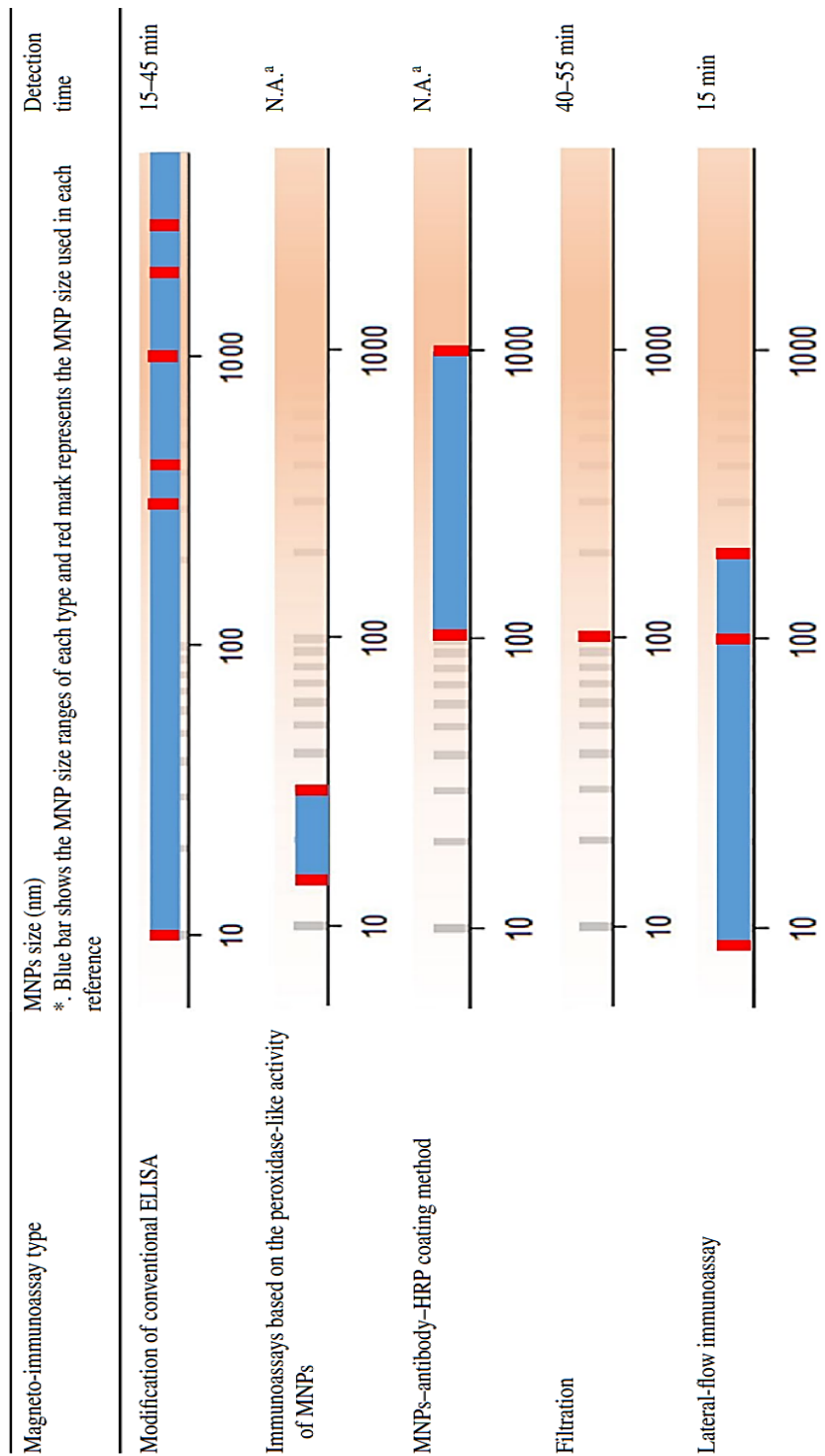
28. Alhamid G, Tombuloglu H, Rabaan AA, Al-Suhaimi E. SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(11). doi:10.1016/j.sjbs.2022.103465
29. Pérez-Abeledo M, Sanz Moreno JC. SARS-CoV-2 variants, a still unfinished story. *Vacunas.* 2021;22(3):173-179. doi:10.1016/j.vacun.2021.06.003
30. Gellenoncourt S, Saunders N, Robinot R, et al. The Spike-Stabilizing D614G Mutation Interacts with S1/S2 Cleavage Site Mutations To Promote the Infectious Potential of SARS-CoV-2 Variants. *J Virol.* 2022;96(19). doi:10.1128/jvi.01301-22
31. Zhang L, Jackson CB, Mou H, et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-19808-4
32. *INFORME INTEGRAL DE COVID-19 EN MÉXICO.*
33. Salamanna F, Maglio M, Landini MP, Fini M. Body Localization of ACE-2: On the Trail of the Keyhole of SARS-CoV-2. *Front Med (Lausanne).* 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.594495
34. Wertenaue C, Pfeifer C, Roskos M, März W. Rapid antigen tests for SARS-CoV-2—a synopsis of the medical evidence. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2023;107(2). doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.116027
35. Di Nardo F, Chiarello M, Cavalera S, Baggiani C, Anfossi L. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors.* 2021;21(15). doi:10.3390/s21155185
36. Swank Z, Gr´ G, Michielin G, et al. A high-throughput microfluidic nanoimmunoassay for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in serum or ultralow-volume blood samples. doi:10.1073/pnas.2025289118/-/DCSupplemental.y
37. Darwish IA. *Immunoassay Methods and Their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.*; 2006.
38. Slagle KM, Ghosn SJ. *CE U P D A T E - C H E M I S T R Y I I I I Immunoassays Tools for Sensitive, Specific, and Accurate Test Results.* <https://academic.oup.com/labmed/article-abstract/27/3/177/2503571>
39. Kingsmore SF. *Multiplexed Protein Measurement: Technologies and Applications of Protein and Antibody Arrays.*
40. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies.* 2019;8(4). doi:10.3390/antib8040055
41. Lin CC, Wang JH, Wu HW, Lee G Bin. Microfluidic Immunoassays. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation.* 2010;15(3):253-274. doi:10.1016/j.jala.2010.01.013
42. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion.* 2007;5(4):227-240. doi:10.2450/2007.0047-07
43. De La Rica R, Stevens MM. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(12):821-824. doi:10.1038/nnano.2012.186

44. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides (NY)*. 2015;72:4-15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
45. Dinis-Oliveira RJ. Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis. *Bioanalysis*. 2014;6(21):2877-2896. doi:10.4155/bio.14.208
46. Vashist SK, Luong JHT. Immunoassays: An overview. In: *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier; 2018:1-18. doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00001-3
47. *Communications to the Editors*.
48. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. *IMMUNOASSAY USING ANTIGEN-ENZYM CONJUGATES*. Vol 15.; 1971.
49. Jun BH, Kang H, Lee YS, Jeong DH. Fluorescence-based multiplex protein detection using optically encoded microbeads. *Molecules*. 2012;17(3):2474-2490. doi:10.3390/molecules17032474
50. Zhang S, Garcia-D'Angeli A, Brennan JP, Huo Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst*. 2013;139(2):439-445. doi:10.1039/c3an01835k
51. Jamiruddin MR, Meghla BA, Islam DZ, et al. Microfluidics Technology in SARS-CoV-2 Diagnosis and Beyond: A Systematic Review. *Life*. 2022;12(5). doi:10.3390/life12050649
52. Lin Z, Zou Z, Pu Z, Wu M, Zhang Y. Application of microfluidic technologies on COVID-19 diagnosis and drug discovery. *Acta Pharm Sin B*. 2023;13(7):2877-2896. doi:10.1016/j.apsb.2023.02.014
53. Lacharme F, Vandevyver C, Gijs MAM. Full on-chip nanoliter immunoassay by geometrical magnetic trapping of nanoparticle chains. *Anal Chem*. 2008;80(8):2905-2910. doi:10.1021/ac7020739
54. *Application Notes Advertising Feature.*; 2008. <http://www.nature.com/naturemethods>
55. Scott SM, Ali Z. Fabrication methods for microfluidic devices: An overview. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(3). doi:10.3390/mi12030319
56. Ching T, Nie X, Chang SY, Toh YC, Hashimoto M. Techniques and materials for the fabrication of microfluidic devices. In: *Principles of Human Organs-on-Chips*. Elsevier; 2023:1-36. doi:10.1016/B978-0-12-823536-2.00014-6
57. Jiang J, Zhan J, Yue W, Yang M, Yi C, Li CW. A single low-cost microfabrication approach for polymethylmethacrylate, polystyrene, polycarbonate and polysulfone based microdevices. *RSC Adv*. 2015;5(45):36036-36043. doi:10.1039/c5ra02220g
58. Peluso P, Wilson DS, Do D, et al. *Optimizing Antibody Immobilization Strategies for the Construction of Protein Microarrays*. www.elsevier.com/locate/yabio
59. Guevara-Pantoja PE, Chavez-Pineda OG, Solis-Serrano AM, Garcia-Cordero JL, Caballero-Robledo GA. An affordable 3D-printed positioner fixture improves the resolution of conventional milling for easy prototyping of acrylic microfluidic devices. *Lab Chip*. 2020;20(17):3179-3186. doi:10.1039/d0lc00549e
60. Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: From separation to detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2020;128. doi:10.1016/j.trac.2020.115915

61. Garcia-Cordero JL, Maerkl SJ. Mechanically Induced Trapping of Molecular Interactions and Its Applications. *J Lab Autom.* 2016;21(3):356-367. doi:10.1177/2211068215578586
62. Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases.* 2017;12(2). doi:10.1116/1.4978435
63. Rodriguez-Moncayo R, Cedillo-Alcantar DF, Guevara-Pantoja PE, et al. A high-throughput multiplexed microfluidic device for COVID-19 serology assays. *Lab Chip.* 2021;21(1):93-104. doi:10.1039/d0lc01068e
64. Tran-Nguyen TS, Ngo-Luong DT, Nguyen-Phuoc KH, Tran TL, Tran-Van H. Simultaneously targeting nitrocellulose and antibody by a dual-headed protein. *Protein Expr Purif.* 2021;177. doi:10.1016/j.pep.2020.105764
65. Grant BD, Anderson CE, Williford JR, et al. SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid antigen-detecting half-strip lateral flow assay toward the development of point of care tests using commercially available reagents. *Anal Chem.* 2020;92(16):11305-11309. doi:10.1021/acs.analchem.0c01975
66. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 2020;92(9):1518-1524. doi:10.1002/jmv.25727
67. Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: A review. *Reports on Progress in Physics.* 2015;78(1). doi:10.1088/0034-4885/78/1/016601
68. Sato K, Yamanaka M, Hagino T, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection. *Lab Chip.* 2004;4(6):570-575. doi:10.1039/b411356j
69. Mani V, Chikkaveeraiah B V., Rusling JF. Magnetic particles in ultrasensitive biomarker protein measurements for cancer detection and monitoring. *Expert Opin Med Diagn.* 2011;5(5):381-391. doi:10.1517/17530059.2011.607161
70. Zhong Z, He J, Li G, Xia L. Recent Advances in Magnetic Nanoparticles-Assisted Microfluidic Bioanalysis. *Chemosensors.* 2023;11(3). doi:10.3390/chemosensors11030173
71. Williams HM. The application of magnetic nanoparticles in the treatment and monitoring of cancer and infectious diseases. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research.* 2017;10. doi:10.1093/biohorizons/hzx009
72. Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: From separation to detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* 2020;128. doi:10.1016/j.trac.2020.115915
73. Kabe Y, Sakamoto S, Hatakeyama M, et al. Application of high-performance magnetic nanobeads to biological sensing devices. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(9):1825-1837. doi:10.1007/s00216-018-1548-y
74. Rogers HB, Anani T, Choi YS, Beyers RJ, David AE. Exploiting size-dependent drag and magnetic forces for size-specific separation of magnetic nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):20001-20019. doi:10.3390/ijms160820001
75. Subramanian M, Miaskowski A, Jenkins SI, Lim J, Dobson J. Remote manipulation of magnetic nanoparticles using magnetic field gradient to

- promote cancer cell death. *Appl Phys A Mater Sci Process*. 2019;125(4). doi:10.1007/s00339-019-2510-3
76. Reynoso-Hernández KB, Guevara-Pantoja PE, Caballero-Robledo GA. Capture efficiency of magnetic nanoparticles through the compaction effect of a microparticles column. *Phys Rev E*. 2021;104(2). doi:10.1103/PhysRevE.104.024603
 77. Teste B, Malloggi F, Gassner AL, et al. Magnetic core shell nanoparticles trapping in a microdevice generating high magnetic gradient. *Lab Chip*. 2011;11(5):833-840. doi:10.1039/c0lc00510j
 78. Hernández-Ortiz JA, Guevara-Pantoja PE, Andrade-Medina M, Carrillo-Tripp M, Caballero-Robledo GA. Computer Numerical Control Micromilling of a Microfluidic Acrylic Device with a Staggered Restriction for Magnetic Nanoparticle-based Immunoassays. *J Vis Exp*. 2022;(184). doi:10.3791/63899
 79. Ogilvie IRG, Sieben VJ, Floquet CFA, Zmijan R, Mowlem MC, Morgan H. Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2010;20(6). doi:10.1088/0960-1317/20/6/065016
 80. Guevara-Pantoja PE, Caballero-Robledo GA. Tuning finely the packing density of heavy microparticles in a microfluidic channel. *RSC Adv*. 2015;5(31):24635-24639. doi:10.1039/c4ra13926g
 81. Bamshad A, Nikfarjam A, Khaleghi H. A new simple and fast thermally-solvent assisted method to bond PMMA-PMMA in micro-fluidics devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2016;26(6). doi:10.1088/0960-1317/26/6/065017
 82. Suleiman E, Mayer J, Lehner E, et al. Conjugation of native-like hiv-1 envelope trimers onto liposomes using edc/sulfo-nhs chemistry: Requirements and limitations. *Pharmaceutics*. 2020;12(10):1-27. doi:10.3390/pharmaceutics12100979
 83. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2011;2(1):21. doi:10.4103/2229-5186.79345
 84. Hackett J, Hoff-Velk J, Golden A, et al. *Recombinant Mouse-Human Chimeric Antibodies as Calibrators in Immunoassays That Measure Antibodies to Toxoplasma Gondii*. Vol 36.; 1998.
 85. Goodhew B, Tang X, Goldstein J, Lee J, Martin D, Gwyn S. Validation of immunoassays for the Chlamydia trachomatis antigen Pgp3 using a chimeric monoclonal antibody. *Sci Rep*. 2023;13(1). doi:10.1038/s41598-023-33834-4
 86. *Cytophilic Monoclonal Antibodies and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*.
 87. Vernet R, Charrier E, Grogg J, Mach N. A quantitative elisa protocol for detection of specific human igg against the sars-cov-2 spike protein. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(7). doi:10.3390/vaccines9070770

Material suplementario



^aNot available

Figura Suplementaria 1. Tamaño de PMNPs utilizadas para diferentes tipos de inmunoensayos y tiempos de detección obtenidos⁶.

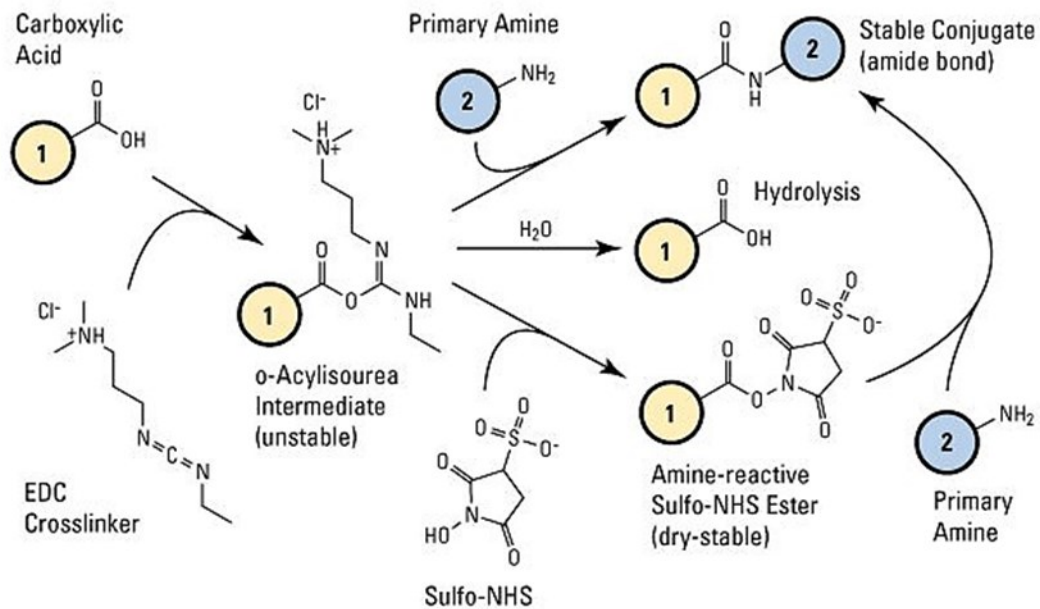


Figura Suplementaria 2. Reacción de conjugación mediante EDC/Sulfo-NHS. El EDC activa a grupos carboxilo presents en las NPMs formando un intermediario de O-acilisuourea reactivo con aminas. En presencia de Sulfo-NHS, el EDC convierte grupos carboxilo en ésteres Sulfo-NHS, que son reactivos con aminas.

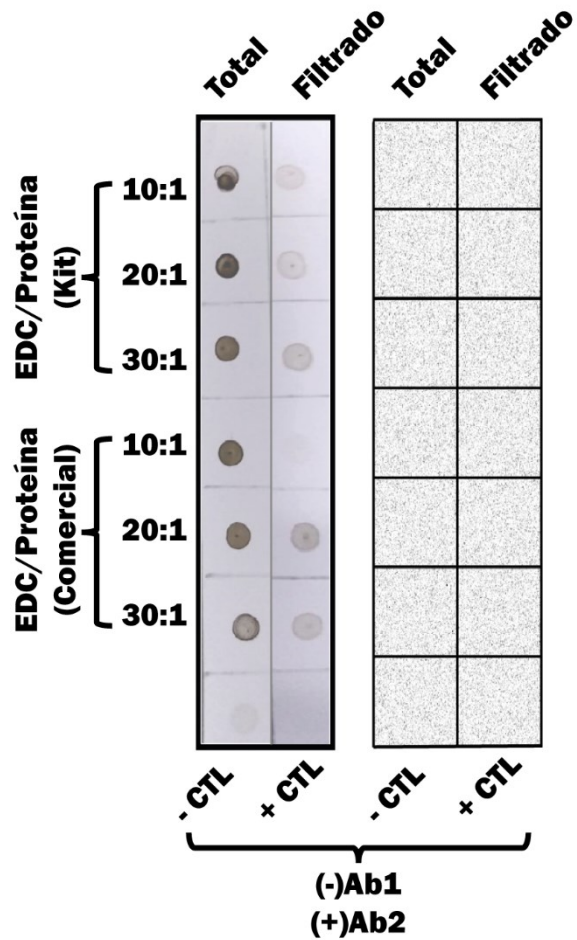


Figura Suplementaria 3. Dot blot para la conjugación de NPMs-lisozima de 1 paso sin Ab1. Se utilizó un exceso molar de 10, 20 y 30 veces de EDC sobre la proteína Lisozima. Se empleó una dilución 1:1000 de Ab2 ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y una concentración de 100 ng mL^{-1} de un Ab1 no dirigido a la proteína lisozima para probar la especificidad de los Abs y la eficiencia del bloqueo. Aun con el máximo tiempo de exposición (10 s) la membrana revelada no muestra la presencia de ninguna señal.

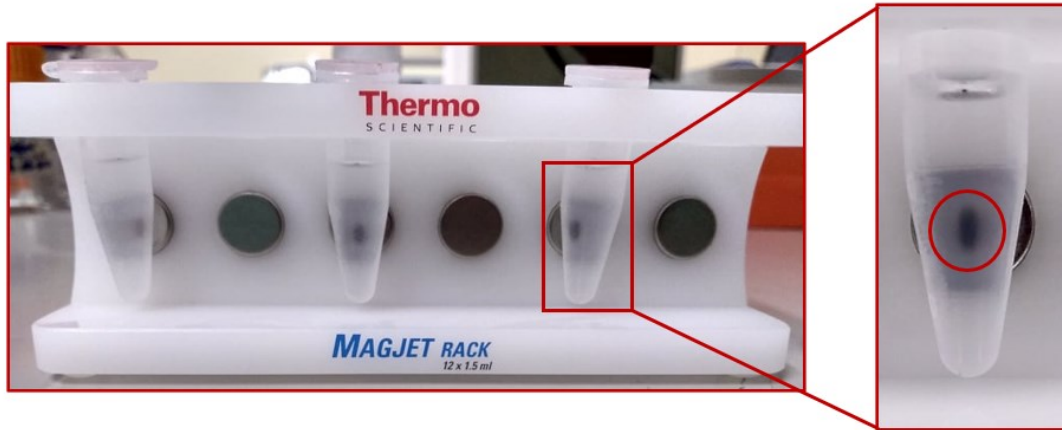
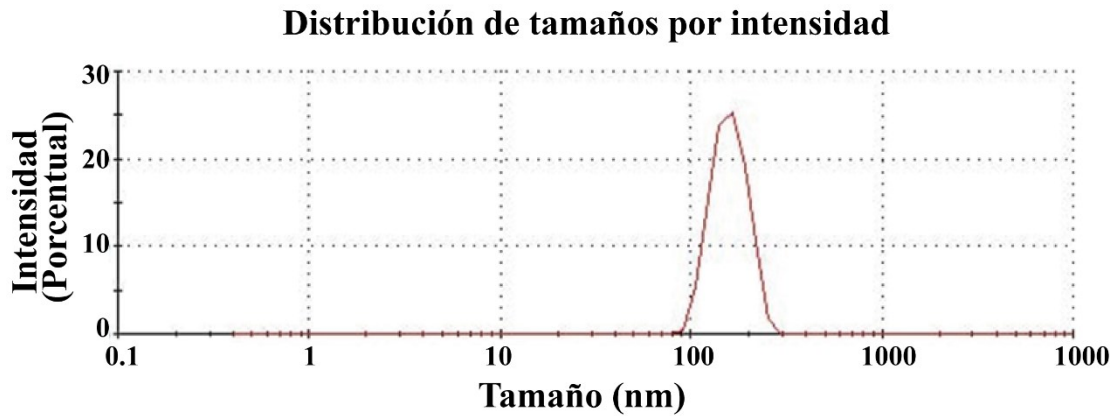


Figura Suplementaria 4. Separación magnética de sobrenadante para NPMs de 30 nm. Se observan los pellets formados de NPMs contenidas en el sobrenadante colectado de los lavados de 3 viales de conjugación de NPMs de 30nm a lisozima mediante el protocolo de 2 pasos. Se dejó 12 h en la gradilla MagJet para permitir la separación magnética. EDC 10:1.

A)



B)

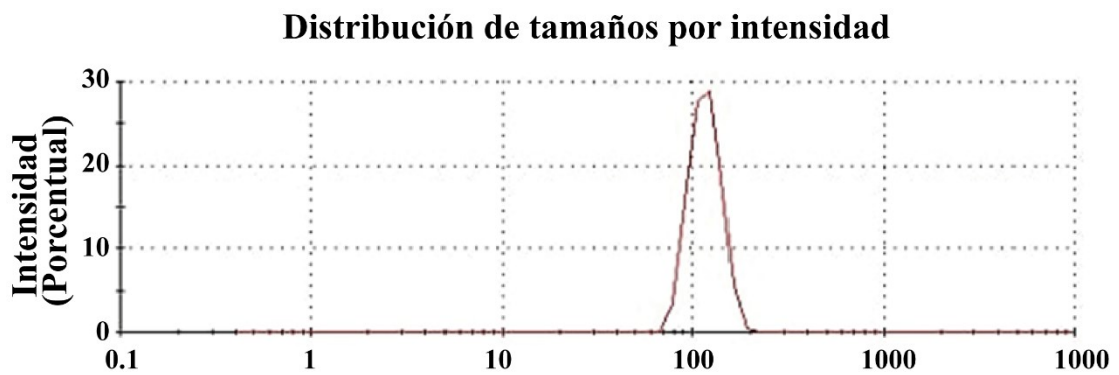


Figura Suplementaria 5. DLS de NPMs de 100 nm. Se muestran los gráficos de distribución de tamaños por intensidad para la fracción del sobrenadante colectada para **A)** NPMs sin proteína conjugada. La distribución de tamaños muestra un valor promedio de 154 nm. **B)** NPMs con lisozima conjugada mediante el protocolo de conjugación de 1 paso. Cada una de las gráfica de distribución de tamaños representa el promedio de 3 repeticiones.

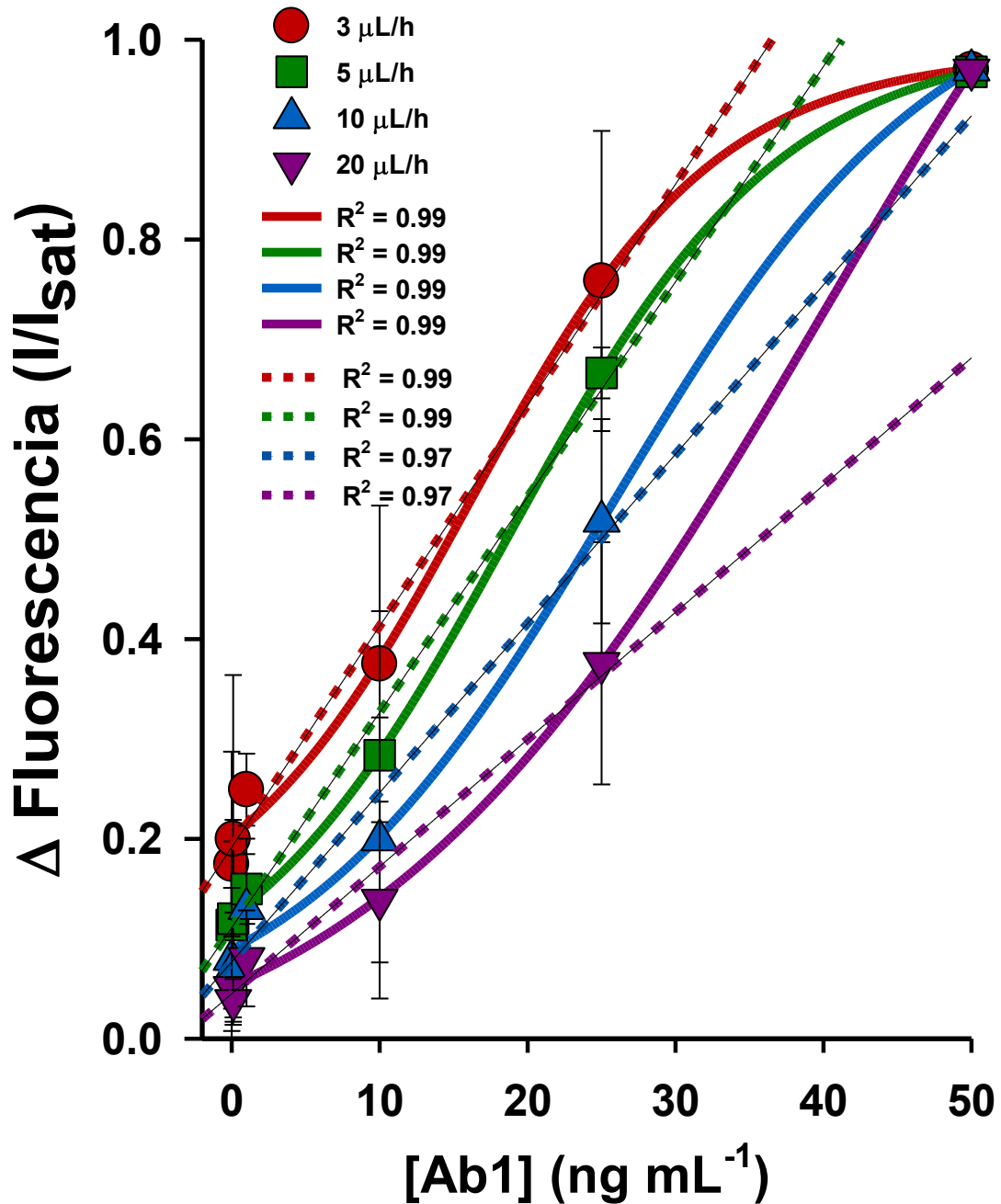


Figura Suplementaria 6. Protocolo de inmunoensayo extendido. Perfil completo de Δ fluorescencia para el rango de concentraciones de anticuerpo anti-lisozima utilizado (0.1-100 ng mL⁻¹) mediante el protocolo de inmunoensayo extendido. Se observa el ajuste lineal en línea punteada. El mejor ajuste lineal ($R^2 = 0.99$) se obtuvo a 10 μ L h⁻¹. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

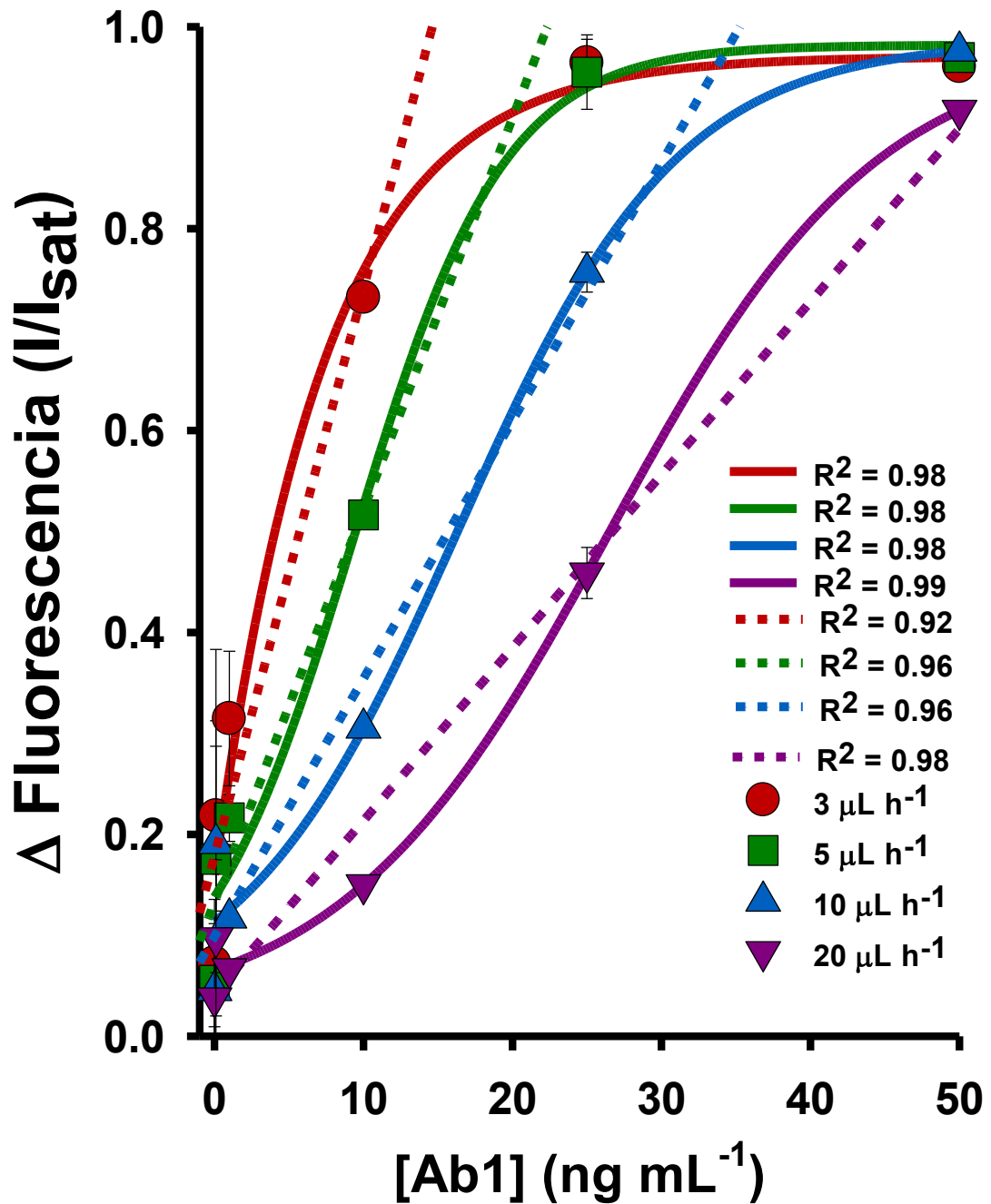


Figura Suplementaria 7. Protocolo de inmunoensayo reducido. Perfil completo de Δ fluorescencia para el rango de concentraciones de anticuerpo anti-lisozima utilizado ($0.1\text{-}50 \text{ ng mL}^{-1}$) con el protocolo de inmunoensayo reducido. Se observa el ajuste lineal en línea punteada. El mejor ajuste lineal ($R^2 = 0.98$) se obtuvo a $20 \mu\text{L h}^{-1}$. $n=3$.

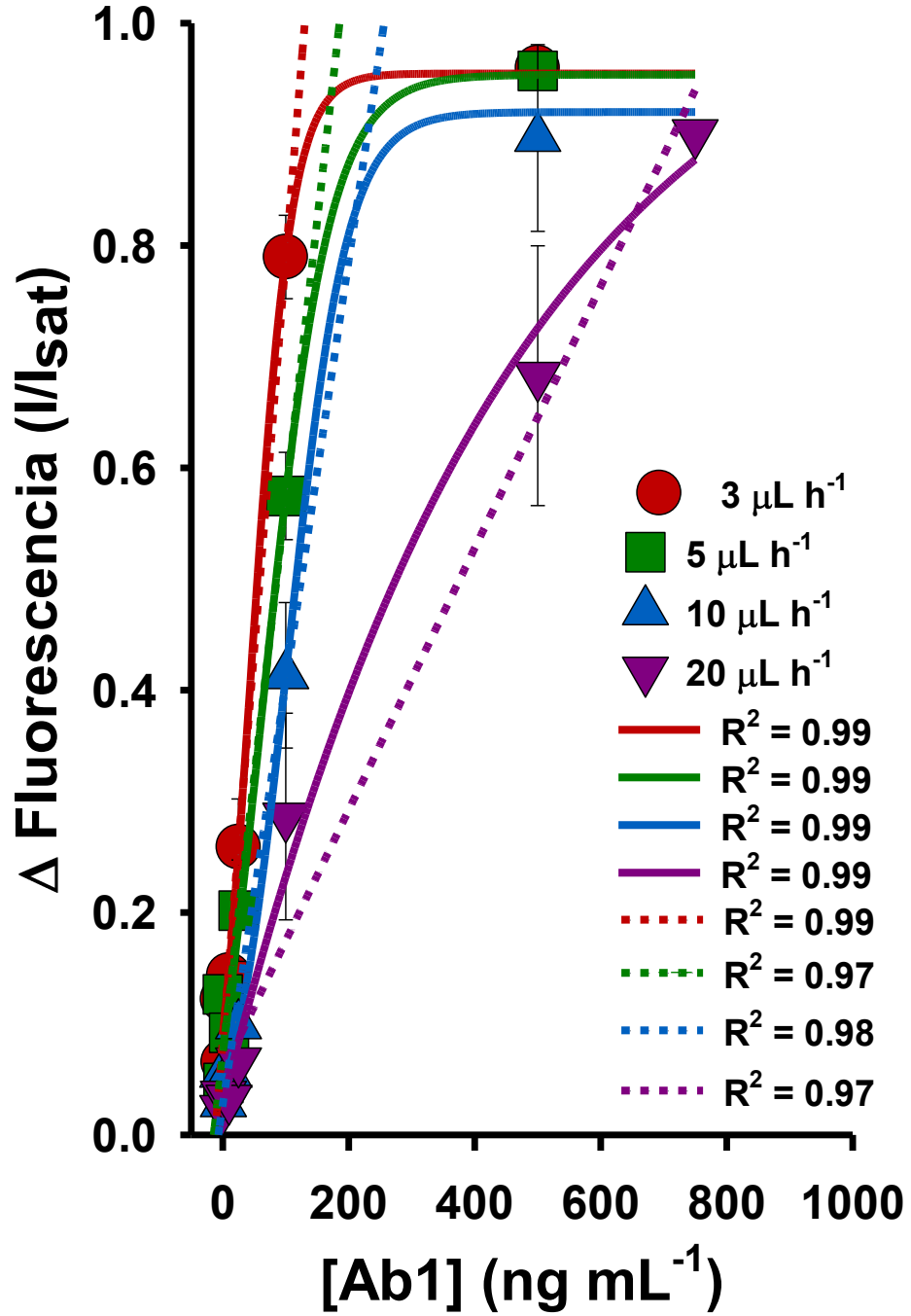


Figura Suplementaria 8. Protocolo de inmunoensayo mixto. Perfil completo de Δ fluorescencia para el rango de concentraciones de anticuerpo anti-lisozima utilizado ($0.1\text{-}50 \text{ ng mL}^{-1}$) con el protocolo de ELISA mixto en el chip. Se observa el ajuste lineal en línea punteada. El mejor ajuste lineal ($R^2 = 0.97$) se obtuvo a una tasa de flujo de $20 \mu\text{L h}^{-1}$. $n=3$.

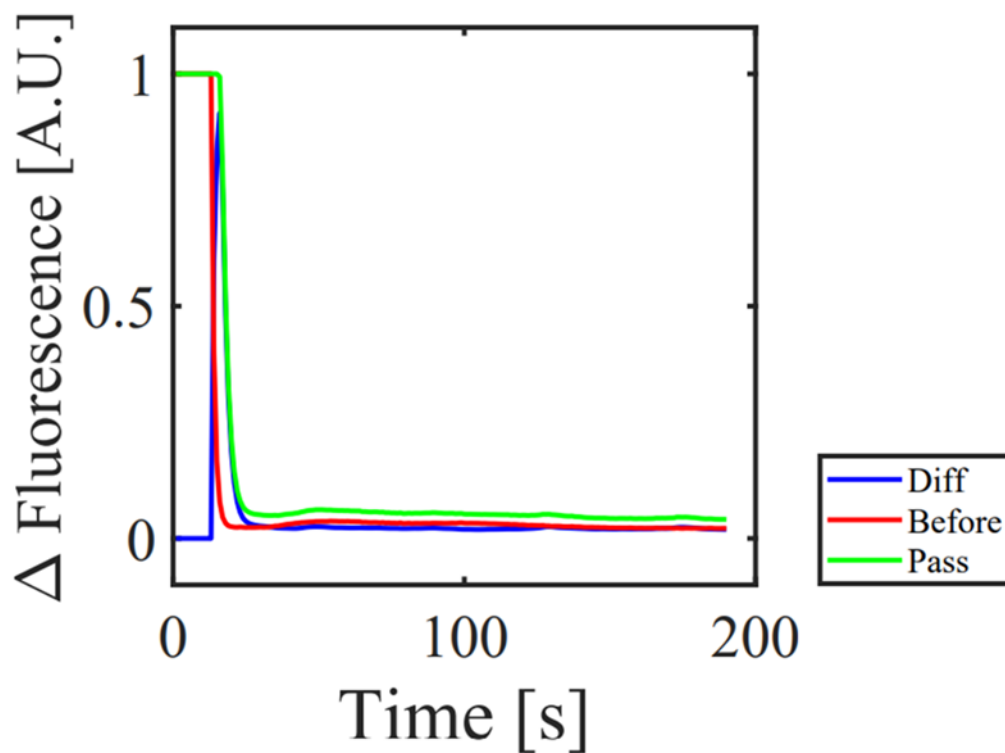


Figura Suplementaria 9. Flujo de lavado en el dispositivo. Entre cada una de las medidas de fluorescencia correspondientes a cada flujo aplicada (3-20 $\mu\text{L h}^{-1}$), se aplicó un flujo de lavado haciendo fluir únicamente el mismo sustrato a 100 $\mu\text{L h}^{-1}$, lo que evita la conversión por parte de la enzima HRP y lleva los niveles de fluorescencia a su nivel basal en pocos segundos para iniciar la siguiente medición. (Before: medición antes de la trampa; Pass: medición después de la trampa; Diff: diferencia después-antes).

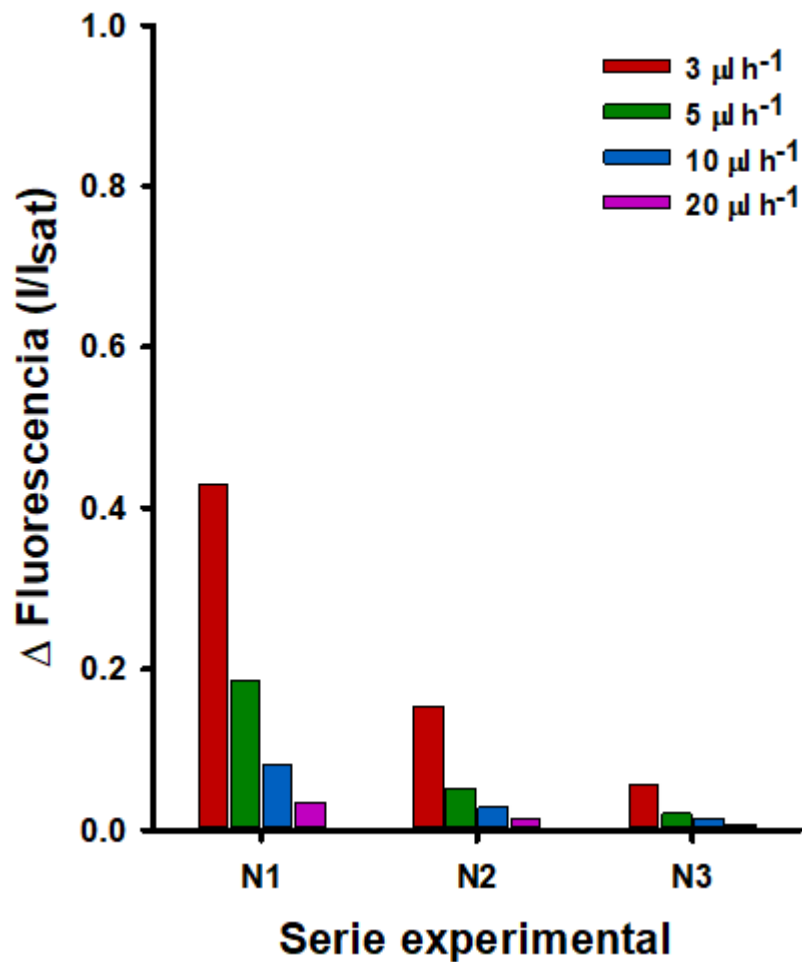


Figura Suplementaria 10. Oxidación gradual del AmpliFlu Red. Mediante el inmunoensayo extenso en nuestro dispositivo observamos una menor señal para una misma concentración de Ab1 anti-lisozima (25 ng mL^{-1}) cuando el vial de AmpliFlu Red fue preparado desde el inicio para los 3 experimentos. Este compartamiento fue debido a la oxidación del sustrato, lo cual generaba una mayor señal de ruido, afectando a la medición final del valor Δ Fluorescencia.

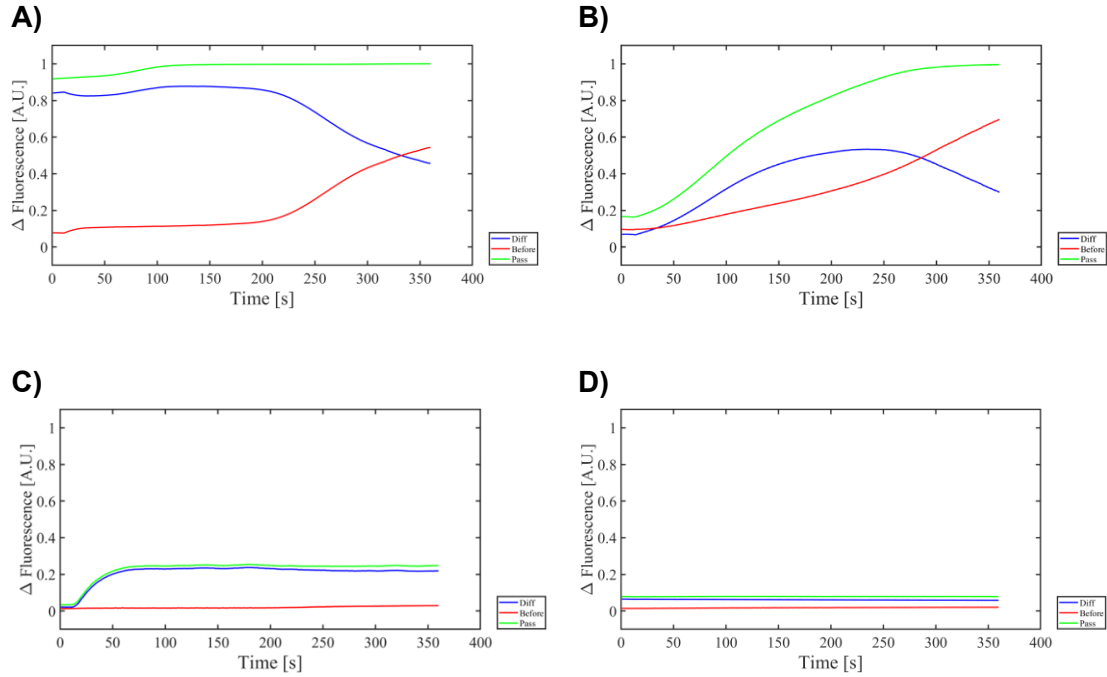


Figura Suplementaria 11. Optimización de la concentración de Ab2 para el inmunoensayo completo dentro del chip. Se utilizó una concentración de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo anti-lisozima para la optimización de la concentración de Ab2 para el protocolo de inmunoensayo completo dentro del chip. **A)** Una dilución de 1:500 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), igual que la utilizada para los protocolos extendido y reducido saturó la señal obtenida. **B)** La dilución de 1:1000 ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) también produce una señal de ruido de fondo alta. **C)** La dilución de 1:2,500 ($0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) se consideró como óptima para las mediciones de Δ fluorescencia, mientras que **D)** en la dilución de 1:5,000 ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) la señal de fluorescencia no fue visible en absoluto. Cada una de las imágenes representativas corresponde a un flujo de sustrato de $3 \mu\text{L h}^{-1}$.

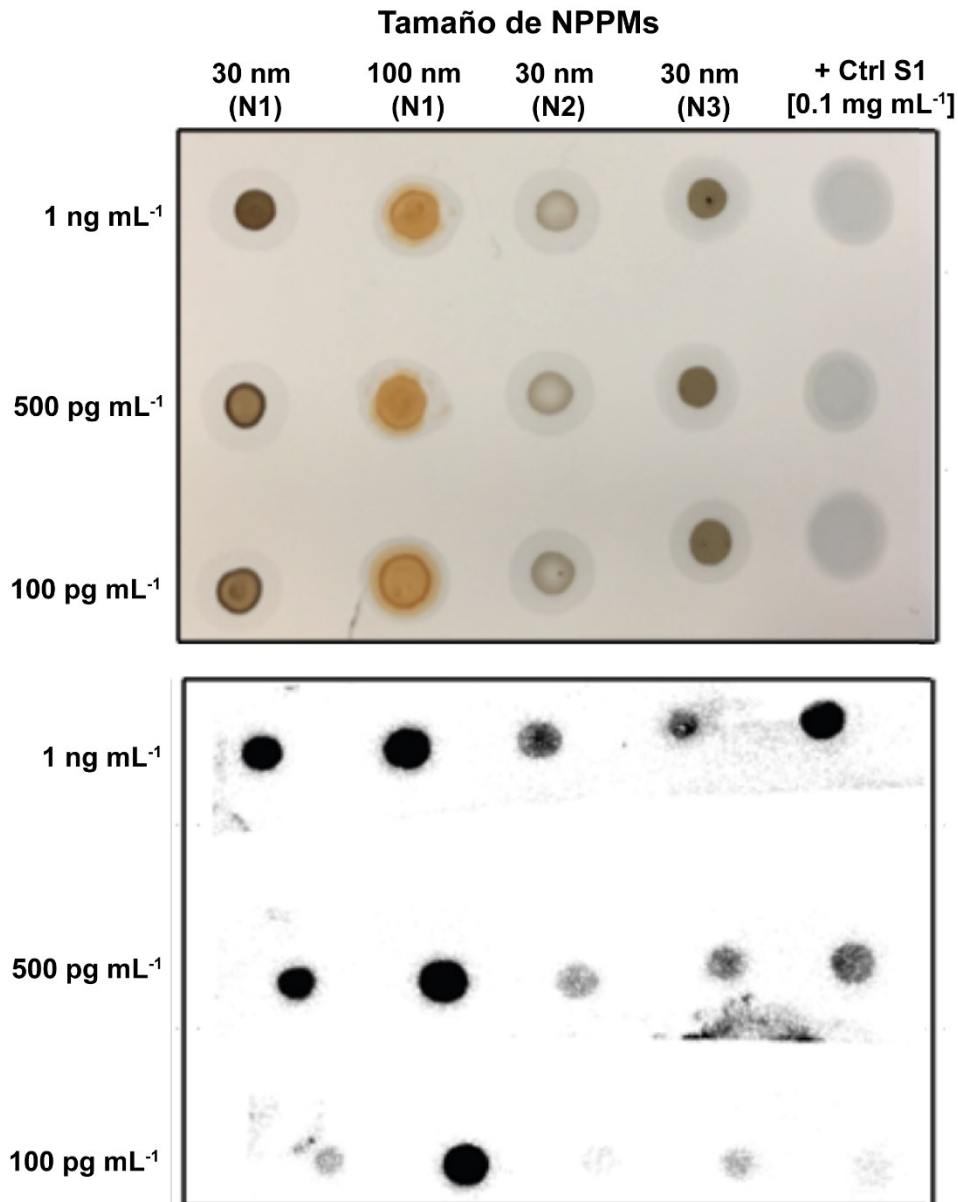


Figura Suplementaria 12. Dot blot para S1 conjugada a NPPMs. Se observa la fotografía de una membrana de dot blot (arriba) y las correspondientes manchas después del revelado (abajo) para NPPMs de diferentes tamaños (30 y 100 nm) con la subunidad S1 del virus SARS-CoV-2 conjugada en su superficie. Se emplearon varias concentraciones de Ab1 (100 pg mL⁻¹ – 1 ng mL⁻¹). Los resultados mostraron una conjugación exitosa para 3 lotes de NPPMs de 30 nm. No obstante, las manchas obtenidas para NPPMs de 100 nm muestran una mayor intensidad lo cual sugiere una conjugación más eficiente al utilizar este tamaño de NPPMs. Tiempo de exposición = 10 s.

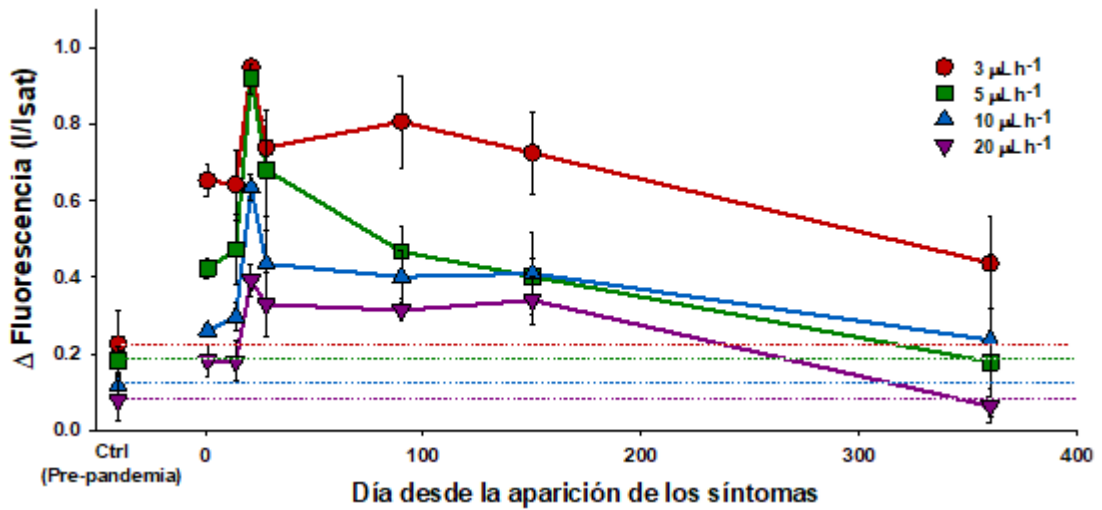


Figura Suplementaria 13. Curso temporal para los niveles de IgG en muestras de suero correspondientes a cada una de las tasas de flujo probadas (3-20 $\mu\text{L h}^{-1}$). La línea punteada indica el nivel de fluorescencia de referencia correspondiente a la muestra de control tomada antes del inicio de la pandemia de COVID-19.

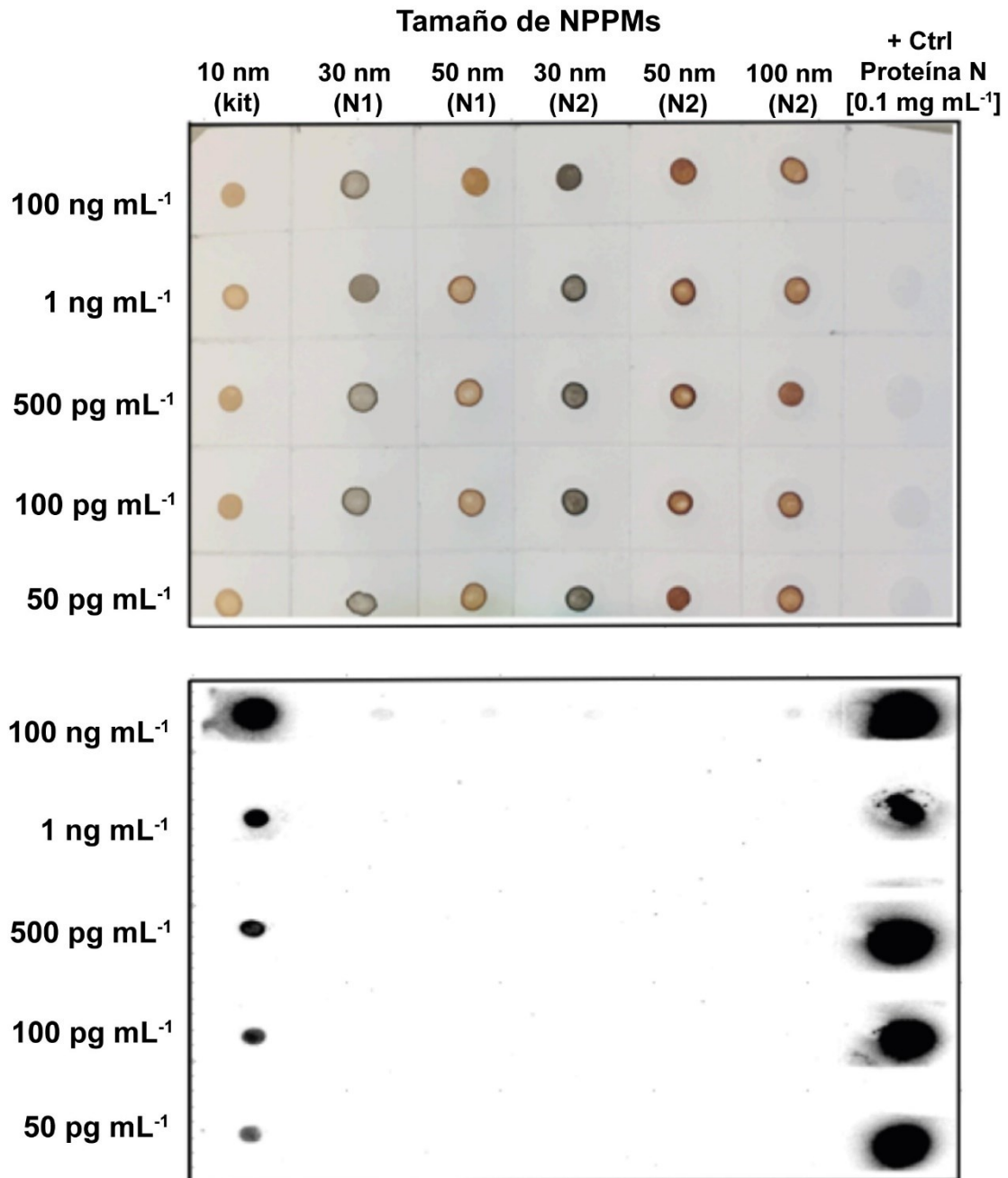


Figura Suplementaria 14. Dot blot para NPMs con Proteína N conjugada. Se observa la fotografía de una membrana de dot blot (arriba) y las correspondientes manchas después del revelado (abajo) para NPMs de diferentes tamaños (10, 30, 50 y 100 nm) conjugadas a la proteína de la nucleocápside (N). Se emplearon varias concentraciones de Ab1 (50 pg mL⁻¹ – 100 ng mL⁻¹). Los resultados preliminares mostraron la conjugación de proteína N únicamente para las NPMs de 10 nm empleando los reactivos del kit de conjugación, mientras que no se observaron las manchas características tras el revelado para ninguno de los otros tamaños de NPMs al emplear el protocolo de 2 pasos empleado con lisozima y S1.

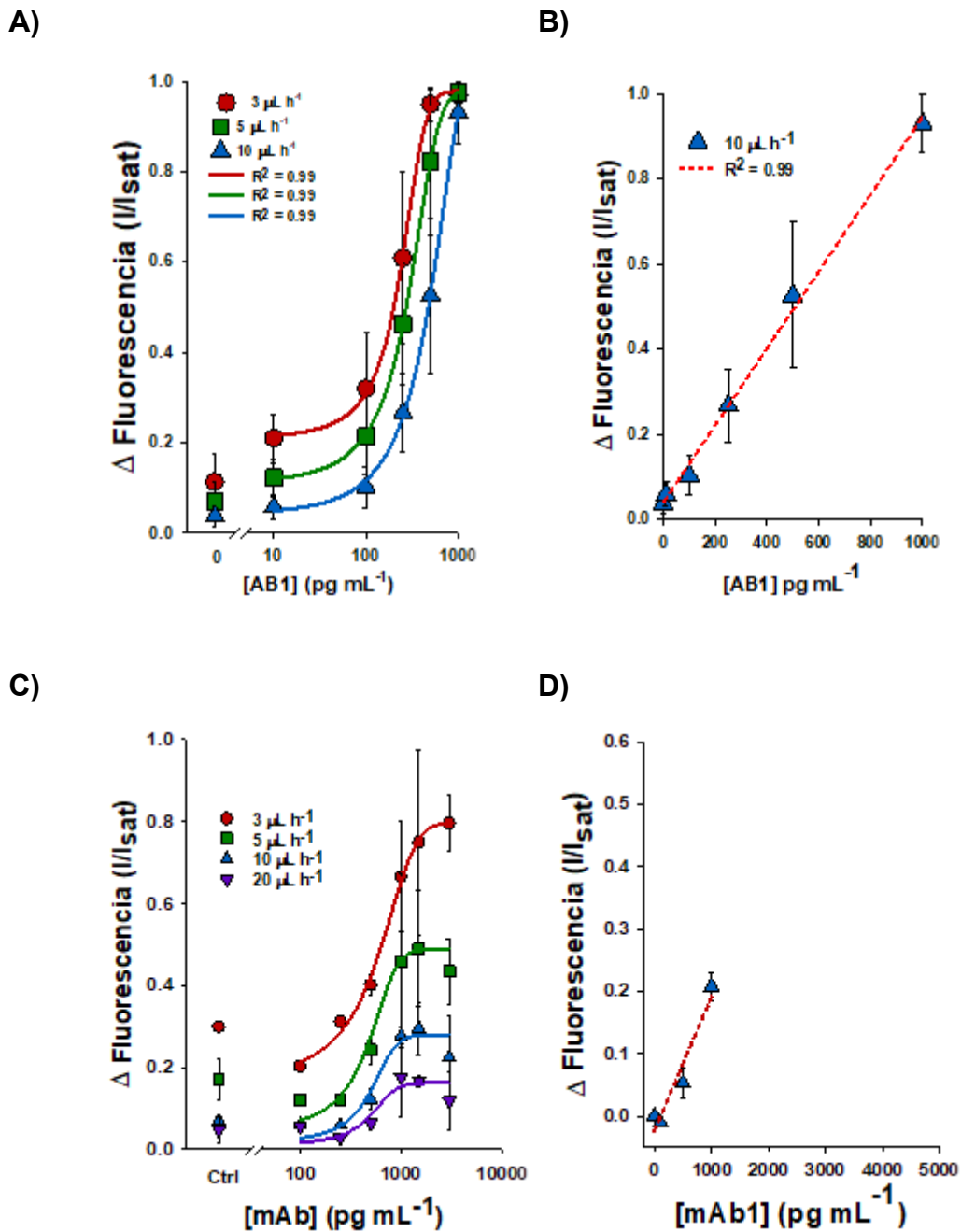


Figura Suplementaria 15. Inmunoensayo extenso para NPMs de 100 nm con la subunidad S1 conjugada. **A)** El valor Δ fluorescencia en el estado estacionario se representó en escala semilogarítmica para diferentes valores de anticuerpo anti-S1 para diferentes velocidades del sustrato (3, 5 y 10 μ L h⁻¹) utilizando el protocolo de inmunoensayo extenso. **B)** El mejor ajuste lineal ($R^2 = 0,99$) se obtuvo a 10 μ L h⁻¹. LOD = 84 pg mL⁻¹; n=3. Se muestran en **C)** y **D)** las gráficas correspondientes al protocolo dentro del chip previamente descritas en las **Figs. 45A** y **46A**.

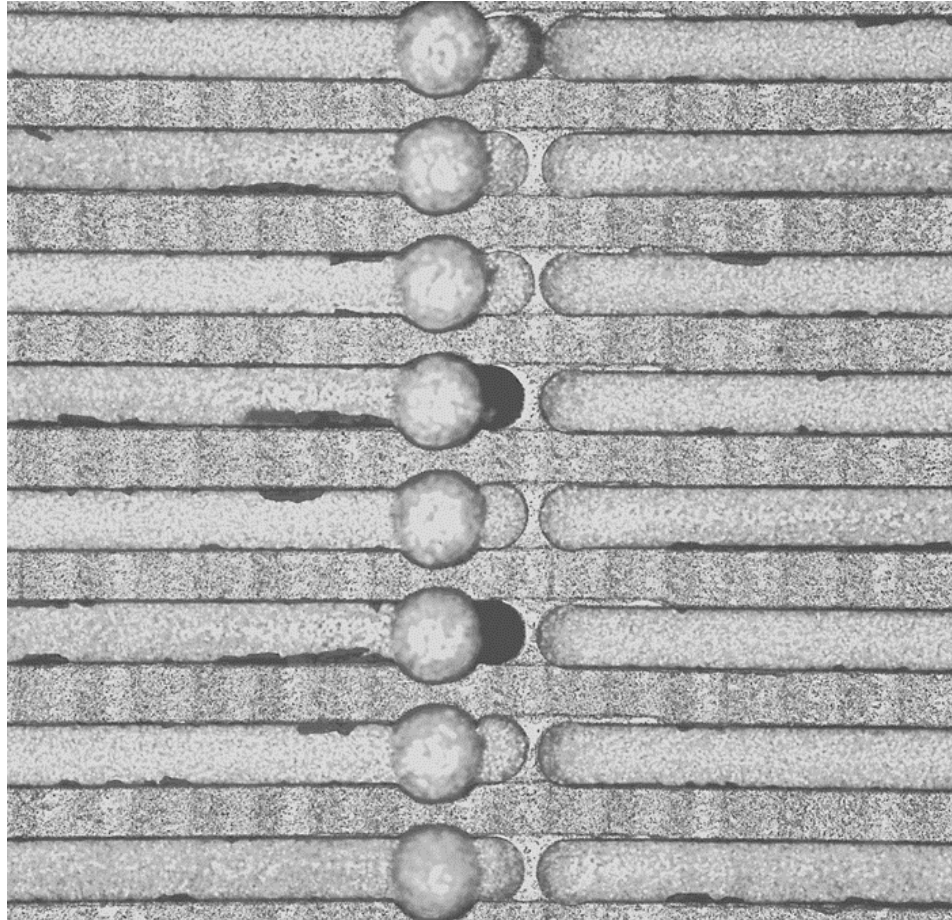


Figura Suplementaria 16. Dispositivo microfluídico con múltiples trampas. Se muestra una fotografía de un prototipo de dispositivo que permite la generación de hasta 8 trampas independientes para el análisis de múltiples muestras o la generación simultánea de la curva de calibración para el análisis cuantitativo.

Apéndice I

Cálculo de LOD

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma/S$$

donde: **S** = pendiente de la curva de calibración

S = m en la ecuación de la recta: $y = mx + b$

σ = desviación estándar del blanco

$$\sigma_{Blanco} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

donde: x_i son las mediciones individuales de las muestras de blanco.

\bar{x} es la media de las mediciones de las muestras de blanco.

n es el número de muestras de blanco.

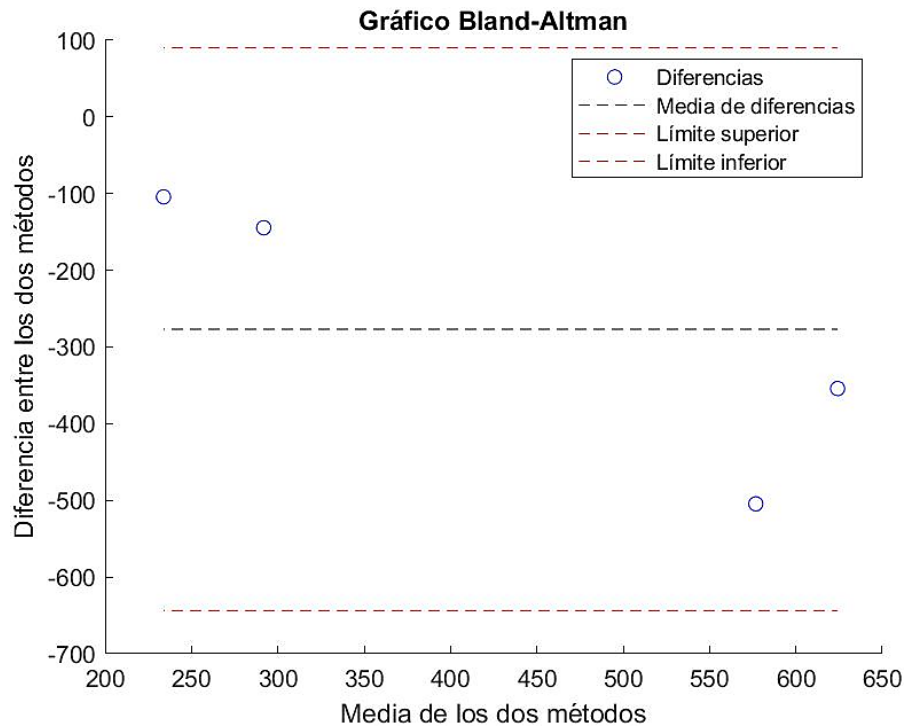
Sistema	Ec. de la recta	S	σ	LOD
Extenso Ab anti-lisozima	$y = 0.0178x + 0.0729$	0.0178	0.0716	3.3 ng mL ⁻¹
Reducido Ab anti-lisozima	$y = 0.0171x + 0.0422$	0.0171	0.0523	10.1 ng mL ⁻¹
En chip Ab anti-lisozima	$y = 0.0012x + 0.0567$	0.0012	8.39x10 ⁻³	231 pg mL ⁻¹
En chip mAb anti-S1	$y = 0.0002x + 0.0231$	0.0002	0.0049	823 fg mL ⁻¹
En chip pAb anti-S1	$y = 8e^{-5}x + 0.0292$	8x10 ⁻⁵	0.0049	205.8 pg mL ⁻¹
Extenso mAb anti-S1	$y = 0.0009x + 0.0394$	0.0009	0.0229	84 pg mL ⁻¹
ELISA kit mAb anti-S1	$y = 0.0007x + 0.0162$	0.0007	0.003	141 pg mL ⁻¹
ELISA kit pAb anti-S1	$y = 0.0092x + 0.1148$	0.0092	8.16x10 ⁻⁴	293 pg mL ⁻¹
ELISA de laboratorio pAb anti-S1	$y = 0.0013x + 0.0958$	0.0013	0.0115	29.2 ng mL ⁻¹

Apéndice II

Análisis de Bland-Altman

El gráfico de Bland-Altman es útil para evaluar tanto la concordancia entre dos métodos de medición como para identificar cualquier sesgo sistemático o patrones en las diferencias. Es importante observar no solo si la mayoría de los puntos están dentro de los límites de acuerdo, sino también si están distribuidos aleatoriamente y si la media de las diferencias es cercana a cero. Esto proporciona una visión más completa de cómo los métodos comparan entre sí.

Mediante esta herramienta estadística evaluamos los resultados cuantitativos ofrecidos por el ELISA en el dispositivo microfluídico y en microplaca desarrollado en el laboratorio. Sin embargo, nuestro análisis se vio limitado a la comparación de únicamente 4 pares de puntos debido a que algunos de los puntos se encontraban fuera del límite lineal cuantificable. Se muestra a continuación el gráfico obtenido y se agrega un análisis del mismo.



Ejes:

- **Eje X:** Media de los dos métodos.
- **Eje Y:** Diferencia entre los dos métodos.

Puntos de datos:

- Cada punto azul representa la diferencia entre las mediciones de los dos métodos para una muestra, trazada contra la media de las mediciones de los dos métodos para esa misma muestra.

Línea de media de diferencias (línea punteada negra):

- La línea horizontal punteada negra representa la media de las diferencias entre las mediciones de los dos métodos. En este gráfico, parece estar alrededor de -300.

Límites de acuerdo:

- **Límite superior:** Línea punteada roja superior, que representa la media de las diferencias más 1.96 veces la desviación estándar de las diferencias. Aproximadamente está en 100.
- **Límite inferior:** Línea punteada roja inferior, que representa la media de las diferencias menos 1.96 veces la desviación estándar de las diferencias. Aproximadamente está en -600.

Análisis de los datos:

- **Distribución de las diferencias:** Las diferencias están dispersas alrededor de la media de -300. Las diferencias varían desde aproximadamente 0 hasta -600, lo que indica que hay una discrepancia considerable entre las mediciones de los dos métodos.
- **Variabilidad constante:** No parece haber una tendencia clara en la que la magnitud de las diferencias aumente o disminuya con la media de las mediciones, lo que sugiere que la variabilidad de las diferencias es más o menos constante a lo largo del rango de medición.
- **Consistencia del acuerdo:** Todos los puntos están dentro de los límites de acuerdo (100 y -600), lo que indica que los dos métodos de medición están en un acuerdo razonable dentro de estos rangos.

Conclusión del análisis:

- El gráfico sugiere que hay un sesgo sistemático, dado que la media de las diferencias no está en cero, lo que indica que un método tiende a dar valores más bajos que el otro en alrededor de 300 unidades, en este caso el ELISA en microplaca.
- Todos los puntos están dentro de los límites de acuerdo, lo que sugiere que, en general, los métodos tienen un buen acuerdo dentro de estos rangos y no hay valores atípicos significativos en este caso.