



Deteção específica de ácidos nucleicos para diagnóstico point-of-care de doenças tropicais

DESENVOLVIDO E PRODUZIDO POR BIOSURFIT SA
Rua 25 de Abril, nº 66,
2050-317 Azambuja, Portugal
info@biosurfit.com

Empresa certificada pela ISO 13485
Certificada pela TÜV Rheinland
www.biosurfit.com



Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundos Europeus
Estruturais e de Investimento

Objetivo

Desenvolvimento de um teste para diagnóstico rápido de síndromes febris causados por doenças infectocontagiosas, com recurso a técnicas de amplificação isotérmica (RPA - Recombinase polymerase amplification) e de detecção de ácidos nucleicos usando microscopia de fluorescência para a visualização dos produtos de amplificação. Os procedimentos desenvolvidos de processamento de amostra, amplificação e detecção serão implementados num disco da plataforma spinit que contém microarquiteturas para manipulação de volumes diminutos de sangue.

Métodos & Resultados

Instrumentação: Desenvolveu-se preliminarmente um protótipo de bancada para leitura de fluorescência. Foram usados filtros compatíveis com os as moléculas fluorescentes usadas na detecção do produto de amplificação. Não foi detetada autofluorescência do material habitualmente usado nos discos da plataforma spinit. A possibilidade de integrar diferentes filtros para detetar vários fluoróforos e desta forma ter um ensaio de multiplex foi também considerada.

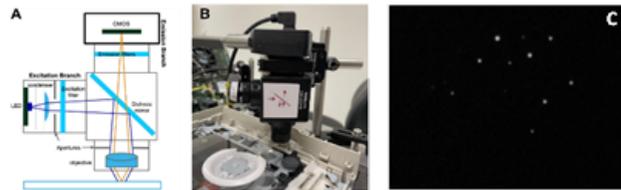


Fig 1 - A) Esquema do protótipo do microscópio de fluorescência. B) Protótipo do microscópio de fluorescência. C) Beads fluorescentes observadas no protótipo de microscópio de fluorescência

Software: Por forma a ser passível de integrar na plataforma spinit foi desenvolvido um algoritmo especificamente projetado para o controle do spinit e a rotação do disco necessária para o desempenho do sistema microfluidoico automatizado. Foi igualmente desenvolvido um algoritmo de contagem eventos fluorescentes, com os seguintes requisitos: 1) Contagem com base no nível de brilho (quadrados azuis observados na Fig 2), 2) Regras de exclusão (quadrados vermelhos observados na Fig 2) com base em tamanho mínimo/máximo e brilho mínimo.

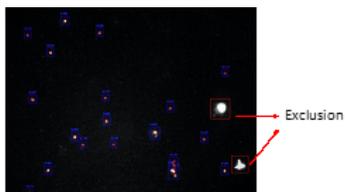


Fig 2 - Exemplo de processamento de imagem pelo algoritmo desenvolvido. Os quadrados azuis são considerados sinais positivos e os quadrados a vermelho identificam objetos excluídos da análise de fluorescência

Disco: No trabalho de integração de um disco na plataforma spinit desenvolveram-se estruturas microfluídicas para a colocação de membranas, que irão também permitir a detecção de fluorescência quer em membrana quer em solução. Foi igualmente projetada a possibilidade de detecção de vários alvos em paralelo e para tal foram desenvolvidos layouts microfluídicos com o objetivo de se fazer uma detecção em multiplex.

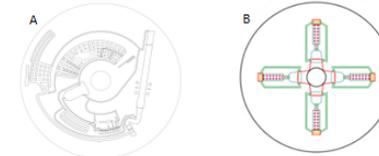


Fig 3 - Disco para a detecção de: A) Um único alvo B) Quatro alvos independentes.

Avaliação de desempenho: Foram usadas sequências curtas de ADN (10-30 nucleótidos) com as modificações necessárias para a captura e detecção através das membranas, para permitir uma avaliação preliminar do desempenho da plataforma. As duas sequências sintéticas são complementares entre si e representam o produto de uma amplificação. Modificações na ponta 3' com as características adequadas à membrana testada foram incluídas para que um dos lados ficasse capturado na superfície da membrana e o outro lado fosse marcado pelas moléculas de detecção (Fig 4). Duas membranas diferentes foram estudadas e caracterizadas. Após calibração foram conduzidos ensaios preliminares onde se amplificou o ADN através da técnica isotérmica RPA e se detetou o produto da amplificação com recurso à membrana. Usou-se apenas a membrana que demonstrou o melhor limite de detecção.

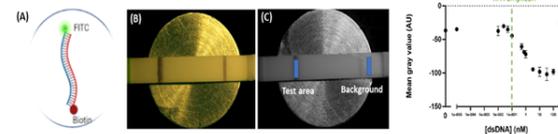


Fig 4 - A) Esquema da molécula de detecção usada como controlo para teste das membranas. B) Solução controlo detectada na membrana. C) Processamento da imagem de microscopia e identificação das áreas de análise. D) Resultado da amplificação por RPA de uma concentração inicial de ADN alvo de 5 pM. Após amplificação a membrana detetou o produto de amplificação e usando a recta de calibração permitiu concluir que se detetou, após amplificação do ADN por 15 min a 37 °C, 100 pM de ADN.

Conclusões

Os resultados até agora alcançados com este projeto permitem prever a expansão do potencial e versatilidade da plataforma spinit®, posicionando a biosurfit na vanguarda do desenvolvimento de soluções de diagnóstico "point-of-care" no campo das doenças infectocontagiosas que possam ser detetadas através de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos isotérmicas, abrindo como possibilidade o mercado de diagnósticos moleculares. Os resultados alcançados mostram que é possível a detecção de material genético numa amostra embora exista margem para otimização e desenvolvimento na integração de todo o teste. Ao nível pediátrico será com certeza uma mais valia para o clínico, que de uma forma rápida e menos dolorosa para a criança, consegue ter acesso ao diagnóstico.