Desarrollo de un dispositivo portátil para la detection *in situ* de *Legionella* viable (PINVIALEG)

FP7-SME-2010-2622561

Aldamiz R.[1], Montero J.A.[1], Martín A.[2], Verdoy L.[2], Gurrutxaga P.[3]

1 Ayuntamiento Bilbao - Sanidad Ambiental; 2 Gaiker-IK4; 3 Ondoan, S. Coop.

PINVIALEG

- 1. PROBLEMÁTICA
- 2. INNOVACIÓN
- 3. OBJETIVO PROYECTO
- 4. RESULTADOS

PINVIALEG

- 1. PROBLEMÁTICA
- 2. INNOVACIÓN
- 3. OBJETIVO PROYECTO
- 4. RESULTADOS

PINVIALEG

Problemática

- Brotes de *Legionella*: gran impacto sanitario y económico, serias implicaciones sociales.
- En Europa, las normativas control de *Legionella* en agua sufren constantes cambios, además de presentar variaciones entre diferentes países.
- Vigilancia: recomendaciones para limitar el número de ufc de *Legionella* por litro en torres de refrigeración.
- El método de detección actual (ISO 11731:1998) es el cultivo microbiológico de las muestras, que identifica bacterias viables y cultivables mediante un proceso largo, laborioso y de baja sensibilidad.

PINVIALEG

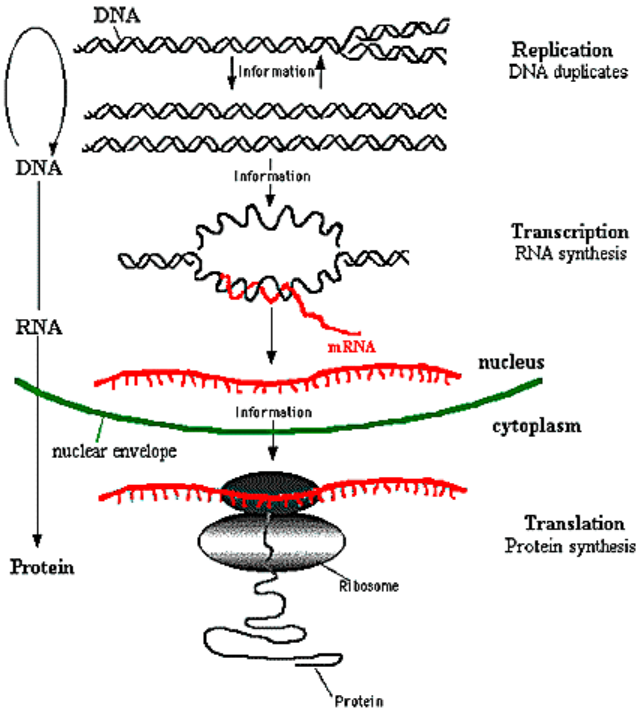
- 1. PROBLEMÁTICA
- 2. INNOVACIÓN
- 3. OBJETIVO PROYECTO
- 4. RESULTADOS

PINVIALEG

Dispositivo portátil para la detección rápida y fácil de interpretar de células viables de *Legionella in situ* de manera efectiva (requerimientos sensibilidad legislación)

PINVIALEG

- **Herramientas biología molecular** (PCR y qPCR): esenciales en el análisis genético: alta **sensibilidad,** precisión y rapidez.
- Actualmente hay kits de detección de *Legionella* en el mercado basados en la identificación específica del ADN. La molécula de ADN es incapaz de discriminar entre bacterias viables e inviables.

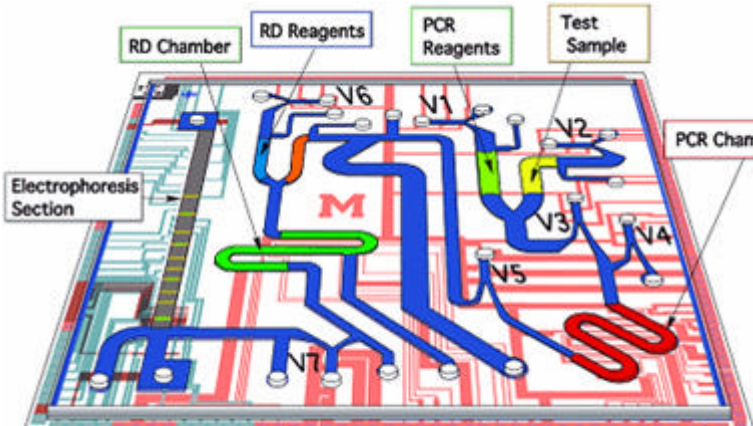


The Central Dogma of Molecular Biology

ARN es un marcador ampliamente utilizado como indicador de **viabilidad.**

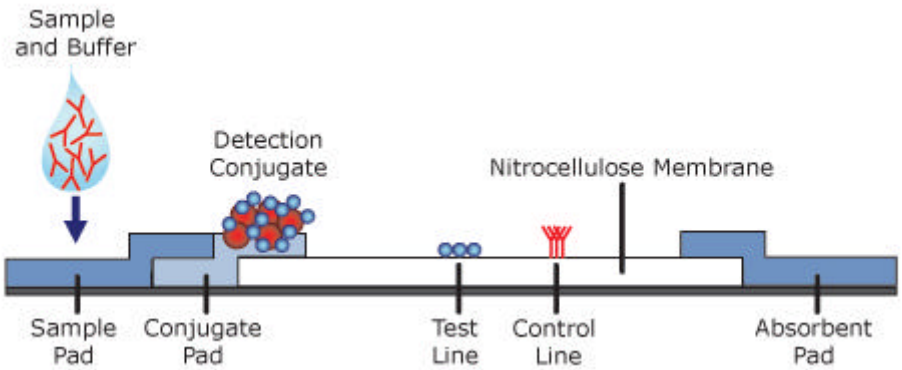
PINVIALEG

- Reciente desarrollo de **sistemas microfluídicos integrados** y su utilización como equipos de diagnóstico, ejemplos: Point of Care, Point of Test.
- Estos sistemas analizan de manera eficiente muestras reales, realizando todos los ensayos analíticos necesarios (lab on chip).
- Ventajas: disminución del tamaño del equipo final (**portabilidad**) y menor tiempo de análisis, menor consumo de reactivos y **reducción del coste** total del mismo.



PINVIALEG

- **Sistema de lectura** portátil y barato: Lateral Flow ImmunoAssay.



Sistema de detección rápido, sencillo y **fácil de utilizar** por personal no cualificado.

PINVIALEG

- 1. PROBLEMÁTICA
- 2. INNOVACIÓN
- 3. OBJETIVO PROYECTO
- 4. RESULTADOS

PINVIALEG

OBJETIVO DEL PROYECTO PINVIALEG

Desarrollar un innovador dispositivo ***portátil****, de* ***base microfluídica****, capaz de identificar* ***in situ*** *y en menos de 3 horas, la presencia de* células **viables** *de Legionella en muestras ambientales.*

- ✓Biología molecular para la detección de células **viables**: **alta sensibilidad**
- ✓**Evitar el pretratamiento** de las muestras, previo al análisis en el laboratorio.
- ✓**Rápida** adquisición de **resultados**
- ✓**Plan de acción para erradicar** la bacteria en el menor tiempo posible.

PINVIALEG

DISPOSITIVO PINVIALEG

- ✓ El **sistema de filtración está integrado con** la tarjeta microfluídica desechable.
- ✓ Todo el procedimiento se realiza ***in situ***.
- ✓ **NASBA: reacción isotérmica,** facilita la **portabilidad**
- ✓ NALFIA como un sistema de lectura: fácil de usar por **personal no cualificado, fácil de interpretar.**

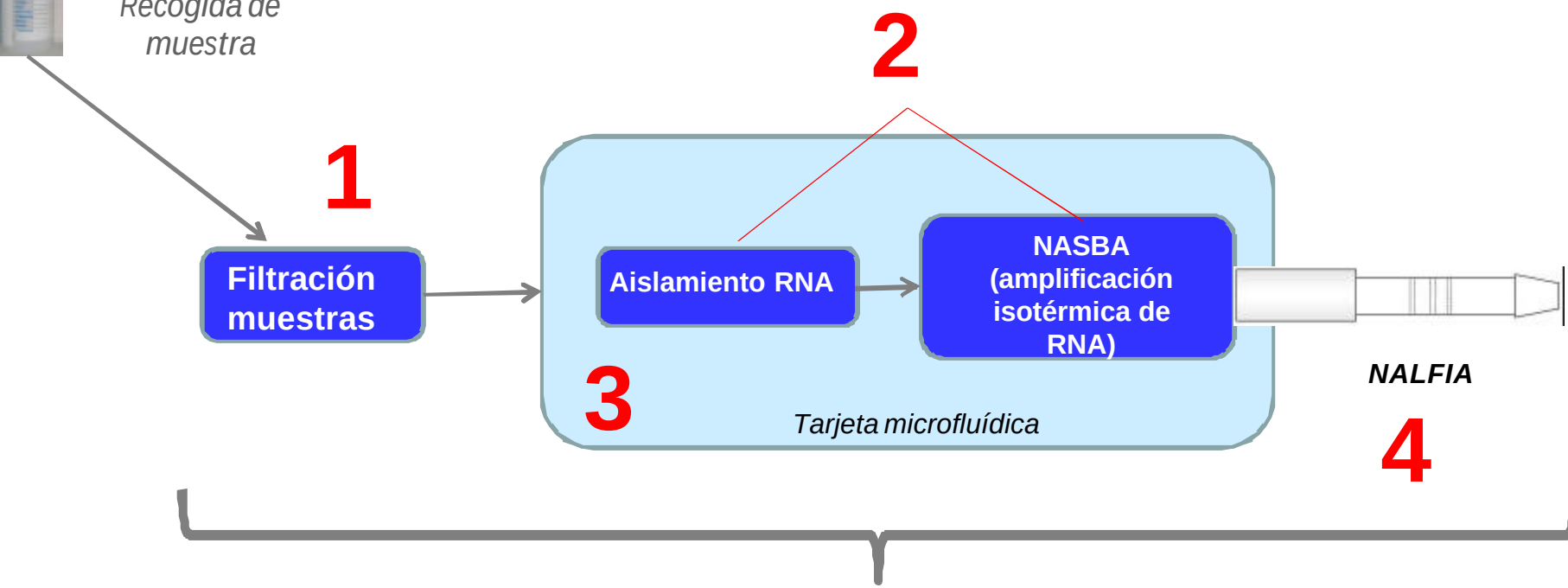
PINVIALEG

- 1. PROBLEMÁTICA
- 2. INNOVACIÓN
- 3. OBJETIVO PROYECTO
- 4. RESULTADOS

PINVIALEG

- Dispositivo PINVIALEG

Paso INICIAL: Recogida de muestra



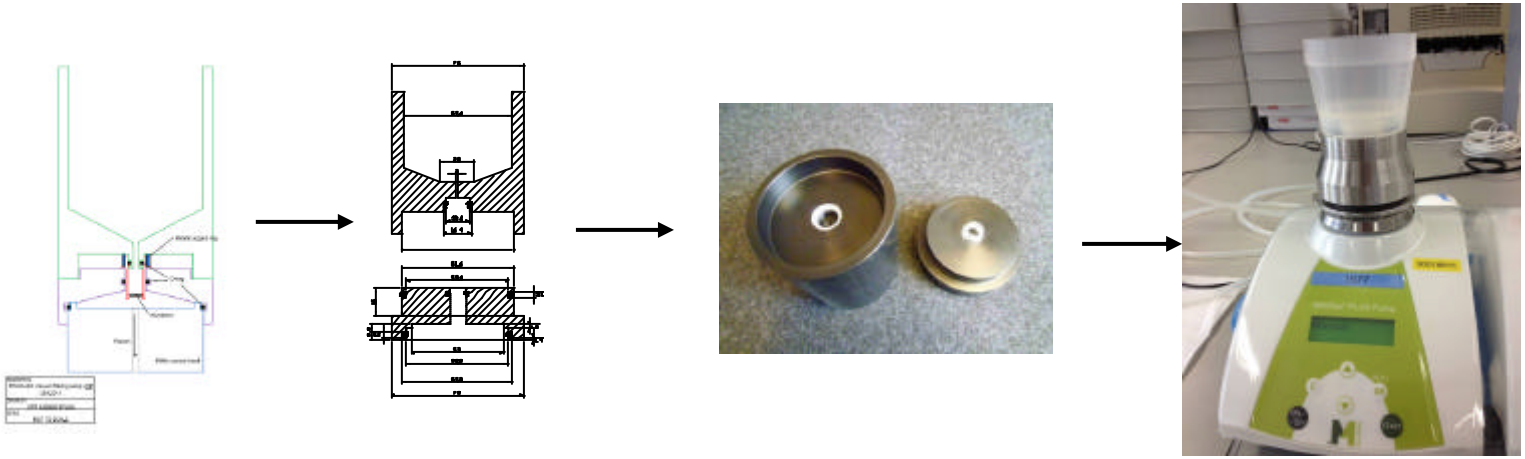
Integración en un dispositivo portátil: dispositivo PINVIALEG

5

PINVIALEG

1. DISEÑO DE UN PROTOTIPO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS Y SISTEMA DE FILTRACIÓN

- Sistema de filtración consiste en 2 ó 3 componentes de fácil ensamblado
- Conexión del dispositivo de filtración con la tarjeta microfluídica (bombas, válvulas, reactivos, etc.)



- Se va a seguir avanzando en el desarrollo del prototipo de filtración.
- El sistema se evaluará para el análisis directo de *Legionella* spp.

PINVIALEG

2. PROCESOS BIOLÓGICOS

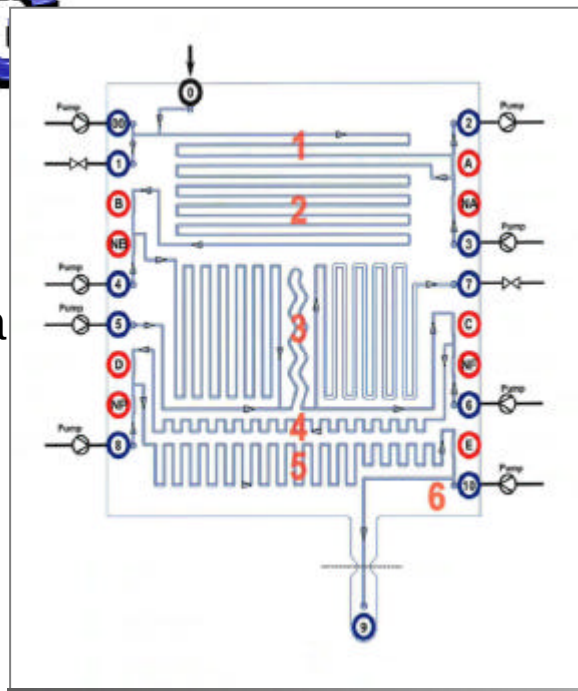
- Se ha puesto a punto un **protocolo de extracción de ARN rápido y sencillo**, **basado en partículas magnéticas,** compatible con el proceso simplificado a realizar en la tarjeta microfluídica, capaz de extraer RNA de 10^2 ufc *L. pneumophila*

- Se ha diseñado un protocolo **NASBA específico y sensible** (RNA correspondiente a 50-100 ufc) para la detección de *L. pneumophila*, adaptado a los requerimientos de miniaturización

- Se ha desarrollado una **tarjeta microfluídica** para realizar procesos biológicos de extracción de RNA y amplificación por NASBA

- Se ha comprobado la **compatibilidad de los procesos biológicos en la tarjeta**

PINVIALEC



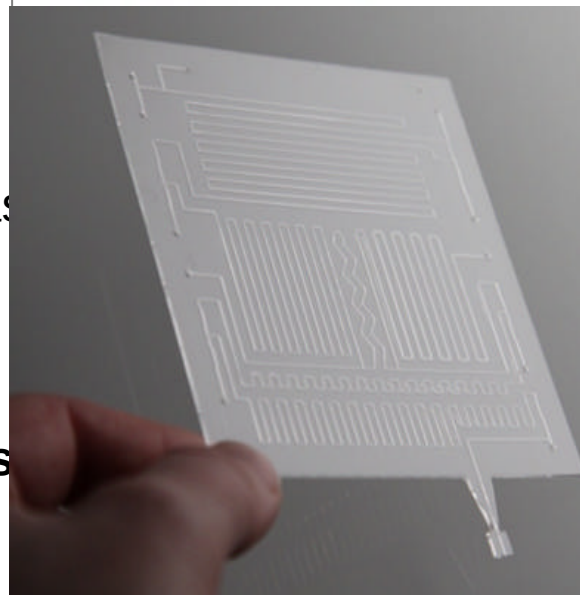
3. TARJETA MICROFLUÍDICA

- Se ha diseñado y fabricado una tarjeta microfluídica (PMMA) para la captura de ARN y la amplificación por NASBA

- El proceso de extración de ARN completo no es posible en el chip desarrollado, algunos de los reactivos degradan el material (PMMA).

- Sin embargo sí que es posible **la captura de las partículas magnéticas y la elución del ARN** de las mismas, aunque se requiere mejorar la repoducibilidad

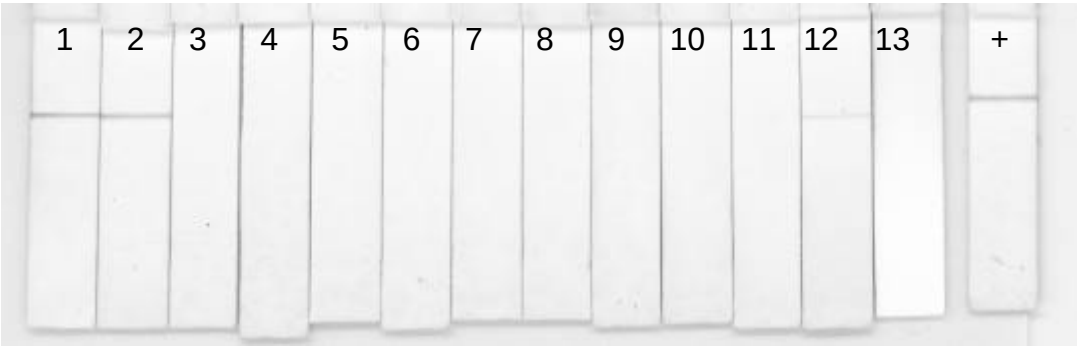
- La amplificación **por NASBA, la hibridación de los sondas para la lectura por NALFIA** es totalmente compatible y reproducible en el chip



PINVIALEG

4. NALFIA PARA LA DETECCIÓN del producto de amplificación de NASBA

- Condiciones de hibridación optimizadas (Tª, buffer composición y pH))
- Control sin producto NASBA: OK
- Producto NASBA sin sondas es negativo: OK



1+2	*Legionella pneumophila*
3+4	*Escherichia coli*
5	*Legionella worsleiensis*
6+7	*Legionella quinlivanii*
8+9	*Legionella sainthelensis*
10	*Legionella micdadeii*
11+12	*Legionella anisa*
13	Negative control (water)
+	Positive control (NASBA DLO)

PINVIALEG

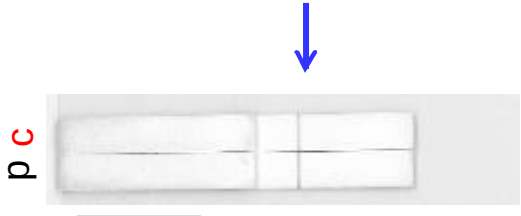
DISPOSITIVO

NASBA: primera fase (mezcla de reactivos y molde, 65ºC 2 minutos) en poyata (tubo)

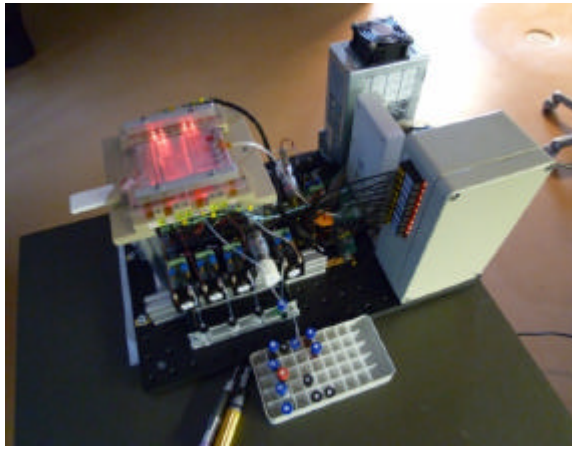
NASBA: segunda fase (adición de enzimas e incubación a 41ºC en tarjeta microfluídica):

- A. NASBA funciona en chip; banda de igual intensidad a la observada en el experimento en poyata (tubo)
- B. NASBA y la inyeccion de los reactivos para la detección de NALFIA funcionan en chip

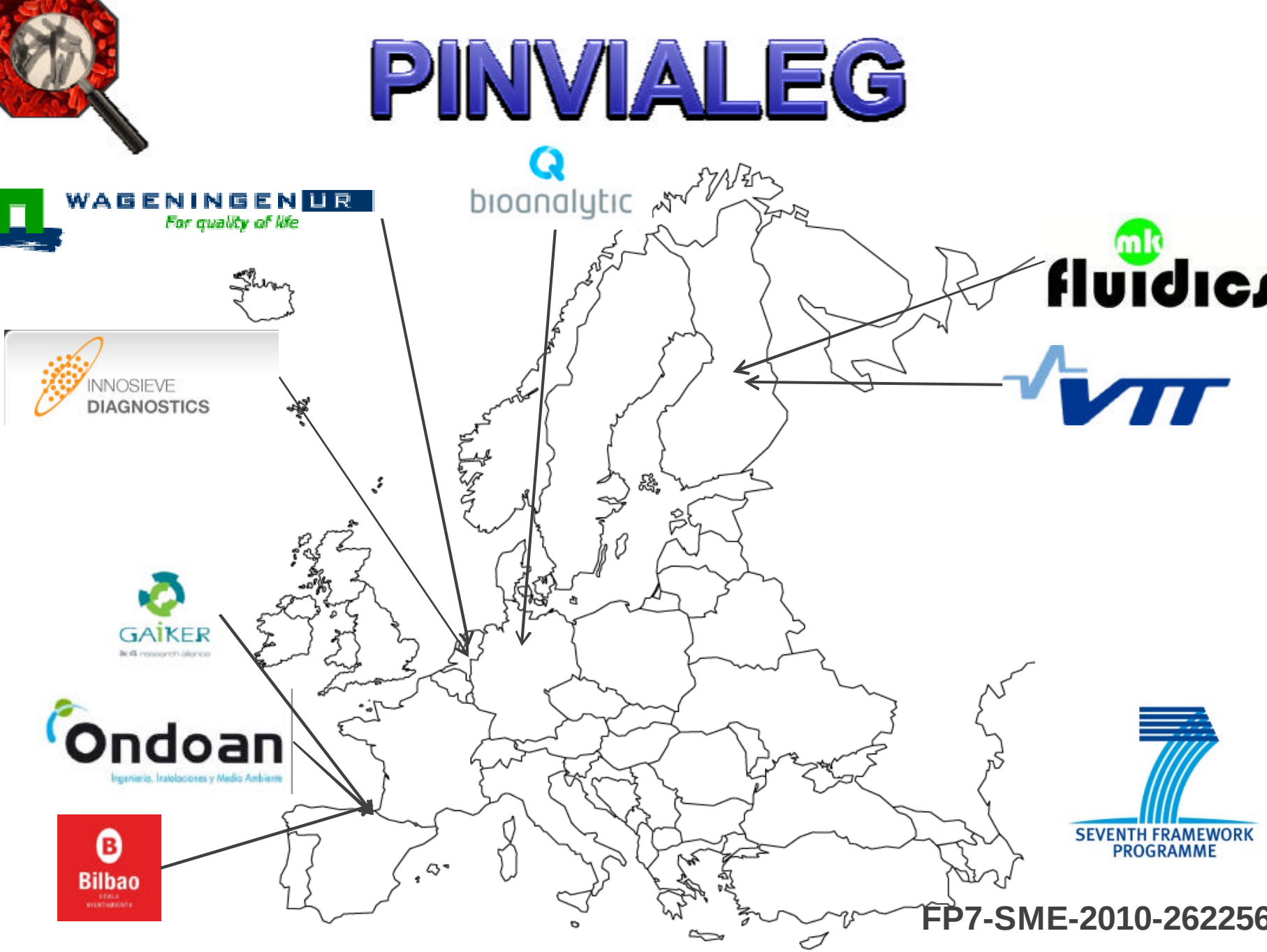
A



B



PINVIALEG



FP7-SME-2010-262256

PINVIALEG

Gracias!

verdoy@gaiker.es