



**Diseño de un prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante
secuencias conservadas de ADN**

Domínguez Salazar, Luis David

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Torres Arias, Marbel, Ph.D

Agosto, 2020



Document Information

Analyzed document	Perfil de titulación Luis Dominguez.pdf (077910675)
Submitted	8/18/2020 8:04:00 PM
Submitted by	Marbel
Submitter email	mimtorres@espa.educ
Similarity	0%
Analysis address	mimtorres.espa@analysis.arkund.com

Sources included in the report

 SA	submission.pdf Document submission.pdf (079108578)	 1
--	---	---



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Diseño de un prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante secuencias conservadas de ADN**” fue realizado por el señor ***Domínguez Salazar, Luis David*** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, agosto 2020

.....
Torres Arias Marbel, PhD.

C.C.: 1802949154



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, *Domínguez Salazar, Luis David*, con cédula de identidad n° 1718163767, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Diseño de un prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante secuencias conservadas de ADN.** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, agosto 2020

.....
Domínguez Salazar, Luis David

C.C.: 1718163767



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, *Domínguez Salazar, Luis David*, con cédula de ciudadanía n°1718163767 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Diseño de un prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante secuencias conservadas de ADN.** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, agosto 2020.

.....
Domínguez Salazar, Luis David

C.C.: 1718163767

Dedicatoria

A mi familia y amigos a quien tanto debemos yo y el presente trabajo.

Luis David Domínguez Salazar

Agradecimientos

A mi tutora, la doctora Marbel Torres por su apoyo, confianza y soporte para realizar el presente proyecto.

A la doctora Ligia Ayala por su predisposición, apertura y solidaridad para solventar cualquier pregunta.

A Álvaro Cadena por su colaboración en el diseño y construcción del circuito electrónico del trabajo.

Al ingeniero Rafael Vargas por la colaboración brindada en el diseño matemático del modelo.

A mis compañeros del laboratorio por sus ideas y colaboraciones para impulsar el presente proyecto.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y a mi familia por su apoyo y ayuda, fundamental para la culminación de mi tesis.

Índice de Contenidos

8

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
Listado de Abreviaturas	14
Resumen	16
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	18
Antecedentes	18
Justificación	20
Objetivos	22
<i>Objetivo General</i>	22
<i>Objetivos Específicos</i>	22
Capítulo II. Revisión Bibliográfica.....	23
Marco Referencial	23
<i>Neumonía</i>	23
Prueba de Flujo Lateral	30
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
Microfluídica	35

	9
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
Metodología	42
Cultivo de Bacteria Streptococcus pneumoniae	42
Reacción en Cadena de la Polimerasa	42
Impresión 3D por Estereolitografía de una Placa de Microfluídica	45
Diseño de una prueba de flujo lateral basada en secuencias conservadas de ADN	47
Control de Flujo para el Paso a través de la Placa de Microfluídica	48
Control de Temperatura de la PCR Continua	49
Controlador del Prototipo	49
Capítulo IV. Resultados	51
Cultivo de Bacteria Streptococcus pneumoniae	51
Reacción en Cadena de la Polimerasa	52
Diseño en 3D de una PCR Continua Microfluídica para Impresión 3D por Estereolitografía	54
Verificación de Integridad de Canales	63
Diseño de una Prueba de Flujo Lateral Basada en Secuencias Conservadas de ADN	66
Control de Flujo para el Paso a través de la Placa de Microfluídica	68
Control de Temperatura de la PCR Continua	69
Ensamblado del Prototipo	71
Capítulo V. Discusión	73

Capítulo VI. Conclusiones.....	10
Capítulo VII. Recomendaciones	79
Referencias.....	80
	81

Índice de Tablas

Tabla 1 Rangos normales de un hemograma en adultos.	27
Tabla 2 Tabla de cebadores.	43
Tabla 3 Componentes de la colony pcr.....	44
Tabla 4 Condiciones de amplificación de la colony pcr.	44
Tabla 5 Controladores de temperatura.	49
Tabla 6 Módulos ocupados en el circuito para el controlador.	49
Tabla 7 Programa de termociclado en condiciones normales.	52
Tabla 8 Programa de termociclado en condiciones adversas.	53
Tabla 9 Viscosidad dinámica de los componentes de la PCR.	58

Índice de Figuras

Figura 1 Tasa de incidencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y estado de la vacunación global.....	21
Figura 2 Radiografía de pecho que muestra los pulmones infectados con neumonía.....	26
Figura 3 Micrografía electrónica de barrido de colonias de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
Figura 4. Alfa hemólisis de cultivo de <i>streptococcus pneumoniae</i> sembrado en agar sangre.	30
Figura 5 Esquema de una prueba de flujo lateral.....	32
Figura 6 Interpretación de resultados de una prueba de flujo lateral.	33
Figura 7 <i>Esquemática del principio de la PCR.</i>	35
Figura 8 Diagrama de proceso de enfoque de litografía para crear los canales de microfluídica.	37
Figura 9 Diseño de canales de microfluídica usando como molde una impresión 3d de alta resolución.	38
Figura 10 Proceso de impresión 3d por estereolitografía.	39
Figura 11 Elisa simultáneo microfluídico.	40
Figura 12 Bioreactor hepático.	41
Figura 13 Cultivo de <i>streptococcus pneumoniae</i> en agar sangre.....	51
Figura 14 Corrida electroforética de productos de colony pcr de muestras de <i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	54
Figura 15 Dimensiones de impresión 3D.	55
Figura 16 Ángulos de impresión y soportes.....	56
Figura 17 Dimensiones del canal diseñado.....	57
Figura 18 Canal microfluídico de cada ciclo de PCR continua.	59
Figura 19 Placa de PCR continua de 26 ciclos.....	60
Figura 20 Disposición de la placa en la impresora 3D.	61
Figura 21 Placa de PCR continua en perspectiva.....	62

Figura 22 Placa sellada con película adhesiva microamp optical adhesive.	13
Figura 23 Micrografía de canales de PCR continua impresos por estereolitografía.	63
Figura 24 Micrografía de canales de PCR continua impresos por estereolitografía.	64
Figura 25 Componentes de la prueba de flujo lateral.	65
Figura 26 Modelo y dimensiones de cubierta para la prueba de flujo lateral.....	66
Figura 27 Prueba de flujo lateral ensamblada.	67
Figura 28 Bomba de inyección acoplada con una canula plástica a la placa de PCR.....	67
Figura 29 Características de la bomba de inyección.....	68
Figura 30 Esquemática del circuito para controlar el prototipo.....	69
Figura 31 Prototipo de PCR continua microfluídica ensamblada.	70
Figura 32 Programa arduino para programar el control de flujo.	71
	72

Listado de Abreviaturas

∇P: Presión aplicada

°C: Grados centígrados

3D: 3 dimensiones

A: Amperios

ADN: Ácido desoxiribonucleico

bp: Pares de bases

cm: Centímetros

CO₂: Dióxido de carbono

DC: Corriente directa

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

KΩ: kiloohmios

LCD: Pantalla de cristal líquido

M: Molar

min: Minutos

mL: Mililitro

mm: milímetros

NH₄OH: Hidróxido de amonio

nm: Nanometros

nM: Nanomolar

PCR, 38; Reacción en cadena de la polimerasa

PDMS: Polidimetilsiloxano

PWM: Modulación por ancho de pulsos

Re: Número de Reynolds

rev: Revoluciones

s: Segundos

uL: microlitros

USB: Bus universal en serie

UV: Ultravioleta

V: Voltios

η : Viscosidad dinámica

μ L: Microlitros

μ m: micrómetros

v: Velocidad

ρ : Densidad

ω : Dimensión característica del flujo

Resumen

La neumonía, a pesar de ser una enfermedad ubicua, es una de las causas principales de mortalidad en población de riesgo y una de las falencias es diagnosticar debido a sus diferentes etiologías. El patógeno con mayor incidencia en la transmisión de la enfermedad por infección bacteriana es causada principalmente por *Streptococcus pneumoniae*. La microfluídica promete disminuir el tiempo y costo de implementación de los métodos de diagnóstico convencionales para detectar la neumonía bacteriana mejorando la eficiencia energética del proceso. En el presente estudio, se diseñó un prototipo de diagnóstico rápido basado en una PCR continua microfluídica y una prueba de flujo lateral basada en secuencias conservadas de ADN. Para determinar los parámetros de diseño del chip de microfluídica se diseñó un cebador astringente del gen conservado *lytA*, este cebador se probó a diferentes condiciones. El diseño del chip de microfluídica se realizó considerando la viscosidad del fluido y la cantidad de calor necesaria para alcanzar la temperatura de cada etapa de la PCR. El modelo se construyó por impresión 3D de estereolitografía. El control de temperatura se realizó con celdas Peltier manejadas por modulación por ancho de pulsos dirigidos por el microcontrolador ESP32. El diseño de la prueba de flujo lateral se realizó considerando un cebador biotinilado de la secuencia conservada *lytA*. La sensibilidad de la prueba puede alcanzar una concentración mínima de 0.24 pg/mL de ADN.

Palabras clave:

- **MICROFLUÍDICA**
- **FLUJO LATERAL**
- ***STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

Abstract

Pneumonia, despite being a ubiquitous disease, is one of the leading causes of mortality in developing countries and one of the most complicated ailments to diagnose due to its different etiologies. The pathogen with the highest incidence in the transmission is *Streptococcus pneumoniae*. Microfluidics promises to decrease the time and cost of implementing conventional methods to detect bacterial pneumonia by improving the energetic efficiency of the process. In the present study, we designed a rapid diagnostic prototype based on a continuous microfluidic PCR and a lateral flow test based on conserved DNA sequences. To determine the design parameters of the microfluidic chip, an astringent primer of the conserved gene *lytA* was designed, this primer was tested under different conditions. The design of the microfluidic chip was made considering the fluid viscosity and the amount of heat necessary to reach the temperature of each stage of the PCR. The model was constructed by 3D stereolithography printing. Temperature control was performed with thermoelectric cells managed by pulse width modulation directed by the ESP32 microcontroller. The design of the lateral flow test was performed considering a biotinylated primer of the conserved *lytA* sequence. The sensitivity of the test can reach a minimum concentration of 0.24 pg / mL of DNA.

Keywords:

- **MICROFLUIDICS**
- **LATERAL FLOW ASSAY**
- ***STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

Capítulo I. Introducción

Antecedentes

La neumonía es una enfermedad que ha sido descrita a lo largo de la historia, que se caracteriza por causar tos, fiebre, disminución de aliento y en algunos casos la muerte. Estos síntomas fueron descritos por primera vez en 460 a.C. en Grecia, donde se la conocía por diferentes nombres. En el siglo XIX, el patólogo alemán Edwin Klebs fue el primero en observar la bacteria causante de la neumonía en el microscopio, a partir de este descubrimiento en el siglo XX empezó el desarrollo de los antibióticos lo cual dio como consecuencia la disminución de la mortalidad causada por la enfermedad (Cilloniz et al., 2016).

A finales de siglo XX se logró determinar la etiología de la enfermedad, la mayor parte de casos es ocasionada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y el resto puede ser atribuido a otros tipos de bacterias y virus. Con los nuevos avances en el conocimiento sobre la enfermedad se logró desarrollar una vacuna que previene la infección por neumococos en menores de edad (Chalmers et al., 2016).

El estándar para el diagnóstico de la enfermedad se basa en el análisis radiológico del tórax del paciente. La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y la Sociedad Pediátrica de Enfermedades Infecciosas han publicado los pasos necesarios para diagnosticar neumonía en niños mayores a 3 meses de edad (Bradley et al., 2011). Las recomendaciones incluyen un tratamiento de antibióticos y el uso de una radiografía del pecho. Aunque las recomendaciones son controversiales, han logrado determinar la existencia de la enfermedad y plantear un tratamiento eficaz en el mayor de los casos (Shah et al., 2017).

Según la Organización Mundial de la Salud, en el siglo XXI la incidencia de la neumonía en población de riesgo es de 151.8 millones de nuevos casos anuales y se ha registrado en el año

2013, 6.3 millones de muertes en pacientes menores de 5 años (World Health Organization, 2019).

En el Ecuador, la neumonía afecta mayoritariamente a la población infantil, personas mayores a 65 años, inmunodeprimidos y pacientes que se encuentran internados en hospitales (Escobar, 2019).

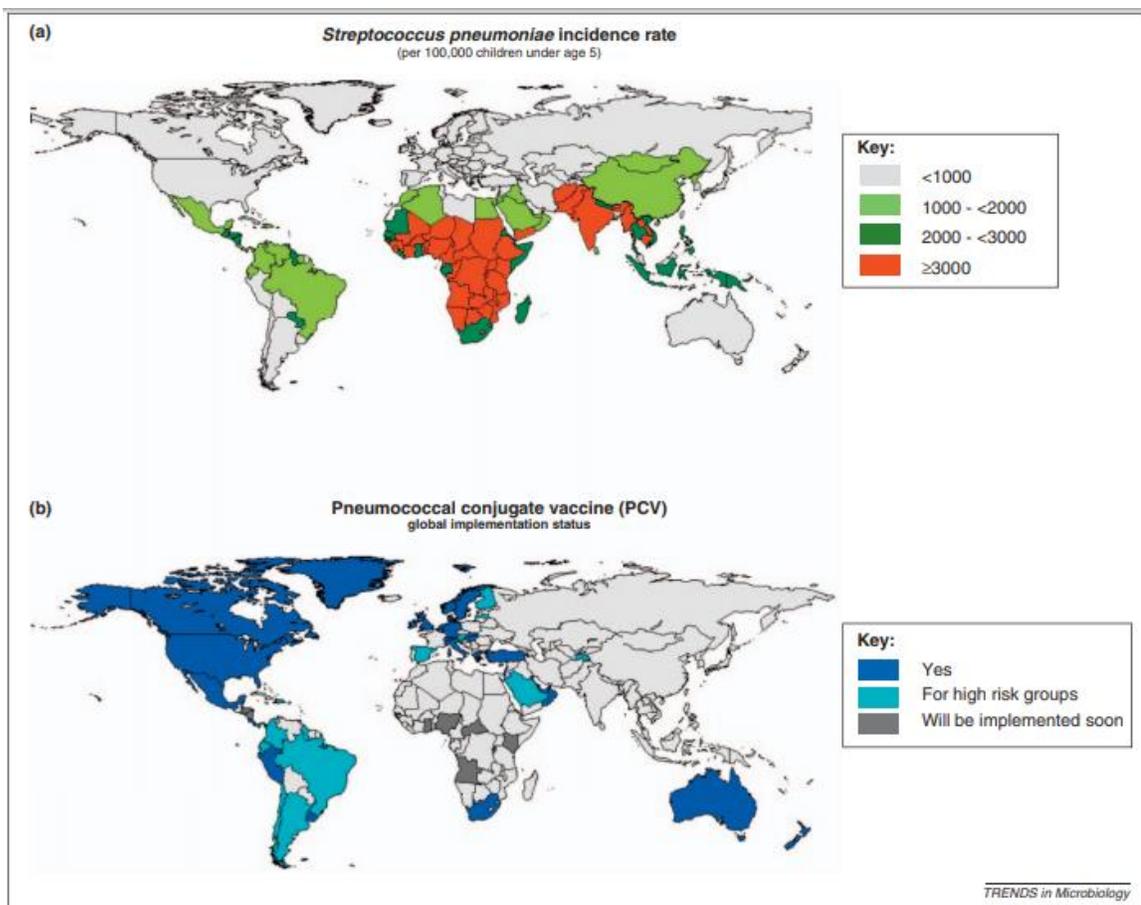
Justificación

La neumonía puede ser adquirida en la comunidad y en hospitales; es causada por hongos, virus, bacterias, parásitos o pueden ser mixtas, dependiendo de la etiología puede considerarse típica o atípica (Pereda et al., 2015). La neumonía típica, causada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, es la causa principal de enfermedad y muerte en niños alrededor del mundo, se estima que tiene una incidencia anual de 156 millones de casos en infantes menores a 5 años. La neumonía atípica, causada por las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae*, puede infectar a pacientes sanos y su incidencia mundial es de 7 a 22% (Ramamoorthy & Sundaram, 2018, p. 44).

El diagnóstico de la enfermedad es complicado, ya que los síntomas y señales de la neumonía varían acorde al paciente y a la etiología de la infección. La Academia Americana de Pediatras recomienda realizar una radiografía del pecho, pero este diagnóstico resulta problemático ya que no tiene la capacidad de diferenciar la etiología de la infección, no se puede estimar un tratamiento pertinente acorde a la etiología, puede causar repercusiones en pacientes inmunodeprimidos, y requiere de la cooperación explícita del paciente (Pereda et al., 2015). Por esta razón ha incrementado el interés en desarrollar nuevas herramientas que permitan diferenciar el tipo de neumonía, determinar la etiología de la infección y diagnosticar la enfermedad de forma exacta, precisa y de forma no invasiva.

Figura 1

Tasa de incidencia de Streptococcus pneumoniae y estado de la vacunación global.



Nota. A) incidencia de la enfermedad en el mundo en niños menores a cinco años. B)

Implementación de la vacuna conjugada contra neumococos. Tomado de Ferreira et al.(2011).

Objetivos

Objetivo General

Diseñar un prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante secuencias conservadas de ADN.

Objetivos Específicos

- Obtener secuencias conservadas de ADN de la cepa bacteriana *Streptococcus pneumoniae*.
- Diseñar una PCR continua en chip de microfluídica para secuencias conservadas de ADN.
- Construir un circuito electrónico para el control del termociclado de la PCR continua.
- Diseñar el método de diagnóstico por flujo lateral.

Capítulo II. Revisión Bibliográfica

Marco Referencial

La neumonía bacteriana es una enfermedad caracterizada por la inflamación del parénquima del pulmón, y es una de las causas principales de mortalidad en población de riesgo (Ramamoorthy & Sundaram, 2018). A pesar de ser una enfermedad común, su diagnóstico es problemático ya que los primeros síntomas son similares a varias enfermedades virales; además, es ocasionada por diferentes especies de bacterias *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, entre otras (Shah et al., 2017). Se han reportado varios métodos de diagnóstico principalmente examen físico e inmunoensayos. Estos, a pesar de tener alta fiabilidad para diagnosticar la enfermedad, no tienen la capacidad de diferenciar la cepa de bacteria que la ocasiona y por lo tanto no se puede estimar el tratamiento adecuado (Ramamoorthy & Sundaram, 2018).

Neumonía

La neumonía es un proceso infeccioso común que permanece como una amenaza de alto riesgo para niños y adultos mayores, afecta la porción distal de las vías respiratorias y el intersticio alveolar causando alteraciones en el intercambio gaseoso, proceso conocido como consolidación (Martínez-Vernaza et al., 2018). Varios microorganismos han sido asociados con la enfermedad por lo que su etiología se clasifica acorde a la población, área geográfica, estado inmunológico del paciente y lugar de infección (File, 2003).

A pesar de la alta incidencia, morbilidad y mortalidad, no existe un diagnóstico universal y práctico para determinar la neumonía. Esta incertidumbre en el diagnóstico ha contribuido al uso inadecuado de antibióticos en pacientes que presentan una infección de una bacteria comensal del organismo, o de una etiología asociada a diferentes microorganismos (Shah et al., 2017).

Fisiopatología

Las vías aéreas y los pulmones están expuestos a patógenos, pero son manejados por los mecanismos de defensas superiores e inespecíficas inferiores. La neumonía se produce cuando estas líneas son comprometidas, un gran inóculo bacteriano supera las defensas o un patógeno particularmente virulento ingresa (Rodríguez & Grunauer, 2013). Las defensas de las vías aéreas superiores incluyen anticuerpos, proteasas, lisozimas e inhibidores de crecimiento que forman parte de la saliva y las mucosas, impidiendo el paso de bacterias, mientras que las defensas inespecíficas de las vías aéreas inferiores incluyen todos los impedimentos físicos que bloquean el paso de patógenos como la tos, la limpieza mucociliar y los ángulos del canal respiratorio (Abbas et al., 2015).

Cuando los microorganismos logran pasar las defensas del huésped empiezan a multiplicarse en el interior de los alveolos causando la inflamación y daño en los pulmones. El síntoma característico es la tos con producción de esputo además produce dolor torácico, escalofríos, fiebre, dificultad respiratoria y, dependiendo de la etiología, puede causar síntomas digestivos (File, 2003). Si la neumonía se agrava puede impedir el intercambio gaseoso en los pulmones causando disnea y disminuyendo el oxígeno en el torrente sanguíneo a niveles mortales. Si el microorganismo causante de la enfermedad no es tratado correctamente puede ingresar al torrente sanguíneo y disminuir la tensión arterial causando sepsis o abscesos pulmonares dejando al paciente con un síndrome de dificultad respiratoria agudo (Pereda et al., 2015).

El sistema respiratorio provee un ambiente favorable para el crecimiento de diferentes especies de microorganismos. A pesar de que tanto, el sistema gastrointestinal como el respiratorio comparten su origen en el embrión, los microbiomas son diferentes. Las superficies de la tráquea y los bronquios están cubiertos de una mucosa de similar composición que la

mucosa que recubre el tracto digestivo, pero la mayor parte del sistema respiratorio también está cubierto de una sustancia con cualidades de surfactante que tiene un efecto bacteriostático (Huffnagle et al., 2017). Los principales géneros de bacterias encontrados en el sistema respiratorio son: *Propionibacteria*, *Corynebacteria*, *Staphylococcus*, y *Moraxella* (Huttenhower et al., 2012).

Etiología

La neumonía puede ser producida por varios agentes etiológicos por lo que se la clasifica en función del ámbito de adquisición, nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Las dos son causadas por similares microorganismos y al igual que la clasificación en función del estado inmunológico del paciente, inmunocompetente o inmunodeprimido, se diferencian en la severidad de la enfermedad (Ruuskanen et al., 2011).

Existen varios patógenos que pueden causar neumonía como bacterias, virus, hongos y parásitos. Los patógenos con mayor incidencia en la transmisión de la enfermedad es la infección bacteriana, causada principalmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, que tienen la capacidad de infectar por contacto directo entre individuos (File, 2003).

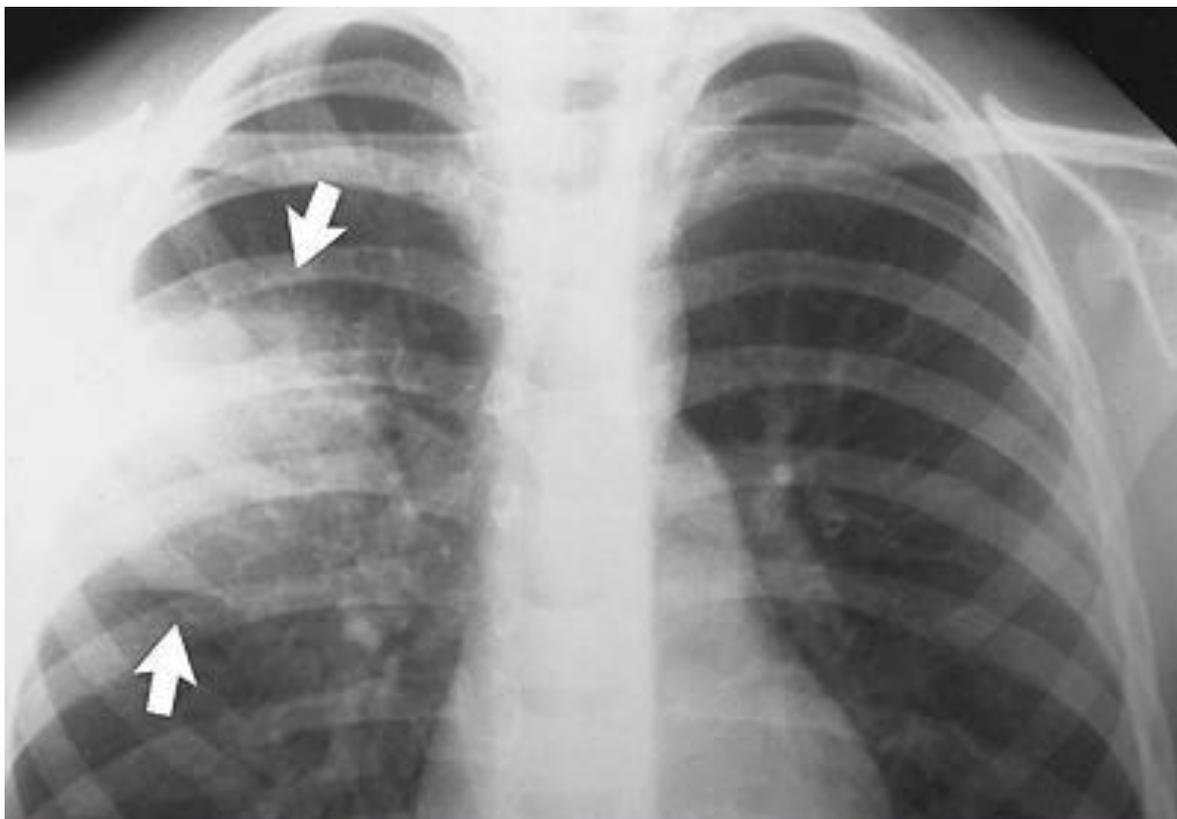
Diagnóstico

Los síntomas comunes de la neumonía incluyen: tos con o sin expectoración, dolor en el pecho, aumento de ritmo cardíaco (>110 ppm), disnea, malestar general y fiebre con una temperatura mayor a 37.7°C. Para descartar otras enfermedades se procede a realizar una examinación física del paciente. El primer paso para determinar si el paciente sufre de neumonía es realizar una radiografía de pecho donde se puede observar consolidados en el área pulmonar (Figura 2), y de existir, se lleva a cabo una oximetría cuya medida debe ser mayor al 96% en pacientes sanos. Si se encuentra indicios de la enfermedad se procede a realizar un hemograma

cuyos rangos normales se describen en la tabla 1 y un cultivo a partir del esputo del paciente en diferentes medios acorde a las posibles etiologías, generalmente se realiza un cultivo en agar sangre en condiciones anaerobias, a 35°C y 5% de CO₂ durante 48 horas para discriminar las especies de mayor incidencia como son *Streptococcus pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (Cilloniz et al., 2016). Una vez determinada la etiología se procede a administrar el tratamiento adecuado. Usualmente, ya que el diagnóstico puede tomar un tiempo prolongado, el medico receta un tratamiento con antibióticos preventivo destinado a eliminar los microorganismos que comúnmente ocasionan la enfermedad (Gupta et al., 2012).

Figura 2

Radiografía de pecho que muestra los pulmones infectados con neumonía.



Nota. Las flechas señalan un consolidado en el área del pulmón indicando neumonía. Tomado de Mayo Clinic (2000).

Tabla 1

Rangos normales de un hemograma en adultos.

Componente sanguíneo	Rango normal en hombre	Rango normal en mujer
Eritrocitos	4.35 a 5.65 billones de células por litro	3.92 a 5.13 billones de células por litro
Hemoglobina	132 a 166 gramos por litro	116 a 150 gramos por litro
Hematocrito	38.3% a 48.6%	35.5% a 44.9%
Glóbulos blancos	3.4 a 9.6 billones de células por litro	3.4 a 9.6 billones de células por litro
Plaquetas	135 a 317 billones de células por litro	157 a 371 billones de células por litro

Nota. Tomado de Mayo Clinic (2018).

Sin embargo, ninguna característica física medible es suficientemente sensible o específica para discriminar la etiología de la enfermedad; el diagnóstico puede tomar tres días para determinar la etiología y se vuelve complicado con la edad ya que pacientes mayores no muestran los síntomas comunes de la enfermedad (Metlay et al., 1997).

Tratamiento y Vacunas

Debido a su conflictiva etiología no existe un tratamiento específico para la enfermedad; el tratamiento requiere una discriminación previa que permita aproximar la fuente de infección. La mayor parte de neumonías registradas son causadas por bacterias que no comparten sensibilidad a antibióticos (Pereda et al., 2015), por ello se procede a recetar un antibiótico común para la mayoría de especies como azitromicina, tetraciclinas y fluoroquinolonas, cuya dosificación es de una tableta cada 8 horas durante una semana (Chalén & Eduardo, 2018). Si el paciente no responde favorablemente al tratamiento se espera a que el análisis de laboratorio

indique la procedencia de la enfermedad y tratarla con los antibióticos pertinentes (Ramamoorthy & Sundaram, 2018).

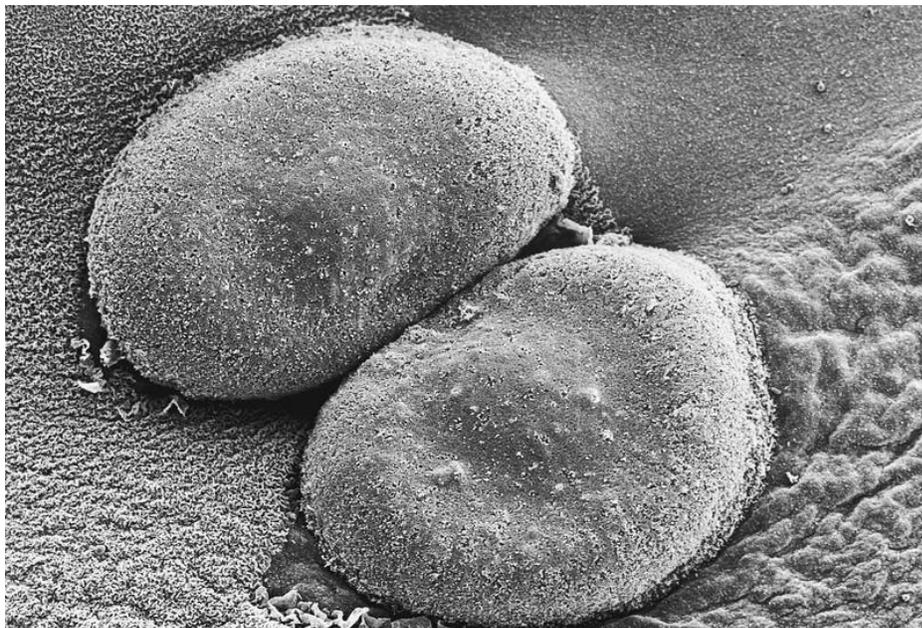
Se han propuesto varias medidas preventivas para la neumonía, la más eficiente es la vacuna que puede ser desarrollada a partir de proteínas de la cápsula de la bacteria (Thompson et al., 2019), de microorganismos atenuados o microorganismos muertos (NCT01033409) (Frey et al., 2013). Sin embargo, aún no han culminado con las fases clínicas necesarias para su aprobación y distribución.

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae es una bacteria gram positiva comensal de la nasofaringe humana mide alrededor de 1.2 a 1.8 μm de longitud, tiene una forma oval y un extremo distal lanceolado. Es inmóvil, no forma endosporas y es alfa hemolítico. Se presenta en forma de diplococo, pero también pueden formar cadenas (Arushothy et al., 2019).

Figura 3

Micrografía electrónica de barrido de colonias de Streptococcus pneumoniae.



Nota. Tomado de Marshall (2019)

La bacteria ataca a eritrocitos y descomponen la hemoglobina, por esta razón requieren un cultivo de agar sangre donde realizan una hemólisis alfa produciendo un color verde bajo sus colonias, este color resulta de la descomposición de la hemoglobina en biliverdina (Cilloniz et al., 2016).

Streptococcus pneumoniae forma colonias de forma discoidales, gris, de bordes lisos, y redondas de 1 a 3 mm de diámetro y al cabo de 48 horas presentan un aspecto umbilicado, el cultivo en agar sangre presenta colonias lisas pequeñas y brillantes con un halo verde de alfa hemólisis bajo ellas (Figura 3) (Chalmers et al., 2016).

Al ser una bacteria comensal del humano, requiere que el huésped se encuentre inmunodeprimido para poder infectar (Martínez-Vernaza et al., 2018). La virulencia de la bacteria está relacionada a su cápsula la cual la protege de la fagocitosis. Su diagnóstico se basa en cultivos de sangre o esputo y técnicas moleculares, pero al ser una infección común su diagnóstico generalmente se basa en el análisis físico del paciente y el tratamiento pasa directamente a una dosis preestablecida de antibióticos (Cilloniz et al., 2016).

Se estima que es causante del 60% de casos de neumonía adquirida en la comunidad (Chalmers et al., 2016). Tiene una alta diversidad genética debido a un eficiente sistema de intercambio de ADN resultando en variaciones en su cápsula principalmente, en la actualidad se conoce 97 serotipos capsulares con potencial de causar la enfermedad (Henriques Normark et al., 2019).

La neumonía se ha vuelto la principal causa de muerte infantil en todo el mundo, y una de las enfermedades problemáticas en hospitales debido a su fácil transmisión. En la actualidad es causante de cerca de ochenta mil muertes en niños menores a 5 años en América Latina y el Caribe (WHO, 2019).

En estudios recientes realizados en Estados Unidos se determinó que la prevalencia de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina ha aumentado hasta ocupar un 35% en ciertas áreas del país (Cherazard et al., 2017). A pesar de que se ha logrado determinar la etiología de la enfermedad en varios casos no se ha podido establecer que el neumococo responsable de la muerte haya tenido una resistencia a antibióticos por lo que se estima que la prevalencia de estas cepas puede ser mayor (Feikin et al., 2000).

Figura 4.

Alfa hemólisis de cultivo de streptococcus pneumoniae sembrado en agar sangre.



Nota. Tomado de Murray & Cassese (2016).

Prueba de Flujo Lateral

El inmunoensayo de flujo lateral es una prueba de detección visual basada en la interacción de biomoléculas y un reportero que reacciona con la interacción para dar una señal que puede ser leída a simple vista. La interacción se da sobre una matriz de nitrocelulosa o

vidrio, la interacción puede ser proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, y ácido nucleico-ácido nucleico (Mak et al., 2016).

La prueba de flujo lateral con interacción ácido nucleico-ácido nucleico también se conoce como un microarray de ADN que se basa en la capacidad de hibridación de las moléculas dadas las condiciones necesarias. En general el sistema funciona inmovilizando una secuencia conservada del gen que se quiere detectar a una matriz previamente tratada, esta secuencia tiene la capacidad de hibridarse específicamente con la secuencia objetivo y formar un complejo que puede ser detectado gracias a una reacción colorimétrica (Majtán et al., 2004).

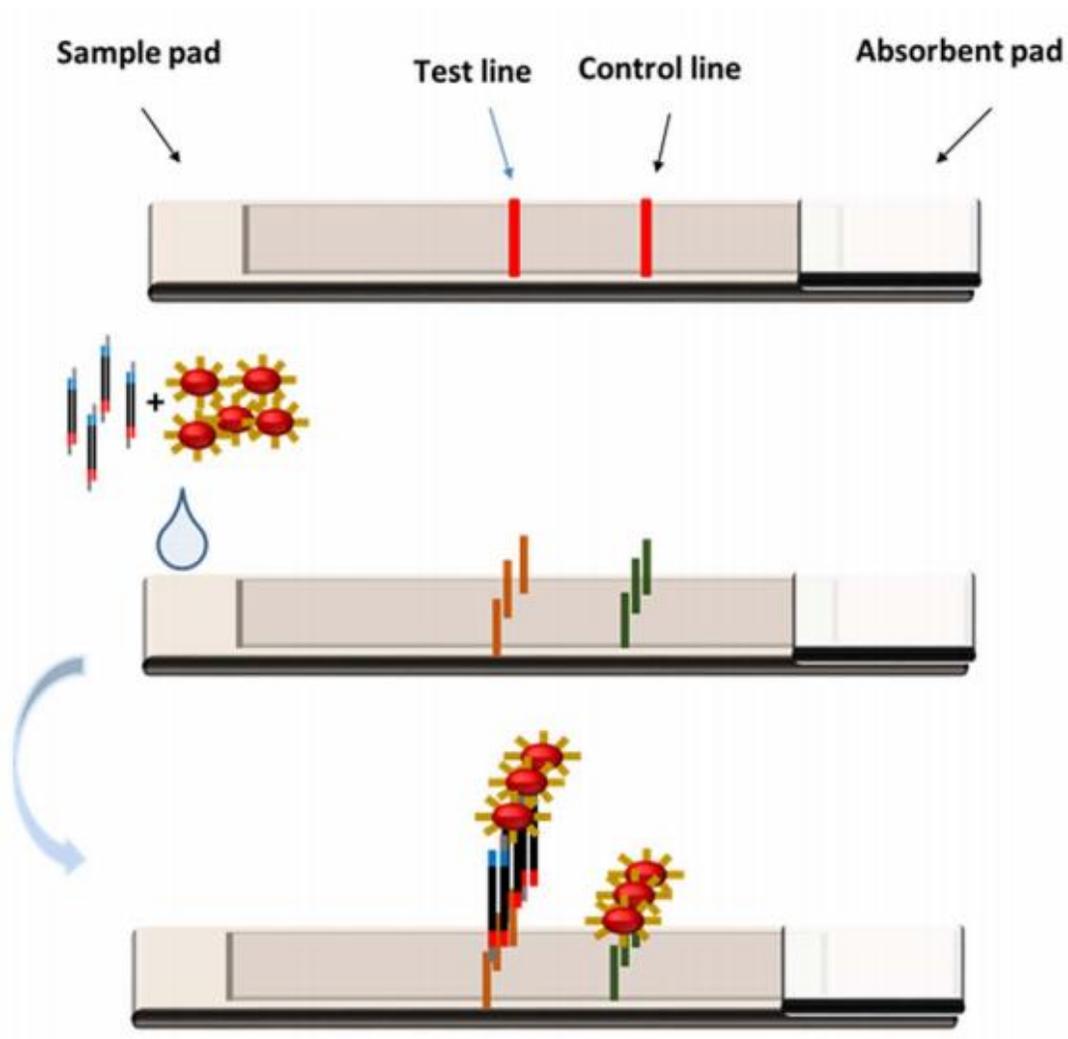
La prueba de flujo lateral consta de 4 elementos, una almohadilla de muestra, una almohadilla absorbente, una banda de prueba y una banda de control (Figura 5) (Choi et al., 2016).

La sensibilidad de las pruebas de flujo lateral varía dependiendo de la afinidad de la proteína o amplicón objetivo, en el caso de una prueba basada en productos de una amplificación en cadena de la polimerasa de colonias bacterianas se ha determinado que se puede alcanzar una sensibilidad mínima de 10 células (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

Las pruebas de flujo lateral están diseñadas para ser usadas en diagnóstico rápido, confiable y fácil aplicación en el campo. La versatilidad de las pruebas son su mayor ventaja, gracias a su bajo costo, larga vida útil sin necesidad de refrigeración y su gran rango de aplicaciones se han podido llevar alrededor del mundo. Sin embargo, al ser dependiente de concentraciones de antígeno en una muestra no pueden ser consideradas pruebas confirmatorias por su baja precisión, por lo que se consideran pruebas exploratorias y de prevalencia (Koczula & Gallotta, 2016).

Figura 5

Esquema de una prueba de flujo lateral.



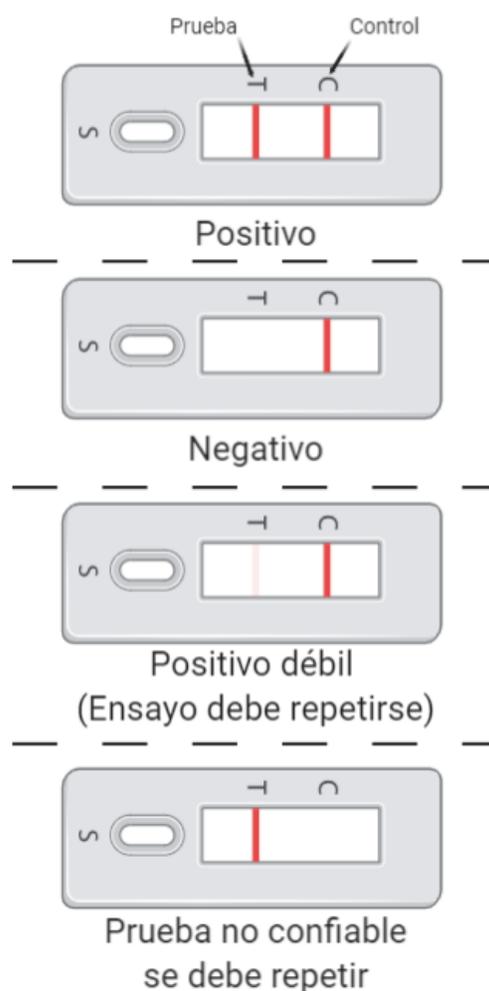
Nota. Tomado de Jauset-Rubio (2016).

En la banda de prueba se fija la secuencia de anclaje que va a ser específica para la muestra objetivo, en la banda control se fija la secuencia objetivo como un control positivo de la prueba, en la almohadilla de prueba se deposita la muestra y el reportero que van a reaccionar con las bandas fijadas. Por último el flujo se comprueba al llegar a la almohadilla absorbente (Fu et al., 2016).

El ensayo puede tomar entre 5 y 30 minutos, el tiempo cambia de acuerdo a la reacción (Posthuma-Trumpie et al., 2009). Para evaluar los resultados de la prueba se requiere analizar las bandas de reacción de prueba y control (Figura 6), al aparecer solo la línea de control se considera la prueba negativa, si reaccionan tanto la banda control como la de prueba se considera que el ensayo fue positivo, por último, si solo reacciona la banda de prueba y no la de control se concluye que el ensayo fue fallido y se debe repetir (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

Figura 6

Interpretación de resultados de una prueba de flujo lateral.



Nota. Se detallan los posibles resultados e interpretaciones de la prueba: positivo, negativo, débil positivo o prueba no confiable.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

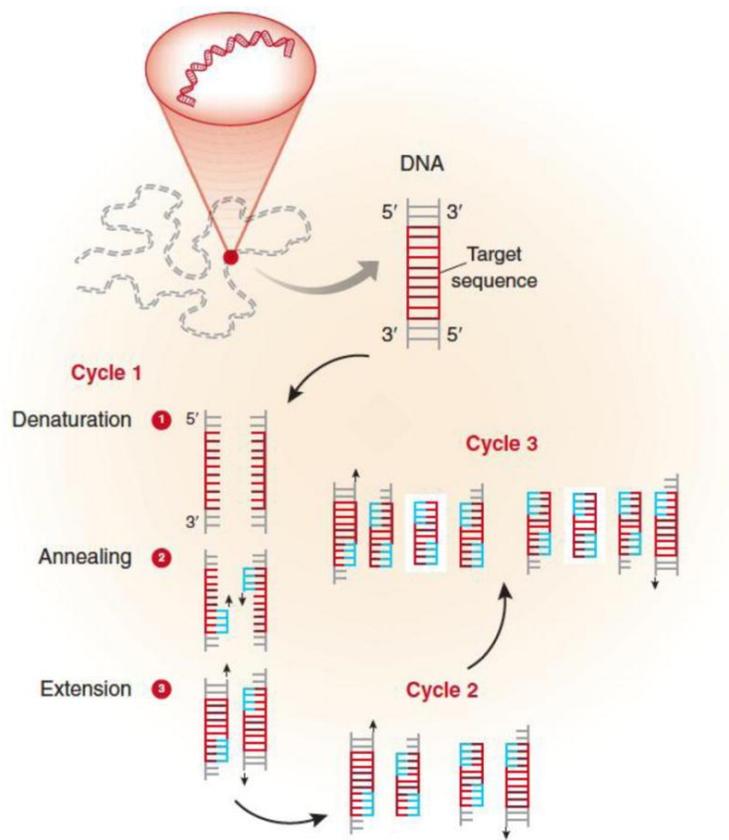
La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular basada en la reacción enzimática de replicación de ADN. La técnica se puede replicar en el laboratorio proporcionando el ambiente y materiales adecuados para obtener una gran concentración de ADN objetivo (Rahman et al., 2013). Para controlar la temperatura requerida para la reacción, el procedimiento ocurre en un tubo dentro de un termociclador, que tiene la capacidad de enfriar y calentar rápidamente (Garibyan & Avashia, 2013).

Cada ensayo de PCR requiere la presencia de una muestra de ADN, cebadores, nucleótidos y polimerasa de ADN. La reacción ocurre por ciclos, donde cada ciclo tiene tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión. En el primer paso, desnaturalización, el termociclador aumenta la temperatura a aproximadamente 90°C, las cadenas de ADN se separan, inmediatamente, el termociclador disminuye la temperatura a alrededor de 60°C para que ocurra el alineamiento de los cebadores con la muestra de ADN; finalmente, la temperatura sube a aproximadamente 72°C, la temperatura óptima para que la polimerasa extienda la secuencia a partir del cebador y obtener una copia de la cadena objetivo. Las temperaturas son variables ya que dependen de la muestra, cebadores y enzimas. Terminado cada ciclo se duplican las moléculas de ADN (Figura 7) (Garibyan & Avashia, 2013).

La elevada sensibilidad de este proceso también se puede convertir en su limitación, ya que, cualquier tipo de contaminación en la muestra, o algún diseño defectuoso en los cebadores pueden causar falsos positivos. Además, al requerir un mínimo de veinte ciclos, el procedimiento toma un mínimo de dos horas, considerando la preparación de la muestra y el revelado por electroforesis (Clewley, 1989).

Figura 7

Esquemática del principio de la PCR.



Nota. Tomado de (Garibyan & Avashia, 2013)

Microfluídica

La microfluídica es la tecnología de manejo de fluidos donde en al menos una de las dimensiones del canal de flujo mide menos de un milímetro y su volumen interno no supera los 100 uL. Esta tecnología permite disminuir los requerimientos de un proceso tanto en materia como energía (Stroock, 2008).

Características Físicas de un Régimen Microfluídico

Las ecuaciones gobernantes de un régimen microscópico para el flujo de fluidos y transferencia de materia son iguales a las ecuaciones de un sistema macroscópico. Hay que tomar en cuenta que el flujo es una relación del volumen con el área en el que se mueve el

fluido por lo que este valor decrece, la importancia de las fuerzas que actúan en el fluido como la gravedad y tensión superficial disminuyen al punto de ser despreciables. La única fuerza de relativa importancia es la viscosidad que actúa en el flujo. La razón de las fuerzas viscosas inerciales se expresa como el número de Reynolds (Stroock, 2008).

$$Re = \frac{\rho \omega v}{\eta}$$

Donde ρ (kg/m^3) es la densidad del fluido, v (m/s) es la velocidad, ω (m) es la dimensión característica del flujo y η (kg/ms) es la viscosidad dinámica del fluido. En canales de microfluídica el $Re < 100$ por lo que los flujos se consideran laminares, en este régimen los fluidos pierdes características miscibles y capacidad de transferencia de masa (Stroock, 2008).

Características Técnicas de un Régimen Microfluídico

La forma más común de impulsar los flujos es a través de gradiente de presión, donde la velocidad de flujo está dada por

$$v \sim \omega^2 \nabla P \eta (\text{m/s})$$

Donde ∇P es la presión aplicada, para mantener un flujo dado el gradiente crece rápidamente conforme la dimensión del canal disminuye (Stroock, 2008).

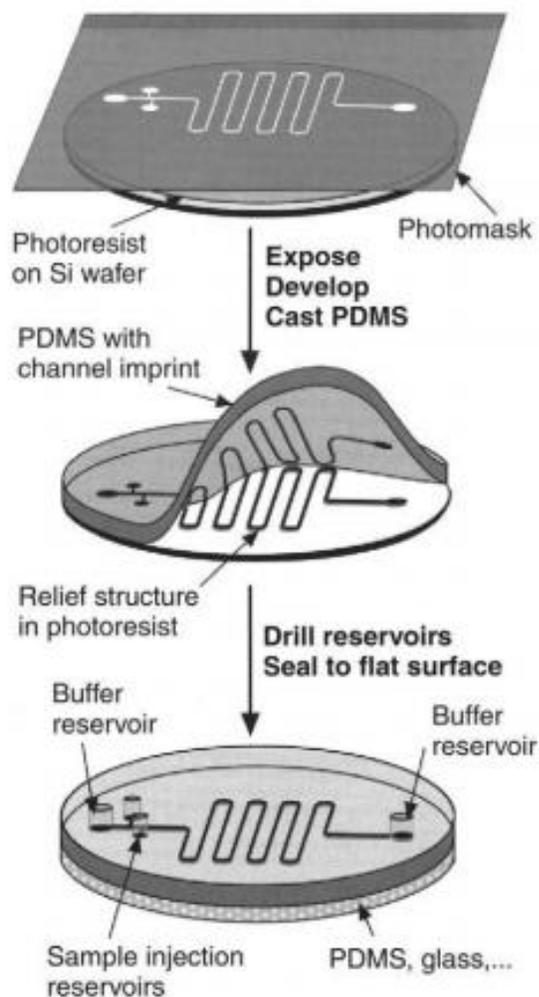
Fabricación de Estructuras de Microelectrónica

La mayor parte de métodos de fabricación de sistemas microfluídicos se basan en la adaptación de técnicas de fabricación de estructuras de microelectrónica como la fotolitografía. Donde se forma una estructura por litografía que va a servir como un molde positivo para la

construcción del chip con un polímero de preferencia biocompatible como el polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 8) (Cabaleiro, 2020).

Figura 8

Diagrama de proceso de enfoque de litografía para crear los canales de microfluídica.



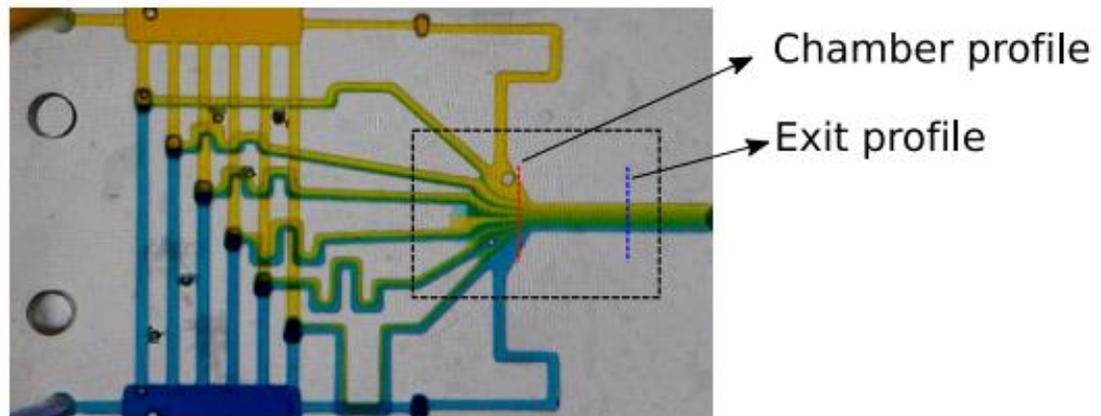
Nota. Tomado de Stroock (2008).

Se han trabajado otros enfoques como aplicar el mismo principio descrito previamente pero aplicando nuevas tecnologías como la impresión 3D de alta resolución, la disminución de costos de esta tecnología ha vuelto esta aproximación posible y ha demostrado tener buenos

resultados para la fabricación del molde que a la postre servirá como base para crear un chip de microfluídica (Willems et al., 2019).

Figura 9

Diseño de canales de microfluídica usando como molde una impresión 3d de alta resolución.



Nota. Tomado de Cabaleiro (2020).

Impresión 3D por Estereolitografía

La estereolitografía es una tecnología que se basa en el curado o solidificación de un polímero líquido fotosensible con el uso de una fuente de irradiación lumínica que provee la energía necesaria para inducir una reacción química que une varias moléculas del polímero formando un sólido. Los polímeros más utilizados son aquellos basados en monómeros de acrilatos y metacrilatos, estos monómeros se solidifican rápidamente (Bártolo, 2011).

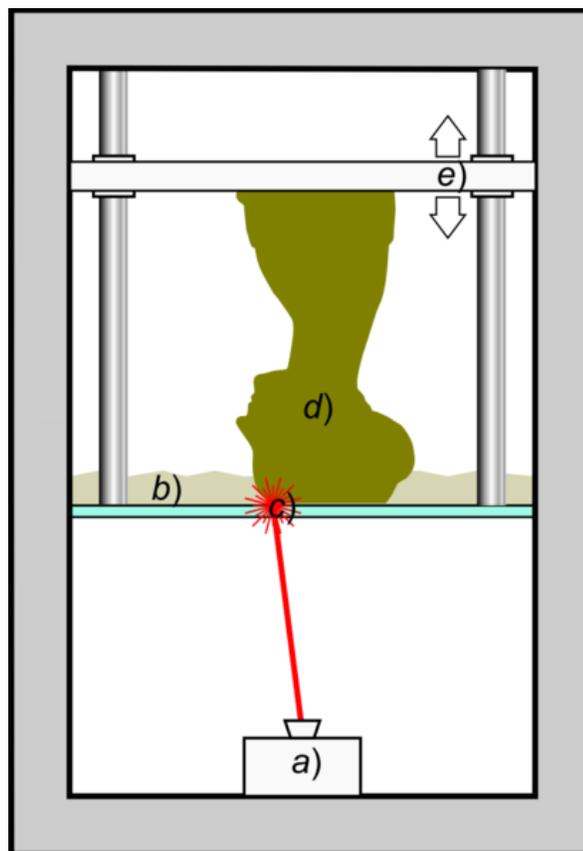
La impresión 3D basada en estereolitografía es una tecnología que se ha usado en la ingeniería de tejidos. La tecnología consiste en una fuente con una base transparente, en esta fuente se deposita una cantidad determinada de resina, una plataforma del tamaño del interior de la fuente ingresa por la parte superior y se sumerge en la resina hasta dejar una capa micrométrica de resina entre la plataforma y la base transparente de la fuente. Bajo la fuente se encuentra una fuente lumínica capaz de solidificar la resina bajo la plataforma, esta fuente

solidifica una capa según la forma establecida por el usuario (Figura 10). Una vez solidificada la capa la plataforma sube y vuelve a sumergirse en la resina esta vez a una distancia mayor a la anterior. Este proceso se repite hasta obtener el sólido deseado (Wang et al., 2016).

La ventaja de la impresión 3D basada en estereolitografía es su versatilidad, ya que otros compuestos pueden ser incluidos en la resina para quedar atrapados en el polímero como antibióticos y otros compuestos utilizados en biomedicina. La estereolitografía también tiene una resolución mayor que otras técnicas de impresión, alcanzando los 20 μm (Jacobs, 1992).

Figura 10

Proceso de impresión 3d por estereolitografía.



Nota: a) Fuente lumínica que solidifica la resina. b) Resina líquida en la fuente. c) Fuente con base transparente para permitir el paso de luz. d) Modelo solidificado por capas. e) Plataforma que sostiene al modelo controlando la altura. Tomado de Scopigno et al. (2017).

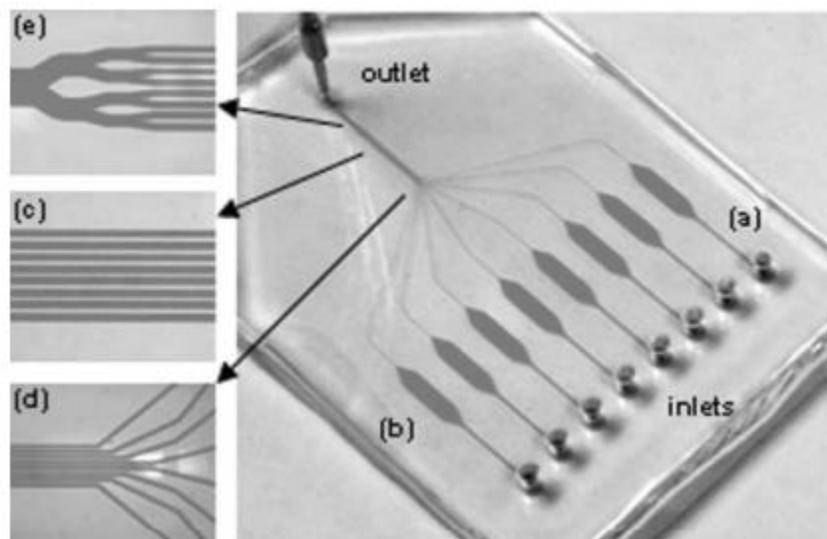
Aplicaciones

La microfluídica ha evolucionado en una poderosa herramienta para la bioingeniería y la ingeniería biomédica disminuyendo los requerimientos energéticos de varios procesos. Se ha logrado implementar la microfluídica en diagnósticos moleculares, cultivos celulares en tres dimensiones, reacciones químicas, entre otros (Sosa-Hernández et al., 2018).

La aplicación de la microfluídica en diagnósticos moleculares permite disminuir el uso de los reactivos y tiempos de incubación, por ejemplo, en el trabajo de Herrmann et al. (2006) se diseñó y construyó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en un chip de microfluídica de 5 cm x 7.5 cm, el ensayo tiene una duración de 5 minutos y una sensibilidad de 0.1 a 6.7 pM (Figura 11).

Figura 11

Elisa simultáneo microfluídico.

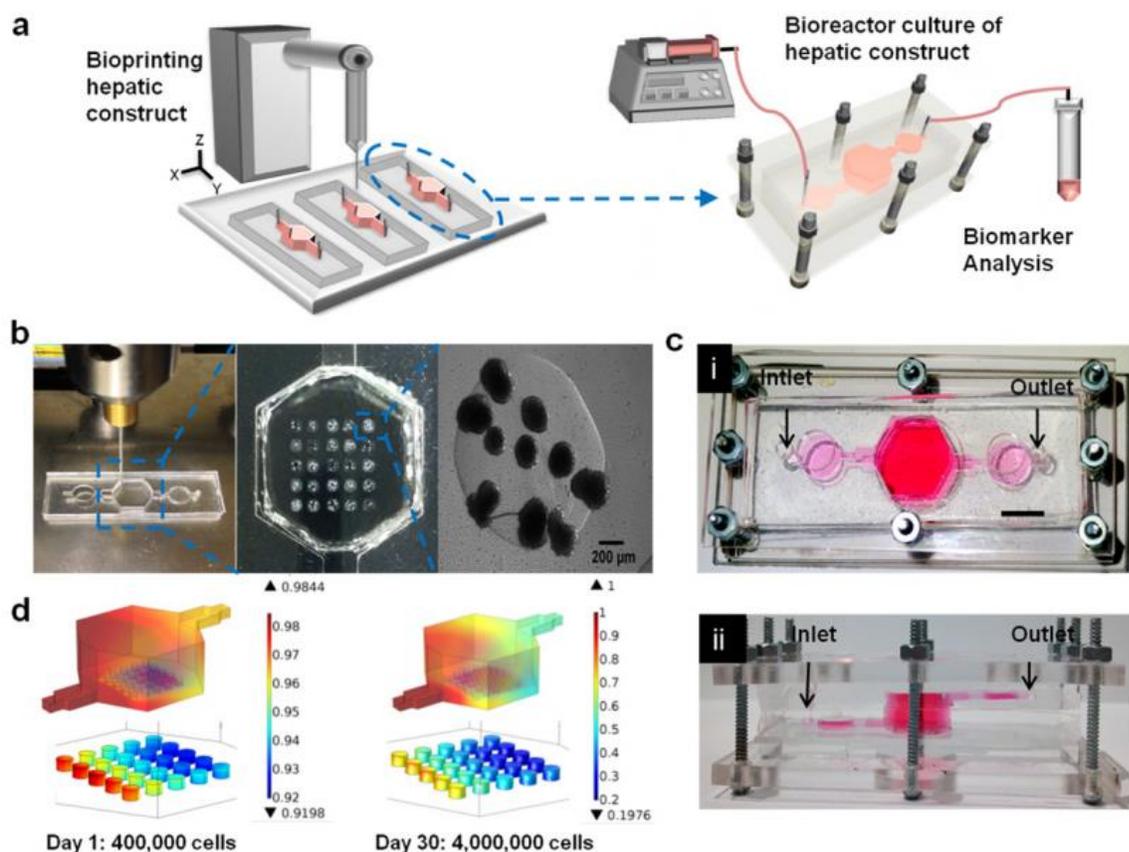


Nota. a) Canal de 200x500 μm b) Cámara de reacción c) Canales para detección d) Unión de los canales e) Unión de los canales y salida de flujo. Tomado de Herrmann et al. (2006).

La construcción de cultivos tridimensionales en microfluídica han permitido crear simulaciones de órganos completos. Según Bhise et al. (2016), el desarrollo de un hígado en chip de microfluídica ha facilitado realizar pruebas de toxicidad de diferentes drogas mejorando el monitoreo continuo de las reacciones sin ninguna limitación (Figura 12).

Figura 12

Bioreactor hepático.



Nota. a) Esquemática del reactor y la plataforma de cultivo b) Impresión del chip a base de hidrogel c) Vista superior y lateral del reactor ensamblado d) Gradiente de concentración de oxígeno en el reactor. Tomado de Bhise et al. (2016).

Capítulo III. Materiales y Métodos

Metodología

Para la determinación de la presencia o ausencia del patógeno descrito previamente se va a diseñar dos ensayos: una reacción en cadena de polimerasa (PCR) continua en un chip de polímero para microfluídica y un biosensor de flujo lateral basado en hibridación de ADN; la PCR continua diseñada en el chip de polímero para microfluídica incrementa la concentración de ácidos nucleicos de la muestra aprovechando las propiedades de los fluidos a escala micro disminuyendo tiempos, materiales y requerimientos energéticos. El producto obtenido del chip de polímero para microfluídica pasará al biosensor que dará una señal visible para determinar la presencia o ausencia del patógeno.

Cultivo de Bacteria *Streptococcus pneumoniae*

Para el cultivo de la bacteria se preparó agar nutriente suplementado con sangre en una concentración de 5%, anfotericina B (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio), y cristal violeta en una concentración de 1:500 000. Las bacterias se incubaron en condiciones anaerobias, a 35°C y en presencia de 5% de CO_2 (Nichols & Freeman, 1980).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Preparación de la Muestra

Previo a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se prepararon las muestras provocando lisis celular con un tratamiento con buffer lisis (0.1% Triton-X100 en buffer TE 1X). Una unidad formadora de colonias de la bacteria objetivo se sumergió en 15 μL de buffer lisis, a esta solución se calentó por 5 minutos a 95°C, posteriormente se enfrió la muestra en hielo hasta alcanzar temperatura ambiente. Se dejó reposar el tubo hasta que se logró diferenciar un sobrenadante, el cual puede ser utilizado como modelo para la PCR.

Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizaron los software Serial Cloner y Mega-X, además se utilizaron las herramientas en línea Blast y Primer Blast del Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y la herramienta en línea Primer3Plus (<https://primer3plus.com/>). Con estas herramientas se buscaron genes conservados de la especie *Streptococcus pneumoniae*, que sean específicos para la especie y no interactúen con genes humanos. Además, se buscó una temperatura de melting de aproximadamente 60°C y un valor de complementariedad propia menor a 5.

Tabla 2

Tabla de cebadores.

Gen	Tipo	5'-Primer-3'	Extension (pb)	Temperatura de Hibridación (°C)	Contenido de guaninas y citocinas (%)	Extensión de producto de PCR (pb)
lytA	F	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	22	60.3	45.45	75 bp
	R	TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT	21	57.4	42.86	
psaA	F	GCCCTAATAAATTGGAGGATCTAATGA	27	58.89	37.04	114 bp
	R	GACCAGAAGTTGTATCTTTTTTCCG	26	59.14	38.46	
ply	F	GCTTATGGGCGCCAAGTCTA	20	60.18	55.00	78 bp
	R	CAAAGCTTCAAAGCAGCCTCTA	23	59.75	43.48	
	R	ACCTTGACTGGAGCCGTTA	20	60.93	55.00	

Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de Colonias bacterianas (Colony-PCR)

Se amplificaron las secuencias seleccionadas durante el diseño de cebadores por medio de una Colony PCR. El volumen total de la reacción será 25 uL.

Tabla 3*Componentes de la colony pcr.*

Componentes	Concentración Final	Volumen Final (uL)
H ₂ O DEPC	--	6.5
Primer Forward	30 nM	2
Primer Reverse	30 nM	2
Gotaq Green master mix	1X	12.5
ADN	--	2
Volumen total	--	25

Tabla 4*Condiciones de amplificación de la colony pcr.*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	20 s	26
Hibridación	59	50 s	26
Extensión	72	30 s	26
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	4	∞	--

Electroforesis

Los productos de PCR (entre 70 y 80 pares de bases) se identificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3%, donde se cargaron 5 uL de producto de PCR y 2 uL de marcador de

100 bp. Se corrió la electroforesis a 90 voltios y 400 mA por 45 minutos. El gel fue revelado en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Impresión 3D por Estereolitografía de una Placa de Microfluídica

Diseño en 3D de una PCR Continua Microfluídica para Impresión 3D por Estereolitografía

El diseño se realizó en el software AutoCad 2018 y Rhinoceros 5. Tomando en cuenta las limitaciones de la impresora 3D Anycubic Photon, se diseñó un canal abierto micrométrico de dimensiones: 500 μm de ancho, 800 μm de profundidad y 4674 mm de largo. El canal se distribuyó en un chip de dimensiones: 14 cm de largo, 3 mm de ancho y 6.5 cm de profundidad.

Impresión 3D por Estereolitografía

El diseño realizado en los diferentes programas mencionados fue exportado al formato .stl, esta extensión puede ser leída por el software propio de la impresora 3D, ANYCUBIC Photon Slicer64. En el software de la impresora se establecieron los siguientes parámetros de impresión: 0.02 milímetros de grosor de capa, 2 segundos de tiempo de exposición normal, 10 segundos de tiempo de descanso entre capas (off time), 95 segundos de tiempo de exposición de las capas de fondo (bottom exposure time) y 5 capas de fondo.

Para mejorar la resolución de la impresión, el modelo fue girado 67° en el eje de las ordenadas, aumentando la superficie de contacto con la luz UV.

Posteriormente, se añadió soportes de 0.8 milímetros de diámetro (heavy) de forma piramidal, distribuidos en toda la placa automáticamente por el software. El archivo generado por el software se exportó a una memoria USB para ser leída por la impresora.

Previo a la impresión se estableció la posición de impresión inicial siguiendo las recomendaciones del manual de usuario. La bandeja donde se coloca la resina fue extraída y en su lugar se colocó una hoja de papel bond; utilizando el panel de control de la impresora se bajó

la plataforma hasta hacer presión sobre el papel bond. Una vez abajo se cuadró la plataforma con la pantalla LCD y se aseguró el tornillo.

Se colocó la resina fotosensible ELEGOO 3D Printer Rapid Resin 405 nm en la bandeja colectora hasta alcanzar un tercio de su capacidad.

Finalmente, se introdujo la memoria USB en el puerto de la impresora y se inició la impresión de un tiempo aproximado de 30 horas.

Lavado, Fortalecimiento y Tratamiento de Termorresistencia de la Placa de Microfluídica

Una vez terminada la impresión, el modelo se separó de la plataforma de la impresora y se realizó 3 lavados con alcohol etílico 99% y 3 lavados con agua destilada. Posteriormente, el modelo fue almacenado en el desecador por una hora aproximadamente hasta secarse completamente.

Para fortalecer el modelo, la impresión fue expuesta a un tratamiento con luz UV por media hora por cada lado.

Finalmente, para aumentar la termorresistencia del modelo se trató con calor por intervalos de veinte minutos dejando enfriar el modelo entre cada intervalo y aumentando la temperatura. Se ocupó una estufa para controlar las siguientes temperaturas: 50 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C y 95 °C.

Sellado de la Placa

Para sellar los canales se ocupó la película adhesiva MicroAmp™ Optical Adhesive Film de 14 cm de largo y 6.5 cm de ancho para proporcionar un sello hermético sobre la placa. Una vez sellada, se procedió a realizar el tratamiento de termorresistencia descrito en el apartado 1.3.3.

Verificación de Integridad de Canales

La verificación de los canales se llevó a cabo en un microscopio óptico de campo claro, comparando la profundidad, ancho y rugosidad del canal con el modelo diseñado en el software. Posteriormente, se procedió a medir los canales en zonas curvas en el software AutoCad 2018.

Diseño de una prueba de flujo lateral basada en secuencias conservadas de ADN

Limpieza, Activación y Tratamiento de Membranas de Nitrocelulosa

Se cortaron membranas de nitrocelulosa en un rectángulo de dimensiones: 0.5 cm de ancho y 3 cm de largo. Las membranas fueron limpiadas por 1 minuto en agua destilada posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron tratadas con luz UV-30A en cada lado de la membrana.

Para activar las membranas limpias en el proceso previo, se preparó la solución RCA compuesta por agua destilada, peróxido de hidrógeno e hidróxido de amonio en las siguientes proporciones: 71.42% H₂O, 14.29% H₂O₂ y 14.29% NH₄OH. Las membranas fueron sumergidas por un minuto en la solución RCA a una temperatura de 60°C. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 80°C por 30 minutos.

Finalmente, las membranas fueron modificadas sumergiéndolas en una solución de PBS 1X suplementada con poli lisina a una concentración de 1 µL/mL de buffer. La solución se mantuvo en agitación suave a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con agua destilada, secadas en la estufa a 55°C y almacenadas en una caja cubierta con papel aluminio en el desecador por una semana.

Cabe recalcar, que todos los procesos descritos fueron realizados en una cabina extractora de gases para evitar posibles contaminaciones en las membranas.

Fijación de Cebadores en Membrana de Nitrocelulosa Tratada

Para realizar el marcado (spotting) de los cebadores seleccionados se preparó una solución madre tampón salina-citrato de sodio (SSC) 20X compuesto por cloruro de sodio en una concentración 3M y citrato trisódico en una concentración 0.3 M.

Los cebadores (1X) seleccionados fueron disueltos en la solución tampón SSC 6X en una proporción 1:1. Se depositó 1 μ L de esta solución en la membrana de nitrocelulosa. Finalizado el marcado, se trató la membrana con luz UV por 1 minuto y posteriormente se expuso la membrana a 80°C en la estufa por una hora treinta minutos.

Finalmente se procedió a bloquear la membrana, para este proceso se preparó una solución de bloqueo compuesta por una solución tampón 5X, 0.1% de dodecilsulfato sódico y 1% de albúmina de suero bovino. Las membranas se sumergieron en la solución de bloqueo y se dejó en agitación suave toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua destilada y fueron secadas a 55°C en la estufa.

Cabe recalcar, que todo el proceso fue realizado en una cabina de flujo laminar cuidando posibles contaminaciones en las membranas.

Control de Flujo para el Paso a través de la Placa de Microfluídica

El flujo se controló con una bomba de inyección, el motor se fijó en 1.3 rev/min para mantener un régimen laminar y que el proceso dure un máximo de 10 minutos.

Para poder estimar el caudal, se consideró las especificaciones del motor junto con el circuito integrado. La bomba tiene una resolución de 0.04 μ L por paso del motor, considerando que el volumen total del canal en el chip de microfluídica es de 1.75 mL, se pudo deducir que el caudal en el canal fue de 175 μ L/min.

Control de Temperatura de la PCR Continua

La temperatura se controló con tres celdas Peltier y tres sensores digitales de temperatura, los cuales se detallan en la Tabla 5. Estos módulos fueron controlados con un microcontrolador.

Tabla 5

Controladores de temperatura.

Módulo	Cantidad	Temperatura máxima (°C)
Termistor DS18B20	3	125
Celda Peltier CM23-1.9	2	85
Celda Peltier Laird HiTemp ET12	1	150

Controlador del Prototipo

Tanto la temperatura como el flujo fueron dirigidos por un microcontrolador, la temperatura fue controlada por modulación por ancho de pulsos (PWM), en la tabla 4 se detallan los módulos que se ocuparon para desarrollar el circuito completo.

Tabla 6

Módulos ocupados en el circuito para el controlador.

Módulo	Cantidad
Fuente de poder 12V5A	1
Convertidor de voltaje DC-DC LM2596	3
Transistor Mosfet IRFZ44N	3
Resistor 220K Ω	3

Módulo	Cantidad
Resistor 1K Ω	3
Microcontrolador ESP32	1

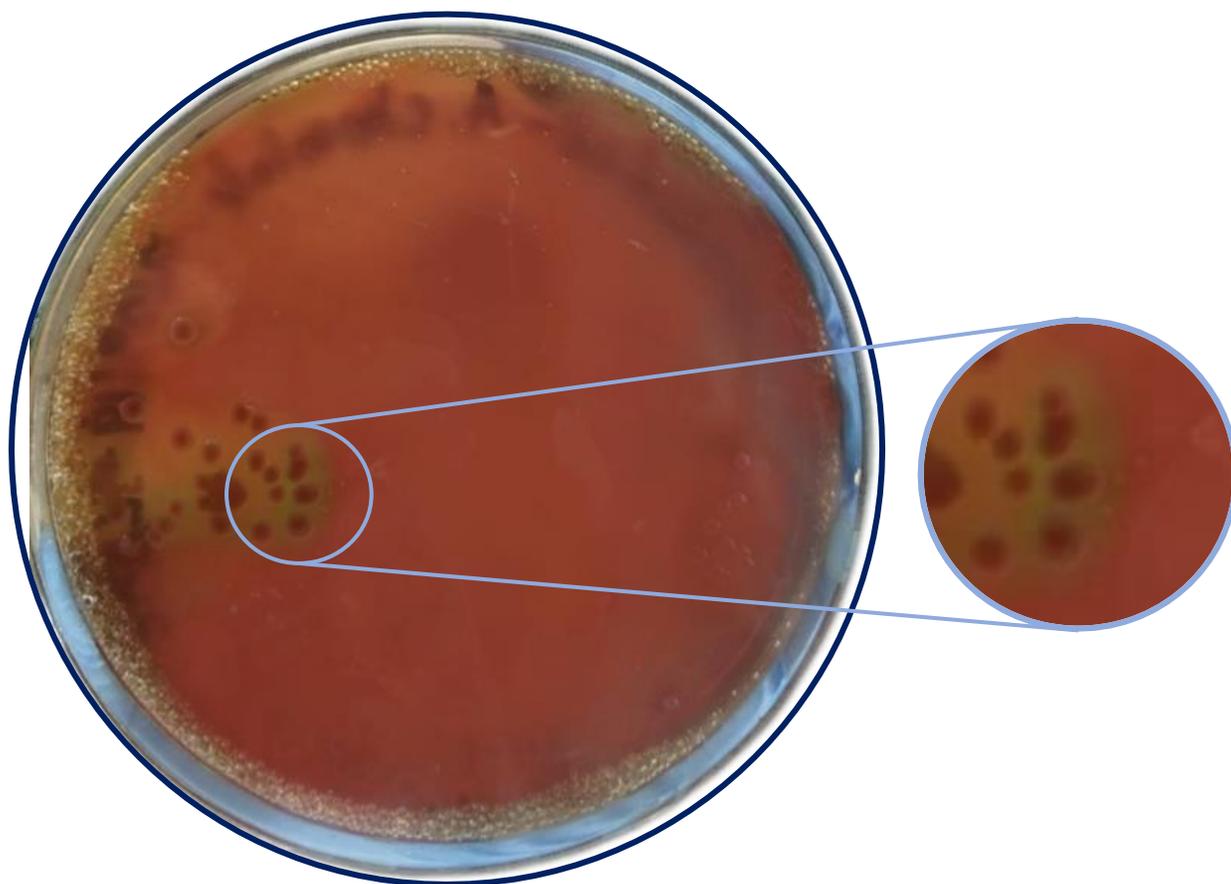
Capítulo IV. Resultados

Cultivo de Bacteria *Streptococcus pneumoniae*

La muestra, proveniente de hisopado nasofaríngeo del Laboratorio Zurita & Zurita caracterizada por su morfología y confirmada por PCR, fue resembrada en agar sangre e incubada en condiciones anaerobias a 35°C durante una semana hasta encontrar crecimiento de colonias que formen alfa hemólisis (Figura 13).

Figura 13

Cultivo de streptococcus pneumoniae en agar sangre.



Nota. Las colonias de *Streptococcus pneumoniae* forman círculos concéntricos de color gris oscuro y muestran alfa hemólisis en presencia de sangre. Tiempo de cultivo: 1 semana.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se probaron dos programas de termociclado para determinar el tiempo mínimo requerido en cada uno de los pasos. En la tabla 7 se detalla el programa que fue usado para comprobar que la cepa bacteriana era la esperada usando el cebador *lytA*, descrito en la tabla 3. Este programa es considerado como la referencia o condiciones normales.

Tabla 7

Programa de termociclado en condiciones normales.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	20 s	26
Hibridación	59	50 s	26
Extensión	72	30 s	26
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	4	∞	--

En la tabla 8 se detalla el programa usado en condiciones adversas. El tiempo de cada etapa del termociclado es igual, sin embargo, los ciclos y la temperatura se mantienen constantes.

Tabla 8

Programa de termociclado en condiciones adversas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	30 s	1
Desnaturalización	95	30 s	26
Hibridación	59	30 s	26
Extensión	72	30 s	26
Extensión final	72	30 s	1
Mantenimiento	4	∞	--

En la figura 14 se muestra el gel revelado, donde en el primer canal se muestra el marcador ExcelBand Super Range DNA Ladder cuyo rango va de 50 pares de bases a 25 mil pares de bases. En los canales 2,3,4 y 5 se corrieron los productos obtenidos de la PCR que fueron sometidos al termociclador con el programa descrito en la tabla 6, mientras que en los canales 6, 7, 8, y 9 se corrieron los productos de PCR que fueron sometidos al termociclador con el programa descrito en la tabla 7. Por último, en el canal 10 se corrió un control negativo que fue sometido al programa de termociclado descrito en la tabla 6. En los canales 2-9 se puede observar un amplicón de entre 50 y 100 pares de bases, se esperaba una banda de 75 pares de bases.

Figura 14

Corrida electroforética de productos de colony pcr de muestras de Streptococcus pneumoniae.



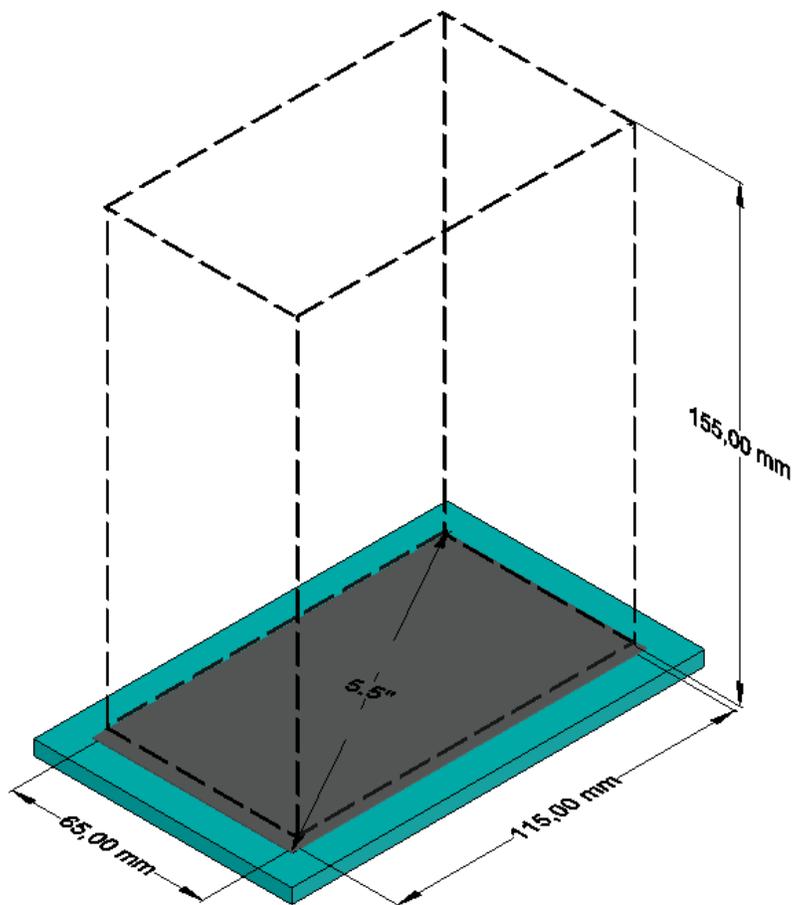
Nota. El canal 1 muestra el marcador utilizado en la corrida (ExcelBand Super Range DNA Ladder); los canales 2-5 muestran un amplicón de alrededor de 74 pares de bases, amplificado con el primer programa detallado en la tabla 6; los canales 6-9 muestran un amplicón de aproximadamente 74 pares de bases, amplificados con el programa detallado en la tabla 8. En el canal 10 se corrió un control positivo siguiendo el programa detallado en la tabla 7.

Diseño en 3D de una PCR Continua Microfluídica para Impresión 3D por Estereolitografía

Para determinar la longitud del canal y el tamaño de la placa para la PCR continua se establecieron los límites de resolución y tamaño de la impresora 3D. Acorde a las especificaciones del fabricante la impresora tiene una resolución en el eje X y Y de 47 μm y en el eje z tiene una resolución de 1.25 μm . Las dimensiones físicas de impresión son de 115 mm, 65 mm y 155 mm de largo, ancho y altura respectivamente (Figura 15). Sin embargo, el manual recomienda usar una resolución en el eje z de mínimo 10 μm y máximo 200 μm .

Figura 15

Dimensiones de impresión 3D.



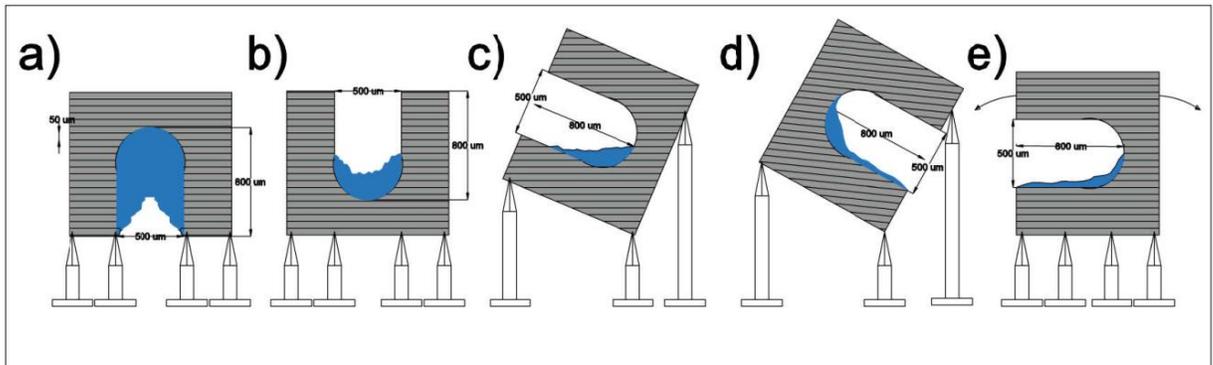
Nota. En la parte inferior de la figura se detalla la pantalla LCD 2K. Esta pantalla emite luz ultravioleta en cada uno de sus píxeles.

Debido a la viscosidad de la resina usada en la impresión se consideró para los cálculos una resolución de $50\ \mu\text{m}$ en el eje z y la resolución máxima en los ejes X y Y.

Para maximizar el tamaño impresión, minimizar la cantidad de soportes y maximizar la superficie de contacto para la polimerización de la resina se consideró que el modelo sea impreso en un ángulo de 67° (Figura 16).

Figura 16

Ángulos de impresión y soportes.

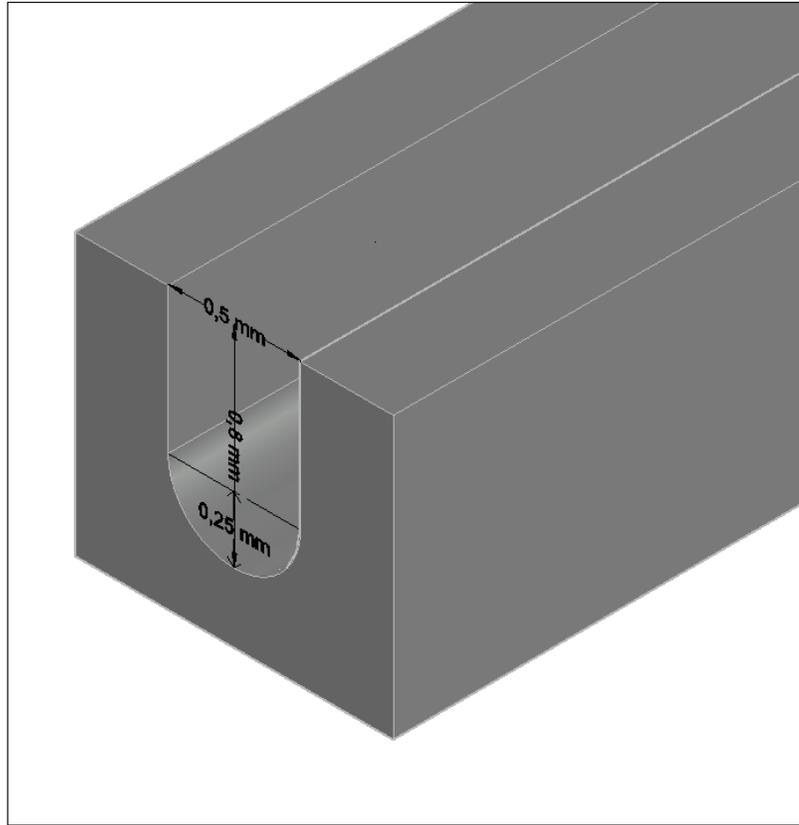


Nota. Los modelos están divididos en capas de 50 µm. En azul se detalla la resina atrapada durante la impresión, también se muestran soportes que ayudan a mantener la integridad del modelo durante el proceso. a) Impresión con la apertura del canal en dirección a la pantalla LCD. b) Impresión con la apertura del canal en dirección opuesta a la pantalla LCD. c) Impresión con la apertura del canal inclinada y alejada de la pantalla. d) Impresión con la apertura del canal inclinada y en dirección a la pantalla. e) Impresión con la apertura del canal girado 90° con respecto a la pantalla.

Debido a las limitaciones de la impresora en generar canales cerrados, se optó por un canal abierto. Para minimizar problemas de impresión se optó por un canal de 500 µm de ancho y 800 µm de profundidad (Figura 17).

Figura 17

Dimensiones del canal diseñado.



Para verificar que el flujo que va a pasar a través de los canales se mantiene en régimen laminar fue necesario estimar la viscosidad cinemática del fluido usando la ecuación Refutas (Ecuación 1, Ecuación 2 y Ecuación 3).

$$VBN_i = \frac{\ln(v_i)}{\ln(1000 \cdot v_i)} \quad (1)$$

$$VBN_{mixture} = \sum_{i=0}^N X_i \cdot VBN_i \quad (2)$$

$$\eta_{mixture} = \exp \left(\exp \left(\frac{VBN_{mixture} - 10.975}{14.534} \right) \right) - 0.8 \quad (3)$$

Para estimar los valores de viscosidad de los elementos de la PCR se usaron valores experimentales, la ecuación de Einstein para mezclas heterogéneas (Ecuación 4) y la regla de Kern (Ecuación 5), los valores obtenidos se describen en la tabla 8.

$$\frac{\eta_m}{\eta_1} = \frac{1 + 0.5\phi}{(1 - \phi)^4} \quad (4)$$

$$(\eta_{sol.} \leq 2\eta_{H_2O})_{30\%} \quad (5)$$

Tabla 9

Viscosidad dinámica de los componentes de la PCR.

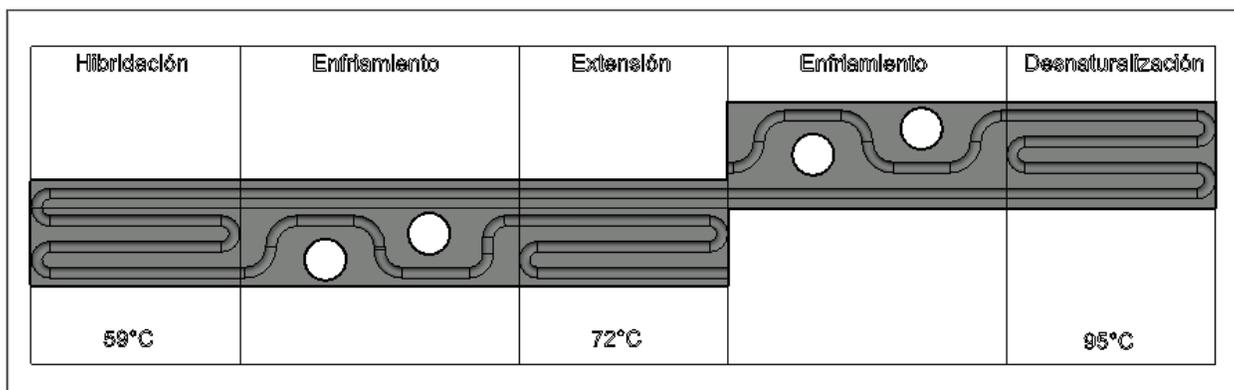
Componente	Volumen (μL)	Fracción volumétrica (X_i)	Viscosidad cinemática (m^2/s)	Número de mezcla de viscosidad (VBN)	$X_i \cdot \text{VBN}$
ADN (Buffer lisis y ácido nucleico)	2	0.08	0.9207	-0.0121	-9.68×10^{-4}
Gotaq Green master mix	12.5	0.5	1.7854×10^{-6}	2.0916	1.0458
Cebadores (Primer forward y reverse)	2	0.08	1.7324×10^{-6}	2.0894	0.1672
H ₂ O	8.5	0.34	8.9268×10^{-7}	1.9838	0.6745
Total	25	1			1.8865

La viscosidad cinemática de la mezcla fue $0.9076 \text{ m}^2/\text{s}$. Los valores calculados son aproximaciones desfavorables.

En la figura 18 se muestra el modelo de un ciclo de la PCR continua, la etapa de hibridación, extensión y desnaturalización tienen similar distancia.

Figura 18

Canal microfluido de cada ciclo de PCR continua.



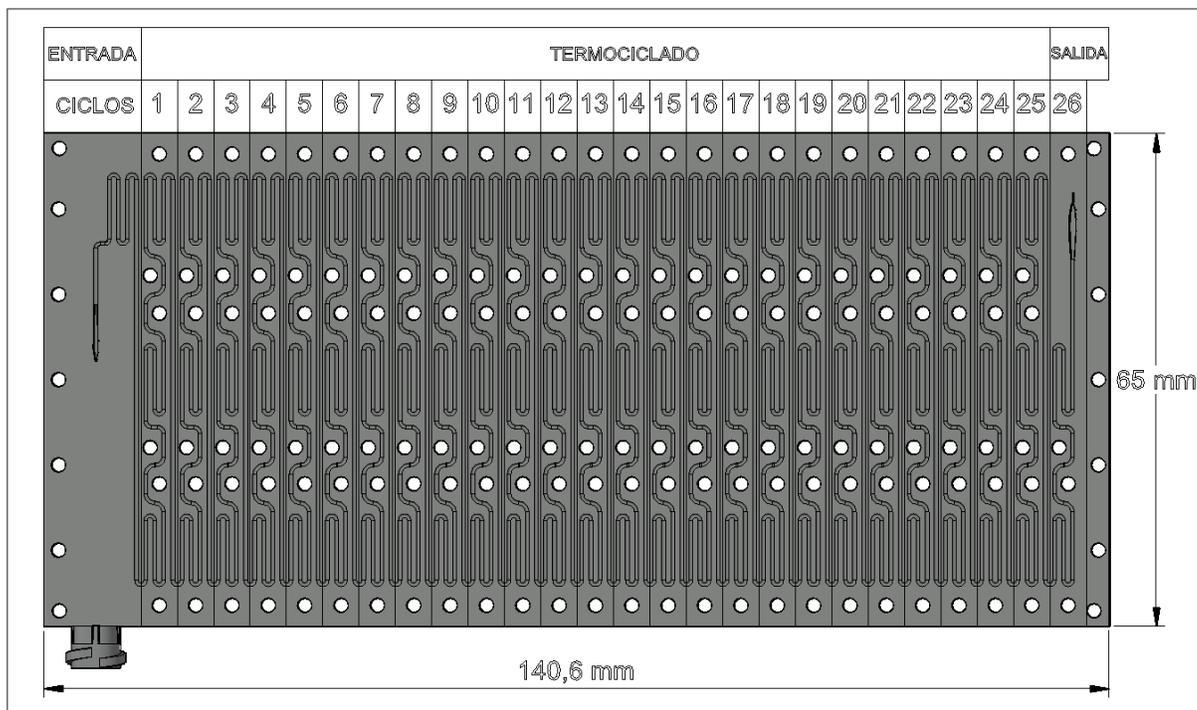
Nota. Se detallan las etapas de la PCR en el canal y su temperatura. Diseñado en: Rhinoceros

5.0.

En la figura 19 se muestra la placa completa, recreando una PCR de 26 ciclos. Las medidas finales de la placa fueron 140.6 milímetros de largo, 65 milímetros de ancho y 3 milímetros de profundidad. En las medidas se consideraron un excedente en cada dimensión para evitar errores de impresión en los filos de los canales. En la placa se añadieron orificios para facilitar el sellado posterior, además, de un puerto a la entrada que puede ser utilizado para acoplar una inyección convencional (Figura 21). La salida del flujo se diseñó en forma cónica de 1.5 mm de diámetro en la parte posterior de la placa.

Figura 19

Placa de PCR continua de 26 ciclos.



Nota. En la figura se detalla el tamaño de la placa, la entrada que puede ser acoplada a una inycción convencional y la salida. Diseñado en: AutoCad 2018.

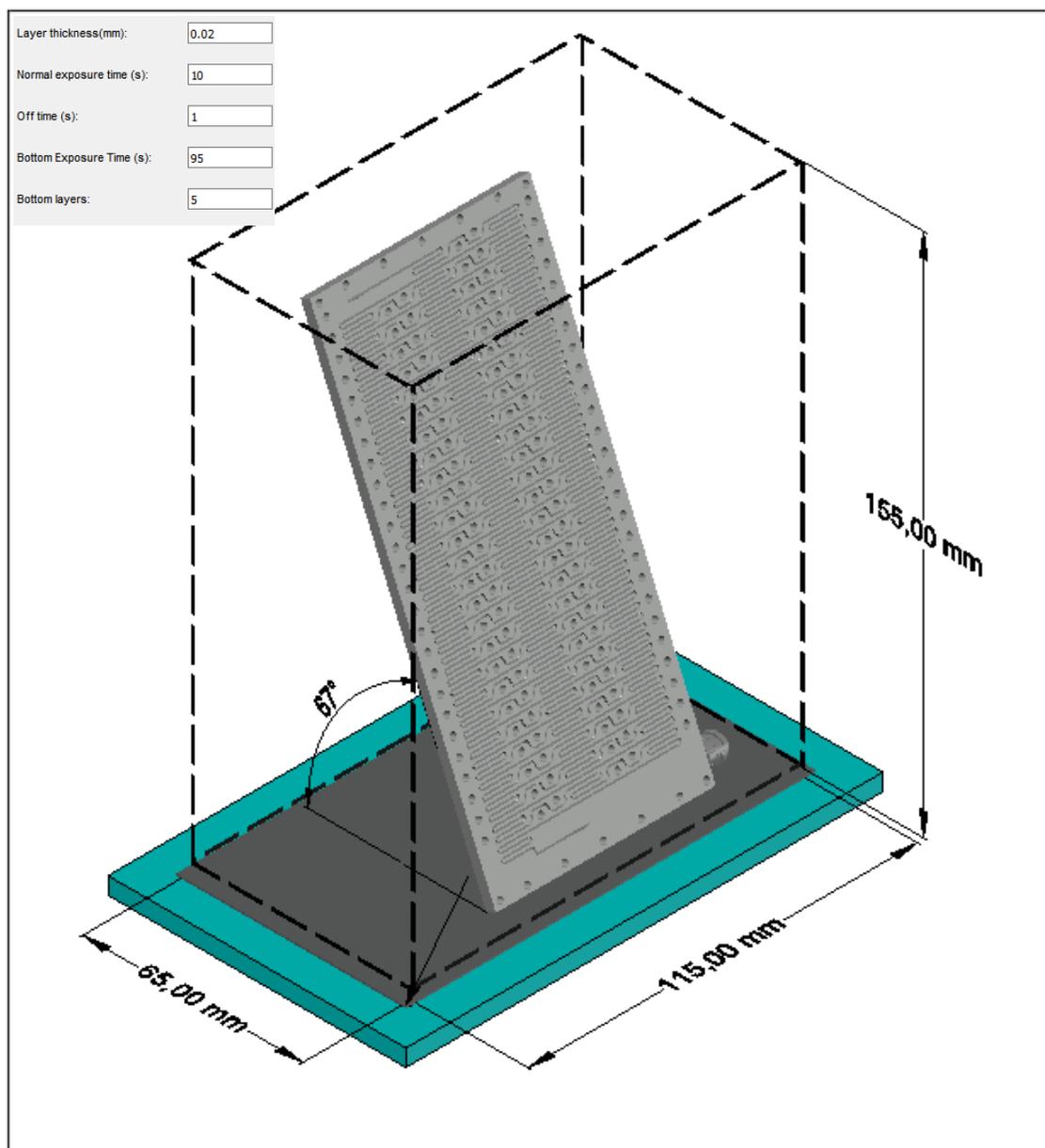
Para la impresión de la placa se realizó girando la placa en el eje x en 67°, debido a la altura que ocupó el modelo el tiempo de impresión fue de 30 horas aproximadamente (Figura 20). La longitud final del canal fue de 4673.7542 milímetros generando un volumen de 1.74 cm³ y el área transversal es de 0.0037 cm². Considerando la distancia del canal, la dimensión característica del flujo, la viscosidad del fluido y estimando una velocidad máxima de flujo de 6 μL/min, se calculó el número de Reynolds usando la ecuación 6.

$$Re = \frac{\rho \omega v}{\eta} \quad (6)$$

A partir de los datos considerados se calculó que el valor del número de Reynolds es siempre menor a 100, por lo tanto, se considera que el flujo es laminar.

Figura 20

Disposición de la placa en la impresora 3D.



Nota. En la esquina superior derecha se detallan los parámetros de impresión que se utilizó.

Diseñado en: AnyCubic Photon Slicer64.

Para estimar la cantidad de calor que se conduce a través de la membrana con la que se selló la placa (Figura 22) se utilizaron la ecuación de conducción de Fourier (Ecuación 7), la

ecuación de la capacidad calorífica específica (Ecuación 8) y la ecuación de calor sensible (Ecuación 9).

$$dq = -kdA \frac{dt}{dx} \quad (7)$$

$$C_p = \frac{Q}{m\Delta T} \quad (8)$$

$$Q = m(H_2 - H_1) \quad (9)$$

Dado a que la ecuación 7 depende del área y las ecuaciones 8 y 9 dependen de la cantidad de masa que se encuentra en el canal, la cantidad necesaria de energía para llevar al líquido a equilibrio termodinámico con el controlador de temperatura es mínima, se considera que la velocidad a la que pierde y gana calor es de 3 °C/s (Crews et al., 2008).

Figura 21

Placa de PCR continua en perspectiva.

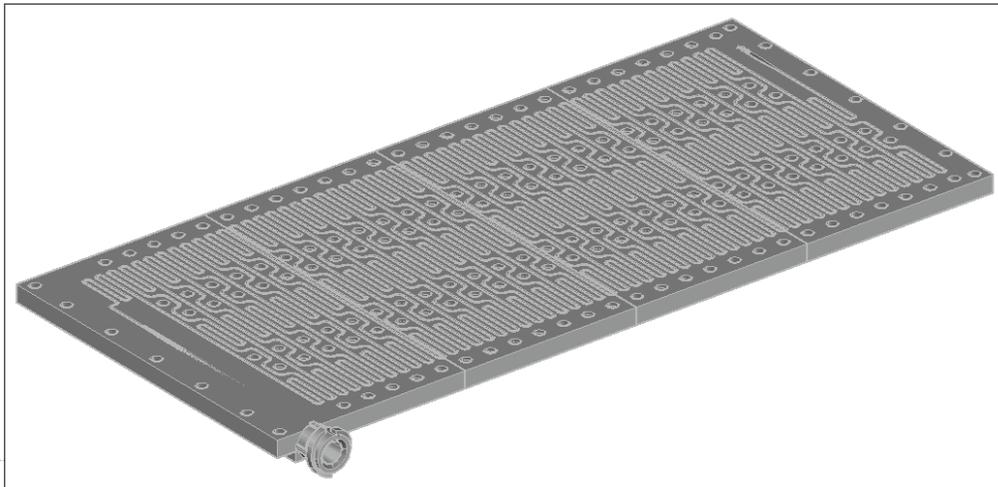
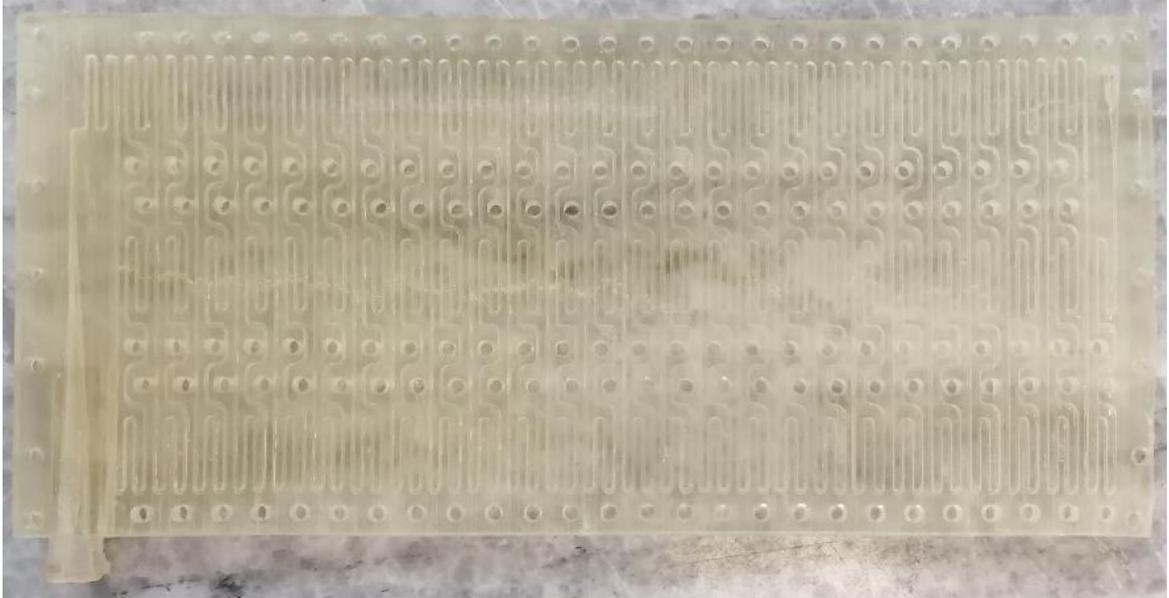


Figura 22

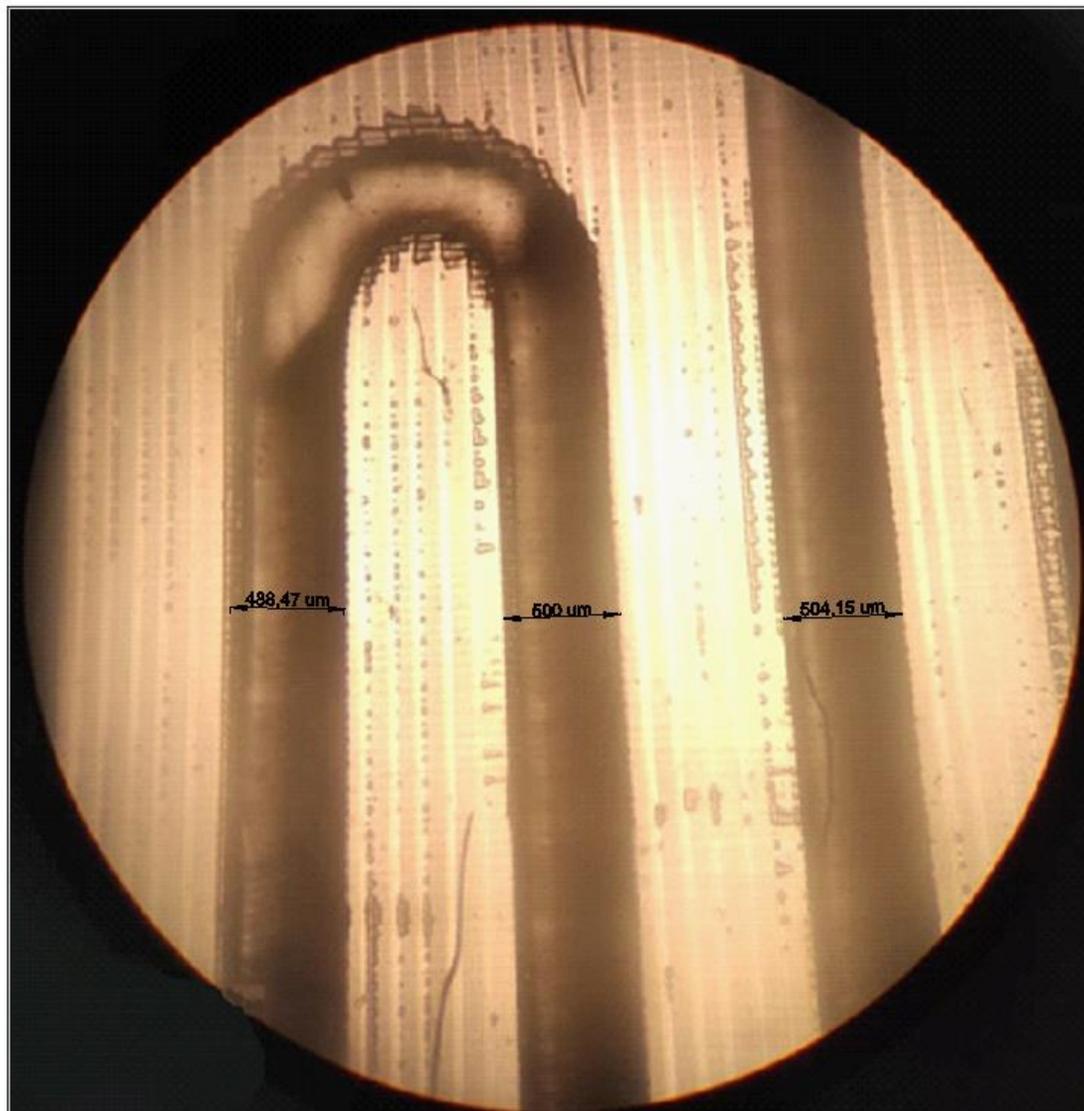
Placa sellada con película adhesiva microamp optical adhesive.

**Verificación de Integridad de Canales**

Para la verificación del tamaño de los canales se observó en el microscopio óptico de campo claro y se comparó las medidas obtenidas con las establecidas en la impresión (Figura 23 y Figura 24)

Figura 23

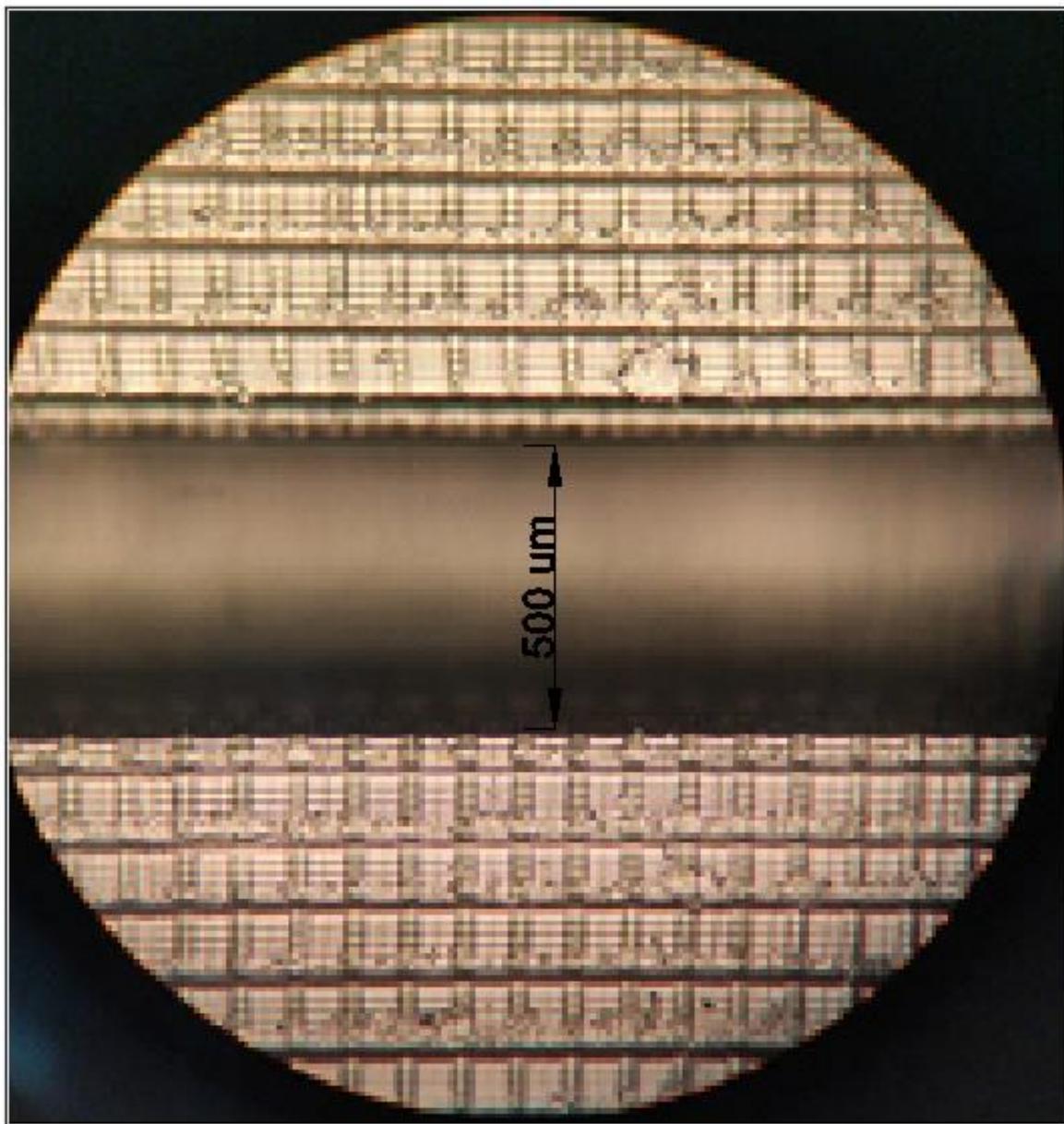
Micrografía de canales de PCR continua impresos por estereolitografía.



Nota. Los canales fueron medidos en el software AutoCad 2018 considerando el aumento en el microscopio. Magnificación: 40X.

Figura 24

Micrografía de canales de PCR continua impresos por estereolitografía.



Nota. Los canales fueron medidos en el software AutoCad 2018 considerando el aumento en el microscopio. Magnificación: 40X.

Diseño de una Prueba de Flujo Lateral Basada en Secuencias Conservadas de ADN

Para la construcción de la prueba de flujo lateral el cebador hacia adelante fue fijado en la membrana de nitrocelulosa y el cebador reverse biotinilado fue fijado en la almohadilla de conjugado como se detalla en la figura 25. El diseño de la cubierta de la prueba de flujo lateral se realizó considerando las necesidades del prototipo de diagnóstico. La entrada se colocó en la parte inferior de la prueba para acoplarse a la placa de PCR continua microfluídica. Para el tamaño de la cubierta se consideró el tamaño de la membrana de nitrocelulosa (5 mm x 48 mm). La cubierta fue diseñada en el software Rhinoceros 5.0 (Figura 26). El modelo se imprimió en el equipo Anycubic Photon (Figura 27).

Figura 25

Componentes de la prueba de flujo lateral.

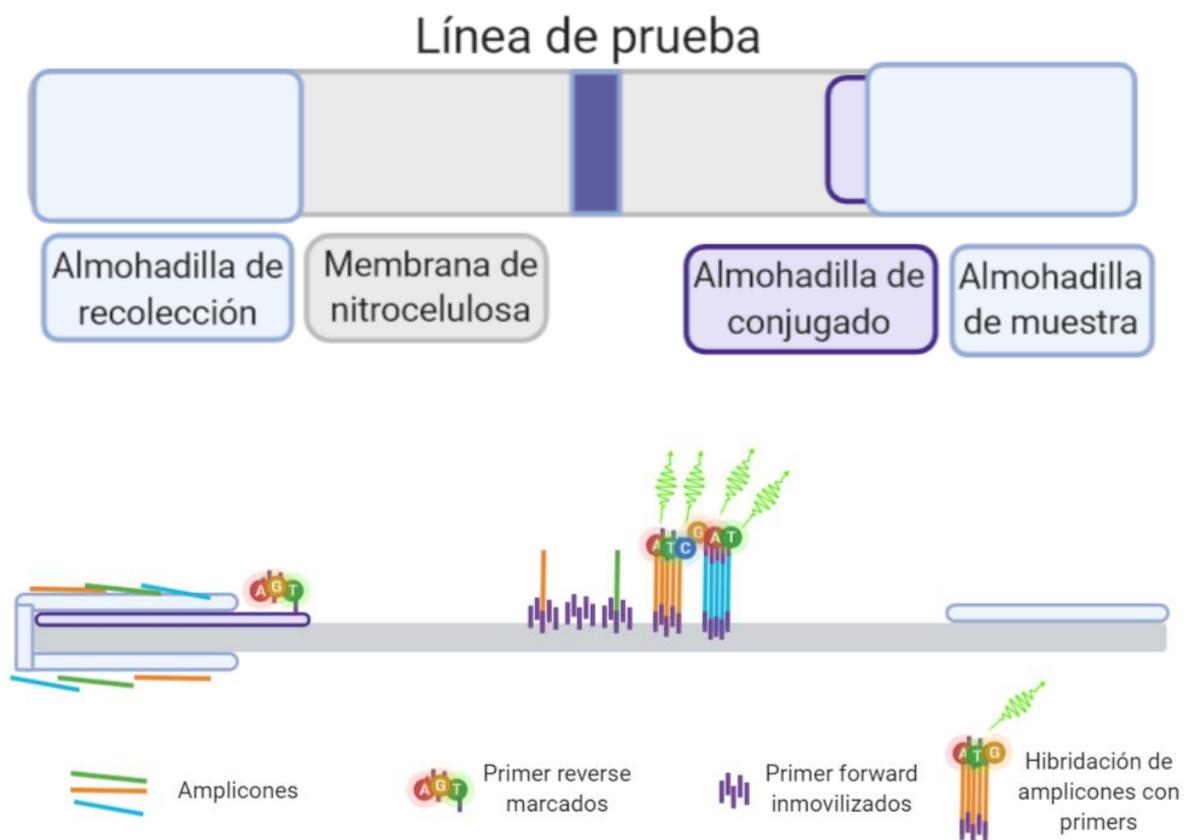
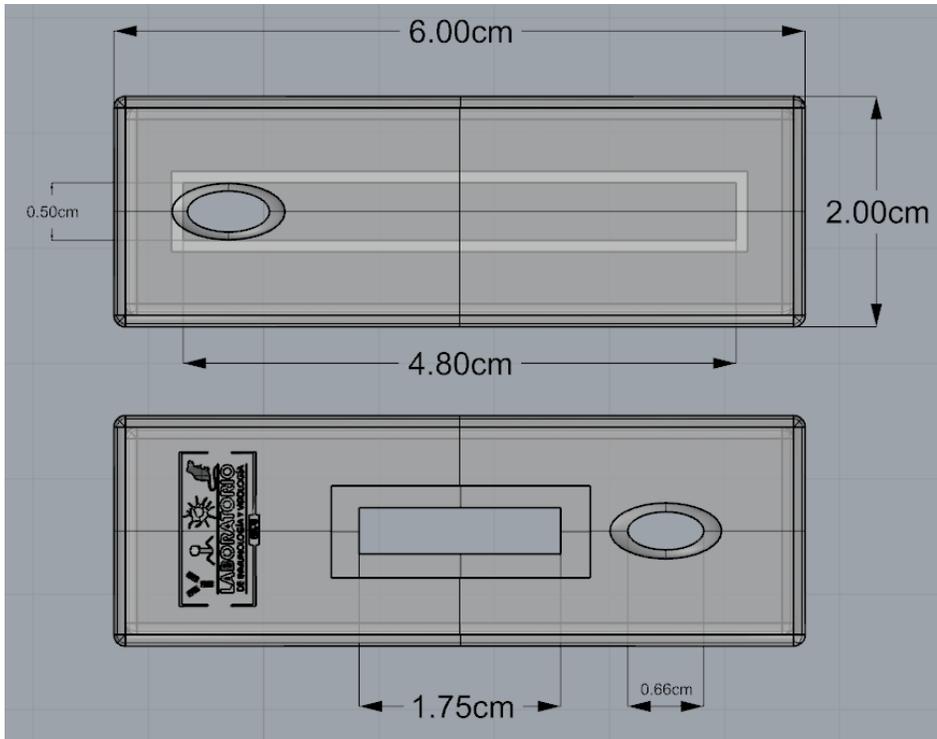


Figura 26

Modelo y dimensiones de cubierta para la prueba de flujo lateral.



Nota. Diseño realizado en el software Rhinoceros 5.0

Figura 27

Prueba de flujo lateral ensamblada.



Nota. La cubierta fue impresa por estereolitografía. Diseño en el software Rhinoceros 5.0

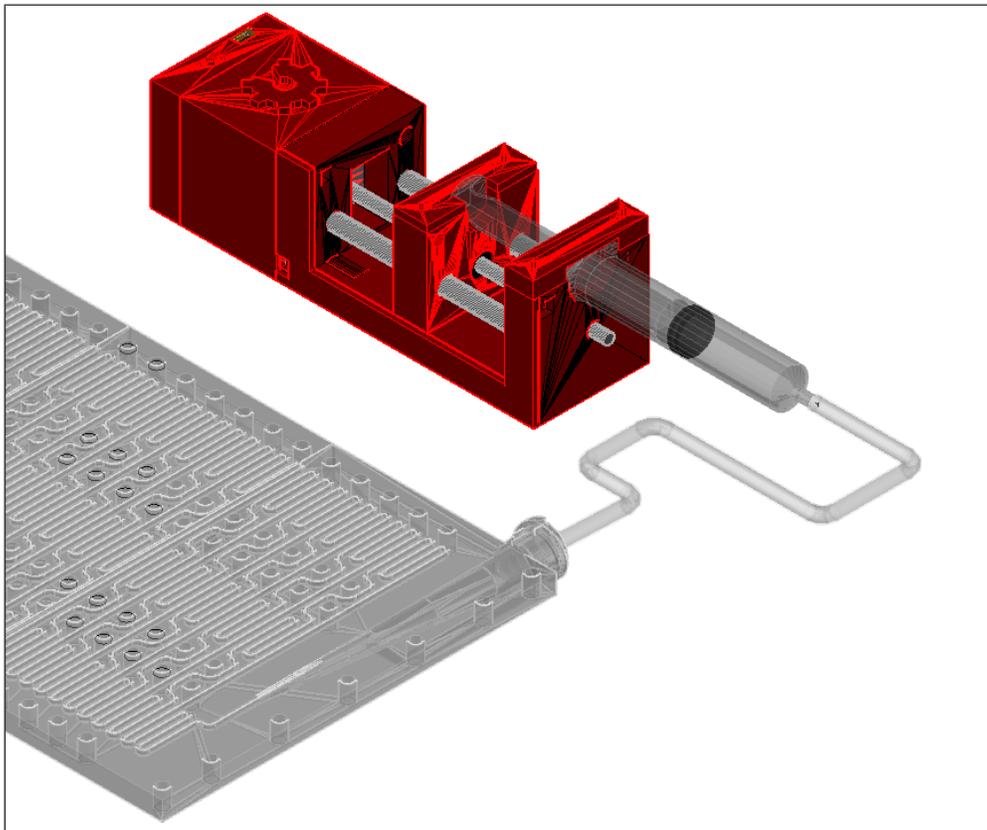
Control de Flujo para el Paso a través de la Placa de Microfluídica

Para controlar el flujo se utilizó una bomba de inyección dirigida por un microcontrolador Arduino (Figura 28). La bomba usa una inyección de 5 mililitros acoplada a un sistema dirigido por un motor a pasos y un controlador para el motor de micro pasos. La bomba tiene una resolución de $0.04 \mu\text{L}$ por cada micro paso (Figura 29). Usando la ecuación del volumen del cilindro (Ecuación 10) se estableció que se requiere 12.65 revoluciones para empujar el volumen total guardado en los canales de la placa de PCR continua.

$$V_{\text{Desplazado}} = \pi r^2 L \quad (10)$$

Figura 28

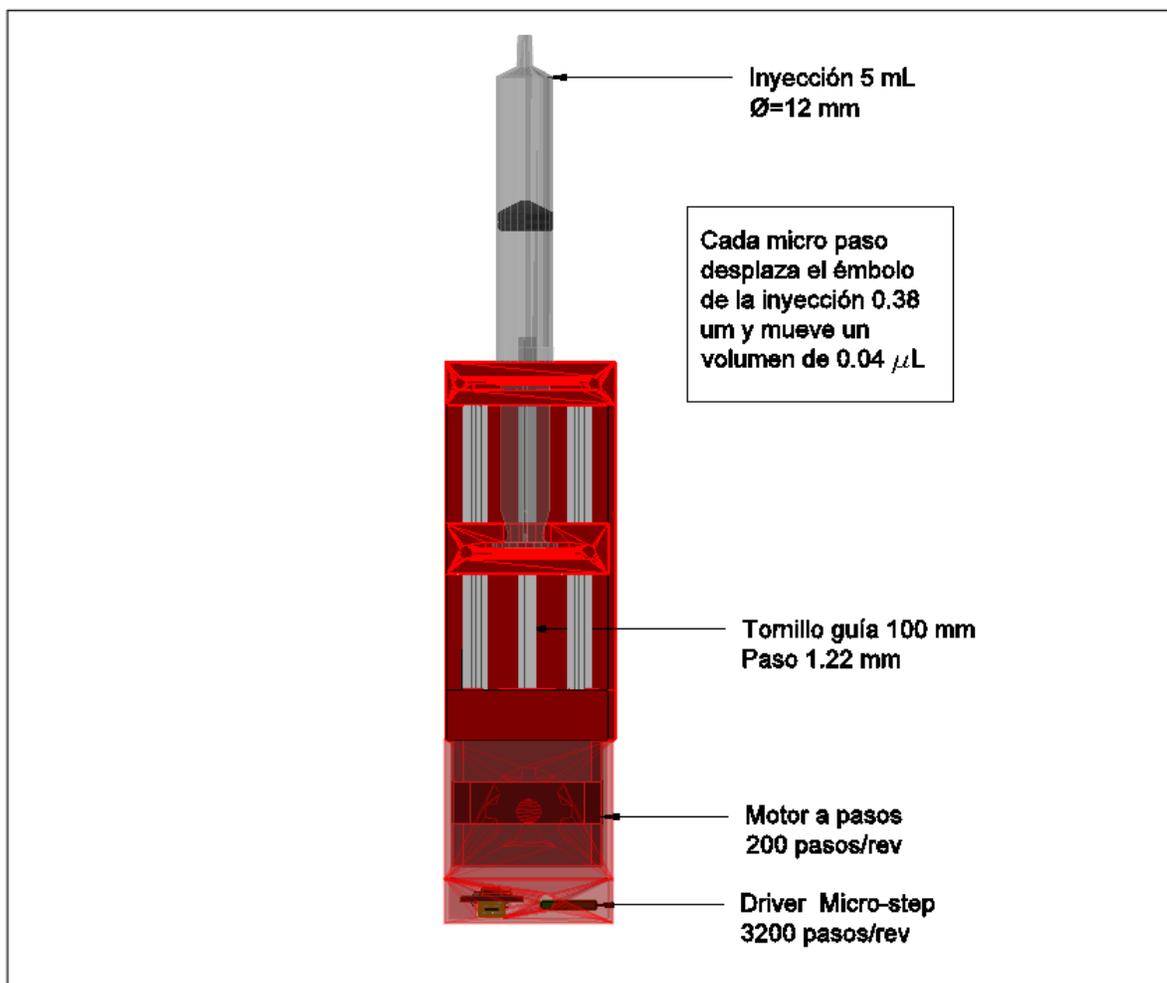
Bomba de inyección acoplada con una canula plástica a la placa de PCR.



Por lo tanto, para que el evento de PCR dure un tiempo de 10 minutos se requiere establecer que el motor rote a una velocidad de $1.265 \text{ rev}/\text{min}$.

Figura 29

Características de la bomba de inyección.



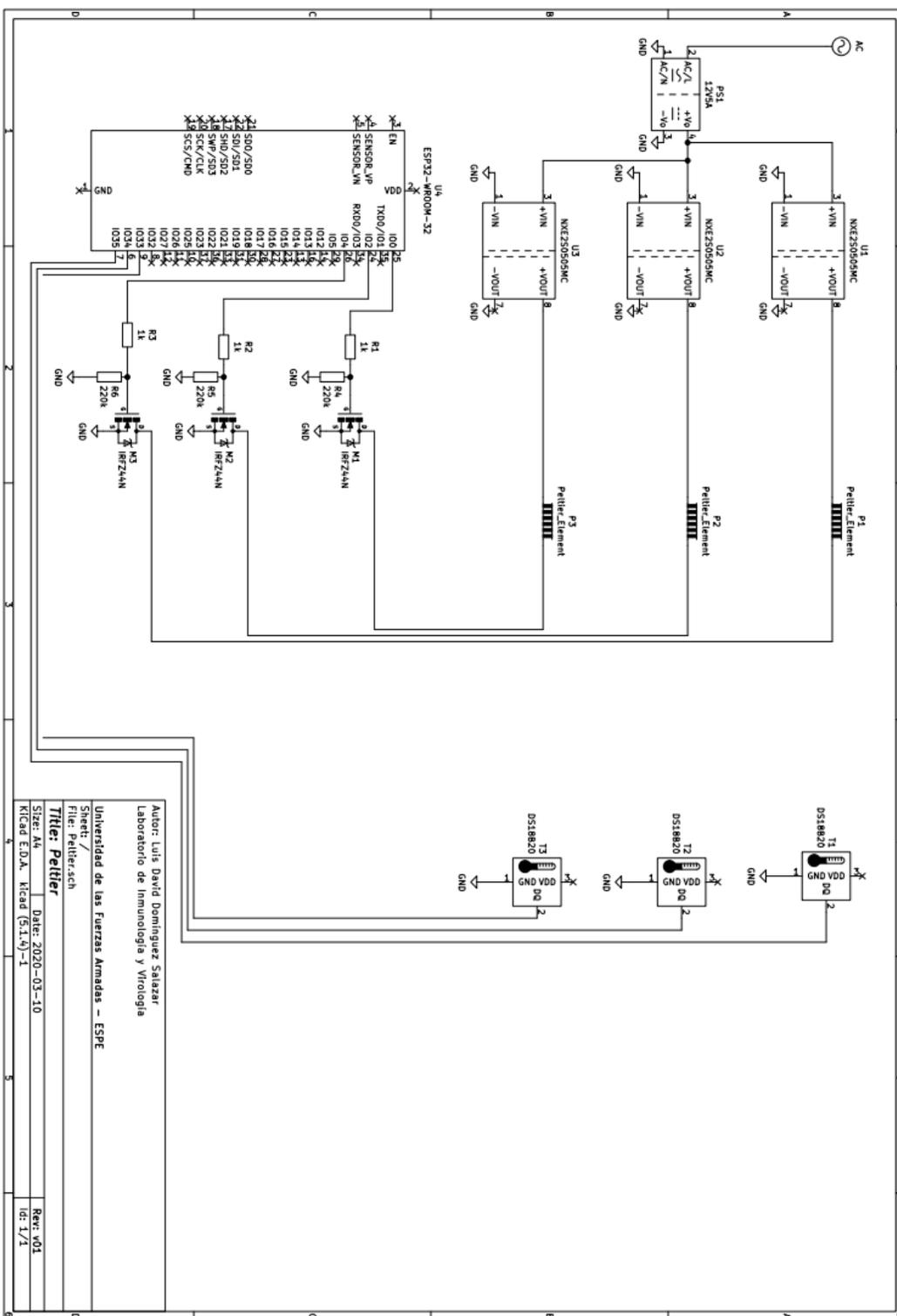
Nota. El cuerpo de la bomba fue impreso en el equipo Anycubic Photon. Adaptado de Negrier (2015)

Control de Temperatura de la PCR Continua

Se diseñó el control de temperatura y tiempo usando el microcontrolador ESP32 en el circuito descrito en la Figura 30.

Figura 30

Esquemática del circuito para controlar el prototipo.

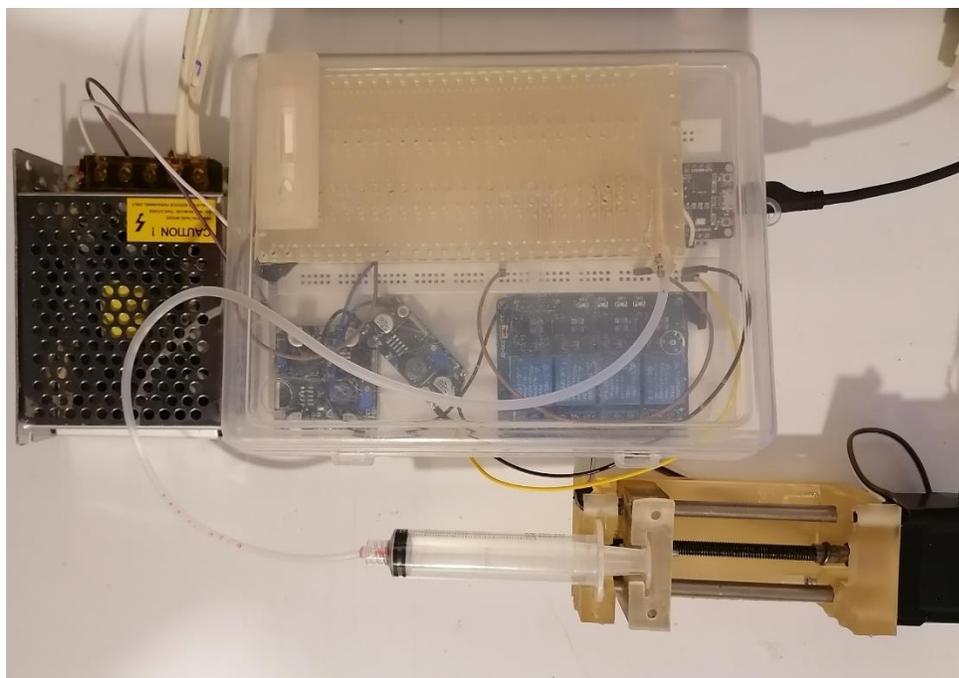


Ensamblado del Prototipo

Se ensambló el prototipo considerando las necesidades del circuito y las dimensiones de la placa de PCR continua microfluídica (Figura 31). La muestra o máster mix se carga directamente al tubo de alimentación previo a ajustarlo a la bomba de inyección. Posteriormente se acopla la cánula plástica a la inyección y se enciende el circuito; el flujo se controla a través del programa Arduino ingresando la velocidad del motor en revoluciones por minuto (Figura 32).

Figura 31

Prototipo de PCR continua microfluídica ensamblada.



Cada muestra o reacción de PCR debe tomar un mínimo de 3 minutos para completar la amplificación, por lo tanto, la velocidad máxima del motor es de $4.22 \text{ rev}/\text{min}$. Se estima que el tiempo mínimo del ensayo completo será de 5 minutos.

Capítulo V. Discusión

La neumonía, a pesar de ser una enfermedad ubicua, es una de las causas principales de mortalidad en población de riesgo y una de las dolencias más complicadas de diagnosticar debido a sus diferentes etiologías (Ramamoorthy & Sundaram, 2018). Se ha determinado que el cultivo celular y las técnicas moleculares son los mejores métodos para determinar la procedencia de la enfermedad, sin embargo, las dos técnicas requieren largos tiempos de incubación y altos costos de implementación (Gupta et al., 2012). El uso de nuevas tecnologías como la microfluídica prometen disminuir tanto el tiempo como el material necesitado para procesos complejos de laboratorio (Stroock, 2008).

El patógeno con mayor incidencia en la transmisión de la enfermedad por infección bacteriana es causada principalmente por *Streptococcus pneumoniae*. Esta bacteria forma colonias circulares y alfa hemolíticas (Figura 13). El neumococo tiene una respuesta autolítica característica cuando se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento que promueve a una excesiva lisis celular en cultivos *in vitro* (Mellroth et al., 2012). La expresión del gen LytA ocasiona la lisis cortando enlaces en la membrana celular. Este gen es conservado y se ha determinado que contribuye a la virulencia de la cepa (Tomasz et al., 1970). Por esta razón, se diseñaron cebadores astringentes para detectar el gen LytA (Tabla 2), estos cebadores fueron utilizados tanto para la reacción en cadena de la polimerasa como para el diseño de la prueba de flujo lateral.

La infección de *Streptococcus pneumoniae* puede ocurrir en dos diferentes niveles, invasiva o respiratoria. La invasiva se caracteriza por ocasionar infecciones sanguíneas y meningitis (Hortal et al., 2000). Mientras que la respiratoria provoca la formación de consolidados en los pulmones o neumonía adquirida en la comunidad (Ruvinsky, 2001). Las muestras consideradas para el estudio fueron hisopados nasofaríngeos para facilitar la

discriminación de una infección respiratoria, adicionalmente, el hisopado permite diferenciar de las bacterias comensales del tracto digestivo y, en parte, del tracto nasal superior (Mirete Ferrer et al., 2001).

El método más eficiente para determinar la existencia de un gen bacteriano a partir de un cultivo celular es la reacción en cadena de la polimerasa de colonias o colony PCR (Bergkessel & Guthrie, 2013). Se probaron dos programas de termociclado, en el primer programa (Tabla 7) se probó una adaptación del programa descrito por Bergkessel & Guthrie (2013) donde se aplica una desnaturalización inicial prolongada con el objetivo de destruir las membranas celulares de las bacterias y facilitar las etapas siguientes de la PCR; además se considera una etapa de extensión y extensión final prolongada para aumentar el tiempo de reacción de la polimerasa. En el segundo programa de termociclado (Tabla 8), basándose en los criterios de Hoorfar & Cook (2003), se variaron los tiempos de cada etapa para facilitar el diseño posterior de la PCR en microfluídica, por lo tanto, se determinó una duración de treinta segundos por cada etapa. En la figura 14 se puede determinar que los dos programas utilizados muestran bandas intensas de tamaño similar, por lo tanto, se consideró el segundo programa para el diseño posterior.

La impresión 3D procesa un material líquido o fundido solidificándolo por capas delgadas para formar un modelo, existen dos tipos de impresoras 3D comerciales: estereolitografía (SLA) y modelado por deposición fundida (FDM) (Milovanović et al., 2019). La estereolitografía proporciona mayor definición sacrificando volumen de trabajo, costo, tiempo y post procesamiento mientras que las impresoras de modelado por deposición fundida disminuyen el tiempo de impresión, costo y post procesamiento afectando la definición del modelo. Debido a la geometría micrométrica de los canales diseñados se optó por la impresión 3D por estereolitografía, sin embargo, existen modelos de impresoras 3D FDM de alta gama que

pueden alcanzar la resolución de la estereolitografía comercial a un costo excesivo (Szykiedans & Credo, 2016).

El diseño fue realizado en los softwares AutoCad 2018 y Rhinoceros 5 (Martinez et al., 2017). Para determinar la longitud y tamaño de la placa se establecieron los límites de la impresora 3D Anycubic Photon (Anycubic, 2019). Considerando las recomendaciones del manual se estableció una impresión de capas de 50 μm de alto, posteriormente se analizaron los posibles ángulos de impresión del modelo (Figura 16). El modelo con la apertura del canal en dirección a la pantalla LCD de la impresora (literal a, Figura 16) forma pequeños errores en cada capa que acumulan resina e incrementan el ancho cerrando el canal por completo; en la impresión con la apertura del canal en dirección opuesta a la pantalla LCD, se atrapa una cantidad mínima de resina, pero el tamaño de la placa se limita al tamaño de la pantalla LCD y aumenta el área que requiere soporte. En la figura 16, literal c; la apertura del canal inclinada y alejada de la pantalla LCD disminuye el uso de soportes, aumenta el volumen de impresión posible y se atrapa una cantidad menor de resina en el proceso. En el modelo con la apertura del canal inclinado y en dirección a la pantalla LCD se disminuye drásticamente la cantidad de resina atrapada, pero los soportes afectan a la polimerización correcta de los canales (Wang et al., 2016). Por último, se analizó una prueba con la apertura del canal girado en 90° con respecto a la pantalla, este modelo disminuye significativamente la cantidad de resina atrapada, pero también disminuye el área de soporte y al incrementar el tamaño de impresión el peso vence al modelo y ocasiona errores de construcción (Wang et al., 2016). Por lo tanto, se consideró imprimir el modelo en un ángulo de 67° con el canal alejado de la pantalla LCD, para maximizar el volumen de impresión y superficie de contacto, igualmente, se consideró diseñar canales abiertos, debido a las limitaciones de la impresora para construir canales cerrados de tamaño microscópico (Wang et al., 2016).

Con el objetivo de minimizar los errores de impresión se optó por un canal de 500 μm de ancho y 800 μm de profundidad (Figura 17), para verificar que las medidas establecidas logran mantener en un régimen laminar al flujo es necesario considerar la viscosidad cinemática del fluido (Chevalier et al., 1988). Debido a que el flujo está formado en gran parte por mezclas complejas, no se pudo determinar un valor de viscosidad fiable y por lo tanto calcular un valor real del número de Reynolds (Ecuación 6) necesario para determinar el régimen del flujo. Por ende, se estimaron valores de viscosidad para los elementos de la PCR usando valores experimentales, la ecuación de Einstein para mezclas heterogéneas (Ecuación 4), la regla de Kern (Ecuación 5) y las ecuaciones Refutas (Ecuación 1, 2 y 3) con el propósito de determinar un valor aproximado del régimen del flujo (Zhmud, 2014). Los valores calculados son aproximaciones desfavorables.

Los canales abiertos que simulan cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa fueron diseñados considerando el tiempo de cada etapa de PCR establecidos en la tabla 8, ya que los tiempos son iguales, se determinó que los canales deben ser de igual distancia para cada etapa (Figura 18) y, considerando el área del canal, se calculó la cantidad de calor conducido al flujo con las ecuaciones de conducción de Fourier (Ecuación 7), la ecuación de capacidad calorífica específica (Ecuación 8) y la ecuación de calor sensible (Ecuación 9). Los resultados se compararon con lo obtenido por Crews et al. (2008) quienes determinaron que la pérdida y ganancia de calor en canales de similar tamaño es de $3^\circ\text{C}/\text{s}$. Adicionalmente, se añadió dos áreas por cada ciclo para el enfriamiento del fluido, la distancia de estos canales se determinaron considerando la pérdida de calor determinada previamente (Crews et al., 2008).

Considerando el canal calculado para cada ciclo, se modeló la placa completa para 26 ciclos (Figura 19). La longitud final del canal fue de 4673.75 milímetros generando un volumen de 1.74 cm^3 y un área transversal de 0.0037 cm^2 . Considerando la distancia del canal, la

dimensión característica del flujo, la viscosidad del fluido y una velocidad máxima de flujo de 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Li et al., 2006), se calculó el número de Reynolds usando la ecuación 6. Por lo tanto, el valor del número de Reynolds es siempre menor a 100, en consecuencia, el flujo se encuentra en régimen laminar (Kopp et al., 1998).

La impresión de la placa de microfluídica se realizó considerando las recomendaciones del manual y las establecidas por Wang et al. (2016) (Figura 22). Los canales obtenidos fueron verificados y medidos en un microscopio óptico de campo claro (Figura 23 y 24). Se determinó un error de impresión menor al 3%.

El diseño de la prueba de flujo lateral se realizó considerando el cebador analizado previamente. El primer forward fue inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa tratada previamente, una segunda membrana de una fracción del tamaño de la anterior fue tratada con el primer reverse del gen *lytA*, marcado con biotina (Mak et al., 2016). Las dos membranas fueron flanqueadas por papel filtro (Figura 27). Finalmente, la membrana fue acoplada a la cubierta diseñada e impresa por estereolitografía (Figura 26 y 27). Teóricamente, se ha establecido que la sensibilidad de la prueba de flujo lateral de secuencias conservadas de ADN puede alcanzar a detectar una muestra con una concentración de 0.24 pg/mL (Fu et al., 2016).

Existen varios métodos para controlar el flujo a través de una placa o chip de microfluídica, entre ellos la presión a través de una bomba de inyección (Bártolo, 2011). Se estableció previamente de caudal de 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ y usando la ecuación del volumen del cilindro (Ecuación 10) se determinó que la bomba de inyección (Figura 29), basada en el modelo de Negrier, (2015), debe funcionar a 1.265 revoluciones por minuto para alcanzar el caudal deseado (Figura 23).

El controlador de temperatura y del prototipo fueron diseñados considerando las necesidades de las celdas Peltier o celdas termoeléctricas como corriente directa y un bajo

efecto de ondulaciones residuales en la corriente (Cui et al., 2018). Por lo tanto, se ocupó una fuente de poder de corriente directa y un convertidor de corriente directa a corriente directa (LM2596) conectados en serie con cada módulo Peltier (Tabla 5), el paso de corriente a cada módulo fue controlado por un transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor (Mosfet IRFZ44N) conectado a su vez al microcontrolador ESP32. Finalmente, la temperatura fue medida por tres sensores digitales de temperatura (DS18B20). El circuito completo se describe en la figura 30.

El diagnóstico basado en técnicas de microfluídica ayuda a disminuir los requerimientos energéticos, económicos y temporales (Kulinsky et al., 2013). La placa de PCR continua microfluídica disminuye dramáticamente el tiempo que requiere procesar una muestra por métodos convencionales, alcanzando una disminución del 95% e igualando su sensibilidad y especificidad. Al aumentar la concentración del gen objetivo, se amplifica la señal de la prueba de flujo lateral. La unión de estos dos procedimientos en un solo ensayo aprovecha los beneficios de cada prueba y apuntala sus debilidades, eliminando el revelado en la PCR y aumentando la sensibilidad de la prueba de flujo lateral (Carrell et al., 2019).

Capítulo VI. Conclusiones

Se determinó al gen *lytA* como una secuencia conservada de la cepa bacteriana *Streptococcus pneumoniae*, generando un amplicón de 75 pares de bases. Durante la reacción de amplificación, en presencia de ADN de diferentes especies bacterianas, no se registró interacción del cebador de *lytA* con otros genes.

El diseño del chip de microfluídica se realizó en el programa AutoCad 2018 considerando canales abiertos con una longitud de 4673.7542 milímetros, 0.8 milímetros de profundidad, 0.5 milímetros de ancho y 0.0037 cm² de área transversal. El flujo en estas condiciones se mantiene en régimen laminar, por ende, el fluido cumple con las condiciones de un estado microfluídico.

El control de temperatura del termociclado de la PCR continua en microfluídica se realizó con celdas Peltier, que a su vez fueron manejadas por modulación por ancho de pulsos dirigidos por el microcontrolador ESP32.

El diseño de la prueba de flujo lateral se realizó considerando el cebador para la secuencia conservada *lytA*. Teóricamente, la sensibilidad de la prueba puede alcanzar a detectar una cantidad mínima de 10 bacterias.

Capítulo VII. Recomendaciones

Se recomienda usar cebadores marcados con sondas o fluorescencia para facilitar la adhesión a una matriz de nitrocelulosa.

Se recomienda adaptar el sistema para las especies causantes de la neumonía atípica: *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae*.

Se recomienda probar el uso de modelado por deposición fundida de alta calidad para mejorar el tiempo de impresión de la placa de PCR continua microfluídica.

Se recomienda corroborar el funcionamiento del prototipo de diagnóstico rápido para la bacteria *Streptococcus pneumoniae* mediante secuencias conservadas de ADN.

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular + StudentConsult*. Elsevier España.
- Anycubic. (2019, septiembre 6). *Anycubic Photon*. ANYCUBIC 3D Printing.
<https://www.anycubic.com/products/anycubic-photon-3d-printer>
- Arushothy, R., Ramasamy, H., Hashim, R., Raj A.S., S., Amran, F., Samsuddin, N., & Ahmad, N. (2019). Multidrug Resistant *Streptococcus pneumoniae* causing Invasive Pneumococcal Disease (IPD) Isolated from a Pediatric Patient. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.037>
- Bártolo, P. J. (2011). *Stereolithography: Materials, Processes and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. En *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 299-309). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Bhise, N. S., Manoharan, V., Massa, S., Tamayol, A., Ghaderi, M., Miscuglio, M., Lang, Q., Zhang, Y. S., Shin, S. R., Calzone, G., Annabi, N., Shupe, T. D., Bishop, C. E., Atala, A., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2016). A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*, 8(1), 014101. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/014101>
- Bradley, J. S., Byington, C. L., Shah, S. S., Alverson, B., Carter, E. R., Harrison, C., Kaplan, S. L., Mace, S. E., McCracken, G. H., Moore, M. R., St Peter, S. D., Stockwell, J. A., & Swanson, J. T. (2011). The Management of Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children Older Than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 53(7), e25-e76. <https://doi.org/10.1093/cid/cir531>

- Cabaleiro, J. M. (2020). Flowrate independent 3D printed microfluidic concentration gradient generator. *Chemical Engineering Journal*, 382, 122742.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122742>
- Carrell, C., Kava, A., Nguyen, M., Menger, R., Munshi, Z., Call, Z., Nussbaum, M., & Henry, C. (2019). Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. *Microelectronic Engineering*, 206, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.12.002>
- Chalén, A., & Eduardo, B. (2018). *Diagnostico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos en centros de salud de primer nivel*.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/12560>
- Chalmers, J. D., Campling, J., Dicker, A., Woodhead, M., & Madhava, H. (2016). A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults. *BMC Pulmonary Medicine*, 16(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0242-0>
- Cherazard, R., Epstein, M., Doan, T.-L., Salim, T., Bharti, S., & Smith, M. A. (2017). Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. *American Journal of Therapeutics*, 24(3), e361.
<https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000551>
- Chevalier, J. L., Petrino, P., & Gaston-Bonhomme, Y. (1988). Estimation method for the kinematic viscosity of a liquid-phase mixture. *Chemical Engineering Science*, 43(6), 1303-1309. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(88\)85104-2](https://doi.org/10.1016/0009-2509(88)85104-2)
- Choi, J. R., Hu, J., Gong, Y., Feng, S., Abas, W. A. B. W., Pingguan-Murphy, B., & Xu, F. (2016). An integrated lateral flow assay for effective DNA amplification and detection at the point of care. *Analyst*, 141(10), 2930-2939. <https://doi.org/10.1039/C5AN02532J>

- Cilloniz, C., Martin-Loeches, I., Garcia-Vidal, C., San Jose, A., & Torres, A. (2016). Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 2120. <https://doi.org/10.3390/ijms17122120>
- Clewley, J. P. (1989). The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *Journal of Virological Methods*, *25*(2), 179-187. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(89\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0166-0934(89)90031-1)
- Crews, N., Wittwer, C., & Gale, B. (2008). Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomedical Microdevices*, *10*(2), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9124-9>
- Cui, L., Miao, R., Wang, K., Thompson, D., Zotti, L. A., Cuevas, J. C., Meyhofer, E., & Reddy, P. (2018). Peltier cooling in molecular junctions. *Nature Nanotechnology*, *13*(2), 122-127. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0020-z>
- Escobar, N. (2019, octubre 8). OPS/OMS Ecuador—SISTEMA DE REDES DE VIGILANCIA (SIREVA II) / OPS/OMS. Pan American Health Organization / World Health Organization. https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=96:sistema-redes-vigilancia-sireva-ii&Itemid=299
- Feikin, D. R., Schuchat, A., Kolczak, M., Barrett, N. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L., McGeer, A., Farley, M. M., Vugia, D. J., Lexau, C., Stefonek, K. R., Patterson, J. E., & Jorgensen, J. H. (2000). Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. *American Journal of Public Health*, *90*(2), 223-229.
- Ferreira, D. M., Jambo, K. C., & Gordon, S. B. (2011). Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends in Microbiology*, *19*(9), 464-470. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.003>
- File, T. M. (2003). Community-acquired pneumonia. *The Lancet*, *362*(9400), 1991-2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15021-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15021-0)

- Frey, S. E., Lottenbach, K. R., Hill, H., Blevins, T. P., Yu, Y., Zhang, Y., Brennehan, K. E., Kelly-Aehle, S. M., McDonald, C., Jansen, A., & Curtiss, R. (2013). A Phase I, dose-escalation trial in adults of three recombinant attenuated *Salmonella Typhi* vaccine vectors producing *Streptococcus pneumoniae* surface protein antigen PspA. *Vaccine*, *31*(42), 4874-4880. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.049>
- Fu, X., Cheng, Z., Yu, J., Choo, P., Chen, L., & Choo, J. (2016). A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, *78*, 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.099>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, *133*(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gupta, D., Agarwal, R., Aggarwal, A. N., Singh, N., Mishra, N., Khilnani, G. C., Samaria, J. K., Gaur, S. N., & Jindal, S. K. (2012). Guidelines for diagnosis and management of community- and hospital-acquired pneumonia in adults: Joint ICS/NCCP(I) recommendations. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*, *29*(Suppl 2), S27-S62. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.99248>
- Henriques Normark, B., Codemo, M., Iovino, F., Muschiol, S., Normark, S., & Nyunt, S. (2019). *MICROPARTICLES FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AS VACCINE ANTIGENS*.
- Herrmann, M., Veres, T., & Tabrizian, M. (2006). Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA. *Lab on a Chip*, *6*(4), 555-560. <https://doi.org/10.1039/B516031F>
- Hoorfar, J., & Cook, N. (2003). Critical Aspects of Standardization of PCR. En K. Sachse & J. Frey (Eds.), *PCR Detection of Microbial Pathogens* (pp. 51-64). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-344-5:51>

- Hortal, M., Ruvinsky, R., Rossi, A., Agudelo, C. I., Castañeda, E., Brandileone, C., Camou, T., Palacio, R., Echaniz, G., & Di Fabio, J. L. (2000). Impacto de *Streptococcus pneumoniae* en las neumonías del niño latinoamericano. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *8*, 185-195. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892000000800006>
- Huffnagle, G. B., Dickson, R. P., & Lukacs, N. W. (2017). The respiratory tract microbiome and lung inflammation: A two-way street. *Mucosal Immunology*, *10*(2), 299-306. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.108>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., FitzGerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Jacobs, P. F. (1992). *Rapid Prototyping & Manufacturing: Fundamentals of Stereolithography*. Society of Manufacturing Engineers.
- Jauset-Rubio, M. (2016). Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay. *Scientific Reports*, *10*.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 111-120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Kopp, M. U., Mello, A. J., & Manz, A. (1998). Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5366), 1046-1048. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1046>
- Kulinsky, L., Noroozi, Z., & Madou, M. (2013). Present Technology and Future Trends in Point-of-Care Microfluidic Diagnostics. En G. Jenkins & C. D. Mansfield (Eds.), *Microfluidic*

Diagnostics: Methods and Protocols (pp. 3-23). Humana Press.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-134-9_1

Li, S., Fozdar, D. Y., Ali, M. F., Li, H., Shao, D., Vykoukal, D. M., Vykoukal, J., Floriano, P. N., Olsen, M., McDevitt, J. T., Gascoyne, P. R. C., & Chen, S. (2006). A Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Microchip With Regional Velocity Control. *Journal of microelectromechanical systems : a joint IEEE and ASME publication on microstructures, microactuators, microsensors, and microsystems*, 15(1), 223-236.

<https://doi.org/10.1109/JMEMS.2005.859083>

Majtán, T., Bukovská, G., & Timko, J. (2004). DNA microarrays—Techniques and applications in microbial systems. *Folia Microbiologica*, 49(6), 635-664.

<https://doi.org/10.1007/bf02931546>

Mak, W. C., Beni, V., & Turner, A. P. F. (2016). Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 297-305.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.017>

Marshall, D. (2019, noviembre 10). *SEM of Streptococcus pneumoniae colony*. Wellcome Collection. <https://wellcomecollection.org/works/xuqu2dc>

Martinez, P. R., Goyanes, A., Basit, A. W., & Gaisford, S. (2017). Fabrication of drug-loaded hydrogels with stereolithographic 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.003>

Martínez-Vernaza, S., Mckinley, E., Soto, M. J., & Gualtero, S. (2018). Neumonía adquirida en la comunidad: Una revisión narrativa. *Universitas Medica*, 59(4), 93-102.

<https://doi.org/10.11144/javeriana.umed59-4.neum>

- Mayo Clinic. (2000, enero 1). *Radiografía de pecho que muestra la neumonía*. Mayo Clinic.
<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/pneumonia/multimedia/chest-x-ray-showing-pneumonia/img-20005827>
- Mayo Clinic. (2018, diciembre 19). *Hemograma completo—Mayo Clinic*.
<https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/complete-blood-count/about/pac-20384919>
- Melloth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2012). LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(14), 11018-11029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>
- Metlay, J. P., Schulz, R., Li, Y. H., Singer, D. E., Marrie, T. J., Coley, C. M., Hough, L. J., Obrosky, D. S., Kapoor, W. N., & Fine, M. J. (1997). Influence of age on symptoms at presentation in patients with community-acquired pneumonia. *Archives of Internal Medicine*, *157*(13), 1453-1459.
- Milovanović, A., Milošević, M., Mladenović, G., Likozar, B., Čolić, K., & Mitrović, N. (2019). Experimental Dimensional Accuracy Analysis of Reformer Prototype Model Produced by FDM and SLA 3D Printing Technology. En N. Mitrovic, M. Milosevic, & G. Mladenovic (Eds.), *Experimental and Numerical Investigations in Materials Science and Engineering* (pp. 84-95). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99620-2_7
- Mirete Ferrer, C., Gutiérrez Rodero, F., Carlos Rodríguez Díaz, J., Royo García, G., Shum Fhunk, C., & Martín Hidalgo, A. (2001). Etiología de la neumonía adquirida en la comunidad tratada ambulatoriamente. Utilidad de un protocolo diagnóstico con pruebas microbiológicas convencionales y detección de antígenos de *Streptococcus pneumoniae*

y *Legionella pneumophila* en orina. *Medicina Clínica*, 117(17), 657-659.

[https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(01\)72212-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(01)72212-9)

Murray, T. S., & Cassese, T. (2016). 2—Bacteriology of the Head and Neck Regions. En J. R. Hupp & E. M. Ferneini (Eds.), *Head, Neck, and Orofacial Infections* (pp. 27-37). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28945-0.00002-8>

Negrer, A. (2015, enero 1). *3D Printed Syringe Pump Rack*. Instructables.

<https://www.instructables.com/id/3D-Printed-Syringe-Pump-Rack/>

Nichols, T., & Freeman, R. (1980). A new selective medium for *Streptococcus pneumoniae*.

Journal of Clinical Pathology, 33(8), 770-773.

Pereda, M. A., Chavez, M. A., Hooper-Miele, C. C., Gilman, R. H., Steinhoff, M. C., Ellington, L. E.,

Gross, M., Price, C., Tielsch, J. M., & Checkley, W. (2015). Lung Ultrasound for the Diagnosis of Pneumonia in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics*, 135(4), 714-722.

<https://doi.org/10.1542/peds.2014-2833>

Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569-582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>

Bioanalytical Chemistry, 393(2), 569-582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain

Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30-36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>

Ramamoorthy, K., & Sundaram, A. S. S. (2018). *Detection of Chlamydia pneumoniae and*

Mycoplasma pneumoniae in hospitalised children with community acquired pneumonia.

<https://doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20182076>

Rodríguez, D. V. C., & Grunauer, D. H. N. (2013). *DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA,*

ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO PARA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD,

*MEDIANTE EXÁMENES CLÍNICO, LABORATORIAL E IMAGENOLÓGICO EN PACIENTES
ADULTOS MAYORES. HOSPITAL HOMERO CASTANIER. 2013—2014. 91.*

- Ruuskanen, O., Lahti, E., Jennings, L. C., & Murdoch, D. R. (2011). Viral pneumonia. *The Lancet*, 377(9773), 1264-1275. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61459-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61459-6)
- Ruvinsky, R. O. (2001). Streptococcus pneumoniae: Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de las enfermedades invasoras en Latinoamérica. *Revista chilena de infectología*, 18, 10-14. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000000003>
- Scopigno, R., Cignoni, P., Pietroni, N., Callieri, M., & Dellepiane, M. (2017). Digital Fabrication Techniques for Cultural Heritage: A Survey. *Computer Graphics Forum*, 36(1), 6-21. <https://doi.org/10.1111/cgf.12781>
- Shah, S. N., Bachur, R. G., Simel, D. L., & Neuman, M. I. (2017). Does This Child Have Pneumonia?: The Rational Clinical Examination Systematic Review. *JAMA*, 318(5), 462-471. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.9039>
- Sosa-Hernández, J. E., Villalba-Rodríguez, A. M., Romero-Castillo, K. D., Aguilar-Aguila-Isaías, M. A., García-Reyes, I. E., Hernández-Antonio, A., Ahmed, I., Sharma, A., Parra-Saldívar, R., & Iqbal, H. M. N. (2018). Organs-on-a-Chip Module: A Review from the Development and Applications Perspective. *Micromachines*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/mi9100536>
- Stroock, A. D. (2008). Chapter 17—MICROFLUIDICS. En F. S. Ligler & C. R. Taitt (Eds.), *Optical Biosensors (Second Edition)* (pp. 659-681). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044453125-4.50019-X>
- Szykiedans, K., & Credo, W. (2016). Mechanical properties of FDM and SLA low-cost 3-D prints. *Procedia Engineering*, 136, 257-262.

Thompson, A., Lamberth, E., Severs, J., Scully, I., Tarabar, S., Ginis, J., Jansen, K. U., Gruber, W.

C., Scott, D. A., & Watson, W. (2019). Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*, 37(42), 6201-6207.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.048>

Tomasz, A., Albino, A., & Zanati, E. (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, 227(5254), 138-140.

<https://doi.org/10.1038/227138a0>

Wang, J., Goyanes, A., Gaisford, S., & Basit, A. W. (2016). Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.016>

WHO. (2019, agosto 2). *Neumonía*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>

Willems, S. B. J., Zegers, J., Bunschoten, A., Wagterveld, R. M., van Leeuwen, F. W. B., Velders, A., & Saggiomo, V. (2019). *Plasma Etching for Fabricating Microfluidic Devices with Patterned Monolayers* [Preprint]. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.8792342.v1>

World Health Organization. (2019, febrero 8). *Neumonía*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>

Zhmud, B. (2014). Viscosity Blending Equations. *Lube: The European Lubricants Industry Magazine*, No. 121(No.93), 1.