



# VII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

"GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"

16-18  
junio 2016

Unidad de Seminarios, BUAP



## CARACTERIZACIÓN DE TIRAS REACTIVAS UTILIZADAS EN PRUEBAS DE EMBARAZO EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DIFUSA

Diana Antonieta Sen Salinas<sup>a,b</sup>, Jorge Castro Ramos<sup>b</sup>, José Gabriel Aguilar Soto<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Centro Estatal de Vacunas, Secretaría de Salud del Estado de Puebla,  
[dianasen13@gmail.com](mailto:dianasen13@gmail.com)

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, GIOB, Tonantzintla, Puebla,  
[jcastro@inaoep.mx](mailto:jcastro@inaoep.mx)

<sup>c</sup> Laboratorio de Visión por Computadora, INAOE, Tonantzintla, Puebla,  
[gabrielsd64@gmail.com](mailto:gabrielsd64@gmail.com)

### RESUMEN

En este trabajo se realiza una caracterización mediante espectroscopía de reflectancia difusa de las pruebas cualitativas empleadas en la detección de la fracción beta de la hormona Gonadotropina Coriónica (hGC) en orina. Cuando se ejecuta una prueba, la muestra añadida a la almohadilla migra por capilaridad al otro extremo de la tira de nitrocelulosa, en donde se encuentran partículas inmovilizadas que usualmente son nanopartículas de oro coloidal. La importancia de esta caracterización radica en la posibilidad de encontrar pruebas no-válidas y/o falsos negativos en los resultados, así mismo, poder determinar de manera indirecta el tamaño aproximado de las nanopartículas utilizadas en la fabricación de las tiras reactivas, empleando los espectros obtenidos experimentalmente.

### 1. INTRODUCCIÓN

La hormona Gonadotropina Coriónica (hCG) es una hormona glicoprotéica sintetizada por la placenta y detectable en orina de manera temprana después de la implantación de un óvulo fertilizado en el tejido coriónico. Es la señal principal y el marcador específico de que existe embarazo. El cassette de diagnóstico es un ensayo para la detección cualitativa de niveles elevados de hCG en orina. El principio se basa en un ensayo inmunométrico que utiliza una combinación única de anticuerpos para identificar selectivamente hCG; contiene una tira reactiva plástica con un cojín de absorción de muestra y una zona de membrana. La fórmula contiene anticuerpo monoclonal anti-hCG de ratón con oro coloidal. La membrana de nitrocelulosa es impregnada con IgG chivo-antirratón en la zona de control y anticuerpo chivo anti-hCG en la zona de prueba [1]. Durante la prueba, la muestra de orina se aplica en un extremo y es absorbida en la membrana, posteriormente la muestra fluye lateralmente a través de la nitrocelulosa debido a la acción capilar, la hormona hCG en la muestra de orina se combina con el oro coloidal, moviéndose cromatográficamente por toda la membrana. El anticuerpo chivo anti-hCG pre impregnado en la zona de prueba atrapa el complejo resultante. La aparición de una línea púrpura en la zona de prueba muestra un resultado positivo, presencia de hCG. La ausencia de esta línea muestra un resultado negativo ó la no presencia de hCG (fig. 1). Las nanopartículas pueden ser de oro coloidal, algún colorante, partícula fluorescente o alguna partícula paramagnética monodispersa de latex [2]. Las nanopartículas de oro son las más utilizadas ya que se obtiene fácilmente, son no tóxicas, tienen alta afinidad a proteínas y biomoléculas, son altamente estables y poseen buena señal óptica de absorción (520 nm a 540 nm). En general, presentan un diámetro entre 20 nm a 100 nm, siendo de 40 nmm la que más se emplea. Las propiedades ópticas de las nanopartículas se determinan por la interacción de la luz con la conducción de electrones libres. El fenómeno de



resonancia de plasmones superficiales provoca una absorción de luz en metales de tamaños nanométricos [2].

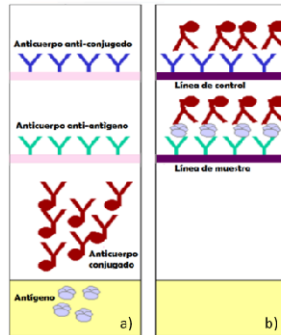


Figura 1.- a) Sobre la membrana de nitrocelulosa se encuentran absorbidos en la línea de prueba, anticuerpos chivo anti-hCG y sobre la línea de control, anticuerpos anti-conjugado IgG chivo-antirátón, de forma que cuando la muestra contiene hCG, ésta fluye por la membrana quedando retenida en la línea de muestra. b) El conjugado, que también es un anticuerpo específico frente a hCG que se busca, está marcado con oro coloidal que también fluye por la membrana, es retenido por el Ag en la línea de reacción y por el anticuerpo en la línea control.

## 2. TEORÍA

Cuando un haz de luz (o fotones) incide en una muestra de materia difusa se produce en la región de contacto los fenómenos físicos de reflexión, esparcimiento y absorción. Debido a que la luz no puede penetrar del todo ya que el material es sólido y opaco, gran parte de la luz se refleja sobre la superficie a analizar. La luz incidente reflejada simétricamente con respecto a una línea imaginaria perpendicular a la superficie es llamada reflexión especular, mientras que la luz incidente esparcida en diferentes direcciones es llamada reflexión difusa. La suma de la luz reflejada especular más la reflejada difusamente se llama reflectancia total como se muestra en la figura 2.

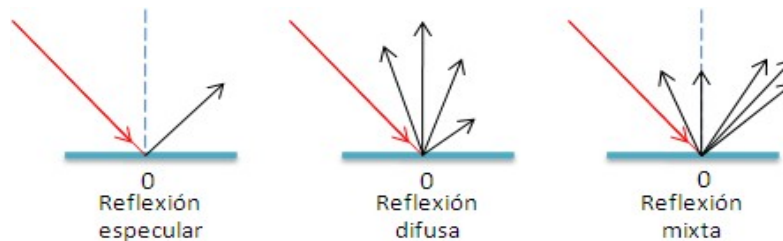


Figura 2.- Reflexión especular, difusa y mixta.

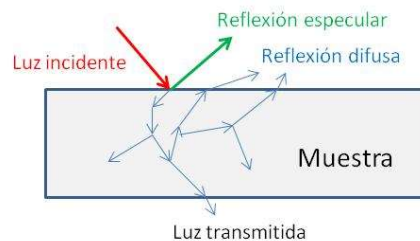


Figura 3.- Al interaccionar la luz con una muestra de materia, la luz reflejada de manera difusa lleva información de la muestra.



Cuando la luz incide sobre una muestra de materia, una cierta cantidad de los fotones puede transmitirse a través de la muestra y el resto es reflejado, o absorbido por algunos enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes que se acoplan con la frecuencia o longitud de onda exacta de la radiación incidente luminosa, como muestra la figura 3. La absorción es selectiva y depende de los grupos moleculares involucrados. Así, la absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente  $L_i$  y la reflejada  $L_r$  o transmitida  $L_t$ . Cuando se trabaja en el modo de reflexión, se utiliza una muestra lo suficientemente opaca para que la transmisión ( $L_t$ ) sea igual a cero, calculándose la absorción de luz por la diferencia

$$L_a = L_i - L_r \quad \text{ec. (1)}$$

En términos más rigurosos, la energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial) más la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego re-emitida por la muestra, sólo esta última forma de luz entrega información útil acerca de la naturaleza o composición de la muestra. Es decir la luz reflejada de manera difusa ya lleva información de la muestra, porque es reflejada después de interactuar con las moléculas que componen la superficie de ésta. Esto es bastante útil porque nos permite obtener el espectro de absorción de la muestra iluminada, siempre que esta luz reflejada difusa sea enviada a un espectrómetro. Para obtener los espectros de reflectancia difusa de éste trabajo, se emplea un espectrómetro de la empresa Ocean Optic's modelo USB-4000 (345nm - 1100nm) conectado a una computadora por medio de un puerto USB y controlado por el software Spectrasuite, que a su vez se conecta a una fuente de luz de tungsteno-halógeno modelo HL-2000 (360nm - 2000nm) por medio de una sonda bifurcada con 7 fibras ópticas, como se muestra en la figura 4.

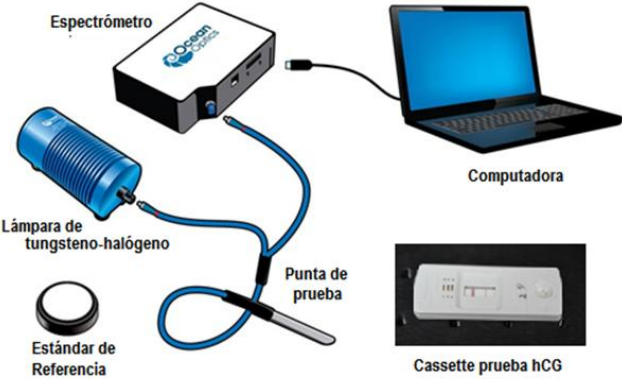


Figura 4.- Equipo empleado en la caracterización.

El software Spectrasuite en la opción de reflectancia difusa, se trabaja dentro del rango del espectro visible al infrarrojo cercano (350nm a 1000nm), y utiliza la siguiente ecuación para obtener las curvas de reflectancia [3]:

$$R_{t\lambda} = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \times 100\% \quad \text{ec. (2)}$$

en donde  $S_{\lambda}$  es la intensidad de la muestra a cierta longitud de onda,  $D_{\lambda}$  es la intensidad del espectro oscuro y  $R_{\lambda}$  es la intensidad de la referencia utilizada.



La adquisición de los espectros se realiza mediante la punta de prueba, en donde uno de los extremos que contiene 6 fibras se conecta a la fuente de luz y la envía hacia la muestra de nitrocelulosa. La fibra óptica restante que se encuentra en el centro de la punta de prueba, recolecta una fracción de la luz reflejada difusamente y la envía hacia la rejilla de difracción del espectrómetro, en donde es separada en longitudes de onda que pueden ir desde los 100nm a los 1100nm. La luz llega a un arreglo de fotodetectores que convierten las señales ópticas en señales eléctricas, y finalmente se convierten en señales digitales que se envían a la computadora para su procesamiento

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

Después de calibrar el espectrómetro con el estándar de referencia, colocamos un cassette de prueba para la detección de la hCG sobre una superficie plana, y con una pipeta plástica colocamos 4 gotas de orina (paciente con 27 semanas de gestación) en un orificio circular "S" donde se debe colocar la muestra. Esperamos a que el líquido se desplace hasta que se colorean las bandas de control y/o tester, esta última indica si la muestra de orina es positiva (embarazo).

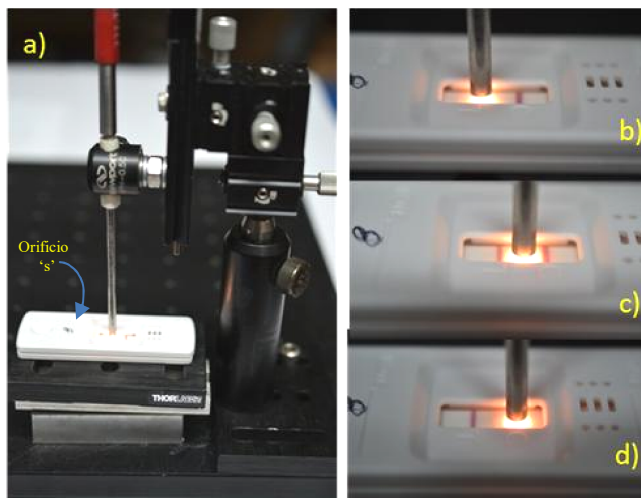


Figura 4.- En el arreglo experimental se tiene la fuente de luz blanca que es enviada a través de la sonda con 6 fibras ópticas hacia el cassette de la prueba de embarazo. La luz pasa a través del material y regresa por reflectancia difusa hacia la fibra que se encuentra en el centro de la sonda.

Después colocamos el cartucho en el arreglo experimental (fig. 4a) y colocamos la punta de la sonda a una distancia aproximada de 4mm, sobre la tira reactiva para obtener una señal con el espectrómetro. Se toman señales en la línea de prueba o tester (fig. 4b), después se coloca la punta de la sonda en la zona blanca de referencia (fig. 4c) y en la línea de control (fig. 4d). En la gráfica de la figura 5a), se observa que hay una diferencia entre señales de reflectancia, por lo que existe una parte de la luz que es absorbida por las líneas de prueba y control. Como puede observarse, estas señales son muy similares, pero ahora, los espectros que necesitamos son los de referencia y tester (fig. 5 b).

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvieron los espectros de reflectancia difusa (usando orina de una paciente no embarazada) para una prueba de embarazo que resulta negativa, en donde las señales de referencia y tester son casi iguales y únicamente se absorbe luz en la línea de control (fig. 6 a).

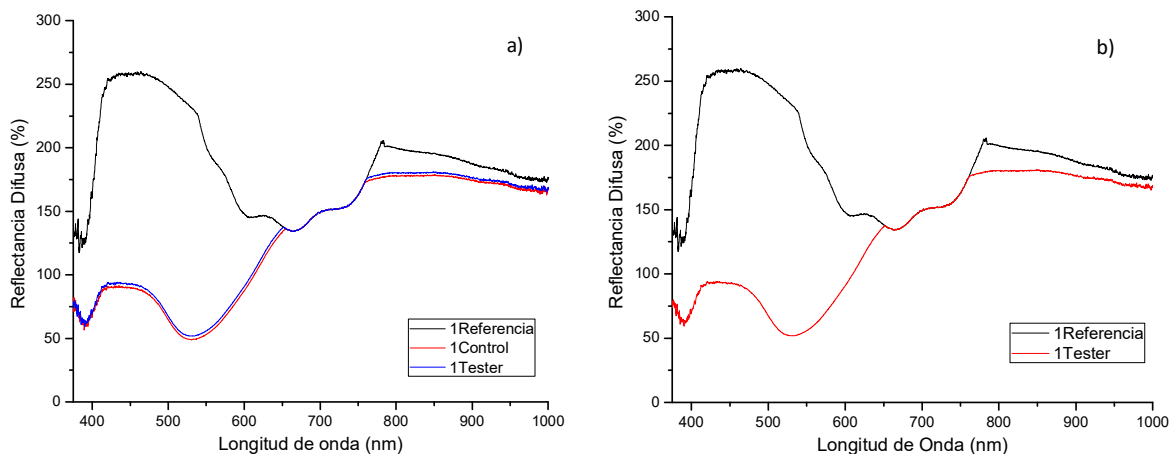


Figura 5.- Espectros de reflectancia difusa de prueba de embarazo positiva.

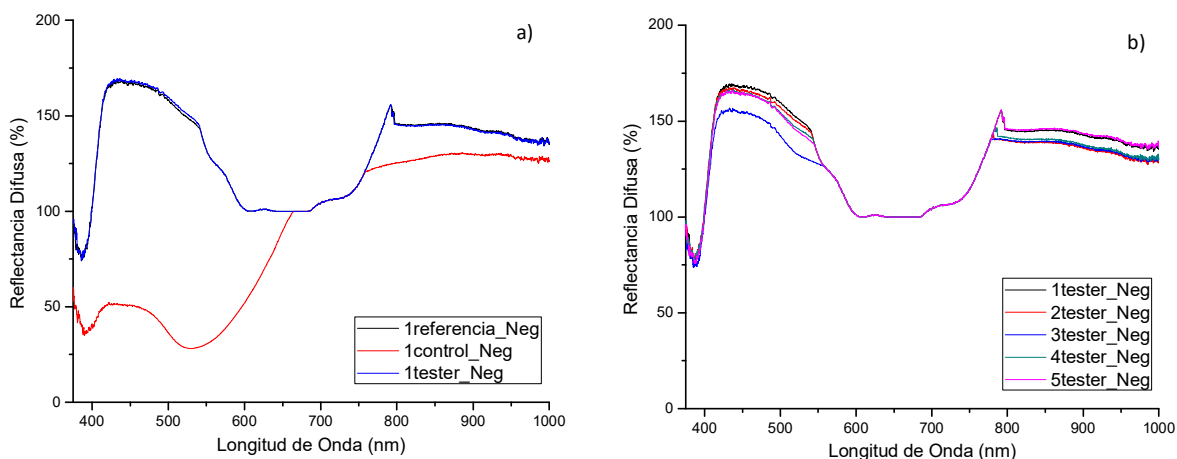


Figura 6.- Espectros de reflectancia difusa de prueba de embarazo negativa.

#### 4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para verificar que la muestra de orina y la prueba de embarazo son negativas, se utilizan cinco muestras para obtener sus respectivas señales, cuyos espectros de reflectancia difusa se muestran en la figura 6 b). Para las pruebas negativas, si el espectro de referencia y el tester son semejantes, se determina el hecho de no estar embarazada dado que la línea tester no hace reacción. Esto es debido a que no hay presencia de hCG y posee una composición similar (orina-nitrocelulosa) a la de referencia. El espectro que aporta información sobre la presencia o no de la hCG es el de tester, por lo que se realizó la caracterización para 25 pruebas de embarazo, de las cuales 24 corroboraron un resultado positivo, mientras que sólo una prueba resultó ser no-válida. Como se trata de pruebas cualitativas, únicamente se muestran los 2 espectros de reflectancia máximos, los 2 mínimos y la prueba no-válida (fig. 7). En esta gráfica podemos observar que existe un intervalo de longitudes de onda aproximado de 600 nm a 760 nm en donde se muestra la



misma absorción debido a la composición similar de orina-nitrocelulosa, tanto para las pruebas positivas como negativas. También se observa un intervalo de mayor absorción (500nm a 575nm) y otro intervalo que va de 790 nm a 1000 nm, en donde se tiene una máxima reflexión. Las longitudes de onda de máxima absorción están en 529.20 nm, 529.82 nm y 532.88 nm (fig. 7).

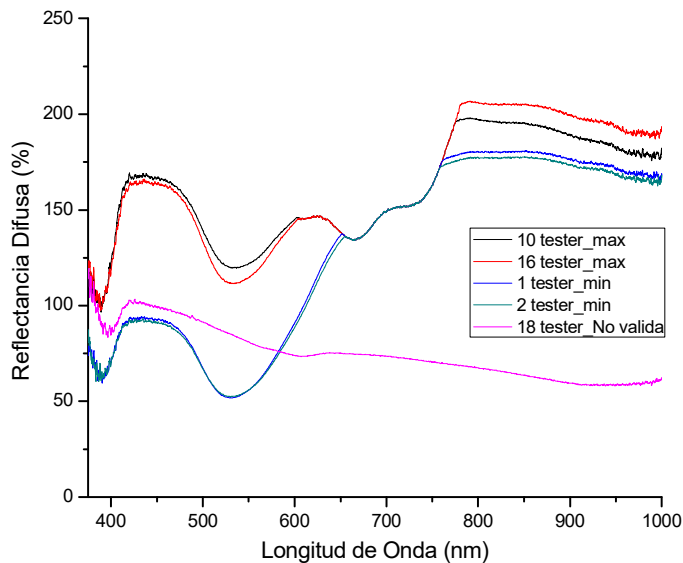


Figura 7.- Espectros de reflectancia para pruebas positivas y prueba no válida.

Para visualizar la banda de absorción estimada, se realizó una operación de sustracción de los espectros de referencia y tester, con lo que se corrobora la presencia de las nanopartículas de oro.

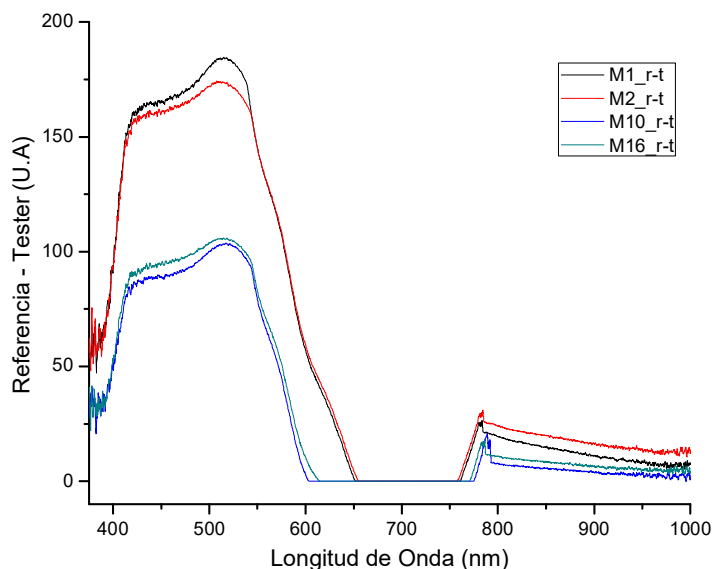


Figura 8.- Sustracción de los Espectros de reflectancia de referencia – tester.



CONACYT    CCADET    CIO    PUEBLA    INRAE

**VII** CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD  
"GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"

**16-18**  
junio 2016  
Unidad de Seminarios, BUAP

UASLP    COORDINACIÓN ACADÉMICA REGIÓN AFOPLANO    CENIT    TAB    JOSLYN    Surge Suppression Incorporated

Las pruebas de embarazo cualitativas muestran que la nitrocelulosa de las pruebas de embarazo contienen nanopartículas de oro, éstas partículas estarían en un rango de 80nm ( $\pm 5$  nm), según los datos reportados en la literatura [4], en los obtenidos en la caracterización y comparando las longitudes de onda con el valor indicado en hojas de datos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bio-Preg Prueba para la detección de la Hormona Gonadotropina Coriónica en cassette, Código: 1001001 Mexlab.
2. Raphael C. Wong | Harley Y. Tse. Lateral Flow Immunoassay. Springer 2009. ISBN: 978-1-58829-908-6.
3. Spectrasuite, "Spectrometer Operating Software", 2001-2006, Número de document 000-20000-300-02-0806, Ocean Optics.
4. Cristal Azucena López Aguilar, Gloria Barbosa Sabanero, Juan Luis Pichardo Molina, Myrna Sabanero López y Raquel Huerta. Mejoramiento de la Síntesis y Funcionalización de Nanopartículas de Oro con Anticuerpos Anti- Acanthamoeba castellanii. VI Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud, del 4 al 6 de Junio de 2015, BUAP, Puebla, Pue.