

ÍNDICE

1	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN	2
1.2	DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3	SOLUCIÓN PROPUESTA.....	3
1.4	OBJETIVOS.....	3
1.4.1	Objetivo General	3
1.4.2	Objetivo Específico	3
1.5	ALCANCES	4
1.6	METODOLOGÍAS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS	4
1.7	RESULTADOS ESPERADOS	4
1.8	ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO.....	5
2	CAPÍTULO II: HANTAVIRUS.....	7
2.1	GENERALIDADES.....	8
2.2	DEFINICIÓN	8
2.3	CEPAS Y RESERVORIOS	9
2.4	ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL HANTAVIRUS EN LOS RESERVORIOS	11
2.5	DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS EN INFECCIONES HUMANAS POR HANTAVIRUS.....	12
2.5.1	Pruebas serológicas	12
2.5.2	Detección viral	13
2.5.3	Ácidos nucleicos	13
2.5.4	Inmunohistoquímicas	13
2.5.5	Aislamiento viral.....	14

2.5.6	Técnicas de diagnóstico rápido	14
2.6	DETECCIÓN DE INFECCIONES POR HANTAVIRUS EN ROEDORES E INSECTIVOROS.....	14
3	CAPÍTULO III: COLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA EN PEQUEÑOS MAMÍFEROS.....	15
3.1	GENERALIDADES.....	16
3.2	RECOLECCIÓN DE ORINA SIN INTERVENCIÓN.....	17
3.2.1	Recolección de orina de ratón utilizando un film plástico transparente	17
3.2.2	Recolección puntual de una muestra de orina utilizando un vaso de precipitados	18
3.2.3	Método de recolección de orina por tubo capilar.....	19
3.3	CONTENCIÓN MODIFICADA UTILIZADA PARA LA COLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS	19
3.3.1	Método del embudo de polietileno.....	19
3.3.2	Dispositivo para la recolección de orina de 24 horas en ratones	20
3.4	MÉTODOS CON JAULAS METABÓLICAS COMERCIALES PARA LA RECOLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS.....	21
4	CAPÍTULO IV: DISPOSITIVO MICROFLUIDICO.....	23
4.1	GENERALIDADES.....	24
4.2	MODELAMIENTO TEÓRICO-NUMÉRICO Y OBTENCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES	25
4.2.1	Detección de biomoléculas y biomarcadores	25
4.2.2	Ensayos de flujo lateral (LFA).....	26
4.2.3	μPADs.....	27
4.2.4	Selección del tipo de dispositivo de trabajo	28
4.2.5	Modelo teórico	30

4.2.6	Modelamiento matemático.....	36
4.2.7	Simulación numérica.....	39
4.3	FABRICACIÓN Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	48
4.3.1	Fabricación de dispositivo rectangular en papel de filtro, para la detección de albúmina en muestras de orina humana	48
4.3.2	Fabricación de μ PAD a través de inmersión en parafina, para la detección de albúmina en muestras de orina humana	50
5	CAPÍTULO V: DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL EQUIPO	62
5.1	GENERALIDADES.....	63
5.2	PROPUESTA DE DISEÑO 1° PROTOTIPO	63
5.2.1	Diseño 3D de componentes.....	65
5.2.2	Componentes electrónicos.....	72
5.2.3	Fabricación	76
5.3	PROPUESTA DE DISEÑO 2°PROTOTIPO	77
5.3.1	Diseño 3D de componentes.....	78
5.3.2	Componentes electrónicos.....	81
5.3.3	Fabricación	89
5.3.4	Prueba de concepto del prototipo 2 y envío de datos remoto.....	90
6	CAPÍTULO VI: COSTOS	93
7	CAPÍTULO VII: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
7.1	SIMULACIÓN NUMÉRICA	98
7.2	EXPERIMENTACIÓN EN DETECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS	101
7.3	EQUIPO	104
8	CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	106
9	CAPÍTULO IX: ANEXOS.....	116
9.1	Anexo A1. Características de algunos tipos de hantavirus	117

9.2	Anexo A2. Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.	118
9.3	Anexo A3. Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores.	119
9.4	Anexo B1. Materiales para fabricación de la tira rectangular en papel de filtro.	120
9.5	Anexo B2. Materiales para fabricación de μ PAD a través de inmersión en parafina.	122
9.6	Anexo B3. Fabricación de moldes metálicos utilizando el centro de mecanizado CNC ROMI 760.....	125
9.7	Anexo B4 Protocolos de fabricación de Dispositivos.....	128
9.8	Anexo C1. Diseño 3D de componentes prototipo 1.....	130
9.9	Anexo C2. Código de programación en Arduino prototipo 1.....	139
9.10	Anexo C3. Resultado fabricación prototipo 1.....	144
9.11	Anexo C4. Archivo board y esquemático del prototipo 1.....	146
9.12	Anexo C5. Diseño 3D de componentes prototipo 2.....	148
9.13	Anexo C6. Resultado fabricación prototipo 2.....	152
9.14	Anexo C7. Archivo board y esquemático prototipo 2.....	155
9.15	Anexo C8. Datos técnicos de los componentes electrónicos seleccionados .	157

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Valores de referencia de concentración de referencia de albúmina en muestras de orina humana.....	29
Tabla 2	Datos de las propiedades ingresadas a la simulación.....	34
Tabla 3	Comparativa de la situación experimental y la simulación computacional para cinco tiempos diferentes.....	45
Tabla4	Rango de los parámetros RGB.....	75
Tabla 5	Lista de materiales de fabricación de la estructura de la 1° propuesta de diseño	76

Tabla 6 Componentes del 2° prototipo y su correspondiente consumo energético.	86
Tabla 7 Componentes seleccionados para energizar el 2° prototipo.	88
Tabla 8 Lista de materiales de fabricación 2° propuesta de diseño	89
Tabla 9 Parámetros del sensor LDR para la lectura del resultado del test.....	91
Tabla 10 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 1.....	94
Tabla 11 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 2.....	95
Tabla 12 Datos de concentración de albúmina en orina humana y su correlación de medición de pixeles.....	102
Tabla 13 Características de algunos tipos de hantavirus.	117
Tabla 14 Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.....	118
Tabla 15 Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores.	119
Tabla 16 Lista de materiales experimento microdispositivo rectangular.	120
Tabla 17 Materiales fabricación de μ PAD a través de inmersión en parafina.	122
Tabla 18 Datos técnicos de los microprocesadores utilizados en el prototipo 1 y en el prototipo 2.....	157
Tabla 19 Datos técnicos de los componentes y sensores seleccionados para los prototipos 1 y 2.....	157
Tabla 20 Datos técnicos de los servomotores seleccionados para los prototipos 1 y 2..	158

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1 Árbol filogenético de los diferentes hantavirus portados por roedores e insectívoros. Adaptada de [4]. HTNV, virus Hantaan; SEOV, virus Seoul; DOBV, virus Dobrava; SAAV, virus Saaremaa; PUUV, virus Puumala; TULV, virus Tula; PHV, virus Prospect Hill; BLLV, virus Blood Land Lake; ISLAV, virus Isla Vista; KHAV, virus Khabarovsk; TOPV, virus Topografov; SNV, virus Sin Nombre; NYV, virus New York; MGLV, virus Monongahela; ELMCV, virus El Moro Canyon; RIOSV, virus Río Segundo; MULV, virus Muleshoe; BAYV, virus Bayou; BCCV, virus Black Creek Canal; LANV, virus Laguna Negra; RIOMV, virus Río Mamore; ANDV, virus Andes; TPMV, virus Thottapalayam.....	10
--	----

Imagen 2 Método de recolección de orina de un único animal utilizando film plástico transparente [27].	18
---	----

Imagen 3 Método de recolección de orina de varios animales utilizando un film plástico transparente [27].	18
Imagen 4 Método para recoger orina de rata a través de un vaso de precipitado [27].	19
Imagen 5 Sistema sencillo y económico para colección de orina de ratón [27].	20
Imagen 6 Dispositivos microfluidicos para biomarcadores, células humanas, bacterias, y detección de virus. Adaptado de [46].	25
Imagen 7 Esquema típico de un ensayo de flujo lateral (LFA) [48].	26
Imagen 8 μ PADs fabricados con cera donde; a) patrón a mano alzada, b) impresión con inyección de tinta en papel de nitrocelulosa y repaso a mano alzada con lápiz de cera, c) impresión dedicada de cera; d) [49], test a una muestra de orina [50].	28
Imagen 9 Configuraciones del μ PAD a desarrollar. Fuente propia.	29
Imagen 10 Dimensiones de la configuración utilizada para definir la situación física en la simulación computacional. Zona A corresponde a la zona de testeo, la zona de muestra es donde se deposita la muestra de fluido y la zona B es la zona de control. Fuente propia.	31
Imagen 11 Configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman $^{\circ}2$, para pruebas de difusión. Fuente propia.	33
Imagen 12 Generación de color en configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman $^{\circ}2$, luego de ser depositada una muestra de orina humana. Fuente propia.	33
Imagen 13 Malla utilizada en la simulación. Se observa el refinamiento de malla sobre la geometría en estudio. Fuente propia.	40
Imagen 14 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 3.210 s de simulación. Fuente propia.	41
Imagen 15 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 6.834 s segundos de simulación. Fuente propia.	41
Imagen 16 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 7.349 s de simulación. Fuente propia.	42
Imagen 17 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 8.580 s de simulación. Fuente propia.	42
Imagen 18 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 13.418 s de simulación. Fuente propia.	43

Imagen 19 Dimensiones de las tiras reactivas rectangulares. Fuente propia.	48
Imagen 20 Disposición de marcaje con las configuraciones A y B. Fuente propia.....	49
Imagen 21 Parejas de tiras reactivas impregnadas con verde de bromocresol y albúmina de suero bovino, según las configuraciones A y B. Fuente propia.....	49
Imagen 22 Cambio de color en parejas de tiras reactivas, producto de la difusión de la orina. Volúmenes de muestra de 30, 60, 120 μ l y control con agua bidestilada. Fuente propia.....	50
Imagen 23 Esquema que explica el procedimiento para aplicar el método de fabricación por inmersión de parafina. Adaptado de [50].	51
Imagen 24 Geometría 1 para molde metálico. Fuente propia.	52
Imagen 25 Geometría 2 para molde metálico. Fuente propia.	52
Imagen 26 Geometría 3 para molde metálico. Fuente propia.	53
Imagen 27 Geometría 4 para molde metálico. Fuente propia.	53
Imagen 28 Geometría 5 para molde metálico. Fuente propia.	54
Imagen 29 Geometría 6 para molde metálico. Fuente propia.	54
Imagen 30 Esquema que representa el marcaje de los reactivos y la muestra en el microdispositivo. Fuente propia.....	55
Imagen 31 Moldes de metal resultantes. Fuente propia.....	55
Imagen 32 Sistema acoplado de imán, lámina de vidrio, papel de filtro y molde de metal. Fuente propia.	56
Imagen 33 Vista superior del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida. Fuente propia.	56
Imagen 34 Vista lateral del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida. Fuente propia.	57
Imagen 35 Cinco de las seis geometrías enfriándose para luego retirar el molde de metal correspondiente. Fuente propia.	57
Imagen 36 Dispositivo microfluídico donde al interior de la geometría se tiene la zona hidrofílica y al exterior la zona hidrofóbica. Fuente propia.....	58
Imagen 37 Vista con un magnificación 400X del microcanal realizado en papel de filtro de nitrocelulosa con parafina líquida. Fuente propia.....	59
Imagen 38 Prueba de detección con las cinco geometrías resultantes. En la fila superior se probó con 30 μ l de orina, en la inferior con 20 y/o 60 μ l. Fuente propia.....	60

Imagen 39 Primer plano de la geometría n°3, después de realizada la prueba de detección de proteína con 30 µl y 20 µl respectivamente. Fuente propia.	61
Imagen 40 Vista trimetrica del diseño del prototipo 1. Fuente propia.....	64
Imagen 41 vista explosionada del diseño del prototipo 1. Fuente propia.	65
Imagen 42 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia.	67
Imagen 43 Nivel de vaciado del vaso de Pitágoras. Fuente propia.	68
Imagen 44 Consideraciones de las dimensiones para el cálculo del tiempo de vaciado del contenido del vaso de Pitágoras, h=9mm corresponde a la altura máxima que alcanza el fluido antes de escurrir, D=18mm es el diámetro interior de todo el cuerpo y d=2mm es el diámetro de salida del fluido. Fuente propia.....	68
Imagen 45 Vista en corte del sistema de colección y separación de orina y heces. Fuente propia.	71
Imagen 46 Diagrama de flujo de programación. Fuente propia.	72
Imagen 47 Arduino Pro Mini [70].	73
Imagen 48 Sensor PIR [71].	74
Imagen 49 Servo motor MG90S [72].	75
Imagen 50 Sensor RGB TSC 3200 [73].	75
Imagen 51 Concepto de modularidad. Fuente propia.	77
Imagen 52 Vista isométrica del diseño del prototipo 2. Fuente propia.	78
Imagen 53 vista explosionada del prototipo 2. Fuente propia.	78
Imagen 54 Acercamiento de la muesca para el acople rápido de los muros en la estructura. Fuente propia.	80
Imagen 55 Muecas para imanes en la unión superior del módulo de recolección. Fuente propia.	80
Imagen 56 Sistema de cierre puerta de cebo. Fuente propia.....	81
Imagen 57 Diagrama de flujo de la programación. Fuente propia.	82
Imagen 58 Mega 2560 PRO MINI AT-mega 2560 [74].	83
Imagen 59 Sensor DHT11 [75].	84
Imagen 60 Modulo Sim 800L [77].	85
Imagen 61 Esquema de alimentación para el prototipo 2. Fuente propia.	85

Imagen 62 Tira reactiva rectangular marcada con la configuración B y probada con agua. Fuente propia.	90
Imagen 63 Función SENDATA del código general de Arduino. Fuente propia.	92
Imagen 64 Planilla Excel GSM SEPT 2019, utilizada como base de datos. Fuente propia.	92
Imagen 65 Distribución de la concentración de albúmina en X, a los 3.210 segundos; 6.834 segundos, 7.349 segundos, 8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente propia.	98
Imagen 66 Distribución de la concentración de albúmina en X para la zona de test comprendida entre los 0.01m – 0.013 m a los 3.210 segundos; 6.834 segundos, 7.349 segundos, 8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente propia.	100
Imagen 67 Situación experimental detección de albúmina en muestra de orina, a los 3 segundos. Fuente propia.	101
Imagen 68 Pruebas realizadas en canal rectangular con 60µl y 120µl. Fuente propia. ..	102
Imagen 69 Gráfica de la función del número de pixeles en función de la concentración de albúmina. Fuente propia.	103
Imagen 70 Trampa Sherman de captura viva para roedores de pequeña envergadura [88].	105
Imagen 71 Conexión electrónica modular, uso de terminales imantados [89].	105
Imagen 72 Trozo de 15x15 cm de plancha laminada acero A36 de 2 mm de espesor. Fuente propia.	125
Imagen 73 Perforaciones a material base de los moldes metálicos. Fuente propia.	125
Imagen 74 Centro de mecanizado vertical CNC ROMI modelo 760 [105].	126
Imagen 75 Material puesto dentro del centro de mecanizado. Fuente propia.	126
Imagen 76 Proceso de mecanizado de material base en el equipo. Fuente propia.	127
Imagen 77 Broca de fresa de 2mm, utilizada para mecanizar el material. Fuente propia.	127
Imagen 78 Primera propuesta de solución. Fuente propia.	130
Imagen 79 Parte superior. Fuente propia.	130
Imagen 80 Muro trasero. Fuente propia.	131
Imagen 81 Compartimiento del cebo. Fuente propia.	131

Imagen 82 Piso parte superior. Fuente propia.	132
Imagen 83 Muro frontal. Fuente propia.....	132
Imagen 84 Paredes. Fuente propia.....	133
Imagen 85 Techo. Fuente propia.	133
Imagen 86 Embudo A vista inferior. Fuente propia.	134
Imagen 87 Embudo A vista superior. Fuente propia.	134
Imagen 88 Dispositivo de rebote. Fuente propia.	135
Imagen 89 Embudo B vista superior. Fuente propia.....	135
Imagen 90 Embudo B vista lateral. Fuente propia.....	136
Imagen 91 Embudo C. Fuente propia.	136
Imagen 92 Embudo C vista lateral. Fuente propia.....	137
Imagen 93 Vaso de Pitágoras. Fuente propia.....	137
Imagen 94 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia.	138
Imagen 95 Sketch código completo. Fuente propia.....	139
Imagen 96 Sketch código completo. Fuente propia.....	140
Imagen 97 Sketch código completo. Fuente propia.....	140
Imagen 98 Sketch sensor RGB. Fuente propia.	141
Imagen 99 Sketch sensor RGB. Fuente propia.	142
Imagen 100 Sketch TIMER Fuente propia.	142
Imagen 101 Sketch sensor PIR. Fuente propia.	143
Imagen 102 Sketch Servomotor. Fuente propia.....	143
Imagen 103 Vista frontal. Fuente propia.	144
Imagen 104 Vista interior sección 2. Fuente propia.	144
Imagen 105 Close-up electrónica y detección de muestra. Fuente propia.....	145
Imagen 106 Archivo board prototipo 1. Fuente propia.....	146
Imagen 107 Esquemático prototipo 1. Fuente propia.	147
Imagen 108 Nivel 1 de captura. Fuente propia.	148
Imagen 109 Nivel 2 de separación y colección. Fuente propia.	148
Imagen 110 Nivel 3 electrónica. Fuente propia.	149
Imagen 111 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia.	149
Imagen 112 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia.	150

Imagen 113 Embudo. Fuente propia.....	150
Imagen 114 Filtro. Fuente propia.....	151
Imagen 115 Vista de los tres niveles separados. Fuente propia.....	152
Imagen 116 Unión de los tres niveles. Fuente propia.	152
Imagen 117 Vista lateral unión de los tres niveles. Fuente propia.	153
Imagen 118 Close-up tercer nivel: electrónica. Fuente propia.	154
Imagen 119 Close-up segundo nivel: Separación y colección de muestra. Fuente propia.	154
Imagen 120 Archivo board prototipo 2. Fuente propia.....	155
Imagen 121 Esquemático prototipo 2. Fuente propia.	156