



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

**Programa de doctorado en Química Física y
Analítica**

**DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS DE
FLUJO LATERAL CUANTITATIVOS.
APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Tesis Doctoral

Myriam Oliveira Rodríguez



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral cuantitativos. Aplicación a la determinación de vesículas extracelulares	Inglés: Development of quantitative lateral flow immunoassays. Application to extracellular vesicles determination

2.- Autor	
Nombre: Myriam Oliveira Rodríguez	DNI/Pasaport -G
Programa de Doctorado: Química Física y Analítica	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Durante la última década, ha habido una creciente tendencia dentro de la comunidad médica a diseñar pruebas de laboratorio de bajo coste, sencillas y portátiles para su aplicación en el punto de atención (sistemas point-of-care, POC). Estas pruebas de diagnóstico POC proporcionan información clínicamente relevante de manera rápida y fiable, sin necesidad de tratamientos previos de la muestra o de la realización de los análisis en un laboratorio clínico central. Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral exploran la posibilidad de diseñar sistemas POC mejorados, basados en pruebas ELISA previamente desarrolladas. Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIAs) se encuentran entre las plataformas POC más establecidas que se hayan aplicado con éxito en la práctica clínica. Estos sistemas son portátiles, de forma que el análisis puede realizarse en el punto de atención, la detección es rápida, con tiempos de análisis inferiores a 15 minutos, y sencilla, pudiendo llevarse a cabo por personal no experimentado. Sin

embargo, su utilidad diagnóstica real se encuentra limitada por la necesidad de incrementar la sensibilidad y por la falta de sistemas de cuantificación.

En esta Tesis, las necesidades de sensibilidad fueron abordadas por el empleo de diferentes estrategias de mejora de la señal, como cambios en la arquitectura del papel o el empleo de diferentes elementos de generación de la misma (nanopartículas de oro, carbón o magnéticas). Éstas últimas también permitieron la cuantificación basada en medidas de densidad óptica, magnéticas y reflectancia. La determinación del antígeno prostático específico (PSA), biomarcador de cáncer de próstata, fue elegido como sistema modelo en las etapas iniciales. Sin embargo, durante el tiempo de realización de este trabajo, las vesículas extracelulares (EVs) surgieron como una nueva clase de biomarcadores en varias enfermedades, entre ellas el cáncer y las enfermedades neurológicas. El conocimiento adquirido se aplicó al desarrollo, por vez primera, de LFIA para la detección de EVs. Se espera que este trabajo sirva para acelerar la investigación sobre ese campo, con las consiguientes mejoras en diagnóstico y pronóstico.

Por otra parte, la automatización de todos los pasos del análisis se exploró durante una estancia en la Dublin City University (Irlanda), lo que permitió examinar el potencial de las plataformas centrífugas de microfluidos, conocidas como laboratorio en un disco (*Lab-on-a-disc*), como un sistema POC totalmente integrado. Así, se trató de automatizar un ELISA para la detección de PSA, dejando solamente un paso manual para la introducción de la muestra. Las ventajas de este sistema son la eliminación de etapas tediosas de análisis, disminución de los volúmenes de reactivos y muestras y los tiempos de análisis.

El **primer capítulo** de esta Tesis establece las bases de una nueva línea de investigación en el Grupo de Investigación de Inmuno electroanálisis, centrada en el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral o inmunocromatográficos.

El **segundo capítulo** trata del desarrollo de un LFIA para la detección de PSA con nanopartículas magnéticas como marca. Las tiras de flujo lateral son acopladas posteriormente a un lector magnético experimental.

En el **tercer capítulo** se describen los estudios realizados en el Biomedical Diagnostics Institute (BDI) de Dublín. En este capítulo se detalla la fabricación de un ELISA en un

disco.

La **sección final** de esta Tesis está dedicada al desarrollo de LFIA para la determinación de vesículas extracelulares, que representan una fuente rica en nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades. Con el fin de optimizar la plataforma, se exploró el empleo de diferentes marcas y de sistemas multidetección. El test desarrollado resultó útil para la detección de EVs procedentes de diferentes fuentes (plasma, orina, cultivos celulares, etc.). La cuantificación fue posible a través de medidas de reflectancia.

RESUMEN (en Inglés)

Over the past decade, there has been a growing trend within the medical research community, to design simple, low-cost and portable laboratory tests, for their use into point-of-care settings (POC). These POC diagnostic tests provide information clinically relevant, in a rapid and reliably way, without sample pretreatment or analysis from a central clinical laboratory. The studies carried out in this PhD thesis explore the possibilities to develop improved POC systems based on previously developed ELISA tests. Lateral flow immunoassays (LFIAs) are among the most established POC platforms which have been successfully applied in clinical practice. These systems are portable, so the analysis can be performed at the point-of-care; detection is fast, with analysis times of less than 15 minutes, and simple, and therefore they can be carried out by unskilled operators. However, their actual diagnostics uses are limited by the need for increased sensitivity and quantification capacity.

In this thesis, sensitivity needs were addressed by signal enhancement methods, changes at the paper architecture, and the use of nanoparticles (gold, carbon or magnetic nanoparticles). The latter allowed also quantification methods based on optical density, magnetic or reflectance measurements. The determination of the Prostate Specific Antigen (PSA), biomarker of prostate cancer, was chosen as a model system, at the initial steps. However, during the time that this work was carried out, extracellular vesicles (EVs) emerged as a novel class of biomarkers for tumoral, neurological and

other diseases. The knowledge developed was applied to the development of the first ever LFIAs for EVs. It is expected that this work will speed up the research on that field, with the subsequent improvements in diagnostics and prognostics.

Moreover, the automatization of all the steps of the analysis were explored during a stay at Dublin City University (Ireland), which allowed to explore the potential of a centrifugal microfluidic platform (Lab-on-a-disc) as a fully integrated POC system. An ELISA was automatized, letting only a manual step for the sample introduction. The advantages of this system were the elimination of tedious steps of analysis, the decrease in reagents and sample volumes, and the reduced analysis time.

The first chapter establishes the basis of a new research line in the Immunoanalysis Research Group, focused on the development of lateral flow immunoassays or immunochromatographics.

The **second chapter** deals with the development of a LFIA for PSA by using magnetic nanoparticles as reporter label. The lateral flow strips were then coupled to an experimental magnetic reader.

The **third chapter** describes the studies developed at the Biomedical Diagnostics Institute of Dublin (Ireland). In this chapter the manufacture of an “ELISA on a disc” was described.

The **final section** of this thesis is dedicated to the development of a LFIA for the determination of extracellular vesicles, a rich source of new biomarkers for diagnosis and prognosis of certain diseases. The use of different labels and multi-targeted systems was explored in order to optimize the platform. The test was valid with EVs from different sources (plasma, urine, cell lines...). Quantification was possible through reflectance measurements.

Informe de idoneidad de los miembros del Tribunal

Agustín Costa García y M^a Carmen Blanco López, directores de la Tesis Doctoral titulada *Desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral cuantitativos. Aplicación a la determinación de vesículas extracelulares*, realizada por Myriam Oliveira Rodríguez en el Departamento de Química Física y Analítica, emiten el siguiente informe respecto a la idoneidad de los miembros del Tribunal que juzgarán la mencionada Tesis Doctoral.

El **Dr. Arben Merkoçi** profesor del Institución Catalán de Investigación y Estudios Avanzados (ICREA) y líder del Grupo de Biosensores en el Instituto Catalán de Nanotecnología en Barcelona. Su investigación se centra en la integración de las moléculas biológicas (ADN, anticuerpos, enzimas) y otros biorreceptores, en micro y nanoestructuras con aplicaciones en el diagnóstico clínico y mediambientales. Es autor de más de 250 artículos y presentaciones internacionales, incluyendo coeditor de un libro y editor invitado de dos números especiales en nanotubos de carbono y nanobioestructuras para aplicaciones en biosensores.

El **Dr. Alfredo de la Escosura Muñiz** es investigador senior del Grupo de Biosensores en el Instituto Catalán de Nanotecnología en Barcelona. Ha publicado numerosos artículos científicos relacionados con el campo de la nanotecnología para su aplicación a la determinación de moléculas biológicas (ADN, anticuerpos, enzimas), desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral y utilización de distintos tipos de nanopartículas y métodos de detección.

La **Dra. Montserrat Rivas Ardisana** es Profesora Titular en el Área de Física Aplicada de la Universidad de Oviedo. Parte de su trabajo en los últimos años ha consistido en la detección de biomarcadores de cáncer e inmunogénicos mediante el uso de métodos magnéticos y al desarrollo de un sensor basado en la detección de partículas superparamagnéticas para su aplicación al campo de la clínica.

El **Dr. José Carlos Martínez García** es Profesor Titular en el Área de Física Aplicada de la Universidad de Oviedo. En los últimos años ha trabajado en la detección de biomarcadores de cáncer e inmunogénicos mediante el uso de métodos magnéticos. Otra parte de su trabajo está dirigido al desarrollo de un sensor basado en la detección de partículas superparamagnéticas para su aplicación al campo de la clínica.

El **Dr. Robert J. Forster** es Catedrático de Química Física en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Dublín y es director del Centro Nacional de Investigación de Sensores. Es autor/coautor de más de 230 publicaciones y ha dirigido más de 35 tesis y trabajos fin de máster. Su investigación se centra en la creación de nuevos materiales con propiedades electrónicas y fotónicas, para la detección, entre muchas otras aplicaciones, de moléculas de ADN y ARN.

La **Dra. Aoife Morrin** es investigadora principal en el Centro Nacional de Investigación de Sensores. Su campo de investigación abarca el desarrollo de dispositivos electroanalíticos para aplicaciones medioambientales y biomédicas. Su

Agradecimientos

Cuando acabé mi residencia en el Servicio de Bioquímica del Hospital San Agustín, mis compañer@s y amig@s me despidieron con la siguiente frase: “Para que una puerta se abra, otra debe cerrarse”. En aquel momento, cerraba mi etapa como QIR, pero me esperaba una nueva en el mundo de la investigación. Por ello, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Agustín Costa, director de esta tesis, por haberme abierto la puerta a su grupo, por confiar en mí y por apoyar mi solicitud para optar a la beca predoctoral Severo Ochoa de FICYT, con la que he realizado esta tesis.

Me gustaría dar las gracias a la Dra. Carmen Blanco, directora de esta tesis, por introducirme en el mundo de “los test de embarazo”, por su tiempo, sus palabras de ánimo cuando las cosas se torcían, su apoyo y por transmitirme su ilusión por este proyecto que iniciamos ya hace un tiempo.

Brevemente, me gustaría dar las gracias al Dr. Enrique S. Uría, que aunque no ha formado parte de forma directa en esta tesis, sí lo ha hecho indirectamente, siendo siempre una mano amiga, desde mis inicios en el mundo de la investigación, orientándome y aconsejándome cuando lo he necesitado.

He comenzado estas líneas hablando de mi etapa como QIR, que aunque ya finalizó hace un par de años, también está presente en esta tesis. Por un lado, por la formación clínica adquirida en esos años y que creo queda reflejada en esta memoria, y por otro, por la oportunidad que me brindó el Dr. Rafael Venta al apoyar mi candidatura a la beca de Intercambio Científico Profesional de la IFCC para realizar mi estancia en Dublín. Por ello, gracias Rafa.

Y hablando de estancias...

I would like to express my gratitude to Professor Richard O’Kennedy for letting me be part of his group and see the progress in the design of POC devices and to Dr. Mishra, Dr. Kinahan and Dr. Nwainkire for welcoming me and for the outstanding supervision in the Lab-on-a-disc manufacturing process.

Me gustaría agradecer también a la Dra. María Yañez y a la Dra. Mar Valés mi breve paso por sus laboratorios para introducirme en el complicado mundo de las vesículas.

Y al hablar de vesículas, como no agradecer a la Dra. Eva Cernuda y la Dra. Esther Serrano la ayuda prestada. Gracias por la paciencia que habéis tenido conmigo en la parte “bio”, por facilitarme el acceso a las muestras y por volver a ponerme en contacto con mi lado clínico.

Muchas gracias a todos los compañeros del laboratorio por los momentos compartidos, durante el trabajo, las comidas...en especial a Fani por los ánimos y el apoyo prestado en este tramo final de la tesis, a Estefanía (Fani también para mi), por los cafés y los ratos compartidos, y sobre todo a mi "StripTeam", al que poco a poco se han ido uniendo nuevos miembros (Lía, Pablo...y las nuevas incorporaciones Amanda y María). Pablo te toca buscar nuev@ compañer@ de "early bird coffee". Os deseo mucha suerte a todos y sabéis que, aunque ahora me toque cerrar esta puerta, os dejo una llave para cualquier cosa que necesitéis.

Agradecer a mis amigas de toda la vida (Vane, Patri, Cris, Roci, Mai) su apoyo, sus ánimos, los días de desconexión del trabajo y su preocupación por cómo evolucionaban las cosas. ¡Ya casi lo hemos conseguido chicas!

Por último, no me puedo dejar a los más importantes, a los que han ido conmigo a lo largo de todo el camino, a mi familia (mis padres, hermanos y cuñados) y a mi marido (todavía me sigue sonando raro):

A mis padres, por convencerme de que si alguien puede hacerlo, es porque es posible y que yo también puedo hacerlo. Y como ya he dicho varias veces, gracias por enseñarme a luchar por lo que quiero y a no abandonar cuando las cosas se ponen difíciles.

Si algo me ha quedado claro a lo largo de todos estos años, tanto en la teoría como en la práctica, es que las cargas (y los polos) opuestos se atraen. Por eso, muchas gracias Mario por ser mi partícula positiva (sí, la que no sale en los crucigramas), tu optimismo siempre compensa mi realismo, o como tú dices...pesimismo. Muchas gracias por hacerme ver el lado bueno de las cosas, por tu apoyo incondicional, por hacer que entiendes lo que te estoy contando y por ayudarme a conseguir lo que me propongo, que sé que a menudo es demasiado.

Me gustaría dedicar esta Tesis a los que son una parte de mí, a mis niñ@s: Sergio, Rubén, Rebeca e Irene. Gracias a vosotros también por ser una vía de escape a las preocupaciones diarias, por vuestro cariño. Espero de alguna forma inspiraros y contribuir a que vuestros sueños se cumplan.

Muchas gracias a todos

INDICE

Estructura de la memoria.....	iii
Resumen	v
Abstract.....	viii
Abreviaturas.....	xi
Índice de tablas y figuras	xvii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Dispositivos en el punto de atención (POC)	3
1.2. Dispositivos POC en papel	5
1.2.1. Tiras reactivas.....	5
1.2.2. Ensayos de flujo a través	6
1.2.3. INMUNOENSAYOS DE FLUJO LATERAL	8
1.2.4. Dispositivos de análisis de microfluídica en papel (μPADs).....	36
1.3. Tecnologías POC emergentes: el laboratorio en un disco.....	39
1.4 Analitos objeto de este trabajo	45
1.4.1. Biomarcadores.....	45
1.4.2. Cáncer de próstata	47
1.4.3. Exosomas: el futuro de los biomarcadores en biomedicina	52
1.5. Bibliografía.....	57
2. OBJETIVOS	75
2.1. Objetivos.....	77
2.2. Objectives	78
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
3.1. Capítulo I: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización	81
3.1.1. Bioconjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro	84
3.1.2. Estrategias de sensibilización.....	85
3.1.3. Artículo 1: “Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays”	89

3.1.4. Abstract extendido: “Diseño de sistemas “point-of-care” utilizando la tecnología de la impresión con cera”	107
3.2. Capítulo II: Acoplamiento de inmunoensayos de flujo lateral a sensores basados en medidas magnéticas	115
3.2.1. Acoplamiento del sensor a las tiras de flujo lateral: optimización de la señal	118
3.2.2. Detección cuantitativa de PSA	118
3.2.3. Artículo 2: “High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles”	119
3.2.4. Artículo 3: “Scanning sensor for quantitative reading of PSA magnetic immunoassays”	133
3.3. Capítulo III: Diseño de plataformas microfluídicas basadas en Lab-on-a-Disc	145
3.3.1. ELISA.....	147
3.3.2. Control de los fluidos en lab-on-a-disc	149
3.3.3. Artículo 4: “Design of a Lab-on-a-disc platform for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”	151
3.4. Capítulo IV: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización para la detección de vesículas extracelulares	163
3.4.1. Técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares	166
3.4.2. Técnicas de sensibilización	167
3.4.3. Artículo 5: “Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids”	169
3.4.4. Artículo 6: “Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection”	197
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	223
4.1 CONCLUSIONES	225
4.2. CONCLUSIONS	227
4.3. PERSPECTIVAS DE FUTURO	229
4.4. FUTURE PROSPECTS	230
5. ANEXOS	231

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La estructura de esta Memoria, realizada como compendio de publicaciones, consta de las siguientes partes: un breve **Resumen** en español e inglés (**Abstract**) sintetizando el trabajo aquí presentado, un listado por orden alfabético de todas las **Abreviaturas** que aparecen lo largo de la Memoria, un listado de las **Tablas y Figuras** presentes en la Introducción, una breve **Introducción** que contextualiza el trabajo desarrollado, el planteamiento de los **Objetivos** (en español e inglés), el apartado de **Resultados y Discusión** en el que se presentan agrupados en **Capítulos** los artículos científicos publicados precedidos de un pequeño resumen de la temática en la que se encuadran, y finalmente las **Conclusiones** obtenidas a lo largo de la Tesis Doctoral junto con las **Perspectivas de Futuro** planteadas para seguir con la línea de trabajo establecida en esta Tesis, de nuevo en español y en inglés, siguiendo la normativa para la obtención de la Mención Internacional en el título de Doctor. Al final de la Tesis se añaden dos **Anexos**, en los que se incluyen una breve explicación de algunas técnicas instrumentales empleadas en este trabajo y una tabla a modo de informe con el **Factor de Impacto** de las publicaciones presentadas.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se desarrollan varios inmunoensayos de flujo lateral y se describe el desarrollo de un sistema de detección basado en un disco. Por tanto, el apartado **Resultados y Discusión** se divide en cuatro capítulos atendiendo al tipo de inmunoensayo desarrollado, las estrategias de sensibilización exploradas y al tipo de sistema de detección empleado.

Estos capítulos son los siguientes:

⇒ **Capítulo I: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización.** Este capítulo está formado por un artículo y un abstract extendido, ambos ya publicados:

1- Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays.

Abstract extendido: Diseño de sistemas “point-of-care” utilizando la tecnología de la impresión con cera.

⇒ **Capítulo II: Acoplamiento de inmunoensayos de flujo lateral a sensores basados en medidas magnéticas.** En este capítulo se presenta un artículo que se

encuentra enviado, en estado de revisión, y un artículo del que ya se han obtenido resultados pero que todavía se encuentra en fase de escritura.

2- High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles.

3- Scanning sensor for quantitative reading of PSA magnetic immunoassays.

➤ **Capítulo III: Diseño de plataformas microfluídicas basadas en Lab-on-a-Disc.**

En este capítulo se presentan, escritos a modo de artículo, los resultados obtenidos durante la estancia en Dublín, resultados que no han llegado a publicarse.

4- Design of a Lab-on-a-disc platform for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

➤ **Capítulo IV: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización para la detección de vesículas extracelulares.** Dentro de este capítulo se encuentran los siguientes artículos ya publicados:

5- Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids.

6- Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection.

Todos los artículos que componen este trabajo se presentan en un formato unificado con el resto de la Memoria para facilitar su lectura.

RESUMEN

Durante la última década, ha habido una creciente tendencia dentro de la comunidad médica a diseñar pruebas de laboratorio de bajo coste, sencillas y portátiles para su aplicación en el punto de atención (sistemas *point-of-care*, POC). Estas pruebas de diagnóstico POC proporcionan información clínicamente relevante de manera rápida y fiable, sin necesidad de tratamientos previos de la muestra o de la realización de los análisis en un laboratorio clínico central. Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral exploran la posibilidad de diseñar sistemas POC mejorados, basados en pruebas ELISA previamente desarrolladas. Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIAs) se encuentran entre las plataformas POC más establecidas que se hayan aplicado con éxito en la práctica clínica. Estos sistemas son portátiles, de forma que el análisis puede realizarse en el punto de atención, la detección es rápida, con tiempos de análisis inferiores a 15 minutos, y sencilla, pudiendo llevarse a cabo por personal no experimentado. Sin embargo, su utilidad diagnóstica real se encuentra limitada por la necesidad de incrementar la sensibilidad y por la falta de sistemas de cuantificación.

En esta Tesis, las necesidades de sensibilidad fueron abordadas por el empleo de diferentes estrategias de mejora de la señal, como cambios en la arquitectura del papel o el empleo de diferentes elementos de generación de la misma (nanopartículas de oro, carbón o magnéticas). Éstas últimas también permitieron la cuantificación basada en medidas de densidad óptica, magnéticas y reflectancia. La determinación del antígeno prostático específico (PSA), biomarcador de cáncer de próstata, fue elegido como sistema modelo en las etapas iniciales. Sin embargo, durante el tiempo de realización de este trabajo, las vesículas extracelulares (EVs) surgieron como una nueva clase de biomarcadores en varias enfermedades, entre ellas el cáncer y las enfermedades neurológicas. El conocimiento adquirido se aplicó al desarrollo, por vez primera, de LFIAs para la detección de EVs. Se espera que este trabajo sirva para acelerar la investigación sobre ese campo, con las consiguientes mejoras en diagnóstico y pronóstico.

Por otra parte, la automatización de todos los pasos del análisis se exploró durante una estancia en la Dublin City University (Irlanda), lo que permitió examinar el potencial de las plataformas centrífugas de microfluidos, conocidas como laboratorio en un disco (*Lab-on-a-disc*), como un sistema POC totalmente integrado. Así, se trató de

automatizar un ELISA para la detección de PSA, dejando solamente un paso manual para la introducción de la muestra. Las ventajas de este sistema son la eliminación de etapas tediosas de análisis, disminución de los volúmenes de reactivos y muestras y los tiempos de análisis.

Por tanto, esta tesis doctoral se divide en cuatro partes, como se detalla a continuación:

El **primer capítulo** de esta Tesis establece las bases de una nueva línea de investigación en el Grupo de Investigación de Inmuno electroanálisis, centrada en el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral o inmunocromatográficos. Estos primeros pasos se llevaron a cabo mediante el uso de PSA como antígeno modelo y nanopartículas de oro como marca para la detección de la señal. Una vez desarrollado el LFIA, el siguiente objetivo fue la mejora de la señal, que se llevó a cabo por estrategias de amplificación basadas en el empleo de plata u otras nanopartículas, o por cambios en la arquitectura de papel. La cuantificación se llevó a cabo por la digitalización de la densidad óptica.

El **segundo capítulo** trata del desarrollo de un LFIA para la detección de PSA con nanopartículas magnéticas como marca. Las tiras de flujo lateral son acopladas posteriormente a un lector magnético experimental. Este sensor ha sido diseñado por el Grupo de Investigación y Desarrollo de Materiales Magnéticos de la Universidad de Oviedo. Como paso previo a la obtención del LFIA, el acoplamiento de ambos sistemas se ensayó a través de la interacción biotina-estreptavidina.

En el **tercer capítulo** se describen los estudios realizados en el Biomedical Diagnostics Institute (BDI) de Dublín. En este capítulo se detalla la fabricación de un ELISA en un disco. Para ello se utilizan varias capas de plástico que luego se alinean y se unen para formar los distintos canales y cámaras de reactivos y de reacción. Además, se emplearán películas solubles para el control de las diferentes etapas del ensayo.

La **sección final** de esta Tesis está dedicada al desarrollo de LFIA para la determinación de vesículas extracelulares, que representan una fuente rica en nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades. El trabajo en este punto consistió en la selección de los mejores anticuerpos, y la inmovilización de los reactivos. Con el fin de optimizar la plataforma, se exploró el empleo de diferentes marcas y de sistemas multidetección. El test desarrollado resultó útil para la detección de EVs procedentes de diferentes fuentes (plasma, orina, cultivos celulares, etc.). La

cuantificación fue posible a través de medidas de reflectancia. Este trabajo fue parte del proyecto de investigación CTQ-2013-47396-R, llevado a cabo por el Grupo de Investigación de Emulsiones, Nanovesículas y Bioanálisis de la Universidad de Oviedo.

ABSTRACT

Over the past decade, there has been a growing trend within the medical research community, to design simple, low-cost and portable laboratory tests, for their use into point-of-care settings (POC). These POC diagnostic tests provide information clinically relevant, in a rapid and reliably way, without sample pretreatment or analysis from a central clinical laboratory. The studies carried out in this PhD thesis explore the possibilities to develop improved POC systems based on previously developed ELISA tests. Lateral flow immunoassays (LFIAs) are among the most established POC platforms which have been successfully applied in clinical practice. These systems are portable, so the analysis can be performed at the point-of-care; detection is fast, with analysis times of less than 15 minutes, and simple, and therefore they can be carried out by unskilled operators. However, their actual diagnostics uses are limited by the need for increased sensitivity and quantification capacity.

In this thesis, sensitivity needs were addressed by signal enhancement methods, changes at the paper architecture, and the use of nanoparticles (gold, carbon or magnetic nanoparticles). The latter allowed also quantification methods based on optical density, magnetic or reflectance measurements. The determination of the Prostate Specific Antigen (PSA), biomarker of prostate cancer, was chosen as a model system, at the initial steps. However, during the time that this work was carried out, extracellular vesicles (EVs) emerged as a novel class of biomarkers for tumoral, neurological and other diseases. The knowledge developed was applied to the development of the first ever LFIAs for EVs. It is expected that this work will speed up the research on that field, with the subsequent improvements in diagnostics and prognostics.

Moreover, the automatization of all the steps of the analysis were explored during a stay at Dublin City University (Ireland), which allowed to explore the potential of a centrifugal microfluidic platform (Lab-on-a-disc) as a fully integrated POC system. An ELISA was automatized, letting only a manual step for the sample introduction. The advantages of this system were the elimination of tedious steps of analysis, the decrease in reagents and sample volumes, and the reduced analysis time.

This PhD thesis is therefore divided into four parts, as follows:

The **first chapter** establishes the basis of a new research line in the Immunoanalysis Research Group, focused on the development of lateral flow immunoassays or immunochromatographics. These first steps were carried out by using PSA as model antigen, and gold nanoparticles as signal detection probe. Once the LFIA was developed, the next target was the signal improvement, which was carried out by amplification strategies based on the use of silver or other nanoparticles, or by changes at the paper architecture. Quantification was carried out by optical density digitalization.

The **second chapter** deals with the development of a LFIA for PSA by using magnetic nanoparticles as reporter label. The lateral flow strips were then coupled to an experimental magnetic reader. This sensor has been designed by the Innovation and Development of Magnetic Materials Research Group at the University of Oviedo. Prior to obtaining the LFIA, the coupling of both systems was tested through the biotin-streptavidin interaction.

The **third chapter** describes the studies developed at the Biomedical Diagnostics Institute of Dublin (Ireland). In this chapter the manufacture of an “ELISA on a disc” was described. For that, several plastic layers were aligned and bonded, to form the channels and reagents and reaction chambers. In addition, dissolvable films are used to control the different gates for the assay stages.

The **final section** of this thesis is dedicated to the development of a LFIA for the determination of extracellular vesicles, a rich source of new biomarkers for diagnosis and prognosis of certain diseases. The work involved selection of the best antibodies, and the immobilization of the reagents. The use of different labels and multi-targeted systems was explored in order to optimize the platform. The test was valid with EVs from different sources (plasma, urine, cell lines...). Quantification was possible through reflectance measurements. This work was part of the research project CTQ-2013-47396-R, carried out at the Emulsions, Nanovesicles and Bioanalysis Research Group.

ABREVIATURAS

μPAD	Dispositivos de análisis de microfluídica en papel	<i>Microfluidic paper-based analytical devices</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ARN	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
ARNm	ARN mensajero	<i>Messenger RNA</i>
AuNP	Nanopartículas de oro	<i>Gold nanoparticles</i>
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Línea de control	<i>Control line</i>
CaP	Cáncer de próstata	<i>Prostate cancer</i>
CB	Carbono coloidal	<i>Carbon Black</i>
CD	Disco compacto	<i>Compact Disk</i>
CF	Película de control	<i>Control film</i>
CK-MB	Creatina Quinasa–MB	<i>Creatine Kinase-MB</i>
CNC	Control numérico por ordenador	<i>Computerized numerically controlled</i>
DF	Película soluble	<i>Dissolvable Film</i>
DLS	Dispersión de luz dinámica	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DP	Plasma empobrecido	<i>Depleted plasma</i>
DTSSP	3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidil propionato)	<i>3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)</i>
DVD	Disco digital versátil	<i>Digital Versatile Disc</i>

EC	Electroquímica	<i>Electrochemistry</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetil propil) carbodiimida	<i>1-ethyl-3-(3-di-methylpropyl) carbodiimide</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EV	Vesículas extracelulares	<i>Extracellular vesicles</i>
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Suero bovino fetal	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Cromatografía de gases	<i>Gas chromatography</i>
HbA1c	Hemoglobina glicosilada	<i>Glycosylated hemoglobin</i>
HBM	HansaBioMed	<i>HansaBioMed</i>
HBS	Solución salina tamponada con HEPES	<i>HEPES-buffered saline</i>
HCG	Gonadotropina coriónica humana	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
HRP	Peroxidasa de rábano silvestre	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAM	Infarto agudo de miocardio	<i>Acute Myocardial Infarction</i>
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
Ig	Inmunoglobulina	<i>Immunoglobulin</i>
Lab-on-a-CD	laboratorio en un CD	<i>Lab-on-a-CD</i>

Lab-on-a-disc	laboratorio en un disco	<i>Lab-on-a-disc</i>
LED	Diodo emisor de luz	<i>Light-emitting diode</i>
LF	Película de carga	<i>Load film</i>
LFA	Ensayo de flujo lateral	<i>Lateral flow assay</i>
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral	<i>Lateral flow immunoassay</i>
LOD	Límite de detección	<i>Limit of detection</i>
MB	Mioglobina	<i>Myoglobin</i>
miARN	Micro ARN	<i>Micro RNA</i>
M-LFA	Ensayos de flujo lateral magnético	<i>Magnetic Lateral Flow Assays</i>
MNP	Nanopartículas magnéticas	<i>Magnetic nanoparticles</i>
MV	Microvesículas	<i>Microvesicles</i>
MVB	Cuerpos multivesiculares	<i>Multivesicular bodies</i>
NC	Nitrocelulosa	<i>Nitrocellulose</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>
NM	Membrana de nitrocelulosa	<i>Nitrocellulose membrane</i>
NP-40	Nonil fenoxi polietoxi etanol	<i>nonyl phenoxypolyethoxylethanol</i>
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud	<i>World Health Organization</i>
PBS	Disolución reguladora de fosfato	<i>Phosphate buffer solution</i>

PBS-T	Disolución reguladora de fosfato con Tween-20	<i>Tween-20 Phosphate buffer solution</i>
PCR	Proteína-C reactiva	<i>C-reactive protein</i>
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	Procalcitonina	<i>Procalcitonin</i>
PDI	Índice de polidispersidad	<i>Polydispersity Index</i>
pI	Punto isoeléctrico	<i>Isoelectric point</i>
PMMA	Polimetacrilato de metilo	<i>Polymethylmethacrylate</i>
POC	Pruebas en el punto de atención	<i>Point-of-care</i>
pro2PSA	Isoforma de proPSA	<i>ProPSA isoform</i>
pro-PSA	Isoforma de PSA	<i>PSA isoform</i>
PSA*	Adhesivo sensible a la presión	<i>Pressure sensitive adhesive</i>
PSA	Antígeno específico de prostata	<i>Prostate specific antigen</i>
PSAt	PSA total	<i>Total PSA</i>
QD	“Puntos cuánticos”	<i>Quantum Dots</i>
RF-LFA	Ensayo de flujo lateral acoplado a radio frecuencias	<i>Radio Frequency Lateral Flow Assays</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPIONs	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
SPMN	Nanopartículas superparamagnéticas	<i>superparamagnetic nanoparticles</i>

T	Línea de test	<i>Test line</i>
TEM	Microscopio electrónico de transmisión	<i>Transmission electron microscope</i>
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
TSH	Hormona estimulante de la tiroides	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>
UC	Ultracentrifugación	<i>Ultracentrifugation</i>
USB	Bus Universal en Serie	<i>Universal Serial Bus</i>

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Principales diferencias entre anticuerpos policlonales y monoclonales.....	23
Tabla 2. Tabla resumen con las características de las principales marcas empleadas en los inmunoensayos de flujo lateral.....	28
Tabla A: Factor de impacto (Impact Factor, IF) de las revistas en las que aparecen publicados los artículos recogidos en esta Tesis Doctoral.....	253
Figura 1. Simplificación del proceso analítico en los análisis en el punto de atención (<i>point-of-care</i> , POC).....	4
Figura 2. A) Representación esquemática de un sistema de flujo a través. B) Resultado observado en el dispositivo en un test positivo.....	7
Figura 3. Esquema del proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral.....	11
Figura 4. Diferencias en el diseño y generación de la señal entre un LFIA competitivo y un LFIA tipo sándwich.....	15
Figura 5. Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección simple o multiplex.....	18
Figura 6. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral en formato dipstick o formato tubo.....	19
Figura 7. Método de selección del par de anticuerpos para los inmunoensayos de flujo lateral basado en el ensayo de manchas o puntos.....	22
Figura 8. Conjugación de nanopartículas a los anticuerpos por diferentes tipos de interacciones.....	26
Figura 9. Inmunoensayos de flujo lateral semi-cuantitativos mediante la inspección visual del color.....	30

Figura 10. Acoplamiento de un lector de tiras para inmunoensayos de flujo lateral con detección colorimétrica (reflectancia) o de fluorescencia.....	33
Figura 11. Ejemplo de representación esquemática de un dispositivo analítico de microfluidos basado en papel (μ PAD), ilustrando su carácter multifuncional.....	37
Figura 12. Representación esquemática de un laboratorio en un disco.....	40
Figura 13. Desafíos presentes en el desarrollo de pruebas diagnósticas en las zonas rurales y países en vías de desarrollo y respuestas que ofrece el laboratorio en un disco.....	41
Figura 14. Representación esquemática de un laboratorio en un disco acoplado a una detección visual con inmunoensayos de flujo lateral.....	43
Figura 15. Ejemplo de evolución en la vida de un biomarcador desde su descubrimiento hasta su aprobación.....	46
Figura 16. Mecanismos de la biogénesis y la secreción de exosomas.....	53

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. DISPOSITIVOS EN EL PUNTO DE ATENCIÓN (POC)

En los últimos años la tecnología de biosensores se ha desarrollado significativamente, especialmente en el campo biomédico, donde se ha visto que el diagnóstico precoz puede cambiar significativamente el pronóstico de una enfermedad. En comparación con los grandes equipos de laboratorio, los biosensores son generalmente de pequeño tamaño, rápidos, sensibles, selectivos, de uso sencillo y no requieren tediosos pre-tratamientos de muestras. Por ello, dentro de la investigación médica, se ha observado una tendencia creciente al desarrollo de pruebas de diagnóstico de laboratorio para su uso descentralizado o en el “punto de atención” (sistemas POC, *point-of-care*) [1]. Este tipo de investigaciones tienen como objetivo principal permitir la creación de una amplia gama de pruebas de diagnóstico de “punto de atención” que puedan mejorar la eficiencia y la accesibilidad al sistema sanitario a nivel mundial, y ayudar a llevar a cabo una medicina personalizada [2]. Los sistemas POC, por tanto, son dispositivos analíticos que proporcionan información clínicamente relevante sin la necesidad de un laboratorio clínico central. Dado que estas pruebas POC son portátiles, permiten un flujo de trabajo acelerado y tiempos de respuesta potencialmente más cortos (Figura 1) [3,4]. Como resultado de ello, proporcionan al usuario información en tiempo real mejorando la atención y reduciendo el coste. Esto hace que los sistemas POC sean atractivos para su uso como primer nivel de atención (métodos de cribado), puedan ofrecer resultados rápidos intraoperatorios o puedan ser utilizados por el paciente en su domicilio. Además, son particularmente susceptibles para su uso en entornos remotos con poca o ninguna infraestructura de laboratorio, como pueden ser las áreas rurales sin una conexión directa a centros médicos, zonas de emergencia o los países en vías de desarrollo. En estos lugares se carece generalmente de las infraestructuras básicas necesarias, como energía, refrigeración o personal capacitado, y no se pueden afrontar los gastos necesarios para llevar a cabo los test diagnósticos que se realizan de forma casi rutinaria en los países desarrollados [5].

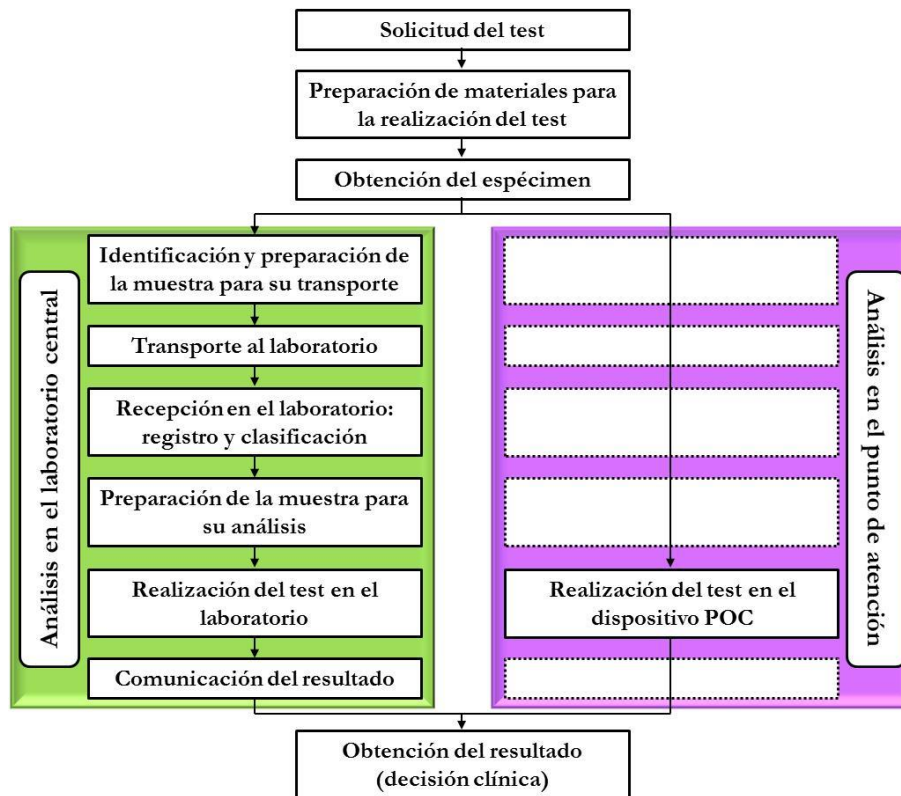


Fig. 1 Simplificación del proceso analítico en los análisis en el punto de atención (*point-of-care*, POC)

Las estrategias utilizadas para desarrollar las aplicaciones de POC a menudo son transferibles entre el campo de la salud y otros sectores que también pueden beneficiarse de estas pruebas rápidas *in-situ* o pruebas de campo [1,6]; tal es el caso del análisis medio ambiental, la agricultura, la alimentación, análisis de contaminantes en agua para garantizar su calidad, y en la seguridad y salud públicas, donde estas pruebas a menudo se refieren como “punto de necesidad” (*point-of-need*, PON).

1.2. DISPOSITIVO POC EN PAPEL

Aunque algunas tecnologías avanzadas de diagnóstico, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), han sido ampliamente utilizadas en laboratorios bien equipados, éstas no son normalmente asequibles o accesibles en entornos con recursos limitados debido a la falta de infraestructura básica, operadores entrenados y/o apoyo financiero. Estas deficiencias implican tiempos de respuesta mayores que se traducen en retrasos en la disponibilidad de los resultados y en la toma de decisiones finales. Por ello, el desarrollo de pruebas POC para su utilización en países en desarrollo es un área activa y prometedora para mejorar la detección y el pronóstico de las enfermedades. Un test de diagnóstico POC ideal para su uso en entornos de recursos limitados debe tener las características propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que se pueden resumir con el acrónimo inglés ASSURED: (1) Asequible (*Affordable*), de fácil acceso para la población en riesgo; (2) Sensible (*Sensitive*), con alta capacidad para detectar muestras positivas; (3) Específico (*Specific*) con pocos falsos positivos; (4) De uso fácil (*User-friendly*) fácil de realizar y para usuarios sin formación previa; (5) Rápido (*Rapid*) para permitir tomar decisiones inmediatas y Robusto, para transportarlo y almacenarlo sin que se altere su funcionamiento; (6) Libre de equipamiento (*Equipment free*), sin instrumentalización; (7) Distribuible a aquellos que lo necesitan, incluso a países en vías de desarrollo (*Delivered to end-users*) [7]. En este contexto, los biosensores basados en papel (incluyendo tanto la celulosa como las membranas de nitrocelulosa), tienen un gran potencial para ofrecer diagnósticos POC en los países en desarrollo ya que cumplen las características ASSURED anteriormente señaladas. Estos dispositivos están siendo actualmente desarrollados y utilizados para la realización de análisis bioquímicos y pueden dividirse dentro de las siguientes categorías: tiras reactivas (*dipsticks assays*), ensayos de flujo a través (*flow through tests*), inmunoensayos de flujo lateral (*lateral flow immunoassays*, LFIA) y dispositivos de análisis de microfluídica en papel (*microfluidic paper-based analytical devices*, μ PADs) [8,9,10].

1.2.1. Tiras reactivas

La primera tira reactiva se introdujo en 1957 para detectar la glucosa en orina y desde entonces esta tecnología POC ha resistido al paso de los años y se utiliza en la actualidad de forma rutinaria por pacientes, enfermeras y médicos en muchos lugares diferentes. En su forma más simple, la muestra se aplica en una superficie porosa de

papel que ha sido impregnada previamente con los reactivos necesarios. Estos sistemas POC son fáciles de diseñar y fabricar y cómodos de usar, pudiendo detectar desde uno hasta diez analitos. Las medidas con tiras reactivas se realizan generalmente a simple vista, evaluando el cambio de color del indicador. No obstante, estas tiras pueden ser comparadas con una tarjeta de indicador estándar basada en una escala de color o acopladas a un detector de reflectancia para proporcionar una estimación semi-cuantitativa del analito. Su principal desventaja es su limitación para diseñar dispositivos más sofisticados, a menudo necesarios para fines diagnósticos. Los ejemplos más conocidos son las tiras reactivas de pH y las de análisis de orina [9,11].

1.2.2. Ensayos de flujo a través

Los ensayos de flujo a través se fundamentan en la migración de la muestra por medio de un flujo vertical a través de una membrana porosa sobre una almohadilla absorbente. Los analitos son capturados por bio-reconocimiento específico de los reactivos que se encuentran inmovilizados sobre la superficie de la membrana (punto de test), seguido por la adición de un segundo reactivo marcado para la visualización del resultado (Figura 2). Esta tecnología de flujo continuo ofrece un procedimiento rápido y relativamente simple para el diagnóstico POC, permitiendo además la detección de varios analitos simultáneamente (análisis multiplex). Este es el caso del producto desarrollado por la casa comercial MedMira, que ofrece la detección simultánea de VIH-1/2, hepatitis B y C y sífilis [12]. A pesar de que el procedimiento de ensayo es sencillo y que en ocasiones son más sensibles que los dispositivos de flujo lateral, uno de los mayores inconvenientes, sin embargo, es la necesidad de la adición del reactivo marcado y las etapas de lavado, exigiendo una mayor destreza del usuario. Esta limitación fue superada por la tecnología del flujo lateral, que proporciona una plataforma diagnóstica más fácil de usar en una sola etapa [13].

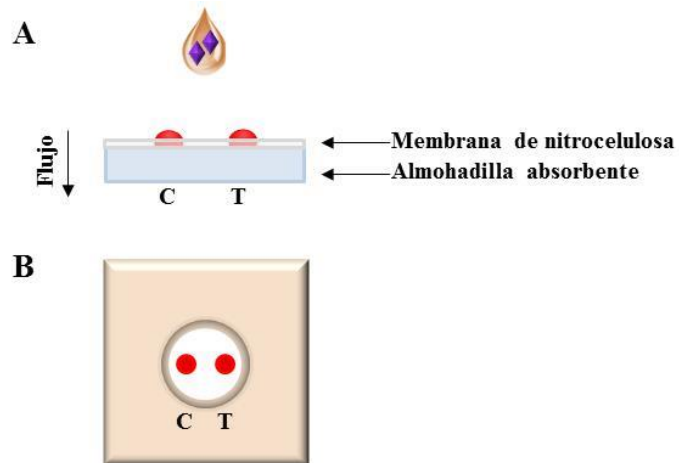


Fig. 2 A) Representación esquemática de un sistema de flujo a través donde se muestra las posiciones relativas de la membrana porosa, la almohadilla absorbente y los puntos de test (T) y el control (C). B) Resultado observado en el dispositivo en un test positivo.

1.2.3. INMUNOENSAYOS DE FLUJO LATERAL

Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) se encuentran entre las plataformas POC más establecidas que se hayan aplicado con éxito en áreas donde la atención médica supone un desafío debido a los pocos recursos existentes. Su amplia difusión se debe en parte a que cumplen con la mayoría de las características previamente descritas para un sistema POC ideal (criterio ASSURED). Esta tecnología constituye la plataforma de ensayo para la realización de pruebas rápidas de diagnóstico más sencilla y exitosa, derivada de la prueba de aglutinación de látex (Singer y Plotz, 1956) [14].

En la década de los setenta, los LFIA serológicos comenzaron a emerger, siendo la clave de tal desarrollo la introducción del primer test de embarazo, originado a partir del radioinmunoensayo para la detección de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (β -hCG). Los avances tecnológicos producidos en los últimos años han permitido la extensión de los LFIA en aplicaciones que requieren alta precisión y sensibilidad, manteniendo las ventajas de la tecnología desde el punto de vista de las necesidades de infraestructura, portabilidad, tiempo de respuesta y facilidad de uso. Estas plataformas, consideradas históricamente como menos precisas y menos capaces que los análisis llevados a cabo por los grandes equipos de laboratorio, se están viendo cada vez más como una tecnología versátil y con altos rendimientos en todas las etapas del proceso de diagnóstico. Estos avances han hecho que los LFIA comerciales se hayan expandido más allá de los diagnósticos clínicos a otros campos como son la veterinaria, la alimentación, las aplicaciones medioambientales y la defensa biológica [6,15]. El mercado mundial de pruebas basadas en LFIA fue estimado en 2010 en 3.360 millones de dólares, con más de 100 compañías, de los cuales el mercado estadounidense representa el 50%, el mercado europeo aproximadamente el 40% y el resto del mundo, el 10% restante [16]. Además, se prevé que este mercado alcanzará los 6.780 millones de dólares en 2020, con una tasa media anual de crecimiento del 8,3% entre 2015-2020 [17]. Para penetrar en el mercado con éxito, es fundamental que estos LFIA estén diseñados usando principios y prácticas centradas en el usuario, es decir, deben adaptarse al flujo de trabajo de las personas que lo van a utilizar, ser intuitivos y fáciles de usar. Para la creación de productos que cumplan con los requisitos anteriores y que sean realmente útiles en el punto de atención, es necesaria la optimización (e innovación cuando sea posible) de cada uno de los componentes clave del sistema de flujo lateral. Algunos de los pasos y/o elementos clave de un sistema LFIA de alto rendimiento, que

serán descritos con más detalle en los apartados siguientes, son los siguientes: selección de materiales, diseño y proceso de fabricación de las tiras; formato de ensayo; reactivos de reconocimiento biológico; elementos de generación de la señal (marcas) y métodos de lectura e interpretación de las señales [15].

1.2.3.1. Principio de los inmunoensayos de flujo lateral

El fundamento de los LFIA se basa en la misma lógica que los ELISA, donde el anticuerpo de captura o antígeno inmovilizado está unido a una membrana, generalmente de nitrocelulosa, en lugar de a un pocillo de plástico. La ventaja que presentan los LFIA es el hecho de que aquí todo el test se puede realizar en un solo paso y en unos pocos minutos, a diferencia de la serie de pasos y etapas de incubación que hay que seguir para llevar a cabo un ELISA. La membrana de nitrocelulosa en la que se inmoviliza el bioreactivo facilita la separación, captura y detección del analito o analitos de interés. Los diversos componentes que constituyen el LFIA tienen la capacidad de transportar fluidos, incluyendo sangre y suero, por acción capilar sin necesidad de bombas externas.

Una tira de flujo lateral estándar se compone de cuatro secciones principales fabricadas de diferentes materiales, que serán discutidas posteriormente con más detalle: almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, membrana de nitrocelulosa y almohadilla absorbente [18]. Cuando se realiza el ensayo, un pequeño volumen de muestra se aplica en uno de los extremos de la tira, donde se encuentra la almohadilla de muestra. La muestra migra a través de esta almohadilla a la almohadilla de conjugado, donde el reactivo de detección (marca) ha sido inmovilizado por un proceso de secado. Esta marca ha sido previamente conjugada a uno de los componentes biológicos específicos del ensayo, ya sea un antígeno o un anticuerpo, dependiendo del formato de ensayo, de forma pasiva o por medio de un enlace covalentemente. Aquí, la muestra en fase líquida moviliza el conjugado seco haciendo que se incorpore al flujo de muestra, a la vez que el analito interactúa con el conjugado y comienza a migrar a la siguiente sección de la tira, la matriz de reacción o membrana. Esta zona de reacción o detección es típicamente una membrana porosa donde se han inmovilizado anticuerpos o antígenos anti-diana (dependiendo del tipo de formato de ensayo) formando una línea o banda (línea de test) que actúan como una zona de captura para el inmunocomplejo. A continuación de esta línea de detección se encuentra otra zona, la línea de control, donde se ha inmovilizado otro reactivo para comprobar la funcionalidad del ensayo. El exceso

de muestra y reactivos continúa migrando a través de la membrana, más allá de las líneas de test y control, hasta una almohadilla absorbente que sirve como almacén de residuos. Los resultados del ensayo se observan en la membrana como la presencia o ausencia de líneas de conjugado capturado, interpretándose bien a simple vista o utilizando un sistema de detección adecuado [15,19].

1.2.3.2. Componentes y proceso de fabricación de las tiras

Como se dijo anteriormente, la fabricación de los inmunoensayos de flujo lateral se realiza en forma de tira, normalmente con una anchura de entre 4 y 6 mm y una longitud que no suele superar los 6-7 cm. En la Figura 3 se muestran las cuatro secciones principales que componen la tira: almohadilla de muestra, generalmente de celulosa, donde se aplica la muestra; almohadilla de conjugado, constituida de fibra de vidrio, que se impregna con la disolución del bioconjugado (reactivo marcado); membrana, de nitrocelulosa, donde se imprimen las líneas de test (T) y de control (C); y la almohadilla de absorción, también de celulosa. Además de éstos, otros materiales pueden ser empleados. Una vez realizados los pre-tratamientos necesarios a cada componente, que serán explicados con más detalle a continuación, éstos se ensamblan en tarjetas autoadhesivas que sirven como soporte, superponiéndose unos 2 mm para permitir el flujo de muestra. Finalmente, las tarjetas se cortan para obtener tiras individuales, que se montan dentro de una carcasa de plástico. Esta carcasa proporciona un control para la aplicación de la muestra, las velocidades de flujo, los patrones de flujo, y tienen efecto sobre la reproducibilidad del ensayo [15].

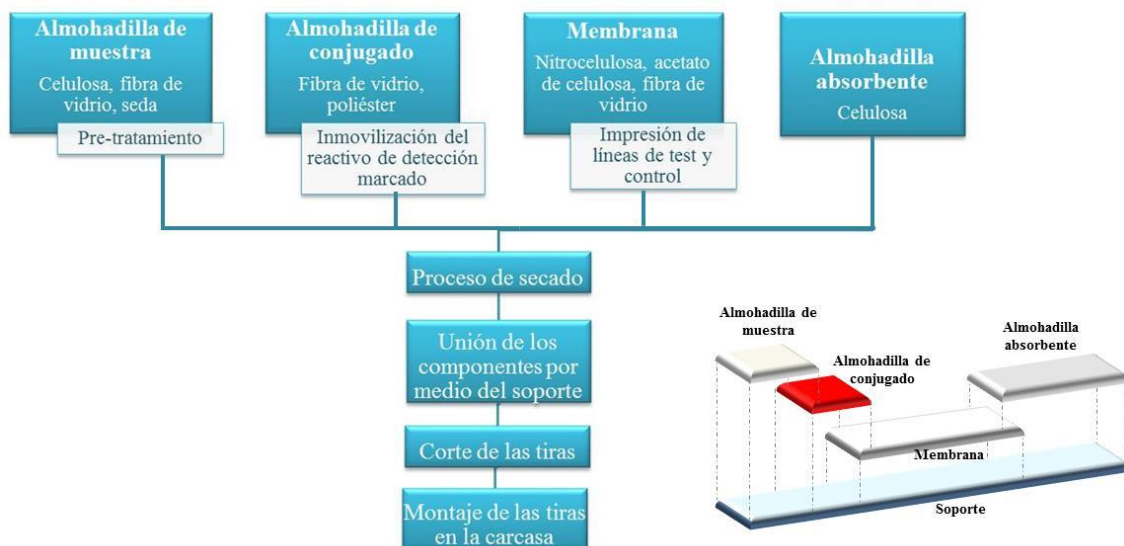


Fig. 3 Esquema del proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral. En la parte superior se detallan los componentes básicos, los materiales de los que se constituyen y el tipo de tratamiento al que son sometidos antes de su ensamblaje, representado en la figura.

Almohadilla de muestra

La función de la almohadilla de muestra es admitir la muestra, tratarla de manera que sea compatible con el ensayo, y liberar el analito con una alta eficiencia. Los tratamientos de la muestra incluyen el filtrado de las células rojas de la sangre, ajustes del pH de la muestra para hacerla compatible con los otros componentes del sistema, eliminación de constituyentes de la muestra que puedan interferir en etapas posteriores, y la disgregación de los componentes de la matriz, tales como mucinas, con el fin de liberar al analito y permitir una interacción eficiente con el resto de los reactivos. Esto se consigue bien por cambios en el material que constituye la almohadilla de muestra, normalmente de celulosa, fibra de vidrio o seda artificial, o por pre-tratamiento de la almohadilla con disoluciones reguladoras, surfactantes o agentes bloqueantes, que además contribuyen a aumentar la sensibilidad del test [18,20].

Almohadilla de conjugado

El papel que juega la almohadilla de conjugado en un inmunoensayo de flujo lateral es contener el conjugado seco, mantenerlo estable a lo largo de toda su vida útil, y liberarlo de manera eficiente y reproducible cuando el análisis se lleva a cabo. Su composición generalmente se basa en fibra de vidrio o poliéster y a menudo se pre-tratan con

diferentes proteínas, polímeros, y agentes tensoactivos para hacerlas hidrófilas y con el fin de garantizar la estabilidad y la liberación óptima del conjugado cuando entra en contacto con la muestra.

Membrana

La matriz de reacción es típicamente una membrana porosa con una estructura hidrófila abierta, que tiene como función el transporte de los líquidos hacia la zona de reacción, sobre la que se han inmovilizado previamente los reactivos de captura biológicos específicos y el reactivo de control. La membrana es, probablemente, la parte más importante de la plataforma de ensayo. Su rendimiento se ve influido en gran medida por su morfología física y composición química. Una amplia variedad de membranas se encuentran hoy en día disponibles comercialmente, como las membranas de acetato de celulosa o fibra de vidrio. Sin embargo, el material de elección en la gran mayoría de sistemas de LFIA es la nitrocelulosa, principalmente debido a su mayor capacidad para inmovilizar proteínas [19]. La nitrocelulosa como material de base es hidrófoba, y se hace hidrófila por la adición de agentes surfactantes durante el proceso de producción de la membrana. El mecanismo de unión de las proteínas a la membrana depende de diferentes fuerzas. Varias líneas de evidencia indican que las biomoléculas interactúan con la nitrocelulosa a través de interacciones hidrófobas no-covalentes entre los carbonos de la nitrocelulosa y la porción hidrofóbica de la proteína, mientras otros lo describen como una interacción principalmente electrostática entre los dipolos de los grupos nitrato de la nitrocelulosa y los dipolos presentes dentro de la proteína. En cualquiera de los casos, está bien establecido que las proteínas se adsorben a las membranas de nitrocelulosa a menos que se haga algo para evitar este proceso. Para evitar esta unión no específica, las membranas de nitrocelulosa pueden ser pre-tratadas con una solución de bloqueo que contiene proteínas, evitando que el analito se adsorba inespecíficamente a la membrana antes de llegar a la línea de captura [21]. En algunos casos, con el fin de reducir la manipulación de la membrana, el bloqueo se realiza "durante la marcha", mientras el ensayo se ejecuta. Para ello, los agentes de bloqueo se impregnan en la almohadilla de muestra, y migran con el frente líquido, produciéndose la unión a la nitrocelulosa a lo largo del camino hacia la zona de detección [22].

Un parámetro clave a la hora de seleccionar una membrana es el tiempo de flujo capilar, que se define como el tiempo requerido para que el líquido pueda mojar completamente

una tira de longitud definida. Este valor se expresa típicamente como segundos por centímetro. El flujo capilar se ve afectado por varias características del medio poroso, como el tamaño de poro y su distribución; por las características del fluido, por ejemplo, la viscosidad; y por la interacción entre ambos. Las membranas con tamaño de poro más grandes generalmente presentan una mayor velocidad de flujo, que es muy útil para reducir los tiempos de análisis. No obstante, dado que la capacidad de unión de las proteínas a la membrana es inversamente proporcional a su tamaño de poro y que a mayor porosidad la velocidad a la que el antígeno atraviesa la región del reactivo de captura es mayor, disminuyendo así el tiempo de interacción entre ellos, la selección de este tipo de membranas puede traducirse en una pérdida de sensibilidad. Por tanto, el uso de membranas de nitrocelulosa de poro fino puede mejorar las interacciones específicas, dando así un límite de detección inferior. Sin embargo, este enfoque no se puede utilizar con todos los antígenos, ya que las membranas de poro fino no son adecuadas para el análisis de analitos de alto peso molecular o gran tamaño, tales como virus, bacterias y células. Visto esto, es muy importante a la hora de seleccionar el tipo de membrana buscar un compromiso entre rapidez, sensibilidad y compatibilidad con el analito de interés [23,24,25].

Almohadilla absorbente

La almohadilla absorbente se compone generalmente de celulosa y se coloca en el extremo de la tira, después de la zona de reacción. La función principal de la almohadilla absorbente es mantener el flujo de la muestra y de los reactivos a través de la membrana y evitar la aparición de falsos positivos, impidiendo la liberación de éstos de nuevo hacia la zona de detección.

Soporte

Con el fin de facilitar el manejo de la tira y proporcionar rigidez a la membrana utilizada en los LFIA, todos los componentes anteriormente descritos (almohadilla de muestra, de conjugado, membrana y almohadilla absorbente) se montan generalmente en un material de soporte. Los materiales utilizados son típicamente poliestireno o diferentes variantes de plástico, que se encuentran recubiertos con un adhesivo sensible a la presión para mantener todos los componentes de la tira unidos en un formato definido [19].

Carcasa

La carcasa es típicamente el último componente incluido en un LFIA. Aunque no es imprescindible, es un componente muy funcional del ensayo, proporcionando un control para la aplicación de la muestra, de las velocidades de flujo, proporciona un flujo adecuado de los fluidos de un componente de la tira al siguiente y tiene un gran efecto sobre la reproducibilidad del ensayo [15].

1.2.3.3. Formatos de los inmunoensayos de flujo lateral

Los LFIAs pueden llevarse a cabo principalmente en dos formatos o esquemas de reacción en función del analito a detectar, por medio de un ensayo competitivo o por un ensayo no- competitivo (o ensayo tipo sándwich).

a) Formato competitivo

El ensayo competitivo se emplea normalmente cuando el analito es de bajo peso molecular, por lo general del tamaño de un hapteno, y sólo tiene un epítipo o determinante antigénico al que sólo puede unirse un anticuerpo. La ausencia de color en la línea de test es indicativa de la presencia de analito en la muestra (aparece una sola línea en la membrana), mientras que la existencia de color tanto en la línea de test como en la de control indica un resultado negativo (aparecen dos líneas en la membrana) (Figura 4). En general, hay dos tipos diferentes de ensayos competitivos. En el primer caso, en la línea de test se inmoviliza antígeno, el mismo que se quiere detectar, donde se unirá específicamente el anticuerpo conjugado a la marca. Cuando la muestra llega a la línea de test, el conjugado marcado se unirá al antígeno inmovilizado en los casos en los que el analito diana no se encuentre en la muestra o cuando esté presente pero en una concentración tan baja que cierto número del anticuerpo marcado esté libre para unirse a la línea de test. Si el analito se encuentra en la muestra por encima de una determinada concentración, que dependerá del ensayo, todos los anticuerpos marcados se encontrarán unidos al analito y no habrá conjugado libre para unirse a la línea de test. En este caso, por tanto, el antígeno en la solución de muestra y el que está inmovilizado en la línea de test en la tira compiten por unirse al anticuerpo marcado (Figura 4A). En el otro tipo de ensayo competitivo, en la línea de test se inmoviliza el anticuerpo de captura específico y la almohadilla de conjugado contiene analito marcado. Cuando la muestra es añadida, el analito de la muestra y el analito marcado compiten por los sitios de unión del anticuerpo presente en la línea de test (Figura 4B) [26]. En estos dos casos,

la intensidad de la señal producida en la línea de test es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. Ejemplos de LFIA de este formato son los de análisis de drogas de abuso en orina [27] y de contaminantes medioambientales [28].

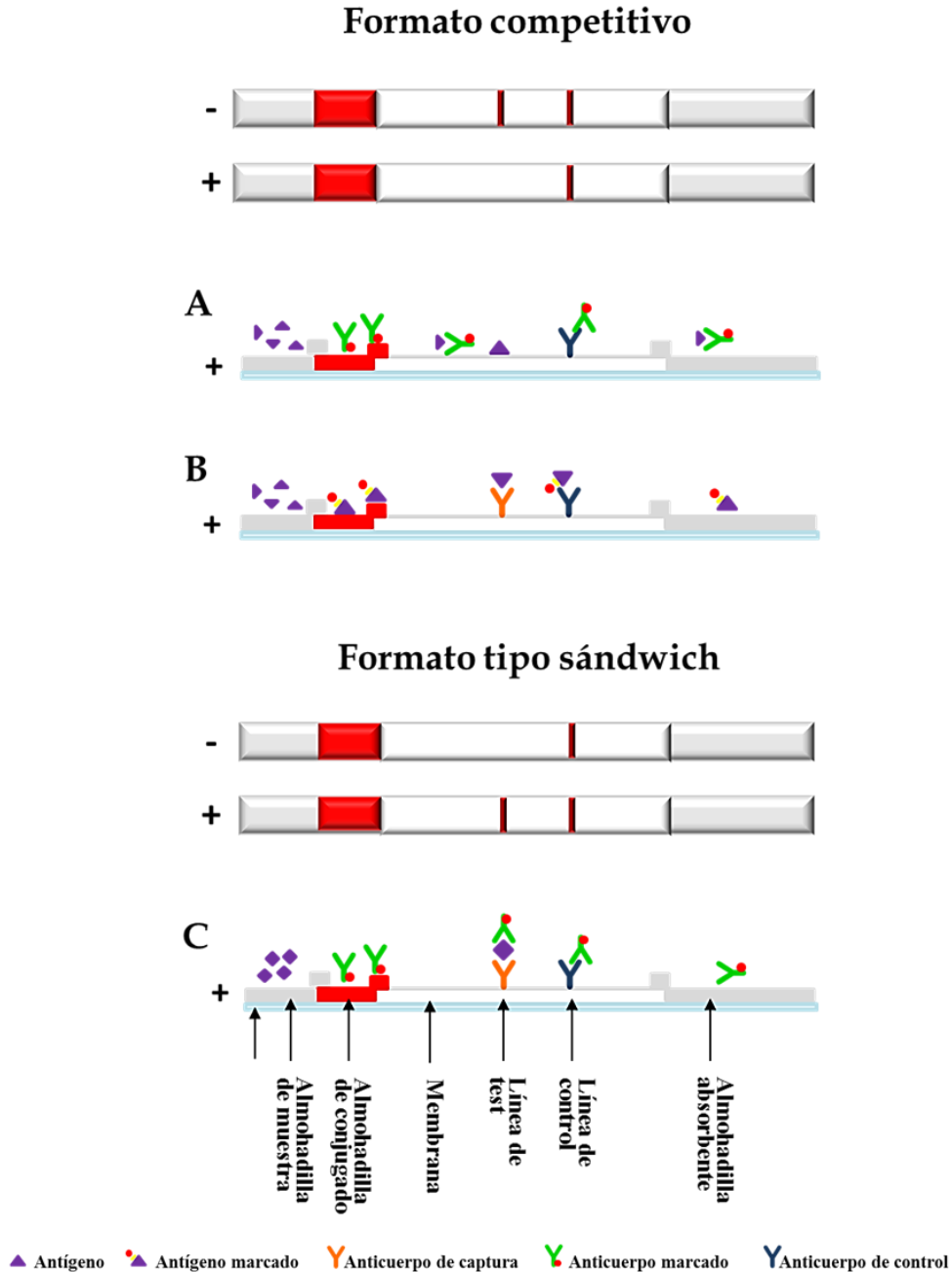


Fig. 4 Diferencias en el diseño y generación de la señal entre un LFIA competitivo y un LFIA tipo sándwich. En el formato competitivo, la respuesta se correlaciona negativamente con la cantidad de analito en la muestra (izquierda): A) Esquema del formato competitivo inmovilizando el antígeno en la membrana; B) Esquema del formato competitivo inmovilizando el anticuerpo de captura en la membrana. En el formato tipo sándwich la respuesta es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra (derecha): C) Esquema de un LFIA tipo sándwich.

b) Formato tipo sándwich

El ensayo no-competitivo o tipo sándwich puede emplearse con analitos grandes que tienen más de un epítopo. En este formato, el anticuerpo de captura se inmoviliza en la membrana formando la línea de test y la almohadilla de conjugado contiene un segundo anticuerpo marcado frente al analito. El analito presente en la muestra se unirá durante la migración por la membrana al anticuerpo marcado con la señal de detección para formar un complejo antígeno-anticuerpo marcado. Este complejo continúa fluyendo a lo largo de la membrana para formar un inmunocomplejo tipo sandwich con el anticuerpo de captura inmovilizado en la línea de test por medio del epítopo libre del analito. La aparición de dos líneas en la zona de detección revelará la presencia de analito en la muestra, siendo la intensidad de la señal producida en la línea de test directamente proporcional a la concentración de analito (Figura 4C). Un problema que puede surgir en este tipo de formato es la incapacidad de algunos antígenos para unirse al mismo tiempo a ambos anticuerpos, al anticuerpo marcado y al inmovilizado en la membrana, debido a la presencia de impedimentos estéricos que pueden dificultar la unión simultánea [29]. Ejemplos de LFIA con formato tipo sándwich son la prueba de embarazo [30] o la detección de troponina cardiaca en el infarto de miocardio [31].

Formato multiplex

Dentro del diseño de los LFIA, un reto que ha surgido a lo largo de los años es el desarrollo de sistemas capaces de medir simultáneamente varios analitos en la misma tira, lo que se conoce como análisis multiplex o detección múltiple. Un formato multiplex se obtiene modificando el diseño del LFIA tradicional con la impresión de varias líneas de test en la misma tira, tantas como analitos se quieran detectar [32] (Figura 5-II). Este formato de detección múltiple es muy útil por ejemplo en el diagnóstico clínico, donde la medida simultánea de varios analitos puede ayudar a la toma rápida de decisiones clínicas. Este es el caso del infarto agudo de miocardio (IAM), donde la detección simultánea de troponina cardiaca y mioglobina puede ayudar a facilitar el diagnóstico de IAM dentro de los primeros 90 minutos desde su presentación [33]. Este diseño de ensayo se encuentra a menudo limitado a la detección de tres o cuatro analitos debido principalmente a las dimensiones de las tiras [25]. Una alternativa para aumentar el número de analitos analizados simultáneamente es emplear varias tiras individualmente, integradas en una misma carcasa (Figura 5-III). Sin

embargo, este abordaje requiere un volumen de muestra más grande y mayor gasto de consumibles, aumentando el coste del análisis. Esto ha hecho que algunos autores hayan sugerido el uso de la tecnología de los microarrays en combinación con las tiras de flujo lateral (Figura 5-IV). Para ello, en lugar de inmovilizar los reactivos en la membrana en forma de línea, se inmovilizan formando una matriz de puntos que contiene diferentes inmunorreactivos [34]. En este sentido, Li y Macdonald [35] van un paso más allá diseñando una matriz de puntos de forma que un espécimen se diagnostica basándose en el conjunto de puntos que aparecen en la membrana y que simulan números del 0 al 9, facilitando así la interpretación por parte del usuario final. La detección múltiple también puede llevarse a cabo empleando el diseño en dos dimensiones, haciendo que la membrana se disponga formando diferentes estructuras geométricas, como por ejemplo el diseño en forma “de tenedor”, “de símbolo de la paz” o de disco (Figura 5-V). La forma de la tira generalmente viene dada por número de analitos diana [36,37,38]. No obstante, estos diseños introducen mayor dificultad al proceso de fabricación, además de tener que realizarse estudios para conocer el comportamiento del flujo de muestra en estos dispositivos.

A pesar de que estos ensayos multiplex pueden incrementar la información clínica en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, debido a su complejidad, se requiere una amplia validación de los paneles de detección destinados a ser utilizados en ensayos clínicos o en laboratorios de diagnóstico. En este sentido, la reactividad cruzada entre los reactivos de detección y los distintos ligandos de captura inmovilizados o la obtención de sensibilidades y rangos dinámicos adecuados para cada uno de los analitos analizados son cuestiones que deben de tenerse en cuenta a la hora de poner a punto estos test [39].

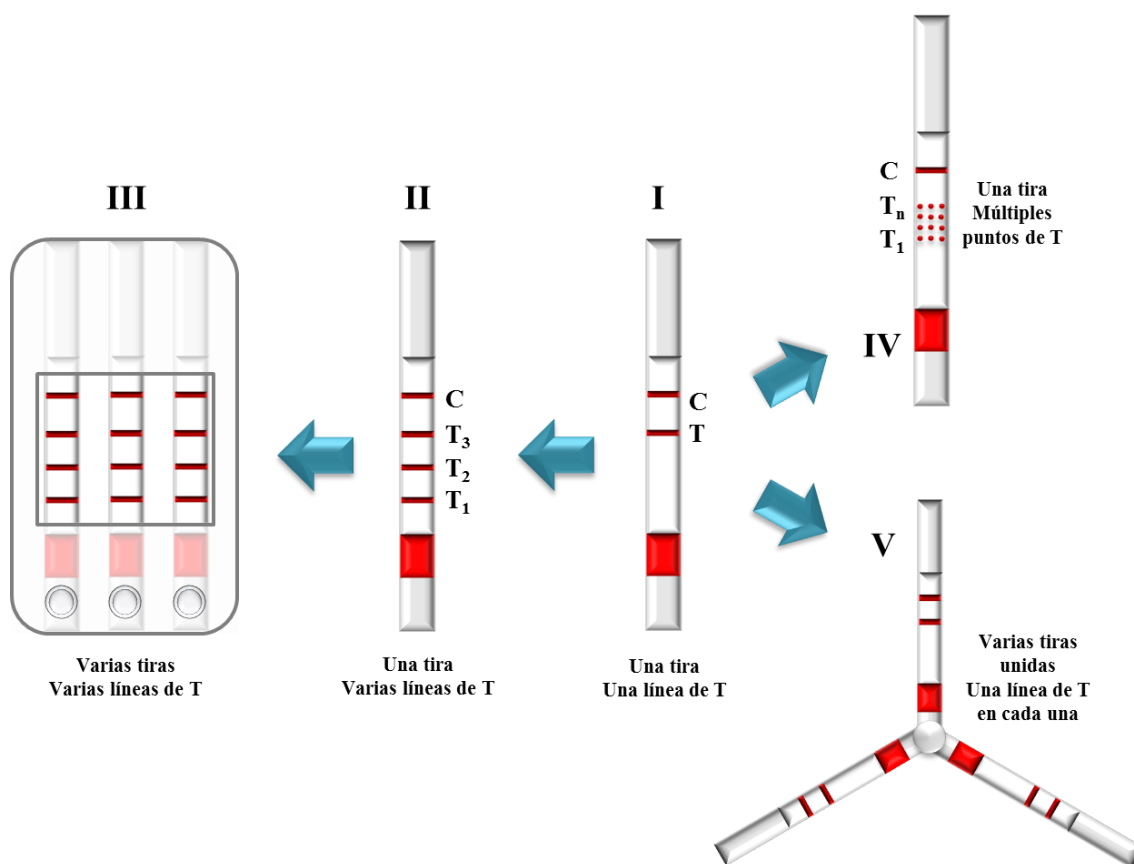


Fig. 5 Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección simple (I) o multiplex: II) Varias líneas de test (T) en la misma tira; III) Varias tiras, integradas en una misma carcasa; IV) Combinación de LFIA con la tecnología de los microarrays; V) Ejemplo de diseño en dos dimensiones obtenido por unión de varias tiras. C: control

Formato dipstick

El formato *dipstick* o formato tubo es una alternativa a los LFIA convencionales. Es un método muy simple y es muy utilizado como método de cribado para establecer los anticuerpos y las condiciones de ensayo adecuados. La plataforma biosensora para realizar el análisis comprende principalmente tres partes: almohadilla de muestra, membrana de nitrocelulosa y la almohadilla absorbente. En este caso la muestra se mezcla previamente con el reactivo marcado, ya sea en pequeños tubos o en placas de microtitulación. La tira se sumerge a continuación en esta disolución y la muestra empieza a fluir hacia la almohadilla absorbente por acción capilar (Figura 6). Los reactivos conjugados con la marca pueden secarse previamente en el fondo del tubo o pocillo, añadirse como una bolita de liofilizado o añadirse el volumen deseado de

conjugado [40]. Este tipo de formato será el empleado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

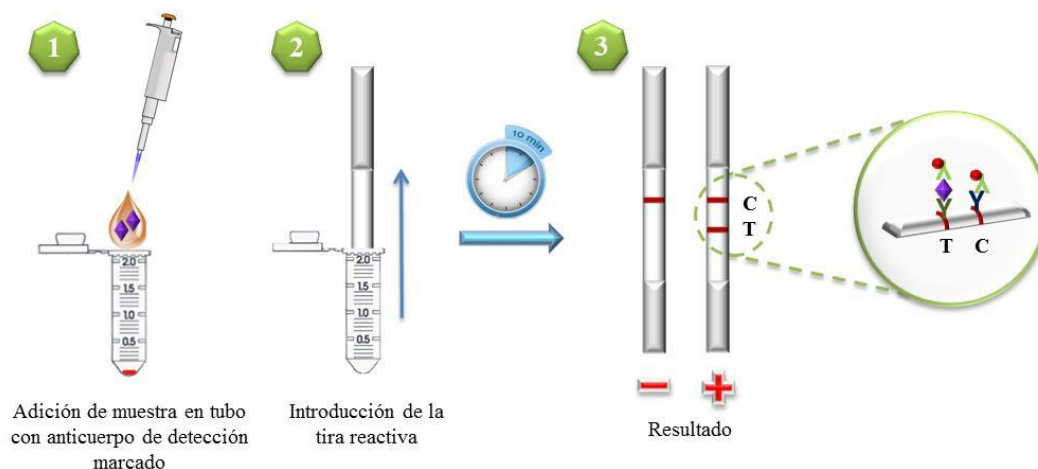


Fig. 6 Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral en formato *dipstick* o formato tubo. 1) Adición de la muestra. 2) Migración de la muestra por acción capilar. 3) Posibles resultados en un LFIA tipo sándwich.

1.2.3.4. Elementos de reconocimiento biológicos en inmunoensayos de flujo lateral

Hay muchos elementos de reconocimiento biológicos diferentes que pueden ser empleados, pero los anticuerpos son, con mucho, los más establecidos y comúnmente utilizados. En un LFIA tipo sándwich típico, como se ha visto, se emplean dos o tres tipos de anticuerpos diferentes: para unirse específicamente al antígeno diana (anticuerpo de captura), para la visualización del resultado (anticuerpo de detección marcado), y para actuar como control (generalmente un anticuerpo anti-IgG). Por esta razón, llevar a cabo un cuidadoso análisis y selección de los reactivos biológicos es absolutamente fundamental para el desarrollo de estas plataformas. El rendimiento del ensayo se verá afectado por la clase de anticuerpos, sus características, incluyendo la especificidad y la afinidad, y también por la constante de velocidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo [15].

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas secretadas por los linfocitos B en respuesta a la exposición a un antígeno extraño. La unidad fundamental de una Ig es una estructura en forma de Y formada por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, conectadas por enlaces disulfuro. Las inmunoglobulinas

de mamíferos se clasifican en cinco clases en base a sus distintas propiedades estructurales y biológicas: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM. Las moléculas de IgG, IgD e IgE se presentan como monómeros (es decir, una sola molécula en forma de Y), mientras que IgM es un pentámero e IgA se encuentra generalmente en forma dimérica en animales domésticos. La interacción entre un epítipo antigénico y un anticuerpo consiste en la inserción del epítipo en una hendidura creada por el plegamiento de las cadenas pesada y ligera de la Ig (sitio de unión al antígeno). Estas interacciones moleculares son muy precisas y son la base para su extenso uso en muchas aplicaciones médicas y biotecnológicas. Algunos epítopos encajan exactamente en el sitio de unión al antígeno (interacción llave-cerradura) y se unen allí muy firmemente, es decir, el anticuerpo tiene alta afinidad por el antígeno. En otros casos, la unión se produce de forma parcial o débil, por lo que el anticuerpo presenta una baja afinidad [41]. Los LFIA son particularmente exigentes en cuanto a la afinidad requerida en las interacciones entre anticuerpos y antígenos. Sin embargo, en algunos casos una alta afinidad puede no ser suficiente. En el ensayo de flujo lateral, esta afinidad necesita ser impulsada principalmente por una alta tasa de reacción (constante de velocidad de asociación). Si tenemos en cuenta la cinética de los LFIA, la zona de la línea de test es típicamente del orden de 0,5-1,0 mm de ancho y la velocidad de flujo es de aproximadamente 0,1-0,7 mm/s, dependiendo del tipo de membrana de nitrocelulosa seleccionado. Esto hace que el analito pase entre 1 y 6 segundos en la zona en la que puede interactuar con el anticuerpo inmovilizado, por lo que es necesario que la interacción se realice a una alta velocidad. La situación es un poco más favorable para el anticuerpo conjugado con la marca, que pasa más tiempo en contacto con el analito. La reacción de unión efectiva se inicia con la re-solubilización del conjugado y termina cuando se alcanza la línea de test. Este tiempo es típicamente del orden de 10 s para las partículas que se encuentran en el extremo más próximo a la membrana, pero puede llegar hasta varios minutos para las últimas partículas liberadas de la almohadilla de conjugado. En un formato *dipstick*, como el anticuerpo conjugado se mezcla previamente con la muestra, el tiempo de reacción anticuerpo/analito será mayor y la interacción entre ambos se verá más favorecida al encontrarse en disolución que en el caso del conjugado seco en la almohadilla. Por lo tanto, los requisitos de alta afinidad (y por lo tanto, velocidad de reacción corta) se aplican a todos los anticuerpos utilizados en los LFIA, independientemente del lugar en la tira en el que se utilicen [16,42]. No obstante, otros factores pueden influir en la unión del antígeno con el anticuerpo. La

afinidad de los anticuerpos podría disminuir en la conjugación con la marca, disminuyendo así la sensibilidad, y los impedimentos estéricos derivados de la conjugación podrían obstaculizar la interacción antígeno-anticuerpo también. Por lo tanto, la afinidad del anticuerpo marcado por el antígeno no se puede predecir y en algunos casos será importante la realización de ensayos de *screening* para la selección de los anticuerpos [29].

Métodos de selección de anticuerpos para los inmunoensayos de flujo lateral

Una práctica común para el *screening* y selección de anticuerpos para los LFIA es el uso de sistemas ELISA. Sin embargo, aunque este enfoque es útil para encontrar pares de anticuerpos potenciales y pueden proporcionar resultados que permitan la clasificación de anticuerpos con respecto a la afinidad relativa, a menudo no es predictivo del rendimiento en los LFIA, ya que las condiciones de ensayo son muy diferentes. Típicamente, estos ensayos ELISA implican largos tiempos de incubación. Las reacciones son, por lo general en el equilibrio, y las concentraciones de anticuerpos empleadas son mucho más bajas que en los LFIA.

El ensayo de manchas o puntos representa un método más adecuado y rápido para predecir los anticuerpos que resultarán más útiles en los LFIA. Es un método muy simple y es susceptible de cribado de un gran número de anticuerpos y condiciones de ensayo. Se utiliza un formato de *dipstick* modificado, donde se ha eliminado también la almohadilla de muestra. En un formato tipo sándwich, el anticuerpo de captura es inmovilizado en la membrana y el antígeno se mezcla previamente con el conjugado, ya sea en pequeños tubos o placas de microtitulación. La tira se sumerge a continuación en esta solución. Las interacciones no específicas aparecerán como puntos completa o parcialmente llenos en presencia de solo reguladora. Cuando las interacciones no específicas son muy débiles, con frecuencia pueden eliminarse más tarde a través de agentes bloqueantes o tensoactivos. Estas reacciones no específicas entre anticuerpos son atribuibles a interacciones de cargas entre ellos. Cuando el antígeno está presente en el ensayo, debe observarse un punto en el lugar donde se ha inmovilizado el anticuerpo. Las interacciones fuertes de alta afinidad, que como se ha comentado suelen ser las más deseables, sólo mostrarán señal en el borde delantero del punto (forma de media luna), lo que indica que todos los antígenos están siendo capturados de manera efectiva tan pronto como entran en la zona donde se encuentra el anticuerpo (Figura 7) [16,42].

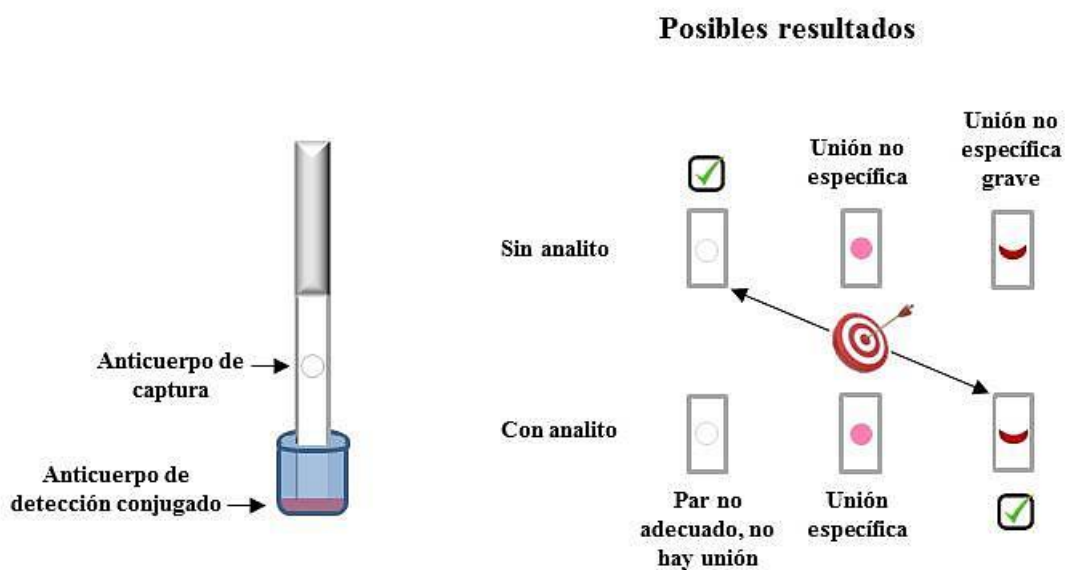


Fig. 7 Método de selección del par de anticuerpos para los inmunoensayos de flujo lateral basado en el ensayo de manchas o puntos. La situación ideal en cada caso se encuentra señalada con un *tick* verde.

Tipos de anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los LFIA pueden ser monoclonales, policlonales, o ambos, aunque cada vez más se están empleando anticuerpos recombinantes. Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales tienen sus propias ventajas, incluyendo la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales, lo que ayuda a disminuir las interacciones no específicas y la reactividad cruzada, mientras que la capacidad de los anticuerpos policlonales para reconocer múltiples epítomos en un solo antígeno, así como su bajo coste de producción en grandes cantidades, son valiosas propiedades. En la Tabla 1 se muestra una comparativa de las principales diferencias entre estos dos tipos de anticuerpos.

ANTICUERPO POLICLONAL	ANTICUERPO MONOCLONAL
Población heterogénea de anticuerpos, no epítipo específico	Población homogénea de anticuerpos, específicos para un único epítipo
Mayor probabilidad de reactividad cruzada	Baja reactividad cruzada
Puede haber variabilidad entre lotes	Lotes constantes
Producción relativamente barata	Caros de desarrollar
Producción rápida (3 meses aproximadamente)	Producción lenta (6 meses aproximadamente)
Muchas opciones de especies huésped	Pocas opciones de especies huésped

Tabla 1. Principales diferencias entre anticuerpos policlonales y monoclonales

La generación de una respuesta inmune frente al antígeno de interés es un requisito necesario para la producción tanto de anticuerpos policlonales como monoclonales [43]. Para la obtención de anticuerpos policlonales, el antisuero se produce mediante la inyección del antígeno de interés en un animal. Los conejos suelen ser los más utilizados, pero el uso de animales más grandes como ovejas o cabras favorece la obtención de volúmenes más grandes. Estos anticuerpos generalmente requieren una purificación por afinidad para hacerlos más adecuados para su uso en LFIA. En una preparación típica de anticuerpos policlonales, sólo del 0,2 al 2% del total de anticuerpos están dirigidos contra el antígeno de interés. El resto no son específicos, pero competirá con los anticuerpos específicos en la unión a la membrana de nitrocelulosa durante el proceso de inmovilización y en el proceso de conjugación por la unión a la marca, lo que limita la densidad de anticuerpo específico efectivo y por tanto la sensibilidad del ensayo [42,44].

Los anticuerpos monoclonales son el resultado de la fusión de linfocitos B productores de anticuerpos, con frecuencia obtenidos del bazo del animal inmunizado, generalmente un ratón, con una línea celular de mieloma. De esta fusión resulta un hibridoma o célula fusionada que conserva la propiedad de la célula de mieloma de crecer indefinidamente en cultivo y la propiedad de los linfocitos B para secretar anticuerpos. La fusión en sí es rápida y sencilla, pero posteriormente se requiere una cantidad considerable de trabajo para aislar las células fusionadas de las que no se han fusionado y para localizar aquellos híbridos que están secretando el anticuerpo específico contra el antígeno diana. Eso sí, una vez que un clon de hibridoma se ha creado, pueden utilizarse como un

recurso constante y renovable de anticuerpos monoclonales. Los hibridomas también se pueden inyectar en la cavidad peritoneal de un ratón con el fin de crear un tumor secretor de líquido ascítico rico en anticuerpos. La ventaja de este método es que se pueden obtener altas concentraciones de anticuerpos [45].

Como en muchas otras aplicaciones, los anticuerpos deben de ser purificados para su uso en LFIA. Para ello, hay disponibles una gran variedad de técnicas de purificación. El procedimiento más común incluye un fraccionamiento salino seguido de una cromatografía de intercambio iónico, de proteína A (o proteína G), o métodos de afinidad. No obstante, hay varios aspectos críticos que deben ser considerados. Debido a que se utilizan en concentraciones relativamente altas (niveles de mg/mL frente a concentraciones del orden de los $\mu\text{g/mL}$ en ensayos ELISA), los anticuerpos tienen que ser muy puros (idealmente $>98\%$), ya que la existencia de otras proteínas contaminantes pueden obstaculizar la unión óptima al antígeno. Por otro lado, la composición de la reguladora es también un factor importante. La exposición de los anticuerpos a condiciones duras de almacenaje (pH o fuerza iónica extremos) debe evitarse a fin de minimizar la desnaturalización. Además, la presencia de altas concentraciones de sales pueden afectar a la reactividad de los anticuerpos. Otra consideración a tener en cuenta es la especie seleccionada para la generación de los anticuerpos. Así, por ejemplo, el uso de anticuerpos de pollo (IgY), que presentan un alto contenido en lípidos procedentes de la yema, requiere su retirada antes de la purificación. Además, a diferencia de otros anticuerpos de mamíferos, las IgY no se unen a las proteínas A o G, haciendo que su purificación sea un proceso más complejo [42,46].

Cuando se lleva a cabo el diseño de un LFIA tipo sandwich y se cuenta con disponibilidad de varios tipos de anticuerpos, el anticuerpo de captura generalmente es un monoclonal, ya que es deseable tener la mayor especificidad posible, capturando solamente al analito diana. Dado que los anticuerpos policlonales pueden unirse a diferentes epítomos del analito, los anticuerpos policlonales suelen preferirse para la detección, con el fin de aumentar las posibilidades de unión, aumentando así la intensidad de la señal que se genera.

Otros elementos de reconocimiento biológicos

Además de los ensayos convencionales basados en anticuerpos, las aplicaciones emergentes de las tiras de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos en forma de

sondas de ADN [47] y aptámeros [48] están ganando importancia rápidamente. Los aptámeros son ligandos cortos de ADN monocatenario o ARN que pueden adoptar conformaciones tridimensionales específicas para interactuar con los analitos diana con alta especificidad y afinidad, de una manera similar a los anticuerpos. Son útiles por tanto en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de los anticuerpos. Además ofrecen la ventaja de que se producen fácilmente por síntesis química [49].

1.2.3.5. Elementos de generación de la señal en inmunoensayos de flujo lateral

La selección de la marca empleada para llevar a cabo la detección del ensayo generalmente depende de la aplicación que vaya a tener el sistema de LFIA, en particular de los requisitos de sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad, de la complejidad (la necesidad de lectores) y del coste. Aunque existen una gran variedad de estrategias para la lectura e interpretación de la señal generada en los LFIA, los métodos ópticos siguen siendo los más explorados debido a la presencia de marcas de colores que evitan la necesidad de costosos detectores y permiten la detección visual del analito de interés (conocido en inglés como *naked-eye detection*) [50].

Una gran variedad de nanomateriales pueden ser utilizados como marcadores colorimétricos en LFIA, entre los que se incluyen las partículas de látex, las nanopartículas de oro (AuNPs), quantum dots (QDs), partículas magnéticas (MB), nanopartículas de carbono (CB), liposomas y enzimas [51]. La modificación de la superficie y la funcionalización de los nanomateriales juegan un papel crítico en el desarrollo de las plataformas con fines biomédicos. Cualquier material que sea empleado como marca debe ser detectable a muy bajas concentraciones y conservar sus propiedades cuando se conjuga con la especie de bio-reconocimiento. A su vez, se espera que este proceso de conjugación no provoque una pérdida de las características de los elementos de reconocimiento, por ejemplo por bloqueo del sitio de unión del antígeno al anticuerpo, como ya se ha comentado anteriormente. La unión de las nanopartículas a las inmunoglobulinas puede llevarse a cabo por enlaces no covalentes, mediante atracciones electrostáticas, hidrofóbicas o por enlace dativo [52,53], o por enlace covalente por medio de los grupos $-NH_2$, $-COOH$ y $-SH$ presentes en la estructura del anticuerpo [54,55] (Figura 8).

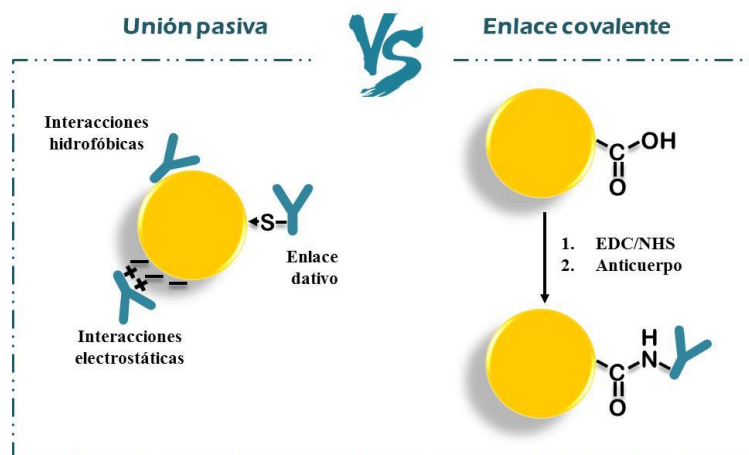


Fig. 8 Conjugación de nanopartículas a los anticuerpos por diferentes tipos de interacciones: uniones no covalentes (izquierda) y ejemplo de conjugación covalente por medio de grupos $-NH$ presentes en la estructura del anticuerpo (derecha).

Por tanto, la facilidad de conjugación con materiales biológicos es una característica importante a la hora de seleccionar una marca. No obstante, existen otros factores que deben tenerse en cuenta. Una marca ideal debe cumplir ciertos requisitos, como ser susceptible de detección por varios métodos en un intervalo dinámico amplio, poseer baja o despreciable unión no específica en las condiciones de ensayo, ser estable durante largos periodos de tiempo tras su conjugación y fácil de producir y/o comercialmente disponible en el mercado a bajo coste [56]. Además, una vez finalizado el ensayo, algunas marcas generan una señal de forma directa (como un color rojo en el caso del oro coloidal), mientras que otras requieren pasos adicionales para producir la señal analítica, como es el caso de las enzimas donde es necesaria la adición de un substrato adecuado [57,58]. A pesar de los avances realizados en los últimos años en el desarrollo de los LFIA, ninguna marca posee todas las características mencionadas. Por lo tanto, como se dijo anteriormente, la elección de la marca se determina en gran medida por el ensayo a desarrollar y la simplicidad del análisis.

Uno de los primeros ejemplos del uso de AuNPs como marca en LFIA se aplicó para la detección de ricina [59]. Desde entonces, las AuNPs se han convertido en uno de los materiales más populares en la última década para la detección de analitos por LFIA, siendo posiblemente la marca más empleada en los ensayos comerciales en la actualidad, principalmente debido a que son fáciles de preparar y conjugar con compuestos biológicos, a su estabilidad, a que son biocompatibles y a sus propiedades

ópticas, dependientes del tamaño y forma de partícula [60,61]. La acumulación de las AuNPs en las líneas de test y de control produce un intenso color fácil de detectar a simple vista o en ocasiones mediante el uso de lectores de color para lograr mejores límites de detección. Otro material ampliamente utilizado como marca coloreada son las partículas de látex, las primeras utilizadas para los LFIA. Las partículas de látex son de bajo coste y tienen la capacidad de incorporar tintes de color (incluyendo colorantes fluorescentes). Las características principales de estas y otras marcas se muestran en la Tabla 2.

Marca	Ventajas	Desventajas	Ejemplos de uso en LFIA
Látex	<p>Coste relativamente bajo</p> <p>Gama de colores disponibles (pueden incorporar tintes fluorescentes)</p> <p>Posibilidad de funcionalización con distintos grupos (varias técnicas de conjugación)</p> <p>Visualización clara en formato multiplex</p>	<p>Menos sensible que el oro como marca visual debido a baja densidad de color y mayor tamaño (menor empaquetamiento en línea de test)</p> <p>Necesidad de uso de agentes tensoactivos debido a la hidrofobicidad y al tamaño de partícula</p>	[62,63]
Oro	<p>Relativamente fácil y barato de preparar en el laboratorio</p> <p>Diferentes tamaños disponibles</p> <p>Relativa alta sensibilidad</p> <p>Métodos de conjugación bien caracterizados</p>	<p>No hay opciones de color, mayor dificultad para formato multiplex</p> <p>Generalmente técnicas de conjugación pasiva</p> <p>Relativamente inestable a cambios de pH y presencia de sales</p>	[64,65]
Carbono coloidal	<p>Barato</p> <p>Relativamente fácil de conjugar</p> <p>Buena estabilidad de la marca y de los conjugados</p> <p>Gran contraste de color</p>	<p>Conjugación por adsorción</p> <p>Tiempos de conjugación largos (desde una a varias horas)</p> <p>Pocos proveedores de partículas de carbón bien caracterizadas</p> <p>Su uso en LFIA comerciales requiere un acuerdo de licencia de los vendedores</p>	[66,67]
Bolas magnéticas	<p>Puede recubrirse de polímero, permitiendo varias técnicas de conjugación (adsorción y covalentes)</p> <p>Permite la separación y preconcentración del analito, evitando efectos de matriz</p> <p>El uso de detectores magnéticos permite medir las partículas de la línea de test, incluyendo las presentes debajo de la superficie</p>	<p>La intensidad de la señal suelen estar relacionados con el tamaño</p> <p>Generalmente poco contraste de color</p> <p>Baja disponibilidad de lectores magnéticos portátiles, normalmente caros</p>	[68,69]
Nanopartículas fluorescentes	<p>Sensibles</p> <p>La conjugación puede realizarse por varias técnicas</p> <p>Bandas de absorción anchas</p>	<p>Pueden ser costosas</p> <p>Más difícil optimizar y estabilizar conjugados</p> <p>No hay señal visual directa, requiere el uso de un lector</p> <p>Debe de tenerse cuidado con la presencia de materiales auto-fluorescentes, por ejemplo: la nitrocelulosa</p>	[70,71]

Tabla 2. Tabla resumen con las características de las principales marcas empleadas en los inmunoensayos de flujo lateral.

En los últimos años ha crecido la tendencia al desarrollo de nuevas marcas o a la mejora de las existentes, con el fin de conseguir sistemas más sensibles introduciendo mejoras en la generación de la señal analítica a través de partículas con mayor brillo o facilitando su detección [72,73]. Así, por ejemplo, la modificación de las AuNPs con

otros metales o compuestos permite mejorar la sensibilidad del ensayo sin pasos adicionales. Dentro de éstas, las nanopartículas conocidas como *core-shell* (núcleo formado por un material y corteza por otro material distinto) son cada vez más populares debido a su brillo. Hay una amplia gama de combinaciones que pueden llevarse a cabo, utilizando tanto materiales orgánicos como inorgánicos. Ejemplos de estas combinaciones son las de AuNPs/plata [74] y las microesferas de AuNP magnéticas (formadas por Fe_2O_3 en el núcleo y recubiertas de oro) [75]. Además de aumentar la señal visual, estas modificaciones pueden permitir la separación y preconcentración del analito a través del empleo de imanes gracias a la introducción de propiedades magnéticas a las AuNPs o el acoplamiento a diversos sistemas de detección, como puede ser la espectroscopía RAMAN [76] o los detectores magnéticos [77].

Una nueva opción en el campo del flujo lateral que muestra prometedores resultados en la generación de sistemas visuales sensibles y cuantitativos es NanoAct, una nueva marca de celulosa con alto rendimiento para su uso en LFIA. Estas partículas son muy estables, con colores intensos y han demostrado un mejor rendimiento respecto a las marcas estándar. Además, están disponibles en varios colores, lo que facilita su uso en formatos multiplex [16,78].

1.2.3.6. Métodos de lectura e interpretación de las señales

Como se acaba de ver en el apartado anterior, en el caso de las AuNPs u otras marcas de color, el análisis cualitativo o semi-cuantitativo se puede hacer mediante la inspección visual del color en las líneas de test y de control. La principal ventaja de la inspección visual, es la respuesta cualitativa rápida "Sí" o "No", en función de la presencia o ausencia de la línea de test. Respuestas de este tipo son importantes ya que pueden ayudar a los clínicos a la toma inmediata de decisiones, tanto en situaciones hospitalarias donde los análisis en el laboratorio central requerirían un mayor consumo de tiempo, como en zonas más alejadas, como puede ser un consultorio periférico o rural. Normalmente, esta prueba cualitativa es adecuada para el análisis de un analito diana a una concentración de hasta un límite conocido. Este es el caso, por ejemplo del test de embarazo. Sin embargo, existen casos en los que la presencia del analito no es concluyente para realizar un diagnóstico clínico, y la línea de test se presenta en una

tonalidad de color diferente en función de la concentración del analito. En estos casos, para evitar el uso de lectores adicionales, la línea de test puede compararse con una tarjeta de referencia que contiene una escala de color. Así, usando rangos de color, el test PCT-Q® (Brahms, Germany) para la medida de procalcitonina (PCT) en suero, permite la clasificación del estado del paciente en una de cuatro categorías en función del nivel de PCT (Figura 9A) [79,80]. Otra alternativa para llevar a cabo el análisis semi-cuantitativo es el empleo de los LFIA tipo “código de barras”. El diseño básicamente es como el de un formato multiplex, pero en esta ocasión todas las líneas de test contienen la misma molécula de captura, y el número de líneas de test que aparecen en la zona de detección se relaciona directamente con la concentración del analito en la muestra. Debido a su simplicidad, el estilo de código de barras se ha utilizado en varios estudios para estimar la concentración de diversos analitos diana, como la proteína C-reactiva (PCR) en suero [81] o la gliadina en muestras alimentarias [82].

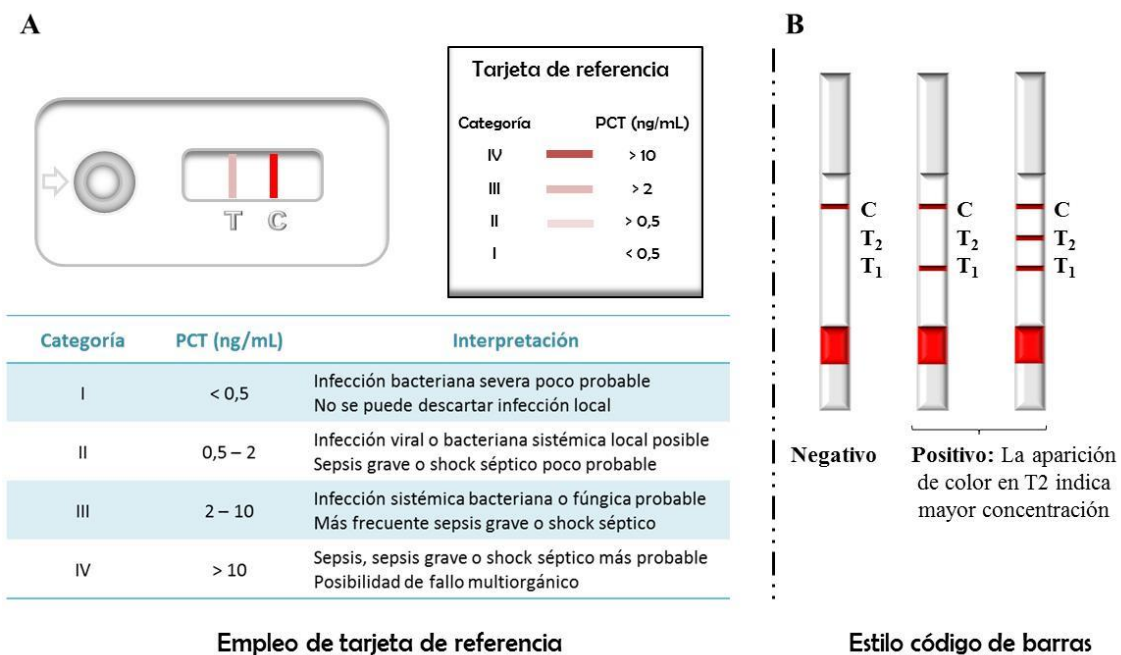


Fig. 9 Inmunoensayos de flujo lateral semi-cuantitativos mediante la inspección visual del color. A) Empleo de una tarjeta de referencia para determinar la concentración del analito e interpretación del resultado. En este ejemplo, el paciente sería incluido en la categoría III. B) LFIA estilo código de barras. Se generan una o dos líneas de test de color rojo, reflejando la concentración del analito.

Aunque estos métodos de interpretación han demostrado ser simples y rápidos, dan lugar a problemas principalmente relacionados con la subjetividad de los operadores. Además, diferencias en las condiciones de iluminación también pueden dar lugar a una variación de los resultados informados, especialmente cuando la intensidad de la señal es baja, haciendo que sea prácticamente imposible el desarrollo de sistemas cuantitativos. En entornos clínicos y de campo también existe la posibilidad de pérdida de datos o errores de transcripción de la información del paciente. El desarrollo de ensayos con sistemas de lectura integrados es una característica necesaria para muchos sistemas POC de nueva generación, ya que la transformación del color en un resultado cuantitativo preciso puede apoyar la toma de decisiones. Por ello, hoy en día se está produciendo una creciente demanda de sistemas automatizados, de fácil manejo, portables y de bajo coste [83,84]. Aunque existe una gran variedad de estrategias para llevar a cabo las lecturas de las tiras de LFIA, los métodos ópticos continúan siendo los más explorados debido a su simplicidad y eficacia.

Una alternativa sencilla para lograr el análisis cuantitativo es el empleo de cámaras o de escáneres. Estos aparatos se pueden utilizar para registrar la intensidad del color, que como ya se dijo anteriormente, se relaciona con la cantidad de analito. Por tanto, un escáner de escritorio o una cámara fotográfica se puede utilizar para adquirir las imágenes de los resultados del ensayo, y la intensidad de la línea de test puede ser analizada por un software de procesamiento de imágenes, como el Photoshop o el ImageJ, cuantificando la intensidad de los píxeles en la zona de detección. Desde una perspectiva técnica, muchos de los modelos actuales de escáneres ofrecen imágenes en color con gran resolución y con un posicionamiento e iluminación reproducibles. Además son compactos y pueden ser controlados totalmente por medio de una conexión USB o por comunicación inalámbrica por un ordenador portátil o de sobremesa [10,85]. En el caso de las cámaras, el procedimiento incluye la colocación correcta de la tira debajo de la cámara y controlar la cantidad de luz que es proyectada en las zonas que van a ser analizadas [26].

En el desarrollo de instrumentación para la aplicación POC, el objetivo es diseñar ensayos y dispositivos que tengan el nivel adecuado de complejidad. Los sistemas automatizados tienen ventajas sobre los métodos manuales de adquisición y procesamiento de imágenes, haciendo que la interpretación de los resultados sea relativamente más fácil, con menor consumo de tiempo (el escaneo de la tira se realiza

en unos pocos segundos) y se reduzca la posibilidad de error humano. En este sentido, comercialmente se han desarrollado lectores de tiras que están disponibles para su uso en una gran variedad de entornos y aplicaciones. Estos lectores pueden ser de mano o sistemas de sobremesa [16].

Un lector de tiras de flujo lateral convencional es un tipo de escáner que ilumina la tira con un haz de luz y mide la atenuación de la luz reflejada desde la superficie de la tira en función de la posición longitudinal. Para ello, el escaneo colorimétrico se realiza moviendo una fuente de luz a lo largo de la tira o viceversa. El instrumento se ajusta de modo que la luz reflejada desde la membrana es recibida por un detector confocal (fotodiodo), que registra la señal y la convierte en una señal eléctrica que se relaciona con la concentración de analito en la muestra. Cuando el haz de luz pasa sobre la línea de control o de test, la luz reflejada se reduce debido a que las partículas de oro coloidal presentes en la línea (o en su lugar partículas de látex coloreadas, nanopartículas de carbono, etc.) absorben luz a esa longitud de onda. Esta intensidad de luz reducida se muestra como una banda negativa (Figura 10). Es importante señalar que las medidas descritas aquí no son medidas de absorción, ya que la fuente de luz y el detector están dispuestos en una configuración confocal (0° ángulo) y no de 180° . Estas medidas se corresponden con medidas de reflectancia [86,87].

Para las medidas de fluorescencia, el proceso de escaneo es el mismo que el descrito anteriormente para los ensayos colorimétricos, con la única diferencia de que el lector ahora contiene un detector de fluorescencia en lugar de uno de reflectancia. El sensor se mueve a lo largo de la tira y excita las partículas fluorescentes presentes en las líneas de control y de test. La luz fluorescente emitida por estas partículas es recibida por el detector confocal, traduciéndose en un aumento de la fluorescencia en el sensor y, por lo tanto, en la aparición de picos positivos (por encima de la línea de base), como se muestra en la Figura 10 [87].

Las fuentes de luz para las lecturas ópticas son normalmente LEDs (diodos emisores de luz) de luz blanca para la lectura de marcas colorimétricas como las AuNP, las partículas de látex de color, y las nanopartículas de carbono y LEDs de color o diodos láser para los colorantes fluorescentes y QDs [85].

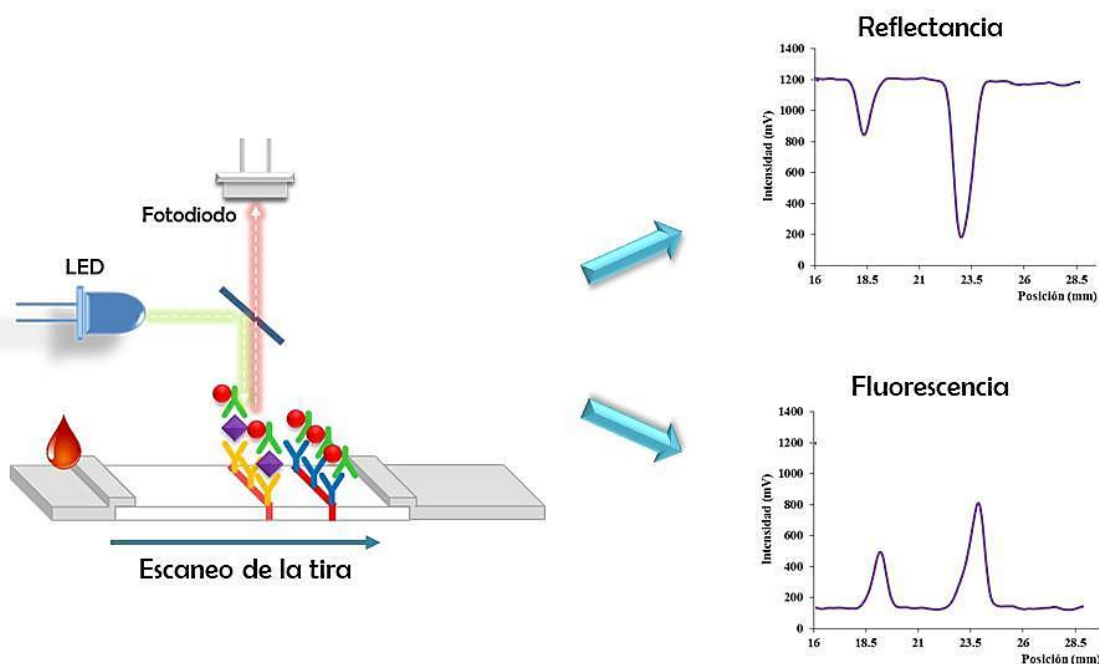


Fig. 10 Acoplamiento de un lector de tiras para inmunoensayos de flujo lateral con detección colorimétrica (reflectancia) o de fluorescencia. Un haz de luz se mueve a lo largo de la tira de flujo lateral. En el caso de la reflectancia, los picos son negativos debido a que al detector llega menos luz por la absorción de la marca empleada a esa longitud de onda.

Comercialmente existen varios lectores ópticos disponibles basados en los principios de reflectancia o de fluorescencia para su uso en LFIA. Uno de los productos más exitosos en el mercado es la prueba de embarazo Clearblue® DIGITAL (SPD Swiss Precision Diagnostics GmbH), que tiene un lector óptico integrado basado en reflectancia que convierte el color azul (partículas de látex) en un resultado digital. En el área de los marcadores cardíacos, Roche Diagnostics ha desarrollado el sistema cobas h 232 POC usando un lector óptico portátil para la medida cuantitativa de tiras de flujo lateral, empleando AuNP como marca, para la detección de mioglobina y troponina, entre otros marcadores. Con el fin de mejorar la sensibilidad de detección a concentraciones de los biomarcadores, Alere Inc. ha desarrollado un lector de flujo lateral portátil basado en fluorescencia para la detección cuantitativa de una serie de marcadores cardíacos, tales como CK-MB y troponina (Triage® Cardio3 Panel) [83]. No obstante, hay muchos otros lectores de tiras de flujo lateral independientes, que pueden emplearse para la lectura de tiras en general, desarrollados por empresas como LRE Médica (Alemania), Detekt Biomédica (Austin, Estados Unidos), Qiagen (Alemania), Alverix (EE.UU.) y Axxin Inc. (Australia).

Estos dispositivos de lectura son ideales para su aplicación en muchos ambientes del primer mundo, ya que son robustos, de coste relativamente bajo (los precios van desde unos pocos cientos de dólares a unos pocos miles de dólares) y son unidades de alto rendimiento con servicio al cliente asociados. Sin embargo, para países en vías de desarrollo, estos lectores son generalmente demasiado complejos y caros, y la infraestructura necesaria para realizar las calibraciones, el mantenimiento y las operaciones es escasa o no está disponible.

Un enfoque alternativo, todavía en las primeras etapas de desarrollo, es el uso de los teléfonos móviles para transformar los resultados de pruebas analógicas en formato digital. Los teléfonos inteligentes actuales proporcionan una plataforma digital prometedora para el diagnóstico POC, ya que están equipados con una cámara de alta resolución, un procesador de gran alcance con alta capacidad de almacenamiento, conectividad inalámbrica, geo-etiquetado en tiempo real, gestión de datos segura y acceso a la nube informática. Estas características convierten a los teléfonos móviles en una plataforma integrada, con la que puede realizarse la adquisición de imágenes, visualización, procesamiento y almacenamiento de los resultados o la comunicación de los mismos para su posterior interpretación por profesionales médicos u otro personal altamente cualificado, ya sea a nivel local o en cualquier parte del mundo. Gracias al rápido aumento de la cobertura y al uso de los teléfonos móviles en todo el mundo, estos dispositivos prometen ser herramientas potentes en el diagnóstico y la telemedicina [20,83,85,88]. El empleo de teléfonos móviles como sistemas de detección ópticos para LFIA colorimétricos ya se ha empleado, por ejemplo en la detección de malaria, tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [89], salmonella [90], drogas de abuso en saliva [91] o para cuantificación de niveles de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) [92]. Además, se ha demostrado el empleo de los teléfonos móviles no solo para marcas de color, sino también como detectores de quimioluminiscencia para la cuantificación de cortisol en muestras de saliva [93].

Además de los teléfonos móviles, están surgiendo dispositivos electrónicos portátiles, como por ejemplo relojes inteligentes y gafas con sensores de inercia integrada o adaptada, imágenes audiovisuales y aparatos de grabación y conectividad inalámbrica. Uno de estos dispositivos inteligentes, las gafas de Google, consiste en un sistema de computación de manos libres que se controla por voz, con capacidad para adquirir imágenes y grabar vídeos, y con diversas tecnologías inalámbricas incluyendo

Bluetooth y Wi-Fi. El acoplamiento de este dispositivo a los LFIA permite la construcción de un sistema de detección óptico, como ya se ha demostrado para la cuantificación del antígeno prostático específico (PSA, marcador de cáncer de próstata) y del VIH [94].

Estas tendencias de la tecnología, que se están moviendo hacia la integración de instrumentación óptica con productos de consumo generales como los teléfonos móviles o los escáneres de escritorio, junto con la tecnología del LFIA podrían proporcionar una nueva solución para una amplia variedad de diagnósticos POC, para una gestión de la asistencia sanitaria descentralizada o para otras aplicaciones.

Hasta este momento únicamente se ha hablado de sistemas de detección ópticos. No obstante, existen otros sistemas de lectura de la señal, aunque se encuentran menos explotados, sobre todo a nivel comercial.

A lo largo de los años, la electroquímica (EC) ha demostrado ser una herramienta muy poderosa en el desarrollo, miniaturización y descentralización de sensores biomédicos. Dado que la detección EC posee características tales como una alta sensibilidad y selectividad, bajo coste y portabilidad, se ha aplicado ampliamente en diversos ensayos, proporcionando así un esquema de detección alternativa para los diagnósticos basados en papel [95]. El ejemplo más exitoso de detección EC es el medidor de glucosa en sangre en tira de reactiva para los pacientes diabéticos [96]. La detección EC por lo general requiere de tres electrodos: un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. Debido a las pequeñas dimensiones de las tiras, a menudo se utilizan electrodos serigrafiados. Para llevar a cabo la detección EC en las tiras se requiere la existencia de una especie electroactiva o una marca que facilite la producción de un producto electroactivo. La magnitud de la respuesta EC de la especie electroactiva se puede correlacionar con la concentración del analito en la muestra [97]. Algunos de los procedimientos iniciales para acoplar las tiras a la detección EC requerían cortar la línea de test para llevar a cabo la medida, como en el caso de la detección de testosterona basada en el uso de un enzima para generar un producto electroactivo [98]. Hoy en día, los electrodos pueden ser fácilmente miniaturizados por diferentes métodos como la serigrafía, la impresión de tinta o la fotolitografía, lo que permite su fácil incorporación en un diseño de LFS. De este modo, ya se han publicado trabajos en los que se produce una total integración de los electrodos en la tira, como es

el caso de la detección del PSA mediante el uso de QDs [99], la cuantificación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, biomarcador de daño oxidativo del ADN [100] o del virus del dengue utilizando ferroceno como etiqueta redox [101].

Los métodos ópticos y electroquímicos presentados sufren de un inconveniente básico, que es que sólo las partículas en la superficie de la tira o en contacto con los electrodos, respectivamente, contribuyen de manera significativa a la señal. La sustitución de estas marcas por etiquetas paramagnéticas o nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs) resuelve este problema, ya que el empleo de un lector magnético adecuado permite medir las señales magnéticas procedentes de las partículas dentro de todo el volumen de la membrana, no sólo en la superficie, permitiendo el desarrollo de tiras de flujo lateral con una mayor sensibilidad y precisión. Además, estas marcas son estables y por lo tanto las tiras pueden volver a analizarse si es necesario. [50]. En el mercado están disponibles una serie de sensores magnéticos para la cuantificación en LFIA, como el lector Magnia® Reader (Magnasense Technologie, Finlandia) o la tecnología MICT® (MagnaBioSciences LLC, Quantum Design, USA), empleado, por ejemplo, para la detección de *Bacillus anthracis* [102].

1.2.4. Dispositivos de análisis de microfluídica en papel (μ PADs)

En los últimos años, el uso de papel para la fabricación de dispositivos de diagnóstico ha ganado mucho interés, debido en gran parte a la necesidad de utilizar materiales de bajo coste que puedan ser aplicados en entornos de pocos recursos. Los dispositivos analíticos de microfluidos en papel (μ PADs) representan una nueva generación de plataformas de diagnóstico POC que integran las capacidades multiplex de la microfluídica con la flexibilidad y la simplicidad de la tecnología de LFIA [103]. La microfluídica basada en papel es una tecnología emergente que utiliza papel como sustrato a través de la creación de patrones complejos de canales hidrófilos y barreras hidrófobas mediante el uso de técnicas de modelado, como por ejemplo la fotolitografía, la impresión con tinta de inyección, la impresión con cera, o la generación de patrones por corte o asistido por láser [104,105]. En su forma ideal, los μ PADs son sistemas de análisis que presentan todos los componentes necesarios para llevar a cabo el ensayo integrados en el dispositivo (transporte de la muestra, pre-tratamiento, reactivos para el ensayo, sistemas de generación de la señal, etc.) [106]. Igual que en el caso de los LFIA,

el transporte de los fluidos en los μ PADs depende completamente del flujo capilar, por lo que no es necesario un sistema de bombeo externo. Por otro lado, la introducción de características de microfluidos a las tiras reactivas clásicas permite aumentar su funcionalidad y su rendimiento. La separación espacial en la introducción de la muestra y en la detección de la señal permite dividir la muestra para la realización de diferentes ensayos, el pre-tratamiento de la muestra en el propio dispositivo o retardar el tiempo de incubación, por mencionar algunas de las opciones que no se encuentran disponibles en los ensayos llevados a cabo en las tiras reactivas (Figura 11).

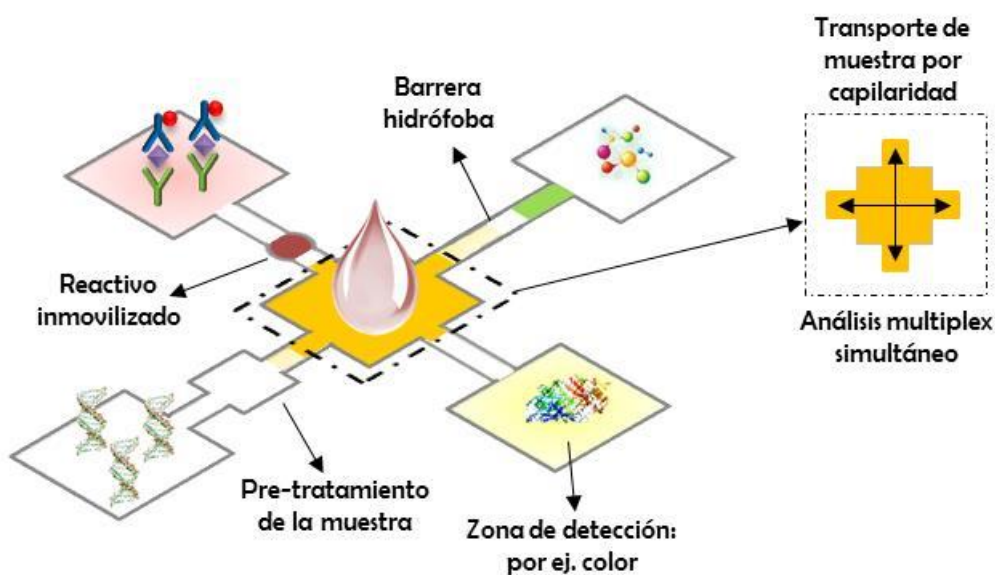


Fig. 11 Ejemplo de representación esquemática de un dispositivo analítico de microfluidos basado en papel (μ PAD), ilustrando su carácter multifuncional.

Una de las técnicas más empleadas para la creación de patrones es la impresión con cera, debido principalmente a la sencillez del procedimiento. Para realizar esta técnica, un patrón de cera se imprime en una hoja de papel, generalmente papel de filtro o papel cromatográfico, usando una impresora de tinta sólida disponible comercialmente. A continuación el papel se calienta para fundir la cera de modo que ésta se extiende a través del espesor del papel, formando una barrera hidrófoba. El procedimiento es fácil, rápido (aproximadamente 5 minutos) y sólo requiere de dos unidades de equipamiento: una impresora de tinta sólida y una placa calefactora u horno [107]. Además con esta técnica el coste por dispositivo es de casi cero, característica que la hace aún más atractiva [108].

En los últimos años se han diseñado distintos modelos de estos dispositivos usando la tecnología de impresión en cera y la fotolitografía fundamentalmente, y algunos de ellos se han aplicado al campo de la clínica [109,110]. En estos dispositivos, cuando la disolución de la muestra procedente de la zona de adicción alcanza la zona de detección en el papel, se produce una reacción química, como puede ser una reacción ácido-base, una reacción de precipitación, redox o una reacción enzimática, que provoca la aparición de un compuesto y el consecuente desarrollo de la señal, que puede ser detectada por diferentes métodos. Por ejemplo, en 2009, Carrilho et al [107] desarrollaron una plataforma para la detección simultánea de proteínas, colesterol y glucosa en fluidos biológicos. La detección en este dispositivo se basó en un ensayo colorimétrico, pudiendo cuantificar el cambio de color mediante el uso de una cámara o un escáner para registrar la intensidad del color y posterior procesamiento de imágenes con Adobe Photoshop o con un software similar, como ya se explicó en el apartado de los métodos de lectura e interpretación de la señal. Con el paso de los años se han ido desarrollando otros métodos de detección, además de los colorimétricos, para estos dispositivos. Así, por ejemplo, Noiphung et al [111] han fabricado una nueva plataforma μ PAD para la detección electroquímica de glucosa a partir de muestras de sangre total, separando las células rojas del plasma en el mismo dispositivo. Por otro lado, Liang et al [112] propusieron la detección de células cancerígenas empleando estos dispositivos y acoplándolos tanto a una detección visual como a medidas de fluorescencia. Otros métodos de detección se basan en quimioluminiscencia [113], electroquimioluminiscencia [114] o fotoelectroquímicos [115], por ejemplo.

Debe de tenerse en cuenta que la investigación sobre los μ PADs se encuentra todavía en una fase inicial, y por lo tanto, se requieren esfuerzos significativos en el campo de la investigación para que estos dispositivos sean prácticos y realmente útiles, y sobre todo para ampliar sus prestaciones para su uso como sistemas POC.

1.3. TECNOLOGÍAS POC EMERGENTES: EL LABORATORIO EN UN DISCO

Los acontecimientos recientes en el área del diagnóstico POC han llevado a muchos investigadores, médicos y responsables políticos a explorar el potencial de los avances tecnológicos con el fin de llevar algo de alivio a los pacientes en las zonas más remotas y más pobres del globo terrestre. Como se ha comentado en el apartado anterior, dentro del área de la microfluídica, los sistemas basados en papel para análisis POC han demostrado ser baratos, fiables, versátiles y, al emplear papel como sustrato, fácilmente eliminables. Sin embargo, estos sistemas presentan ciertas limitaciones como la robustez, la especificidad y, en ciertos casos, falta de sensibilidad. Además, las condiciones de ensayo extremas pueden afectar el rendimiento de estos dispositivos, provocando efectos negativos en los reactivos utilizados o modificando la velocidad de migración del líquido y el reconocimiento entre moléculas. Procesos como estos se encuentran influidos por la temperatura y la humedad del entorno, lo que puede conducir a diferentes resultados en función de las condiciones del medio. Estas deficiencias sugieren la necesidad de un sistema basado microfluidos más sofisticado y robusto, que permita una atención al paciente eficaz. En este sentido, las plataformas centrífugas de microfluidos, también conocidas como laboratorio en un disco (*lab-on-a-disc*) o laboratorio en un CD (*lab-on-a-CD*), tienen un gran potencial para convertirse en una herramienta estándar para el diagnóstico POC [116,117].

La tecnología de microfluidos centrífuga hace uso de un disco, similar en tamaño y forma a un CD o un DVD, para albergar canales microfluídicos y diferentes procesos. La propulsión del líquido por bombeo centrífugo requiere una mínima instrumentación, un motor simple y compacto capaz de crear las fuerzas necesarias para el transporte de los fluidos, eliminando la necesidad de bombas de jeringa externas. De esta forma, los diferentes procesos, como la mezcla de los reactivos, el ajuste del volumen de muestra o la separación de los componentes de la muestra en base a su densidad, pueden ser automatizados simplemente mediante la aplicación de diferentes perfiles de rotación (diferentes velocidades de giro del motor). Además, se pueden ejecutar varios ensayos individuales al mismo tiempo en el mismo disco (Figura 12).

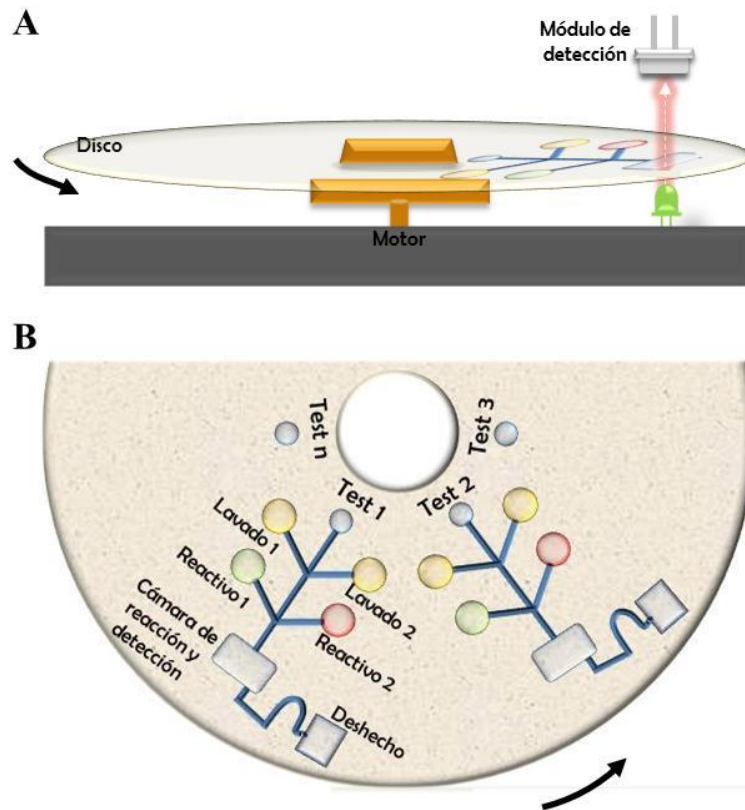


Fig. 12 Representación esquemática de un laboratorio en un disco (*Lab-on-a-disc*). A) Ejemplo de montaje para llevar a cabo la rotación del disco y la detección del analito. B) Ejemplo de diseño para la realización de varios ensayos simultáneamente.

Mediante la utilización de un sistema automatizado *lab-on-a-disc*, limitaciones como el acceso a personal capacitado y a equipos de laboratorio en lugares remotos pueden ser potencialmente superadas. Además, las restricciones en el uso de electricidad y la existencia de condiciones ambientales extremas (altas temperaturas, humedad, polvo, etc.) se pueden solucionar por medio del uso de sistemas que empleen baja potencia para generar el movimiento centrífugo y mediante el uso de biomateriales que permitan la protección y almacenaje de los reactivos. A pesar de su simplicidad, la implementación de estos dispositivos puede conseguir una funcionalidad avanzada y la respuesta a diversas cuestiones, como la realización de análisis de paneles completos de pruebas a bajo coste [118]. La Figura 13 resume los diversos desafíos a los que se enfrentan en las clínicas rurales y en lugares de escasos recursos, con las correspondientes soluciones que puede ofrecer la tecnología de microfluidos en un disco.



Fig. 13 Desafíos presentes en el desarrollo de pruebas diagnósticas en las zonas rurales y países en vías de desarrollo y respuestas que ofrece el laboratorio en un disco. *Ejemplos: panel crítico ya desarrollado para la detección simultánea de cinco parámetros hepáticos [119] y diagnóstico de enfermedad infecciosa (VIH) [120]. Imagen adaptada de [118].

En estos sistemas *lab-on-a-disc*, la mejora de los dispositivos para la realización de bioensayos complejos depende en gran medida del desarrollo de las distintas operaciones que se llevan a cabo en la unidad, incluyendo las etapas de mezcla y tiempos de incubación, apertura de válvulas, los cambios de flujo, la medición de los volúmenes de muestra y reactivos, y su liberación secuencial [121]. De esta forma, la mezcla efectiva de la muestra con los reactivos facilita la reacción física o química y disminuye el tiempo del ensayo.

Las microválvulas y los interruptores de flujo hacen que el flujo de fluido en el disco sea controlable e introducen más posibilidades y funcionalidad al sistema. Este proceso es esencial en estas plataformas, ya que tanto la muestra como los reactivos deben de estar adecuadamente retenidos hasta que se necesiten. Múltiples tipos de válvulas, incluyendo válvulas pasivas y activas, se han desarrollado para el sistema de microfluidos centrífugos y se han implementado con éxito. En el capítulo 3, se describirán algunas de ellas con más detalle.

La medición del volumen de reactivo y de la muestra, sobre todo cuando se trata de sangre total, hace que los ensayos sean más precisos y repetibles. Este ajuste de volumen en un disco se consigue, generalmente, a través de la utilización de un simple “canal de desbordamiento” conectado a la cámara del fluido. Una vez que la cámara ha alcanzado su nivel radial y alcanza este canal, cualquier fluido adicional se dirigirá a una cámara de residuos [122].

Los métodos de fabricación de los discos se pueden dividir en dos grandes grupos: los que emplean polímeros como moldes y los de control numérico por ordenador (CNC, de sus siglas en inglés: *computerized numerically controlled*). Los moldes de polímeros se pueden utilizar para la fabricación en masa de estos dispositivos a bajo coste. Para ello, se requiere de un molde maestro que sea una réplica negativa del diseño del disco deseado [123]. En el CNC, generalmente se utilizan múltiples capas de plástico mecanizadas que luego se alinean y se unen con un adhesivo sensible a presión, en el que se han modelado también los distintos canales y cámaras, con celos o con adhesivos líquidos [124].

Respecto a los métodos de detección, los más ampliamente utilizados se basan en métodos ópticos, por ejemplo, absorbanza, fluorescencia, o la detección basada en imágenes. La lectura óptica tiene varias ventajas, como que no es necesario el contacto físico con el disco, la alta sensibilidad (especialmente cuando se utiliza fluorescencia) y la disponibilidad de los componentes ópticos, como láseres y fotodetectores o incluso componentes desarrollados para unidades de discos ópticos. Sin embargo, estos métodos también plantean algunos problemas, debido principalmente al movimiento centrífugo. Por lo general, el detector y la fuente de luz son estacionarios con respecto al disco giratorio. Esto implica que las medidas se pueden realizar solamente una vez por revolución o que el disco deba detenerse durante las medidas. Además, la luz ambiental puede interferir en estos métodos ópticos, por lo que requieren de un diseño del sistema global más complejo que con otros métodos de detección alternativos [125]. Los sistemas de este tipo se pueden llevar a cabo en un Discman® o dispositivo similar, que incluye un motor para hacer girar el disco y un sistema de láser y lentes para la detección óptica. Los métodos de detección electroquímica, que son de bajo coste, de pequeño tamaño y portátiles, constituyen una buena alternativa a los métodos ópticos. Los nuevos sensores electroquímicos pueden desarrollarse de materiales de bajo coste y permiten la fabricación de dispositivos compactos. Además, estos sensores presentan como ventaja que pueden estar integrados en el disco, y, por lo tanto, pueden girar con él, permitiendo en algunos sistemas la lectura de la señal de forma continua, en contraste con lo que ocurre con los sensores ópticos. Por otro lado, el equipo de detección externo también puede ser simplificado empleando un potenciómetro miniaturizado y la transferencia inalámbrica de los datos, convirtiéndolo en un sistema casi ideal para las aplicaciones de POC [118].

Con el fin de llevar a cabo una simplificación del sistema de detección, algunos autores han optado por el acoplamiento de los discos con sistemas de LFIA (Figura 14). La integración de las tiras en los discos permite la detección rápida y visual del analito, permitiendo que todo el proceso se realice en un sistema compacto y simple. Dispositivos de este tipo se han desarrollado para el análisis molecular de *Salmonella* en alimentos [126] o para la identificación del *Virus Influenza A* (H1N1). En este sistema, además, se propone llevar a cabo un LFIA en formato multiplex para tipificar el virus mediante la detección de dos genes distintos [127].

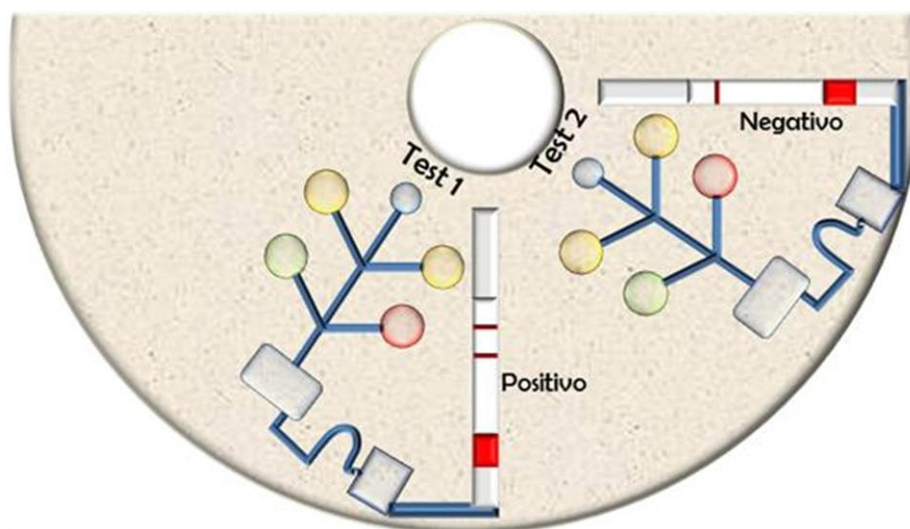


Fig. 14 Representación esquemática de un laboratorio en un disco (Lab-on-a-disc) acoplado a una detección visual con inmunoensayos de flujo lateral (LFIA). En la figura se muestra un resultado positivo (Test 1) y otro negativo (Test 2) en un formato tipo sándwich.

Aplicaciones clínicas

Como ya se ha comentado anteriormente, estos dispositivos basados en discos pueden imitar a los equipos estándar de laboratorio. De hecho, el primer equipamiento de laboratorio emulado en un disco fue una centrífuga. Basándose en diferencias de densidad, se puede llevar a cabo la separación rápida y automatizada de las células rojas de la sangre. Los avances e innovaciones introducidos a lo largo de los años en la tecnología *lab-on-a-disc* han permitido el desarrollo de sistemas más complejos, en términos de funcionalidad y sofisticación. De esta manera, se ha diseñado un disco para

el análisis simultáneo de parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y enzimas hepáticas, entre otros) e inmunológicos (CK-MB) en sangre total. En este sistema, los resultados se obtienen en un periodo corto de tiempo (22 minutos), empleando para ello un pequeño volumen de muestra y con una única etapa manual [128]. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas que se han implementado en los discos. De hecho, recientemente se ha presentado un sistema de detección de patógenos bacterianos mediante la extracción de ADN y PCR, automatizando todo el proceso en el disco [129].

La fuerza de estos sistemas se refleja por un aumento de las actividades de investigación realizadas en los últimos años [122], por un lado, y por otra parte, por el interés cada vez mayor de las principales compañías de diagnóstico, como Panasonic, Roche, Samsung, 3M, y Abaxis, que ya cuentan con productos a base de microfluidos centrífugos en el mercado. Como ejemplos de sistemas comerciales, el analizador Piccolo Xpress (Abaxis) se ha utilizado recientemente para apoyar los diagnósticos de Ébola por medio de la función hepática [130], mientras que Roche ha desarrollado un sistema automático para la medida simultánea de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y de un panel de lípidos [131].

1.4. ANALITOS OBJETO DE ESTE TRABAJO

1.4.1. Biomarcadores

Aunque existen varias definiciones de biomarcador, en general, un biomarcador es una molécula biológica que se encuentra en la sangre, en otros fluidos corporales o tejidos que puede ser objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica [132]. En la práctica, los biomarcadores incluyen herramientas y tecnologías que pueden ayudar en la comprensión de la predicción, causa, diagnóstico, progresión, recidiva, o resultado del tratamiento de una enfermedad [133]. El descubrimiento de biomarcadores es un campo activo y emergente, donde hay numerosas cuestiones prácticas y limitaciones que tienen que ser consideradas. Desde un punto de vista práctico, un biomarcador debe reflejar de manera específica y sensible el estado de la enfermedad pudiendo ser utilizado para el diagnóstico, así como para el monitoreo de la enfermedades durante y después de la terapia. Las características de un marcador ideal son [134]:

- ∞ De acuerdo con la FDA (*Food and Drug Administration*, USA), un biomarcador ideal debe asociarse específicamente con una enfermedad particular o con el estado de la enfermedad, y ser capaz de diferenciar entre condiciones fisiológicas similares.
- ∞ Sería deseable que las fuentes biológicas estándar, como el suero y la orina, se pudieran utilizar para la identificación de biomarcadores (prueba mínimamente invasiva).
- ∞ Una detección rápida, sencilla, precisa y barata del marcador de interés debe estar disponible, junto con una medida y una línea de base estándar que se pueda emplear como punto de referencia.

De los miles de biomarcadores que se han descubierto y de los cientos que se comunican cada mes, sólo un pequeño número de ellos llega a ser validado y a ser clínicamente útil, debido a que su validación y aprobación todavía es un campo desafiante, con una tolerancia mínima para los errores. Esto hace que, biomarcadores históricamente conocidos como la hemoglobina glicosilada o el PSA, hayan necesitado décadas para convertirse en parte de la práctica médica. La Figura 15 refleja la evolución del PSA desde su descubrimiento hasta su aprobación por la FDA, ilustrando cómo se necesitaron varios años para que el PSA llegara a convertirse en un

biomarcador aceptado y finalmente poder ser utilizado para ayudar a desarrollar nuevas terapias [135].

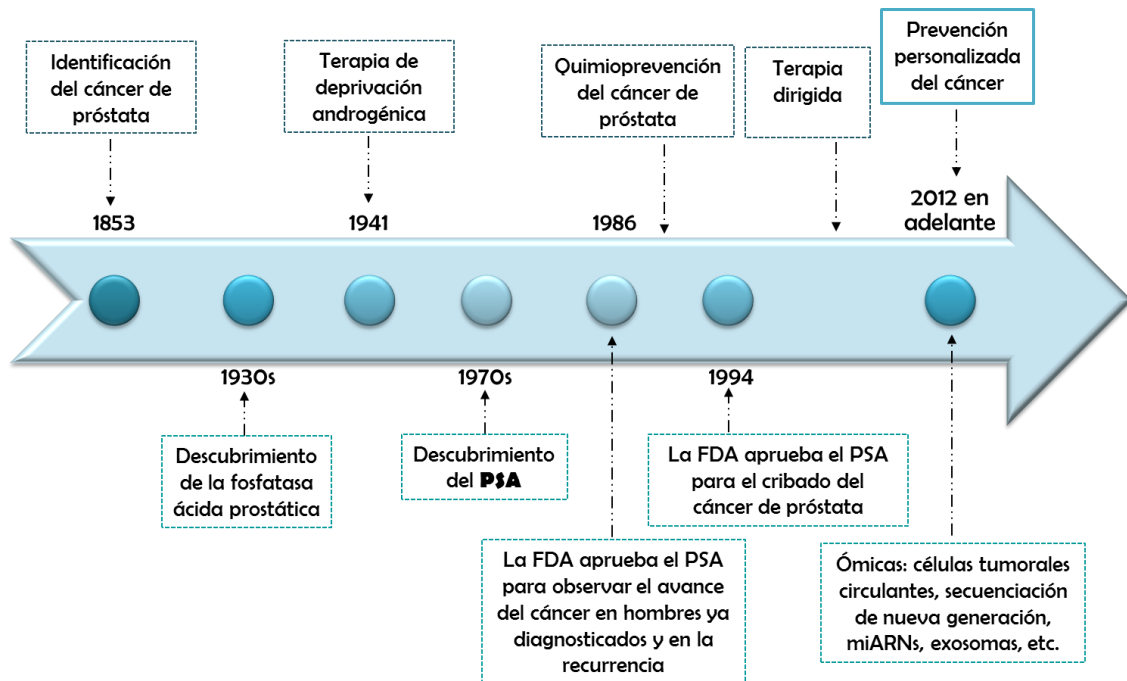


Fig. 15 Ejemplo de evolución en la vida de un biomarcador desde su descubrimiento hasta su aprobación.

1.4.2. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es una causa importante de morbilidad y mortalidad y el segundo cáncer más común en los hombres en todo el mundo [136]. Existe una elevada prevalencia histológica y se ha estimado que hasta el 42% de los individuos mayores de 50 años tienen algún foco canceroso.

El CaP es una enfermedad marcadamente heterogénea. Los tumores de próstata pueden ser indolentes o muy agresivos, a menudo con metástasis a los huesos u otros órganos, causando así una morbilidad y mortalidad significativas. Es un caso particularmente problemático, ya que no es hasta que el cáncer está en las etapas avanzadas cuando los síntomas pueden manifestarse y no puede haber reticencia por parte del paciente a buscar consejo médico. Muchos de los síntomas no son específicos del CaP y pueden ocurrir, en ocasiones, debido a otras condiciones no cancerosas, como infecciones o inflamaciones, o por aumento del tamaño de la próstata. Éstos suelen caracterizarse por problemas urinarios, de erección, existencia de sangre en la orina o en el semen. Esta incertidumbre en los síntomas hace que exista un considerable obstáculo para el diagnóstico precoz y, en algunos casos, que el cáncer no pueda detectarse hasta que nuevos síntomas se producen, como dolor en las costillas, la columna vertebral o las caderas, indicando que el cáncer se ha propagado desde la próstata a los huesos.

A diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, el manejo del cáncer de próstata ha empleado mucho biomarcadores. El primero de ellos, la fosfatasa ácida prostática, comenzó a emplearse en la década de 1930 al observarse que se encontraba elevada en el suero de los hombres con cáncer de próstata metastásico, y durante casi 50 años se investigó su utilidad como marcador clínico en la progresión de la enfermedad [137]. El PSA, descubierto en 1971 (Figura 15), es considerado el biomarcador más importante para la detección, estadificación y seguimiento del cáncer de próstata en su etapa temprana. El PSA es una glicoproteína que se produce casi exclusivamente por las células epiteliales de la próstata participando en la licuefacción del semen. Es órgano específica pero no es específica de cáncer. Esto hace que esté presente en las secreciones prostáticas normales. En condiciones normales, sólo una fracción mínima de PSA se libera a la circulación. Los niveles de PSA a menudo se elevan en presencia de condiciones que alteran las células epiteliales de la membrana basal de la próstata, como la prostatitis, hiperplasia benigna de próstata, las biopsias de próstata y las cirugías, además de en procesos tumorales. A pesar de su conocida falta de

especificidad, el PSA es el biomarcador clínicamente más aceptado en el diagnóstico del cáncer de próstata [138].

1.4.2.1. PSA como biomarcador de cáncer de próstata

El PSA puede encontrarse en la sangre, ya sea en su forma libre (PSA libre) o formando complejos con las proteínas inhibidoras de proteasas, como la α 1-antiquimiotripsina. El PSA libre representa el 5-35% del PSA total (PSAt) y puede aparecer en tres formas moleculares: pro-PSA, PSA benigno y PSA intacto. Por consenso, un nivel de PSAt de 4,0 ng/ml se ha definido como el límite superior de la normalidad. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la mayoría de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata tienen niveles de PSAt sérico en el rango de 2,5 a 10,0 ng/ml. Otro aspecto que hay que tener en cuenta es el hecho de que la concentración de PSAt aumenta con la edad y es mayor en individuos de raza negra. Sin embargo, cuando la concentración de PSAt es superior a 10 ng/mL, la probabilidad de cáncer es superior al 50%. Por otro lado, la relación de PSA libre respecto al PSAt (porcentaje de PSA libre: PSA libre/PSAt) es menor en los pacientes con cáncer de próstata que en individuos sanos o con prostatitis benignas. Además se ha demostrado que esta relación mejora la especificidad en la detección del cáncer en los hombres con valores de PSAt en el intervalo de 4-10 ng/ml (conocida como la zona gris) y un tacto rectal normal [138]. Un ensayo multicéntrico prospectivo encontró que el 56% de los hombres con PSA libre/PSAt $<0,10$ presentaban biopsia positiva para cáncer de próstata, diagnosticándose cáncer tan sólo en el 8% de los hombres con PSA libre/PSAt $>0,25$. Es por ello que se ha seleccionado como punto de corte para la realización de la biopsia un porcentaje del 20-25%, lo que ha mejorado la sensibilidad y especificidad de la prueba de PSA total y reducido el número de biopsias innecesarias. Sin embargo, debido a la inestabilidad del PSA libre comparado con la forma complejada, que hace que el porcentaje de PSA exhiba una gran variabilidad analítica, junto con que los niveles de PSA libre de la misma muestra utilizando kits de diferentes fabricantes no son totalmente reproducibles, hace que el PSA libre no se use como herramienta de cribado de primer nivel [139].

Debido a estos inconvenientes, se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar el rendimiento y el valor predictivo positivo de la prueba de PSA. Estas variaciones incluyen la normalización del PSA con el tamaño de la glándula prostática (densidad de PSA), el seguimiento de la dinámica del cambio de los niveles de PSA en el suero (velocidad de PSA y tiempo de duplicación) o el establecimiento de valores de PSA

específicos según la edad. Otras opciones son la medida de isoformas de la proteína de PSA (pro-PSA, más comúnmente) y, más recientemente, de otra isoforma de proPSA, pro2PSA ([-2] pro-PSA), que ha emergido como un biomarcador prometedor para el CaP, o del antígeno prostático específico de membrana (PSMA). Por otro lado, los avances recientes en biología molecular han permitido la detección robusta de biomarcadores genómicos en la orina del paciente. De esta forma, se ha encontrado que el PCA3 y la detección TMPRSS2-ERG presta una mayor especificidad para la detección del cáncer, lo que resulta en un menor número de falsos positivos [136,137].

Como ya se ha mencionado anteriormente, la búsqueda de nuevos biomarcadores es un campo en constante actividad. Dentro de este contexto, prometedoras vías de investigación de biomarcadores son el aislamiento de las células tumorales y de exosomas del suero y/o de la orina del paciente. Aunque los exosomas serán objeto de una mayor discusión en el siguiente apartado, es importante conocer en este punto que existen estudios que muestran que los pacientes con cáncer de próstata presentan un aumento en el número de exosomas en comparación con los individuos sanos, y que niveles elevados de exosomas también pueden estar correlacionados con el aumento de la puntuación de Gleason (sistema de determinación de los grados del cáncer de próstata utilizado con mayor frecuencia) [135]. Además del PSA, biomarcadores como el PCA3 y TMPRSS2-ERG, también se pueden detectar en exosomas derivados de la orina de pacientes con cáncer de próstata [140,141].

1.4.2.2. Ensayos para la detección del PSA

Como se ha venido comentando, niveles traza de PSA se encuentran de forma natural en el suero; sin embargo, el crecimiento del tumor por lo general conduce a la liberación de altas concentraciones de PSA en el sistema circulatorio. Por tanto, para el diagnóstico de CaP, un valor de PSA por encima de 4,0 ng/ml (y más recientemente 2,5 ng/ml) es generalmente considerado como positivo y podría indicar la necesidad de una biopsia. No obstante, la prueba de PSA también se utiliza para controlar la respuesta de los pacientes a una terapia ablativa, como la prostatectomía radical. En esta situación el PSA debe ser “indetectable” (depende del análisis del laboratorio, pero generalmente valores de <0,05 ó <0,1 ng/ml), y un nivel detectable subsiguiente de PSA es un signo de recurrencia de la enfermedad. Por esta razón, es necesario el desarrollo de ensayos ultrasensibles que sean capaces de detectar concentraciones de PSA en suero en la

región de los pg/ml y así facilitar la detección más temprana de la recidiva tumoral [142].

Existen varios ensayos comerciales (inmunoensayos) para la detección de PSA total para el uso clínico, por ejemplo, el ensayo Elecsys® de Roche, el ensayo IMx® de Abbott o el ensayo Immulite® de Diagnostic Products Corporation. Aunque estos sistemas son muy sensibles y poseen límites de detección en el intervalo de 0,005-0,05 ng/ml, una desventaja importante asociada con el hecho de que estos grandes sistemas se encuentran sólo en laboratorios centralizados es el requisito del transporte de la muestra al laboratorio: esto da lugar a retrasos en el procesamiento y comunicación de los resultados al clínico. Por lo tanto, el tiempo entre la decisión de la realización del test y la acción terapéutica llevada a cabo según el resultado de la prueba, denominado tiempo de respuesta terapéutica, es a menudo del orden de varias semanas [143]. El desarrollo de las pruebas POC para PSA tiene el potencial de revolucionar la experiencia de los pacientes, ya que los resultados se pueden obtener en cuestión de minutos, lo que significa un menor número de visitas a la consulta y ofrecer la posibilidad de un mejor manejo clínico de la enfermedad.

Una revolución en curso en el área del diagnóstico médico es el desarrollo de biosensores que tienen el potencial para su uso como dispositivos POC. Estos proporcionarían resultados cuantitativos rápidos y fiables “en cualquier momento y en cualquier lugar”. Con el fin de que estos sistemas POC puedan convertirse en una realidad, los formatos de análisis actuales deben reducirse al tamaño de los dispositivos portátiles, que requieren sólo pequeñas cantidades de muestra y reactivos, manteniendo al mismo tiempo la posibilidad de análisis múltiples, específicos y sensibles. Los recientes avances en el desarrollo de biosensores, utilizando nanopartículas y superficies nanoestructuras como componentes integrales, han permitido el desarrollo de métodos de detección de analito en la nanoescala, como por ejemplo, los biosensores electroquímicos [143,144,145].

En un esfuerzo por proporcionar una alternativa POC a las pruebas de PSA centralizadas, se han desarrollado varios LFIA para la detección de PSA. Como ya se ha dicho, la principal ventaja de estos dispositivos es su bajo coste, su robustez y la facilidad de uso; sin embargo, los LFIA han demostrado no ser una alternativa real a las pruebas de laboratorio centralizado para el análisis de PSA, debido a su falta de

sensibilidad y, a que generalmente ofrecen un resultado semi-cuantitativo. En el mercado hay una serie de pruebas de PSA de LFIA disponibles: BioSign® de Princeton BioMeditech Corporation o el Test de PSA SEMIQUANT de Seratec®, entre otros. Dispositivos basados en LFIA que ofrecen un resultado cuantitativo son el PSAwatch™ y el FastPack® de IP System. Dentro del campo de la investigación, se están desarrollando pruebas de LFIA para la detección de PSA basadas, por ejemplo, en detecciones capacitivas, colorimétricas o electroquímica [146,147].

1.4.3. Exosomas: el futuro de los biomarcadores en biomedicina

Una de las tendencias emergentes en clínica hoy en día es la búsqueda de una medicina personalizada, que adopte opciones de tratamiento específicas para cada paciente y la administración de una terapia precisa y dirigida a un claro objetivo desde el inicio [148]. Esto permite soluciones terapéuticas con menos efectos secundarios, una mayor conformidad del paciente y una menor carga para los sistemas sanitarios. El análisis de perfiles de biomarcadores (ADN mutado, ARN, proteínas, procesos celulares, concentración sérica de metabolitos) en los fluidos corporales se está convirtiendo en un medio prometedor para predecir la predisposición a una enfermedad, el diagnóstico precoz, y la predicción del éxito de un tratamiento en un paciente dado. En este contexto, los exosomas están emergiendo como una potente herramienta diagnóstica [149,150].

1.4.3.1. Composición, biogénesis y función de los exosomas

Las células, en condiciones fisiológicas y patológicas, secretan una amplia variedad de vesículas, siendo los exosomas y las microvesículas las más comúnmente estudiadas. Los exosomas fueron descubiertos por el Profesor Johnstone y sus colaboradores en los años ochenta cuando mostraron que pequeñas vesículas se formaban por invaginaciones en el interior de un endosoma intracelular, conduciendo a la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs), que a continuación se fusionarían con la membrana plasmática para liberar al exterior sus vesículas internas (Figura 16). En 1987, se propuso la palabra “exosomas” para designar estas vesículas extracelulares (EVs) de origen endosomal [151]. Las EVs consisten en pequeñas estructuras similares a burbujas membranosas que se liberan de las células en tres tipos principales: los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos y juegan un papel fundamental en la comunicación intercelular [152]. Estas vesículas se han estudiado a lo largo de los años usando una gran variedad de estrategias de aislamiento y se han clasificado de acuerdo a sus distintas propiedades estructurales y bioquímicas. Así, de acuerdo a su tamaño, composición y origen, las EVs suelen clasificarse en microvesículas (MV, en torno a los 1000 nm) y exosomas (40-150 nm) [152,153]. No obstante, dada la falta de una demostración perfecta del origen de las EVs y que los métodos de purificación actuales no discriminan totalmente entre microvesículas y exosomas, las recomendaciones realizadas en cuanto a nomenclatura instan a la adopción generalizada del término genérico EVs para referirse a las vesículas secretadas [154].

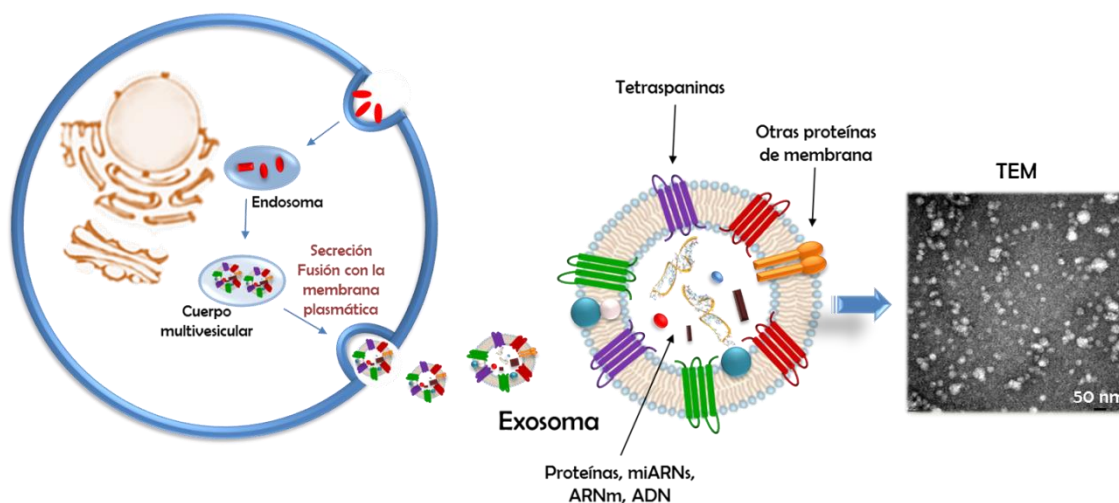


Fig. 16 Mecanismos de la biogénesis y la secreción de exosomas. Dibujo simplificado de la estructura y composición de un exosoma

El contenido en proteínas de los exosomas se ha analizado extensamente a partir de diferentes tipos de células y fluidos corporales por diferentes métodos, como la espectrometría de masas, Western blot, citometría de flujo o microscopía inmuno-electrónica [155] e incluye tanto proteínas conservadas como específicas de la célula de origen. Todas las EVs contienen proteínas implicadas en el transporte de membrana y fusión (Rab GTPasas, anexinas), proteínas de choque térmico (Hsp60, HSP70, HSP90 y HSPA5), integrinas y proporciones variables de tetraspaninas (CD63, CD81 y CD9). Por otra parte, los exosomas también contienen una gran variedad de ácidos nucleicos que incluyen ADN, ARNm y miARN [153,156]. Aunque varias proteínas han sido reconocidas como marcadores específicos de exosomas, los estudios describen a CD9, CD63 y CD81 como las proteínas identificadas con mayor frecuencia en los exosomas y son las que se consideran con generalmente como marcadores clásicos de exosomas [157,158,159].

1.4.3.2. Exosomas como biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad

En los últimos años se ha descubierto que todos los fluidos corporales contienen exosomas (sangre, orina, saliva, leche, entre otros). Dado que los exosomas llevan firmas específicas de las células de origen, indicativas de condiciones fisiopatológicas, y

una composición específica en cuanto a proteínas, ARNs y contenido de lípidos, estas vesículas que son secretadas en los fluidos biológicos pueden ser útiles para el pronóstico, seguimiento de la respuesta de un tratamiento y el diagnóstico precoz de diversas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y hematológicas, y del cáncer. Esto hace que se puedan llevar a cabo diagnósticos mínimamente invasivos (si se emplea un análisis de sangre) o diagnósticos no invasivos (usando muestras de orina y saliva) y que sean una buena alternativa a las agujas tradicionales o las biopsias, reduciendo el dolor y la incomodidad del paciente, a la vez que se reducen los costes y el tiempo para el análisis y la obtención de resultados. Tal es así, que algunos artículos sugieren que las EVs pueden ser usadas como una biopsia líquida [160,161]. Aunque los exosomas se han propuesto como biomarcadores en una gran variedad de enfermedades, la mayoría de los datos clínicos disponibles se han obtenido a partir de estudios de pacientes con cáncer.

Los estudios de biomarcadores relacionados con exosomas se pueden dividir en tres grupos de acuerdo con los analitos analizados [162]:

- (1) La cantidad de EVs: En general, un mayor contenido de exosomas se ha encontrado en pacientes con cáncer en comparación con donantes sanos, y parece existir una relación entre la concentración de exosomas y la progresión de la enfermedad [163,164]. Además, la concentración EVs también se podría utilizar como un indicador del estado clínico. Por ejemplo, cuando se monitoreó el efecto del tratamiento con Imatinib en pacientes con un tumor del estroma gastrointestinal, se encontró que la concentración de las EVs antes del tratamiento estaba incrementada con respecto al momento del control [150].
- (2) La composición proteica de las EVs: son muchos los estudios encontrados en este campo. Algunos ejemplos se muestran a continuación. Como se mencionó anteriormente, las EVs pueden transportar marcadores tumorales conocidos, como el PSA. También se ha encontrado que los niveles de HSP60 en los exosomas se redujeron drásticamente en pacientes con cáncer de colon después de la extirpación quirúrgica del tumor [165]. Como ejemplo de una enfermedad neurodegenerativa, estudios realizados con exosomas aislados de muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer, han mostrado que los niveles de beta-amiloide, tau o la fosforilación alterada del receptor de

insulina en los exosomas aislados pueden predecir el desarrollo de la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos [166].

- (3) La composición de miARN o ARNm de las EVs: se han identificado patrones de expresión específicos de miARNs en suero para cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, y diabetes, proporcionando evidencia de que los miARNs contienen huellas digitales para diversas enfermedades [160].

En general, los biomarcadores exosomales se encuentran todavía en su etapa de descubrimiento y/o desarrollo temprano y su valor potencial en el diagnóstico clínico abre las puertas a la investigación para ser explorados a fondo.

1.4.3.3. Métodos de caracterización y detección de exosomas

Caracterizar el contenido exosomal es muy importante para la comprensión de las funciones biológica de las EVs, así como su papel en el desarrollo de las distintas enfermedades. Varios métodos, incluyendo ensayos ELISA, Western Blot, test Bradford o la citometría de flujo proporcionan información sobre la presencia de proteínas y marcadores de superficie específicos. Sin embargo, se necesita llevar a cabo una normalización y optimización de los distintos protocolos antes de ser adaptados para el análisis de rutina [167].

Tras el aislamiento de los exosomas y su caracterización, muchas aplicaciones posteriores requieren conocimientos sobre el número de exosomas dentro de una muestra específica o simplemente cuantificar el número de exosomas en una muestra para emplearla como herramienta diagnóstica. Para cuantificar los exosomas, muchos investigadores optan por un sistema ELISA estándar. Varios kits ELISA se encuentran disponibles comercialmente y utilizan anticuerpos de detección contra las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, fundamentalmente, aunque no exclusivamente. Aunque el ELISA es un método sensible, es difícil encontrar sistemas de anticuerpos específicos para cada tipo de EVs, y puede requerir de varias optimizaciones. Dentro de las técnicas convencionales, el análisis de seguimiento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) permite determinar la concentración y la distribución de tamaños de las EVs en tiempo real mediante la combinación de la microscopía de luz y un software que analiza el movimiento browniano de las partículas. Un punto importante a tener en cuenta es que las muestras de exosomas deben ser altamente diluidas antes de su

análisis en esta plataforma para que entren dentro del rango dinámico, que suele estar en torno a 10⁶-10⁹ partículas/mL, dependiendo del instrumento [168,169].

En el campo de la investigación, la fabricación de nuevos materiales y de dispositivos más sofisticados (chips de microfluidos o sensores específicos) ha originado algunas interesantes aplicaciones como “prueba de concepto” de tecnologías avanzadas. Estos dispositivos permiten el uso de pequeños volúmenes de muestra y tiempos de procesamiento más cortos, mejorar la sensibilidad y reducir los costes. Ejemplos de estas plataformas de análisis son los sistemas ELISA basados en papel [170] o pequeños dispositivos basados en diferentes principios físico-químicos que permiten la cuantificación de las EVs, como son la resonancia magnética nuclear [171], la resonancia de plasmón superficial [172,173], medidas electroquímicas [174], medidas de corriente electrodinámica [175] o de quimiofluorescencia [176]. Estos métodos tienen el potencial de facilitar el esclarecimiento de las funciones biológicas y las implicaciones clínicas de las EVs circulantes y podrían tener una gran relevancia para aplicaciones biomédicas futuras.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Yager, P., Domingo, G. J., Gerdes, J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2008; 10: 107-144.
- [2] Ahmed, M.U., Saaem, I., Wu, P.C., Brown, A.S. Personalized diagnostics and biosensors: a review of the biology and technology needed for personalized medicine. *Crit Rev Biotechnol.* 2014; 34(2): 180-196.
- [3] Larsson, A., Greig-Pylypczuk, R., Huisman, A. The state of point-of-care testing: a European perspective. *Ups J Med Sci* 2015, 120(1): 1-10.
- [4] Chan, C.P.Y., Mak, W.C., Cheung, K.Y., Sin, K.K., Yu, C.M., Rainer, T.H., Renneberg, R. Evidence-based point-of-care diagnostics: current status and emerging technologies. *Annu Rev Anal Chem.* 2013, 6: 191-211.
- [5] Gubala V., Harris L.F., Ricco A.J., Tan M.X., Williams D.E. Point of care diagnostics: Status and future. *Anal. Chem.* 2012; 84 (2): 487-515.
- [6] Cummins, B.M., Ligler, F.S., Walker, G.M. Point-of-care diagnostics for niche applications. *Biotechnol Adv.* 2016; 34(3): 161-76.
- [7] Drain, P.K., Hyle, E.P., Noubary, F., Freedberg, K.A., Wilson, D., Bishai, W.R., Bassett, I.V. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *The Lancet infectious diseases* 2014; 14(3): 239-249.
- [8] Parolo, C., Merkoçi, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chem Soc Rev.* 2013; 42(2): 450-457.
- [9] St John, A., Price, C.P. Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin Biochem Rev.* 2014; 35(3): 155-167.
- [10] Hu, J., Wang, S., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T.J., Xu, F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron.* 2014; 54: 585-597.
- [11] Jeong, S.G., Kim, J., Nam, J.O., Song, Y.S., Lee, C.S. Paper-based analytical device for quantitative urinalysis. *Int Neurourol J.* 2013; 17(4): 155-161.
- [12] Medmira Inc., Multiplo. Consultado en Agosto de 2016. Disponible en: <http://medmira.com/products/multiplo>

- [13] Wilson, R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem Soc Rev.* 2008; 37(9): 2028-2045.
- [14] Singer, J.M., Plotz, C.M. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 1956; 21: 888–892.
- [15] O'Farrell, B. Lateral Flow Technology for Field Based Applications-Basics and Advanced Developments. *Top Companion Anim Med.* 2015; 30(4): 139-147.
- [16] O'Farrell B. Lateral Flow Immunoassay systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays. In: *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, 4th ed.; Wilde D., Ed.; Elsevier Ltd; 2013; pp 89-107
- [17] Markets and Markets. Lateral Flow Assay Market by Product (Reader, Kits) Application (Clinical Testing (Pregnancy, Infectious Disease, Cholestrol, Cardiac Marker), Veterinary, Drug Development) Technique (Sandwich, Competitive, Multiplex) End User - Global Forecast to 2020. Publicado en Marzo de 2016, consultado en Mayo de 2016. Disponible en <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lateral-flow-assay-market-167205133.html>).
- [18] O'Farrell B. Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 1-33
- [19] Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J., Estrela, P., O'Kennedy, R. Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. *Biosensors* 2015; 5(3): 577-601.
- [20] Eltzov, E., Guttel, S., Low Yuen Kei, A., Sinawang, P.D., Ionescu, R.E., Marks, R.S. Lateral Flow Immunoassays-from Paper Strip to Smartphone Technology. *Electroanalysis* 2015; 27(9): 2116-2130.
- [21] Fridley, G.E., Holstein, C.A., Oza, S.B., Yager, P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays. *MRS bulletin* 2013; 38(04): 326-330.
- [22] Tonkinson, J.L., Stillman, B.A. Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Front Biosci* 2002; 7: c1-12.

- [23] Lee, J.Y., Kim, Y.A., Kim, M.Y., Lee, Y.T., Hammock, B.D., Lee, H.S. Importance of membrane selection in the development of immunochromatographic assays for low-molecular weight compounds. *Anal Chim Acta*. 2012; 757: 69-74.
- [24] Zhang, G.P., Guo, J.Q., Wang, X.N., Yang, J.X., Yang, Y.Y., Li, Q.M., Xing, G.X. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. *Vet Parasitol*. 2006; 137(3): 286-293.
- [25] Dzantiev, B.B., Byzova, N.A., Urusov, A.E., Zherdev, A.V., Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2014; 55: 81-93.
- [26] Sajid, M., Kawde, A.N., Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 2015; 19(6): 689-705.
- [27] Kuzdzal, SA., Nichols, JH. Visualine II™ Drugs-of-Abuse Test Kits. In: *On-Site Drug Testing*. Jenkins, AJ. and Goldberger, BA. Eds; Humana Press, New York; 2002; pp. 213-218
- [28] Xing, C., Liu, L., Song, S., Feng, M., Kuang, H., Xu, C. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water. *Biosens Bioelectron*. 2015; 66: 445-453.
- [29] Posthuma-Trumpie, GA., Korf, J., van Amerongen, A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*. 2009; 393(2): 569-582.
- [30] Park, JM., Jung, HW., Chang, YW., Kim, HS., Kang, MJ., Pyun, JC. Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity. *Anal Chim Acta*. 2015; 853: 360-367.
- [31] Zhu, J., Zou, N., Mao, H., Wang, P., Zhu, D., Ji, H., Qian, J. Evaluation of a modified lateral flow immunoassay for detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin. *Biosens Bioelectron*. 2013; 42: 522-525.
- [32] Huang, X., Aguilar, Z.P., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosens Bioelectron*. 2016; 75: 166-180.

- [33] Zhu, J., Zou, N., Zhu, D., Wang, J., Jin, Q., Zhao, J., Mao, H. Simultaneous detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin by modified sandwich lateral flow immunoassay: proof of principle. *Clin Chem.* 2011; 57(12): 1732-1738.
- [34] Taranova, N.A., Byzova, N.A., Zaiko, V.V., Starovoitova, T.A., Vengerov, Y.Y., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse. *Microchim Acta* 2013; 180(11-12): 1165-1172.
- [35] Li, J., Macdonald, J., Multiplex lateral flow detection and binary encoding enables a molecular colorimetric 7-segment display. *Lab Chip* 2016; 16(2): 242-245.
- [36] Fenton, E.M., Mascarenas, M.R., López, G.P., Sibbett, S.S. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2009; 1(1): 124-129.
- [37] Li, C. Z., Vandenberg, K., Prabhulkar, S., Zhu, X., Schneper, L., Methee, K., Rosser, C.J., Almeida, E. Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis. *Biosen Bioelectron.* 2011; 26(11): 4342-4348.
- [38] Zhao, Y., Wang, H., Zhang, P., Sun, C., Wang, X., Wang, X., Zhou, L. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Sci Rep.* 2016; 6: 21342.
- [39] Ellington, A.A., Kullo, I.J., Bailey, K.R., Klee, G.G. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clini Chem.* 2010; 56(2): 186-193.
- [40] Koets, M., Sander, I., Bogdanovic, J., Doekes, G., van Amerongen, A. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *J Environ Monit.* 2006; 8(9): 942-946.
- [41] Day, M. J. Introduction to Antigen and Antibody Assays. *Top Companion Anim Med.* 2015; 30(4): 128-31.
- [42] Brown, M.C. Antibodies: Key to a Robust Lateral Flow Immunoassay. In: *Lateral Flow Immunoassay.* Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 59-72.
- [43] Ritter, M.A. Polyclonal and monoclonal antibodies. *Methods Mol Med.* 2000; 40: 23-34.

- [44] Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy, C., O'Kennedy, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* 2012; 56(2): 116-129.
- [45] Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J. Weis-Garcia, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 2005; 46(3): 258-268.
- [46] Fassina, G., Ruvo, M., Palombo, G., Verdoliva, A., Marino, M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 49(1): 481-490.
- [47] Sapountzi, E.A., Tragoulias, S.S., Kalogianni, D.P., Ioannou, P.C., Christopoulos, T.K. Lateral flow devices for nucleic acid analysis exploiting quantum dots as reporters. *Anal Chim Acta.* 2015; 864: 48-54.
- [48] Chen, A., Yang, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosen Bioelectron.* 2015; 71: 230-242.
- [49] Fang, Z., Wu, W., Lu, X., Zeng, L. Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of salmonella based on aptamer mediated strand displacement amplification. *Biosen Bioelectron.* 2014; 56: 192-197.
- [50] Quesada-González, D., Merkoçi, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosen Bioelectron.* 2015; 73: 47-63.
- [51] Ge, X., Asiri, A. M., Du, D., Wen, W., Wang, S., Lin, Y. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2014; 58: 31-39.
- [52] Seydack, M. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosen Bioelectron.* 2005; 20(12): 2454-2469.
- [53] Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., Kumarswami, N., Noble, J., Szymanski, M., Porter, R. A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J Immunol Methods.* 2010; 356(1): 60-69.
- [54] Peng, X., Shin, D.M., Chen, H., Mao, H., Huang, J. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. In: *Biomedical Engineering-From Theory to Applications.* Reza Fazel-Rezai Ed.; InTech Open Access; 2011; pp 203-224.

- [55] Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A., Polo, E., Grazú, V., De La Fuente, J.M., Merkoçi, A. Design, preparation, and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold-nanoparticle conjugate as an immunosensing label. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013; 5(21): 10753-10759.
- [56] Chun, P. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 75-93.
- [57] Zou, Z.X., Wang, J., Wang, H., Li, Y.Q., Lin, Y. An integrated electrochemical device based on immunochromatographic test strip and enzyme labels for sensitive detection of disease-related biomarkers. *Talanta* 2012; 94: 58-64.
- [58] Samsonova, J.V., Safronova, V.A., Osipov, A.P. Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk. *Talanta* 2015; 132: 685-689.
- [59] Shyu, R.H., Shyu, H.F., Liu, H.W., Tang, S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon* 2002; 40(3): 255-258.
- [60] Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(7): 2740-2779.
- [61] Yuan, Z., Hu, C. C., Chang, H. T., Lu, C. Gold nanoparticles as sensitive optical probes. *Analyst* 2016; 141(5): 1611-1626.
- [62] Campbell, K., Fodey, T., Flint, J., Danks, C., Danaher, M., O'Keeffe, M., Elliott, C. Development and validation of a lateral flow device for the detection of nicarbazin contamination in poultry feeds. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(6): 2497-2503.
- [63] Mao, X., Wang, W., Du, T.E. Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip. *Talanta* 2013; 114: 248-253.
- [64] Takahashi, A., Uchiyama, S., Kato, Y., Yuhi, T., Ushijima, H., Takezaki, M., Tominaga, T., Moriyama, Y., Takeda, K., Miyahara, T., Nagatani, N. Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as a stress marker. *Sci Tech Adv Mat*. 2009; 10: 034604.

- [65] Majdinasab, M., Sheikh-Zeinoddin, M., Soleimanian-Zad, S., Li, P., Zhang, Q., Li, X., Tang, X. Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 974: 147-154.
- [66] Noguera, P., Posthuma-Trumpie, G.A., Van Tuil, M., Van der Wal, F.J., De Boer, A., Moers, A.P., Van Amerongen, A. Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399(2): 831-838.
- [67] Suárez-Pantaleón, C., Wichers, J., Abad-Somovilla, A., Van Amerongen, A., Abad-Fuentes, A. Development of an immunochromatographic assay based on carbon nanoparticles for the determination of the phytohormone forchlorfenuron. *Biosen Bioelectron.* 2013; 42: 170-176.
- [68] Zheng, C., Wang, X., Lu, Y., Liu, Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control* 2012; 26(2): 446-452.
- [69] Chen, Y., Wang, K., Liu, Z., Sun, R., Cui, D., He, J. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Anal Bioanal Chem.* 2016, 408(9): 2319-2327.
- [70] Zhang, F., Zou, M., Chen, Y., Li, J., Wang, Y., Qi, X., Xue, Q. Lanthanide-labeled immunochromatographic strips for the rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Biosen Bioelectron.* 2014; 51: 29-35.
- [71] Taranova, N.A., Berlina, A.N., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. "Traffic light" immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk. *Biosen Bioelectron.* 2015; 63: 255-261.
- [72] Goryacheva, I.Y., Lenain, P., De Saeger, S. Nanosized labels for rapid immunotests. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013; 46: 30-43.
- [73] Gao, X., Xu, L.P., Zhou, S.F., Liu, G., Zhang, X. Recent advances in nanoparticles-based Lateral flow biosensors. *Am J Biomed Sci.* 2014; 6(1): 41-57.

- [74] Liao, J. Y., Li, H. Lateral flow immunodipstick for visual detection of aflatoxin B1 in food using immuno-nanoparticles composed of a silver core and a gold shell. *Microchim Acta* 2010; 171(3-4): 289-295.
- [75] Xia, S., Yu, Z., Liu, D., Xu, C., Lai, W. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of *Salmonella choleraesuis* in milk. *Food Control* 2016; 59: 507-512.
- [76] Fu, Q., Liu, H. L., Wu, Z., Liu, A., Yao, C., Li, X., Xiao, W., Yu, S., Luo, Z., Tang, Y. Rough surface Au@ Ag core-shell nanoparticles to fabricating high sensitivity SERS immunochromatographic sensors. *J Nanobiotechnology*. 2015; 13(1): 81.
- [77] Tamer, U., Gündoğdu, Y., Boyacı, İ. H., Pekmez, K. Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection. *J Nanopart Res.* 2010; 12(4): 1187-1196.
- [78] Sakurai, A., Takayama, K., Nomura, N., Yamamoto, N., Sakoda, Y., Kobayashi, Y., Kida, H., Shibasaki, F. Multi-colored immunochromatography using nanobeads for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses. *J Virol Methods*. 2014; 209: 62-68.
- [79] Vatcheva-Dobrevsky, R., Ramshev, K. Application of procalcitonin (PCT)-Q test for early detection of bacteremia and sepsis. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* 2004; 18(2): 177-184.
- [80] Batra, P., Dwivedi, A. K., Thakur, N. Bedside ABG, electrolytes, lactate and procalcitonin in emergency pediatrics. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2014; 4(3): 247.
- [81] Leung, W., Chan, C.P., Rainer, T.H., Ip, M., Cautherley, G.W., Renneberg, R. InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections. *J Immunol Methods*. 2008; 336(1): 30-36.
- [82] Yin, H.Y., Chu, P.T., Tsai, W.C., Wen, H. W. Development of a barcode-style lateral flow immunoassay for the rapid semi-quantification of gliadin in foods. *Food Chem.* 2016; 192: 934-942.

- [83] Mak, W.C., Beni, V., Turner, A.P. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016; 79: 297-305.
- [84] Yetisen, A.K., Akram, M.S., Lowe, C.R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip*. 2013; 13(12): 2210-2251.
- [85] Petryayeva, E., Algar, W.R. Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles. *Rsc Adv.* 2015, 5(28): 22256-22282.
- [86] Kim, S., Park, J.K. Development of a test strip reader for a lateral flow membrane-based immunochromatographic assay. *J. Biotechnol Bioproc E* 2004; 9(2): 127-131.
- [87] Faulstich, K., Gruler, R., Eberhard, M., Lentzsch, D., Haberstroh, K. Handheld and Portable Reader Devices for Lateral Flow Immunoassays. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 157-183.
- [88] Vashist, S. K., Mudanyali, O., Schneider, E. M., Zengerle, R., Ozcan, A. Cellphone-based devices for bioanalytical sciences. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(14): 3263-3277.
- [89] Mudanyali, O., Dimitrov, S., Sikora, U., Padmanabhan, S., Navruz, I., Ozcan, A. Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab Chip* 2012; 12(15): 2678-2686.
- [90] Lee, S., Kim, G., Moon, J. Development of a Smartphone-Based Reading System for Lateral Flow Immunoassay. *Journal J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14(11): 8453-8457.
- [91] Carrio, A., Sampedro, C., Sanchez-Lopez, J. L., Pimienta, M., Campoy, P. Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors* 2015; 15(11): 29569-29593.
- [92] You, D.J., San Park, T., Yoon, J.Y. Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. *Biosen Bioelectron* 2013; 40(1): 180-185.

- [93] Zangheri, M., Cevenini, L., Anfossi, L., Baggiani, C., Simoni, P., Di Nardo, F., Roda, A. A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection. *Biosen Bioelectron* 2015; 64: 63-68.
- [94] Feng, S., Caire, R., Cortazar, B., Turan, M., Wong, A., Ozcan, A. Immunochromatographic diagnostic test analysis using Google Glass. *ACS Nano* 2014; 8(3): 3069-3079.
- [95] Mettakoonpitak, J., Boehle, K., Nantaphol, S., Teengam, P., Adkins, J.A., Srisa-
Art, M., Henry, C.S. Electrochemistry on Paper-Based Analytical Devices: A
Review. *Electroanalysis* 2016; 28 (7): 1420-1436.
- [96] Heller, A., Feldman, B. Electrochemical glucose sensors and their applications
in diabetes management. *Chem Rev* 2008; 108(7): 2482-2505.
- [97] Liu, B., Du, D., Hua, X., Yu, X.Y., Lin, Y. Paper-Based Electrochemical
Biosensors: From Test Strips to Paper-Based Microfluidics. *Electroanalysis* 2014;
26(6): 1214-1223.
- [98] Inoue, K., Ferrante, P., Hirano, Y., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T. A
competitive immunochromatographic assay for testosterone based on
electrochemical detection. *Talanta* 2007; 73(5): 886-892.
- [99] Liu, G., Lin, Y.Y., Wang, J., Wu, H., Wai, C.M., Lin, Y. Disposable
electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and
immunochromatographic strip. *Anal Chem.* 2007; 79(20): 7644-7653.
- [100] Zhu, X., Shah, P., Stoff, S., Liu, H., Li, C.Z. A paper electrode integrated lateral
flow immunosensor for quantitative analysis of oxidative stress induced DNA
damage. *Analyst* 2014; 139(11): 2850-2857.
- [101] Sinawang, P.D., Rai, V., Ionescu, R.E., Marks, R.S. Electrochemical lateral flow
immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. *Biosens
Bioelectron* 2016; 77: 400-408.
- [102] Wang, D.B., Tian, B., Zhang, Z.P., Wang, X.Y., Fleming, J., Bi, L.J., Yang,
R.F., Zhang, X.E. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic
lateral-flow immunoassays based on "Road Closure". *Biosen Bioelectron* 2015; 67:
608-614.

- [103] Martínez W.A., Phillips S.T., Whitesides G.M. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem* 2010; 82: 3-10.
- [104] W. Martinez A. Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis* 2011; 3(23): 2589-2592.
- [105] He, P.J., Katis, I.N., Eason, R.W., Sones, C.L. Laser-based patterning for fluidic devices in nitrocellulose. *Biomicrofluidics* 2015; 9(2): 026503.
- [106] Yamada, K., Henares, T.G., Suzuki, K., Citterio, D. Paper-Based Inkjet-Printed Microfluidic Analytical Devices. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015; 54(18): 5294-5310.
- [107] Carrilho E., Martinez A.W., Whitesides G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal Chem.* 2009; 81: 7091-7095.
- [108] Mace C.R., Deraney R.N. Manufacturing prototypes for paper-based diagnostic devices. *Microfluid Nanofluid.* 2014; 16: 801-809.
- [109] Dou, M., Sanjay, S.T., Benhabib, M., Xu, F., Li, X. Low-cost bioanalysis on paper-based and its hybrid microfluidic platforms. *Talanta* 2015; 145: 43-54.
- [110] Xia, Y., Si, J., Li, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosen Bioelectron.* 2016; 77: 774-789.
- [111] Noiphung, J., Songjaroen, T., Dungchai, W., Henry, C.S., Chailapakul, O., Laiwattanapaisal, W. Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta* 2013; 788: 39-45.
- [112] Liang, L., Su, M., Li, L., Lan, F., Yang, G., Ge, S., Yu, J., Song, X. Aptamer-based fluorescent and visual biosensor for multiplexed monitoring of cancer cells in microfluidic paper-based analytical devices. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2016; 229: 347-354.
- [113] Ge, L., Wang, S., Ge, S., Yu, J., Yan, M., Li, N., Huang, J. Electrophoretic separation in a microfluidic paper-based analytical device with an on-column wireless electrogenerated chemiluminescence detector. *Chem Commun* 2014; 50(43): 5699-5702.

- [114] Wu, L., Ma, C., Ge, L., Kong, Q., Yan, M., Ge, S., Yu, J. Paper-based electrochemiluminescence origami cyto-device for multiple cancer cells detection using porous AuPd alloy as catalytically promoted nanolabels. *Biosen Bioelectron.* 2015; 63: 450-457.
- [115] Ge, L., Wang, P., Ge, S., Li, N., Yu, J., Yan, M., Huang, J. Photoelectrochemical lab-on-paper device based on an integrated paper supercapacitor and internal light source. *Anal Chem.* 2013; 85(8): 3961-3970.
- [116] Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M., Lee, B.S., Park, J.M., Kim, J., Kim, H., Madou, M., Cho, Y.K. Centrifugal microfluidics for biomedical applications. *Lab Chip* 2010; 10(14): 1758-1773.
- [117] Gilmore, J., Islam, M., Martinez-Duarte, R. Challenges in the Use of Compact Disc-Based Centrifugal Microfluidics for Healthcare Diagnostics at the Extreme Point of Care. *Micromachines* 2016; 7(4): 52.
- [118] Smith, S., Mager, D., Perebikovskiy, A., Shamloo, E., Kinahan, D., Mishra, R., Torres Delgado, S.M., Kido, H., Saha S., Ducrée J., Madou, M., Land K., Korvink, J.G. CD-Based Microfluidics for Primary Care in Extreme Point-of-Care Settings. *Micromachines* 2016; 7(2): 22.
- [119] Nwankire, C.E., Czugała, M., Burger, R., Fraser, K.J., O'Connell, T.M., Glennon, T., Onwuliri, B.E., Nduaguibe, I.E., Diamond, D., Ducrée, J. A Portable Centrifugal Analyser for Liver Function Screening. *Biosen Bioelectron.* 2014; 56: 352–358.
- [120] Glynn, M., Kirby, D., Chung, D., Kinahan, D.J., Kijanka, G., Ducrée, J. Centrifugo-Magnetophoretic Purification of CD4+ Cells from Whole Blood Toward Future HIV/AIDS Point-of-Care Applications. *J. Lab. Autom.* 2014; 19: 285–296
- [121] Tang, M., Wang, G., Kong, S. K., & Ho, H. P. A Review of Biomedical Centrifugal Microfluidic Platforms. *Micromachines* 2016; 7(2): 26.
- [122] Strohmeier, O., Keller, M., Schwemmer, F., Zehnle, S., Mark, D., von Stetten, F., Zengerle, R., Paust, N. Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications. *Chem Soc Rev.* 2015; 44(17): 6187-6229.

- [123] Focke, M., Stumpf, F., Faltin, B., Reith, P., Bamarni, D., Wadle, S., Müller C, Reinecke H, Schrenzel J, Francois, P., Mark, D., Roth, G., Zengerle, R., von Stetten, F. Microstructuring of polymer films for sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform. *Lab Chip* 2010; 10(19): 2519-2526.
- [124] Nwankire, C. E., Donohoe, G. G., Zhang, X., Siegrist, J., Somers, M., Kurzbuch, D., Monaghan, R., Kitsara, M., Burger, R., Hearty, S., Murrell, J., Martin, C., Rook, M., Barrett, L., Daniels, S., McDonagh, C., O'Kennedy, R., Ducreé, J. At-line bioprocess monitoring by immunoassay with rotationally controlled serial siphoning and integrated supercritical angle fluorescence optics. *Anal Chim Acta*. 2013; 781: 54-62.
- [125] Burger, R., Amato, L., Boisen, A. Detection methods for centrifugal microfluidic platforms. *Biosen Bioelectron*. 2016; 76: 54-67.
- [126] Kim, T.H., Park, J., Kim, C.J., Cho, Y.K. Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens. *Anal Chem*. 2014; 86(8): 3841-3848.
- [127] Jung, J.H., Park, B.H., Oh, S.J., Choi, G., Seo, T.S. Integration of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip on a centrifugal microdevice for influenza A virus identification. *Lab Chip*. 2015; 15(3): 718-725.
- [128] Lee, B.S., Lee, Y.U., Kim, H.S., Kim, T.H., Park, J., Lee, J.G., Kim, J., Kim, H., Lee, W.G., Cho, Y.K. Fully integrated lab-on-a-disc for simultaneous analysis of biochemistry and immunoassay from whole blood. *Lab Chip*. 2011; 11(1): 70-78.
- [129] Czilwik, G., Messinger, T., Strohmeier, O., Wadle, S., von Stetten, F., Paust, N., Roth, G., Zengerle, R., Saarinen, P., Niittymäki, J., McAllister, K., Sheils, O., O'Leary, J., Mark, D. Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation. *Lab Chip* 2015; 15(18): 3749-3759.
- [130] Owen, W.E., Caron, J.E., Genzen, J.R.. Liver function testing on the Abaxis Piccolo Xpress: Use in Ebola virus disease protocols. *Clin Chim Acta* 2015; 446: 119-127.

- [131] Roche, cobas b101 POC System. Actualizado en Mayo de 2015, consultado en Junio de 2016. Available at: <http://www.cobas.com/home/product/point-of-care-testing/cobas-b-101-poc-system.html>
- [132] Naylor, S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3(5): 525-529.
- [133] Mayeux, R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx.* 2004; 1(2): 182-188.
- [134] Jain, K.K. Types of biomarkers. In: *The handbook of biomarkers.* Humana Press, New York, 2010; pp. 1-21.
- [135] Liu, Y., Hegde, P., Zhang, F., Hampton, G., Jia, S. Prostate cancer-a biomarker perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012; 3: 72.
- [136] Kanyong, P., Rawlinson, S., Davis, J. Immunochemical Assays and Nucleic-Acid Detection Techniques for Clinical Diagnosis of Prostate Cancer. *J Cancer.* 2016; 7(5), 523.
- [137] Prensner, J.R., Rubin, M.A., Wei, J.T., Chinnaiyan, A.M. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 2012; 4(127): 127rv3.
- [138] Saini, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr).* 2016; 39(2): 97-106.
- [139] Cary, K.C., Cooperberg, M.R. Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present, and future. *Ther Adv Urol.* 2013; 5(6): 318-329.
- [140] Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O., Widmark, A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2009; 100(10): 1603-1607.
- [141] Mizutani, K., Terazawa, R., Kameyama, K., Kato, T., Horie, K., Tsuchiya, T., Seike, K., Ehara, H., Fujita, Y., Kawakami, K., Ito, M., Deguchi, T. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res.* 2014; 34(7): 3419-3423.
- [142] The Role of PSA. Prostate Cancer Foundation. Consultado en Junio 2016. Available at:
http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.5837041/k.8FFF/The_Role_of_PSA.htm

- [143] Healy, D.A., Hayes, C.J., Leonard, P., McKenna, L., O’Kennedy, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *Trends Biotechnol.* 2007; 25(3): 125-131.
- [144] Escamilla-Gómez, V., Hernández-Santos, D., González-García, M.B., Pingarrón-Carrazón, J.M., Costa-García, A. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosen and Bioelectron.* 2009; 24(8): 2678-2683.
- [145] Biscay, J., González García, M.B., García, A.C. Determination of Total PSA Using Magnetic Beads and a Re-usable Screen Printed Carbon Electrode Array. *Electroanalysis.* 2015; 27(12): 2773-2777.
- [146] Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J., Rawson, K., Nilsson, O., Leung, H. Y., Gnanapragasam, V. One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. *J Immunol Methods.* 2005; 307(1): 1-12.
- [147] Lin, Y.Y., Wang, J., Liu, G., Wu, H., Wai, C.M., Lin, Y. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Biosen Bioelectron.* 2008; 23(11): 1659-1665.
- [148] Hamburg, M.A., Collins, F. S. The path to personalized medicine *N Engl J Med.* 2010; 363(4): 301-304.
- [149] Properzi, F., Logozzi, M., Fais, S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2013; 7(5): 769-778.
- [150] Fais, S., O’Driscoll, L., Borrás, F. E., Buzas, E., Camussi, G., Cappello, F., Carvalho, J., Cordeiro, da Silva. A., Del Portillo, H., El Andaloussi, S., Ficko Trček, T., Furlan, R., Hendrix, A., Gursel, I., Kralj-Iglic, V., Kaeffer, B., Kosanovic, M., Lekka, M.E., Lipps, G., Logozzi, M., Marcilla, A., Sammar, M., Llorente, A., Nazarenko, I., Oliveira, C., Pocsfalvi, G., Rajendran, L., Raposo, G., Rohde, E., Siljander, P., van Niel, G., Vasconcelos, M.H., Yáñez-Mó, M., Yliperttula, M.L., Zarovni, N., Zavec, A.B., Giebel, B. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano.* 2016; 10(4): 3886-3899.
- [151] Kowal, J., Tkach, M., Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; 29: 116-125.
- [152] Gyorgy, B., Szabo, T.G., Paszto, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzas, E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68 (16): 2667-88.

- [153] Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(8): 569-579.
- [154] Gould, S. J., Raposo, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
- [155] Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q., Panaretakis, T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(1): 103-111.
- [156] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200 (4): 373-83.
- [157] Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X. M., Xu, Y.M., Huang, L.F., Wang, X.Z. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *The Scientific World Journal*. 2015; 657086.
- [158] Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014, 5:442.
- [159] Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113 (8): E968-E977.
- [160] Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(7): 940-948.
- [161] Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.M., Xu, Y.M., Huang, L.F., Wang, X.Z. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *Scientific World Journal*. 2015; 2015: 657086.
- [162] Ohno, S. I., Ishikawa, A., Kuroda, M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(3): 398-401.
- [163] Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., Fais, S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4 (4): e5219.
- [164] Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M.F., Piwnicka-Worms, D., Kalluri, R. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523 (7559): 177-82.

- [165] Campanella, C., Rappa, F., Sciumè, C., Marino Gammazza, A., Barone, R., Bucchieri, F., David, S., Curcurù, G., Caruso Bavisotto, C., Pitruzzella, A., Geraci, G., Modica, G., Farina, F., Zummo, G., Fais, S., Conway de Macario, E., Macario, A.J., Cappello, F. Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery. *Cancer* 2015; 121(18): 3230-3239.
- [166] Malm, T., Loppi, S., Kanninen, K.M. Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2016; 97: 193-199.
- [167] Sunkara, V., Woo, H.K., Cho, Y.K. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst* 2016; 141(2): 371-381.
- [168] Peterson, M.F., Otoc, N., Sethi, J.K., Gupta, A., Antes, T.J. Integrated systems for exosome investigation. *Methods* 2015; 87: 31-45.
- [169] Ko, J., Carpenter, E., Issadore, D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst* 2016; 141(2): 450-460.
- [170] Chen, C., Lin, B.R., Hsu, M.Y., Cheng, C.M. Paper-based devices for isolation and characterization of extracellular vesicles. *J Vis Exp.* 2015; 3(98): e52722.
- [171] Issadore, D., Min, C., Liong, M., Chung, J., Weissleder, R., Lee, H. Miniature magnetic resonance system for point-of-care diagnostics. *Lab Chip.* 2011; 11(13): 2282-2287.
- [172] Im, H., Shao, H., Park, Y.I., Peterson, V.M., Castro, C.M., Weissleder, R., Lee, H. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(5): 490-5.
- [173] Rupert, D.L., Lässer, C., Eldh, M., Block, S., Zhdanov, V. P., Lotvall, J.O., Bally, M. Höök, F. Determination of exosome concentration in solution using surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal Chem.* 2014; 86(12): 5929-5936.
- [174] Jeong, S., Park, J., Pathania, D., Castro, C.M., Weissleder, R., Lee, H. Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano.* 2016; 10(2): 1802-9.
- [175] Vaidyanathan, R., Naghibosadat, M., Rauf, S., Korbie, D., Carrascosa, L. G., Shiddiky, M. J., Trau, M. Detecting exosomes specifically: a multiplexed device based on alternating current electrohydrodynamic induced nanoshearing. *Anal Chem.* 2014; 86(22): 11125-11132.

- [176] He, M., Crow, J., Roth, M., Zeng, Y., Godwin, A.K. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab Chip*. 2014; 14(19): 3773-3780.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS

La disponibilidad de métodos rápidos y sensibles para la detección de proteínas es de gran interés en el diagnóstico diario. Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) se encuentran entre las plataformas *point-of-care* (POC) más establecidas para este fin. No obstante, sus usos diagnósticos reales pueden estar limitados por la necesidad de aumentar la sensibilidad y la capacidad de cuantificación.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de sistemas de análisis sensibles, rápidos y POC para la detección de biomarcadores clínicos bien establecidos y para nanovesículas biológicas que han emergido recientemente como potenciales biomarcadores de diagnóstico y / o pronóstico. Además, estos dispositivos están diseñados para ser empleados de forma sencilla por personal no experimentado. Para ello, se escogió inicialmente un sistema ampliamente conocido, como es el antígeno prostático específico (PSA), para después comenzar con el desarrollo de sistemas más complejos para la detección de vesículas extracelulares.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Diseño y desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral en formato *dipstick* para la detección del PSA como biomarcador de cáncer de próstata y exploración de diferentes estrategias de mejora de la sensibilidad.
2. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral en formato *dipstick* para la detección de PSA acoplado a un sensor magnético para lograr tanto detección visual como medidas cuantitativas.
3. Diseño y desarrollo de un ensayo ELISA automático en un disco (laboratorio en un disco).
4. Diseño y puesta a punto de un ensayo ELISA para la detección de vesículas extracelulares y transferencia del inmunoensayo optimizado a tiras de flujo lateral (formato *dipstick*) con el objetivo de crear un sistema de detección rápido y sencillo.
5. Simplificación y optimización de las etapas de aislamiento de las vesículas extracelulares para lograr obtener un "verdadero" sistema de detección POC basado en un inmunoensayo de flujo lateral con cuantificación de la señal por medio de medidas de reflectancia.

2.2. OBJECTIVES

The availability of rapid and sensitive methods for point-of-care (POC) detection of protein biomarkers is of great interest in daily diagnosis. Lateral flow immunoassays (LFIAs) are among the most established POC platforms for this purpose. However, their actual diagnostics uses are limited by the need for increased sensitivity and quantification capacity.

The general objective of this PhD thesis is the development of sensitive, rapid and POC analysis systems for the detection of well-established clinical biomarkers and emerging biological nanovesicles with diagnostic and/or prognostic biomarker potential. These devices are designed to be used by unskilled operators. For that, a widely known system such as prostate specific antigen (PSA), was initially selected, to follow later with the development of more complex systems for the detection of extracellular vesicles.

The specific objectives are as follows:

1. Design and development of a lateral flow dipstick immunoassay for the detection of PSA as biomarker for prostate cancer with enhanced sensitivity.
2. Development of a lateral flow dipstick immunoassay for the detection of PSA coupled to a magnetic sensor to achieve both quantitative measurements and visual detection.
3. Design and development of an automated lab-on-a-disc ELISA.
4. Design and development of an ELISA for the detection of extracellular vesicles and transference of the optimized immunoassay to lateral flow strips for a quick and easy detection system.
5. Simplification and optimization of the extracellular vesicles isolation steps for a “true” POC detection by lateral flow immunoassay with signal quantification by means of reflectance measurements.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Capítulo I: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización

- ∞ Artículo: “Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays”
- ∞ Abstract extendido: “Diseño de sistemas “point-of-care” utilizando la tecnología de la impresión con cera”

Como se ha mencionado en la introducción, a pesar de los avances realizados en los últimos años en los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA), éstos siguen sufriendo limitaciones de rendimiento analítico debido principalmente a problemas de sensibilidad. En este contexto, existen muchos estudios que han tratado de mejorar la sensibilidad del inmunoensayo, mediante el uso de diferentes marcas (nanopartículas de oro (AuNPs), partículas magnéticas, enzimas, quantum dots, etc.), el acoplamiento con transductores o mediante la amplificación de la señal de detección. De esta manera, la señal óptica obtenida de AuNPs puede ser amplificada por la deposición de plata, otras AuNPs o enzimas¹. Otra tendencia actual, aprovechando los avances realizados en el campo de la nanotecnología en los procesos de generación y manipulación de los nanomateriales, está siendo el desarrollo de materiales híbridos, como por ejemplo las microesferas magnéticas recubiertas de oro o las nanopartículas bimetálicas de Pt-Au o Au-Ag, entre otros. Además de la elección de la marca, otras estrategias empleadas para incrementar la sensibilidad de estos ensayos se basan en cambios en la estructura del papel, como por ejemplo cambios en la arquitectura de las almohadillas de muestra y de conjugado, o la impresión de pilares de cera en la membrana de detección para disminuir la velocidad de flujo de la muestra y aumentando, de esta forma, el tiempo de reacción del inmunocomplejo en la línea de test^{2,3}.

En este capítulo, se presenta el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral. Para iniciarse en este campo de los LFIA, se ha seleccionado un sistema ampliamente conocido, como es un inmunoensayo para la detección del PSA. Este marcador presenta el problema analítico y el desafío de necesitar el desarrollo de ensayos ultrasensibles que sean capaces de detectar concentraciones de PSA en suero muy bajas y así poder emplearse en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata y en las recidivas tumorales, como ya se ha comentado en el apartado 1.4.2.2 de la presente tesis. Por ello, inicialmente se procederá al desarrollo del LFIA, optimizando la bioconjugación del

1 Ge, X., Asiri, A. M., Du, D., Wen, W., Wang, S., Lin, Y. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2014; 58: 31-39.

2 Parolo, C., Medina-Sánchez, M., de la Escosura-Muñiz, A., Merkoçi, A. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. *Lab Chip*. 2013; 13(3): 386-390.

3 Rivas, L., Medina-Sánchez, M., de la Escosura-Muñiz, A., Merkoçi, A. Improving sensitivity of gold nanoparticle-based lateral flow assays by using wax-printed pillars as delay barriers of microfluidics. *Lab Chip*. 2014; 14(22): 4406-4414.

anticuerpo de detección al oro y los diferentes elementos clave del sistema, para posteriormente ensayar diferentes estrategias de amplificación de la señal analítica.

3.1.1. Bioconjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

En general, los anticuerpos se pueden unir a las nanopartículas de oro por cinco estrategias principales, que se basan en: 1) adsorción por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals; 2) enlace covalente a través de grupos amino o carboxilo; 3) enlace por medio de proteínas bacterianas como la proteína A o G; 4) oxidación de la cadena de oligosacáridos de la región Fc del anticuerpo; 5) empleando una molécula puente que facilita la unión entre ambos⁴.

En este capítulo se explorará la posibilidad de llevar a cabo una unión pasiva del oro al anticuerpo, para lo que es necesario llevar a cabo un ensayo de titulación o floculación y así determinar la cantidad de proteína requerida para alcanzar la estabilidad coloidal, parámetro crítico en la preparación de estos bioconjugados. Si la cantidad de proteína adsorbida en la superficie del oro es muy pequeña, puede ocurrir agregación de las partículas tras la adición de los electrolitos presentes en las reguladoras de trabajo o en la muestra real. Para determinar la cantidad óptima de proteína, basta con incubar un volumen pequeño y constante de oro coloidal con diferentes concentraciones del anticuerpo. Tras la adición de una sal a la disolución anterior, generalmente NaCl, se observa si existe un cambio de color respecto a la solución de oro coloidal original. Por ejemplo, la formación de agregados en oro coloidal de 40 nm se pone de manifiesto por el cambio de color a violeta o azul. Este proceso se consigue de manera óptima a un pH próximo al punto isoelectrico (pI) del anticuerpo⁵. La conjugación de las nanopartículas y su estabilidad puede ser monitorizada utilizando herramientas de caracterización como la absorción VIS-UV, espectroscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de transmisión (TEM), o por dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Esta última técnica será la utilizada en esta tesis para seguir la conjugación.

4 Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., Sedighimoghaddam, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research* 2016; 9: 17-22.

5 Chun, P. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 75-93.

3.1.2. Estrategias de sensibilización

Con el fin de aumentar la sensibilidad del LFIA se diseñaron diferentes estrategias, que pueden dividirse en dos grupos: estrategias basadas en la amplificación de la señal una vez terminado el ensayo y cambios en la arquitectura del papel. A continuación se explicarán con más detalle cada una de ellas.

3.1.2.1. Estrategias de amplificación de la señal

Una vez desarrollado y optimizado el LFIA para la detección de PSA, se llevaron a cabo diferentes estrategias de amplificación de la señal, tres basadas en la deposición de plata sobre oro y otra empleando un segundo oro coloidal. Este grupo de estrategias fueron objeto del primer artículo científico.

Deposición de plata

La deposición de plata sobre oro es un fenómeno bien conocido y que ha sido explotado desde los últimos 30 años en biosensores para la amplificación de la señal, gracias a la simplicidad del método y a la alta sensibilidad que puede ser alcanzada⁶. Esta estrategia de amplificación se basa en que las AuNPs puede promover la deposición de plata en presencia de una sal de plata (nitrato o acetato) y un agente reductor (por ejemplo, hidroquinona tamponada a pH ácido en una reguladora de ácido cítrico/citrato de sodio). Este proceso hace que aumenten las dimensiones de las partículas y que el color de las líneas de test y control, rojas por la presencia de las AuNPs, pasen a un color gris metálico-negro, que produce un mayor contraste sobre la membrana.

Con esta estrategia, una vez finalizado el ensayo para la detección del PSA, se llevaron a cabo tres procedimientos distintos: inmersión de la tira de LFIA en una disolución de sal de plata y el agente reductor, inmovilización de la sal de plata en la almohadilla de muestra y posterior adición de la disolución reductora, e inmovilización de la sal y el agente reductor en dos almohadillas distintas que se superponen en la zona de detección.

Doble oro

La extraordinaria afinidad de la avidina por la biotina, la interacción no covalente más fuerte conocida entre una proteína y su ligando, se puede utilizar como una herramienta

⁶ Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W., Gao, Y. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews* 2014; 49(2): 121-138.

útil en el diseño de sistemas de detección ya que permite que las moléculas que contiene biotina en una mezcla compleja se unan con conjugados de avidina. Partiendo de esta premisa, se ha realizado una modificación en la etapa de bloqueo del proceso de conjugación del anticuerpo con el oro, sustituyendo la albúmina bovina (BSA) por BSA-biotinilada. Esto nos permitió que, una vez finalizado el ensayo para la detección del PSA, se pudiera añadir un segundo oro conjugado con neutravidina que, por medio de la interacción biotina-avidina, permitió la inmovilización de estas partículas a la línea de test y, por tanto, la amplificación de la señal.

Los resultados correspondientes a estas dos estrategias (deposición de plata y doble oro) han sido publicados en la revista *Talanta* (sección 3.1.3).

3.1.2.2. Cambios en la arquitectura del papel: diseño de canales de cera

Los dispositivos de fluídica en papel, hechos a partir de patrones en este mismo sustrato, constituyen un nuevo campo de investigación desarrollado por la fusión de las ventajas de los sistemas de microfluidos con las características de este material, como son la sencillez, rentabilidad, portabilidad y disponibilidad⁷. Con la idea de mejorar las características analíticas de los LFIA, están surgiendo plataformas que combinan su desarrollo con las tecnologías en papel descritas (fotolitografía, la impresión con tinta de inyección, la impresión con cera, entre otras). Como ya se comentó en la introducción de este capítulo, una opción es la impresión de pilares de cera en la membrana de detección para producir una disminución de la velocidad de flujo³. No obstante, esta plataforma sigue requiriendo de múltiples almohadillas (almohadilla de muestra, de conjugado, membrana, y almohadilla absorbente) hechas de diversos materiales para construir la tira de flujo lateral. Una alternativa al LFIA puede ser la creación de patrones en papel de forma que se simule la estructura de la tira, pero utilizando un único material. Estudios realizados en esta línea proponen diseñar una tira inmunocromatográfica utilizando la impresión con tinta de inyección sobre el papel para crear canales, de forma que se sustituyen las diferentes almohadillas de una tira convencional por una única sección de papel de filtro. Aunque se estima que los precios de los dispositivos obtenidos con esta tecnología son muy bajos, algunos de los inconvenientes que tiene este tipo de fabricación son las etapas previas de desarrollo de la plataforma, con un tiempo para obtener la plataforma de más de 2 horas, y el uso de

⁷ Martínez W.A., Phillips S.T., Whitesides G.M. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem.* 2010; 82: 3-10.

tolueno, disolvente orgánico volátil con efectos sobre el medio ambiente y la salud y que requiere de ciertas medidas de seguridad para su utilización⁸.

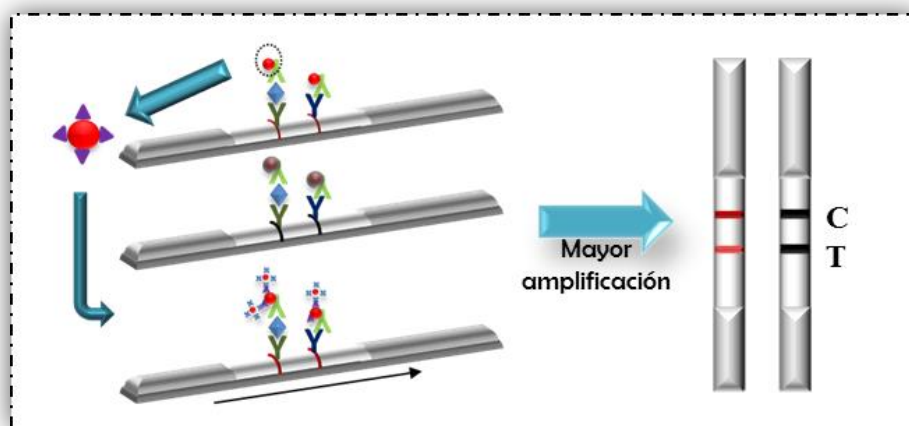
En este capítulo se propone como alternativa a la fabricación con tolueno el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral en papel empleando la tecnología de la cera, que como ya se ha mencionado es un método rápido, sencillo y barato. Aquí, la cera permite dirigir y confinar el fluido para intentar mejorar la sensibilidad. Con el fin de optimizar la plataforma de análisis, se llevaron a cabo cambios en la arquitectura de la tira (longitud, anchura, ángulo de entrada de la muestra a la zona de detección) y del material empleado como membrana (celulosa pura o éster de celulosa). Con el fin de demostrar su aplicabilidad real, se empleará para la detección del PSA total.

Esta estrategia de sensibilización se presentó como trabajo final del Diploma de Innovación Tecnológica y Gestión del Laboratorio Clínico (Cátedra extraordinaria Roche de diagnóstico e innovación), siendo seleccionado para su publicación como abstract extendido en la revista de Roche Diagnostics.

⁸ Abe K., Kotera K., Suzuki K., Citterio D. Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398: 885–893.

3.1.3. Artículo 1: “Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays”

Talanta 148 (2016) 272-278





Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Silver and Gold enhancement methods for lateral flow immunoassays

Myriam Oliveira Rodríguez, Lucía Blanco Covián, Agustín Costa García, Maria Carmen Blanco-López*

Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ABSTRACT

Sensitivity is the main concern at the development of rapid test by lateral flow immunoassays. On the other hand, low limits of detection are often required at medical diagnostics and other field of analysis. To overcome this drawback, several enhancement protocols have been described. In this paper, we have selected different silver enhancement methods and one dual gold conjugation, and we critically compared the amplification produced when applied to a gold-nanoparticle based lateral flow immunoassay for the detection of prostate specific antigen (PSA). The highest amplification was obtained by using an immersion method based on a solution of silver nitrate and hydroquinone/citrate buffer in proportion 1:1. Under these conditions, the system is capable of detecting PSA within 20 min at levels as low as 0.1 ng/mL, with a sensitivity improvement of 3-fold.

KEYWORDS: Lateral Flow Immunoassay Dipstick, Enhancement procedures, Silver enhancement, Dual gold conjugate

Introduction

Nowadays, there is a need to develop rapid, simple, and cost-effective tests capable of being performed by unskilled operators in areas such as diagnosis of diseases in developing countries or emergency rooms [1]. In this way, lateral flow immunoassay test (LFIA) represent a well-established and very appropriate technology when applied to a wide variety of point-of-care (POC) or in-field use applications. However, the detection sensitivity of the LFIA is lower than the others immunoassays based on fluorescent, radioactive, and enzyme-colorimetric methods (ELISA) [2] and a higher sensitivity is often required in medical diagnostics. Many studies have attempted to improve the sensitivity of the immunoassay, such as by using different labels (colloidal metal nanoparticles [3-6], enzymes [7-9], magnetic beads [10-12], quantum dots [13-14], etc.), coupling with transducers or by amplifying the detection signals. Gold nanoparticles (AuNP) are commonly used because they can be easily conjugated with biomolecules. Furthermore, they allow signal amplification in biosensing where they serve as labels [15]. One strategy to follow in order to enhance the signal is the use of larger nanoparticles. However, while colloidal gold particles smaller than 15 nm were found to be too small for producing an intense color, AuNP larger than 60-70 nm are more unstable, forming aggregates after several days of storage at 4°C [16]. They also require larger concentrations of antibodies in the conjugation, increasing costs. Tang et al. [17] developed a novel LFIA for the screening of aflatoxin B2 in food samples. The detector reagent consisted of magnetic nanogold microspheres (with nano-Fe₂O₃ particles as core and AuNP as shell) bio-functionalized with monoclonal anti-AFB2 antibodies. The visual detection limit obtained with this approach was about threefold lower compared to a conventional immunodipstick test using AuNP. Parolo et al. [18] discussed the development of an enhanced LFIA based on the use of AuNP in combination with the enzymatic activity of the HRP when it is coupled to the detection antibody. A detection limit of 310 pg/mL was achieved using this approach. Recently, H. Chon et al. [19] have carried out a similar approach using AuNP-assisted enzyme for detection of pathogens in food, adding the substrate in the cross-flow direction. With this approach, the limit of detection can be increased by about 1000-fold. AuNP can act as a catalyst and reduce copper and especially silver ions into their respective metals in the presence of a reducing agent. The reaction leads to the deposition of copper and silver on the gold surface as nucleation site and enlargement of the size of AuNP,

resulting in a remarkable signal amplification in the test and control line of the immunostrip [20]. The silver staining can be carried out in an incubation mode by immersing the membrane in the enhancement silver after performance the LFIA [21]. Silver enhancement technology was developed by Yang et al. [22] based on the use of two pads where AgNO_3 and the reduction agent were fixed. These two approaches have the inconvenient of involving additional operation steps in the assay, increasing the time and the difficulty to use them outside of the laboratory. To overcome this technical limitation Choi et al. [23] developed a new method to detect Troponin I utilizing two AuNP-antibody conjugates in different pads. The 1st AuNP conjugate was blocked with BSA and it was immobilized at the conjugate pad with an antibody against the antigen chosen. The 2nd AuNP anti-BSA conjugate was designed to bind only with the 1st AuNP conjugate and to enhance the signal. The LFIA method developed in this study is useful since it is a rapid one step analysis with a signal 100-fold more sensitive than the normal LFIA. Similarly, Wiriyachaiorn et al. [24] have recently proposed a double-targeted nanogold using the 2nd gold conjugate with anti-biotin instead of anti-BSA. With this approach they demonstrated a 4-fold lower LOD in the detection of influenza virus. Other approaches based on the use of two different AuNPs make use of DNA as crosslinker agent [25,26].

In this study, one new protocol of silver enhancement was developed with the aim of amplifying the signal of colloidal gold on the test strip after the standard assay, avoiding therefore the silver solution handling by the end user. This consisted on immobilizing the silver salt in a separated pad. Results were compared with those obtained by using other protocols reported at the literature. The thick silver layer on the gold nanoparticles endowed particular features, such as colorimetric, electrical and electrochemical properties for quantitative biosensing [27]. Silver has been used as electrochemical label for immunoassays [28,29], and therefore this protocol could be useful to explore the coupling of the strip with an electrochemical transducer in future work. A novel gold enhancement system was also developed based on the use of biotin-neutravidin bridge. While other methods reported in the literature use secondary antibodies such as anti-BSA or anti-biotin to perform the amplification [23, 24], in this work a new method is presented, potentially more advantageous than others reported previously, because it involves a neutravidin protein instead a specific antibody. As a

model antigen for this immunoassay research, prostate specific antigen (PSA), biomarker of prostate cancer, was used.

1. Material and methods

1.1. Chemicals and reagents

Mouse monoclonal anti-PSA antibodies HS-5 (capture antibody) and HS-8 (detection antibody) were produced by Healthsens (Oviedo, Spain). Anti-mouse IgG was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). PSA standard solution, calibrated against International Standard Stamey 9010 was obtained from Fujirebio Diagnosis. Gold nanoparticles (AuNP) of 40-nm and 20-nm were purchased from BBInternational (UK) to conjugate the antibody or neutravidin. Bovine serum albumin (BSA), Biotin-conjugated bovine serum albumin, AgNO₃, hydroquinone, citric acid monohydrate and sodium citrate dehydrate were purchased by Sigma-Aldrich. Neutravidin was purchased by Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA). Other reagents used in this study were of analytical grade.

Nitrocellulose membranes (UniSart CN95) were purchased from Sartorius (Spain). Other materials used were: glass fiber sample pads (GFCP001000, Millipore, Germany), backing cards (KN-V1080, Kenoshatapes, Netherlands) and absorbent pads (Whatman, USA).

Based on previous results, the sample buffer consisted of 10mM PBS pH 7.4 with 0.05% Tween-20 and 2% BSA.

1.2. Equipment

An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection line. A guillotine Fellowes Gamma (Spain) was used to cut the strips. To analyze the enhancement procedure, the strip was scanned before and after this step using a HP Officejet Pro 8500A scan. The optical density of the capture image from the signal monitoring window was digitized using ImageJ 1.48v software.

1.3. Labelling antibody with colloidal gold

The desirable concentration of the antibody to stabilize the gold nanoparticles was found following the titration of gold colloid procedure as described in reference [30]. Then, 100 μ L of 150 μ g/mL HS-8 anti-PSA was added to 1.5mL of gold solution. After shaking for 1h, 100 μ L of the blocking solution Biotin-conjugated BSA (40% v/v ; prepared by mixing 40 μ L of 1 mg/mL Biotin-conjugated BSA with 60 μ L of 1 mg/mL BSA in phosphate buffer (PBS 10mM, pH 7.4) was added to the mixture to block the residual surfaces of antibody-colloidal gold conjugated. After 20 min of reaction, the solution was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PBS with 10% sucrose and 1% BSA (100 μ L). The product (AuNPs-HS-8 conjugate) was then stored at 4°C until used.

1.4. Characterization of nanoparticles conjugates

Size distribution and ζ -potential were carried out with a Zetasizer Nano ZS (Malvern) equipped with a solid-state He-Ne laser ($\lambda= 633$) for monitoring the conjugation process.

1.5. Preparation of immunostrip

The nitrocellulose membrane (NC, 25 mm-wide) was incorporated onto a plastic backing card to give robustness to the membrane. The test zone of the strip was prepared dispensing a desired volume of 1 mg/mL mouse monoclonal HS-5 anti-PSA and anti-IgG to form the test (T) and control (C) lines respectively with the dispenser IsoFlow onto NC membrane at a dispensing rate of 0.100 μ L/mm and was dried for 20 min at 37°C. The sample pad and the absorbent pad were then settled onto the backing card with an overlap between them of around 2 mm. The complete strip was cut into individual 4 mm strips. The strip was assembled as describe in Figure 1.

1.6. Lateral flow immunoassay

PSA standard solutions at concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 4 and 10 ng/mL were prepared by diluting a PSA stock solution in the sample buffer. The amount of BSA and Tween-20 was optimized for this assay, obtaining the best results when 2% BSA and 0.05% Tween-20 were added to the PBS. The volume of AuNPs-HS8 conjugate was

also optimized, looking for a compromise between sensitivity and reagent costs. For dipstick analysis, samples were transferred into the microtube containing 10 μL of AuNPs-HS-8 conjugate and homogenized (final volume 100 μL). Then the dipstick was added into the microtube and the sample was allowed to run for 10 min (Figure 1). The performance of the immunostrip relied on non-competitive assay formats. PSA in the sample was sandwiched between an anti-PSA antibody immobilized on the strip (Test line, T) and the AuNP-conjugated antibody. The unbound AuNP-conjugates migrated further to be captured with the anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) for system functional verification. Once the test was run, the line intensities were recorded by scanning the images.

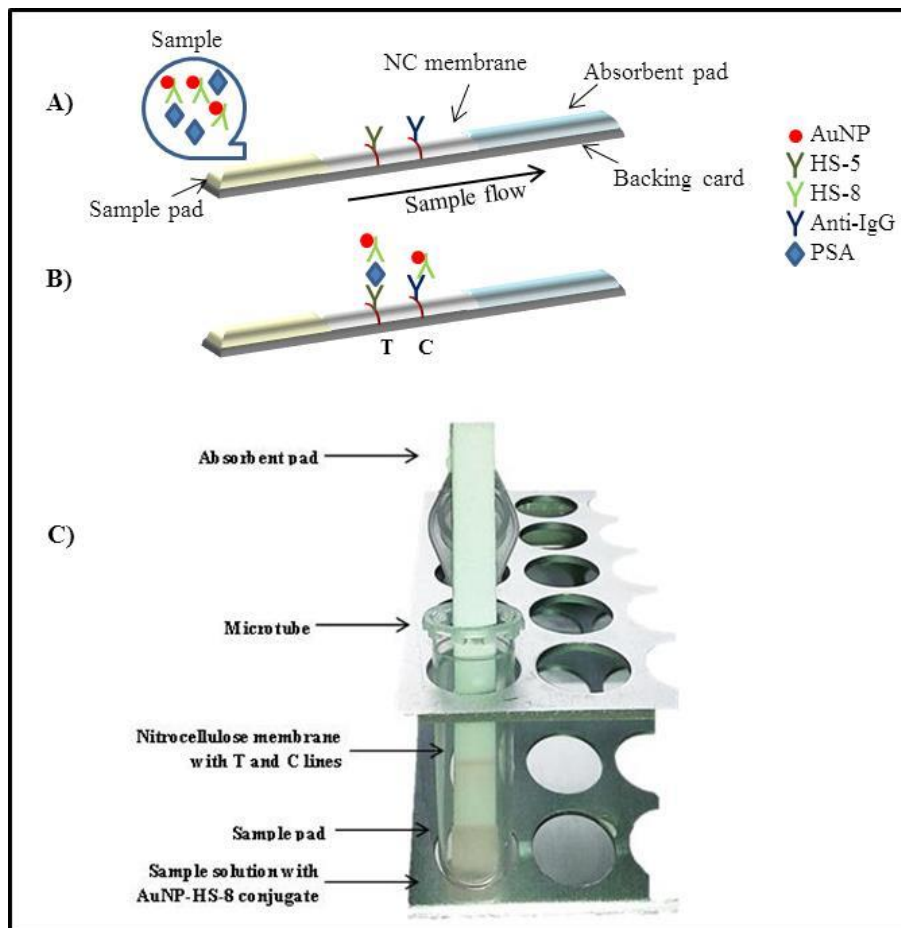


Fig. 1 A) Schematic representation of the Lateral Flow Immunoassay Dipstick. Specific antibodies against prostate specific antigen (PSA) (Test, T) and anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) are immobilized on the membrane. B) Detection of PSA before the amplification procedure. PSA, if present in the sample, form a complex with AuNP-conjugated antibodies and are captured onto the membrane by the immobilized antibodies. C) Dipstick procedure for sample analysis

1.7. Silver enhancement procedure

2.7.a. Immersion

The immersion protocol for silver enhancement was carried out according to the literature with some variations [31]. A solution of silver nitrate (0.3 % w/v in water) and other of hydroquinone (3 % w/v in 0.5 M citrate buffer pH 4.0) were prepared and stored at room temperature in the dark. Just before use, the enhancing solution was freshly prepared by 1:1 mixing of the two solutions. 10 min after the addition of the sample, the NC strip was dipped into the microtube containing 100 μ L of this solution for 10 min. The strip was then scanned to analyze the signal intensity.

2.7.b. Sandwich immunochromatographic assay

The protocol was executed as described elsewhere [22]. A glass fiber pad (4x10 mm) was washed with distilled water and immersed in a silver nitrate solution (0.3 % w/v in water). Another pad with the same dimensions was saturated with the reducing agent (3% w/v hydroquinone in 0.5 M citrate buffer pH 4.0). Both pads were dried at room temperature in the dark and kept in those conditions until use. After 10 min of the sample adding, the test zone on the NC membrane was covered by the silver pad, and then the reducer pad was placed above it. Once the pads were located forming a sandwich in the strip, 100 μ L of distilled water was added to the pads. After 10 min, the strip was scanned to measure the optical density of the stain.

2.7.c. Conjugated pad modified with silver

In order to perform this assay, the silver salt for silver enhancement was incorporated into the device itself. A glass fiber sample pad (4x10 mm) was washed with different solutions to study the release of the silver from the pad and was immersed in a silver nitrate solution (0.3 % w/v in water). It was dried at room temperature in the dark and placed in the strip in the place of the sample pad. The strip should be kept in the dark until use. The test was carried out as described in part 2.5. After running the test, 50 μ L of 3 % w/v hydroquinone in 0.5 M citrate buffer pH 4.0 were added in the microtube. Line intensities were recorded by scanning images after 10 min.

1.8. Gold enhancement procedure

In this assay, two AuNP conjugates were used. The first conjugate contained a monoclonal antibody against the analyte in the same way as in previous assays. The second conjugate is prepared by conjugation of 20-nm AuNP with neutravidin (the conjugation protocol is the same that in the case of AuNP with HS-5 described in part 2.3, after the optimization of the neutravidin concentration required to stabilize the gold). This procedure was designed to bind only the first primary AuNP conjugate to improve the signal. The test was carried out as described in part 2.5. Once the test was run, 8 μL AuNP-neutravidin conjugate, previously optimized, was added to the microtube containing PBS buffer with 0.05% Tween (final volume 50 μL). Line intensities were recorded by scanning images after 10 min.

2. Results and Discussion

2.1. Characterization of nanoparticles conjugates

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were carried out to confirm the conjugation reaction between the gold nanoparticles and the antibody or neutravidin in each case. This technique allows monitoring the size variation of the nanoparticles after the conjugation reaction. Comparing with TEM, the DLS values are expected to be larger due to the double layer which goes into the calculations of the hydrodynamic diameter of the particles in solution. The results showed that the hydrodynamic sizes of the conjugates were 85.60 nm (PDI 0.180) and 43.88 (PDI 0.230) for AuNP-HS8 and AuNP-Neutravidin respectively. The data from DLS shows that the conjugates are monodisperse (Figure 2). The absence of additional peaks, together with the PDI value obtained, indicate the not presence of aggregates in the solution.

To determinate their stability, ζ -potential measures were carried out. To remain stable, they must have enough repulsion to keep the particles apart. The results showed a ζ -potential of -20 mV and -23 mV for AuNP-HS8 and AuNP-Neutravidin respectively, indicating that the conjugates were stable.

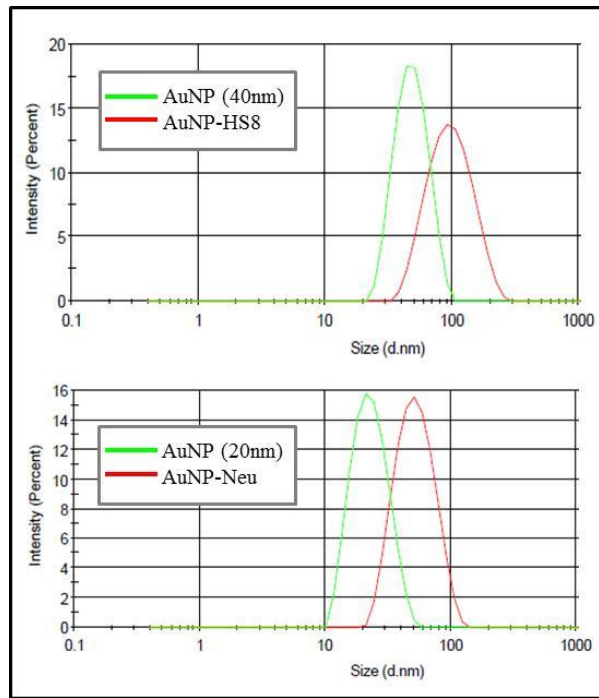


Fig 2. Hydrodynamic size distribution profiles of different gold nanoparticles solutions before (denoted as AuNP 40 nm and AuNP 20 nm) and after the conjugation with antibody or neutravidin (denoted as AuNP-HS8 and AuNP-Neu, respectively)

2.2. Silver immobilization optimization

The first step to carry out the silver enhancement was to study the silver immobilization process itself. In order to optimize the silver release from the sample pad, it was treated with different solutions before the immobilization process (water, PBS 10mM with 0.05% Tween and PBS 10mM with 1%BSA). Only in the case that the sample pad was treated with BSA, the grey signal produced when the hydroquinone/citrate solution was added in the second step appeared. This could be explained because in the others methods either the immobilization process was less effective or the silver was strongly bond to the sample pad and couldn't be released from it. Additional experiments were carried out by modifying the sample pad with PBS 10mM with 1%BSA before the silver immobilization.

2.3. Gold enhancement procedure

Different volumes of AuNP-Neutravidin and different sample buffers were tested in order to obtain the higher amplification. The best results were obtained when 8 μ L of AuNP-Neutravidin were added to PBS buffer with 0.05% Tween. Higher volumes resulted in a high background, hindering the signal.

2.4. Comparison of enhancement procedures

We compared four signal amplification methods involving gold, silver or both: Immersion in silver hydroquinone/citrate solution, Sandwich immunochromatographic assay, Conjugated pad modified with silver and Gold enhancement procedure (Figure 3). In order to compare these different enhancement strategies, and based in previous experiments, we selected a low PSA concentration, which produced a weak red line in the test line, almost undetectable when it was scanned. The concentration chosen was 0.5 ng/mL. All the assays were performed by triplicate and were scanned in grey scale with a scan resolution of 2400ppp. The results are shown in Figure 4. The test line intensity was analyzed using ImageJ software.

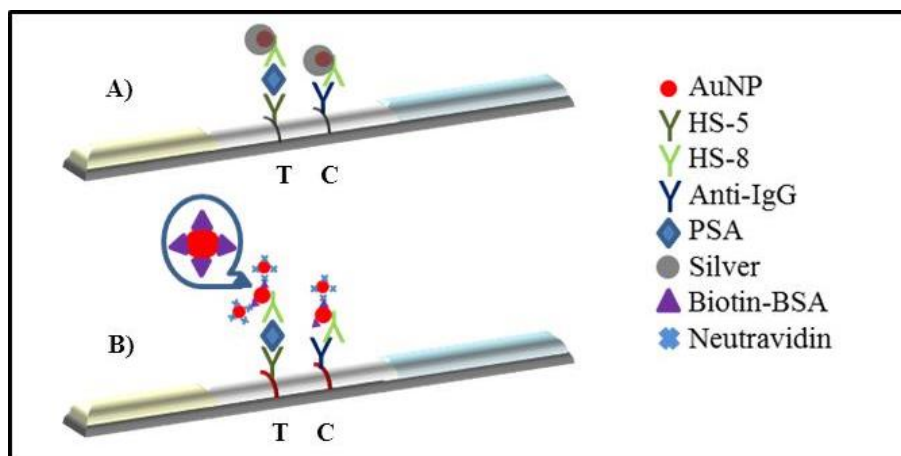


Fig. 3 A) Silver enhancement procedure. Reducing reagent and silver ions are applied on the membrane and silver clusters are formed around the AuNP. B) Gold enhancement procedure. A second AuNP-conjugated is added on the membrane and it binds with the AuNP-conjugated antibody immobilized in the test line.

Referring to Figure 4, we see that, basing on naked-eye, the higher amplification was obtained using the immersion method. These results were confirmed using the ImageJ software, which showed 3-fold amplification related to the signal obtained when only gold is used. The optical density in this case is higher than in the other amplification methods. The results obtained when the sandwich method was used were good too, but the process is more tedious because it needs more user manipulation to put the two modified pads over the test and control lines. Moreover, it produces a higher background that in the case of the immersion. When silver is immobilized in the conjugate, the signal obtained in the test line is not homogeneous when the first binding assay with AuNP-HS8 is carried out. This is probably due to the non-homogeneous

presence of BSA and silver nitrate in the sample pad. This effect also results in a lower sensitivity even before the enhancement step. The assay performed using two gold nanoparticles produced good results. However, they do not reach the amplification level of the silver immersion method. This approach has got the advantage of that it can be performed in a single step, mixing the two conjugates in the microtube before dipping the strip in. The amplification, however, is a bit worst, due probably to some steric impediments.

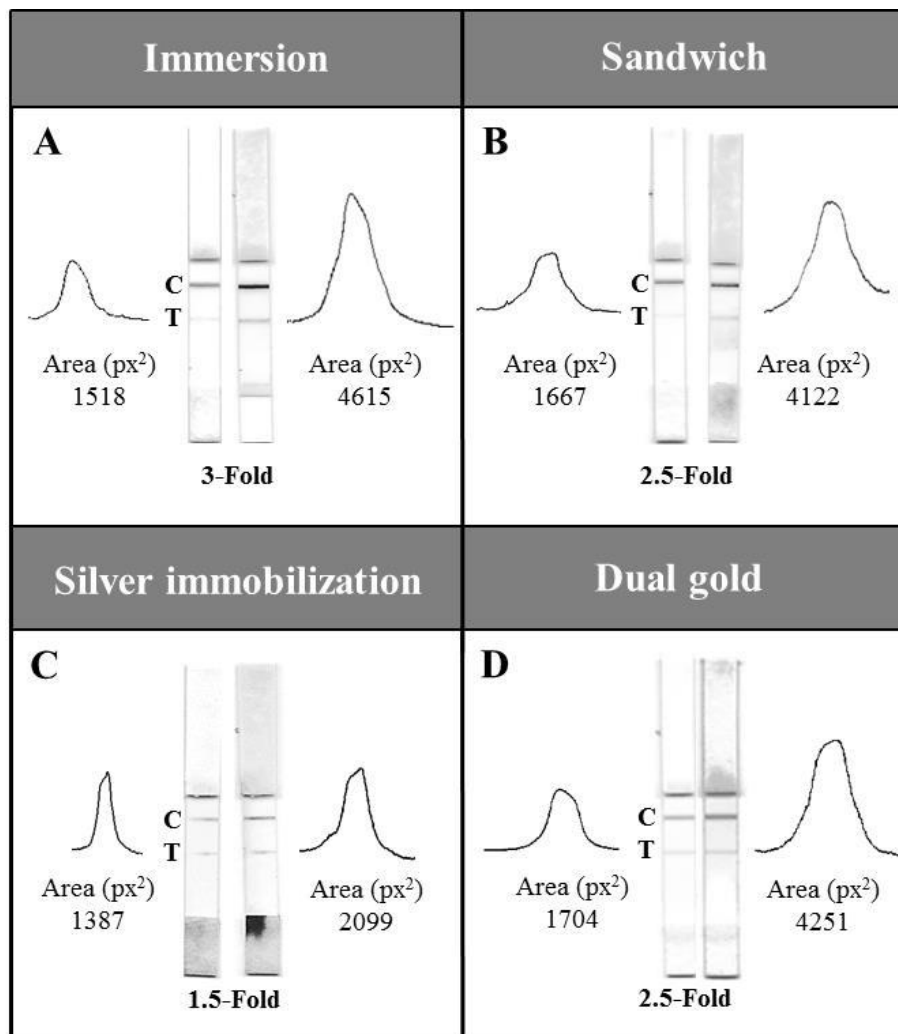


Fig. 4. Results obtained by enhancement process. In each cell of the table, the strip before the amplification process is on the left, and the strip after the amplification is on the right. The strips are accompanied by corresponding signal intensity peaks generated by ImageJ software A) Immersion. B) Sandwich immunochromatographic assay. C) Conjugated pad modified with silver. D) Gold enhancement procedure. Bottom row show the amplification obtained in each case. Both images and the image analysis are representative of three individual experiments.

In view of these results, it can be concluded that the immersion in silver and hydroquinone/citrate solution produced low background, and yielded a relatively strong

signal, in a simple step consisting in mixing two solutions previously prepared. Therefore this was selected as the best amplification method for further assays. A photograph showing the red and grey-dark test and control lines produced by both gold (primary) and the best silver enhancement method is shown in Figure 5.

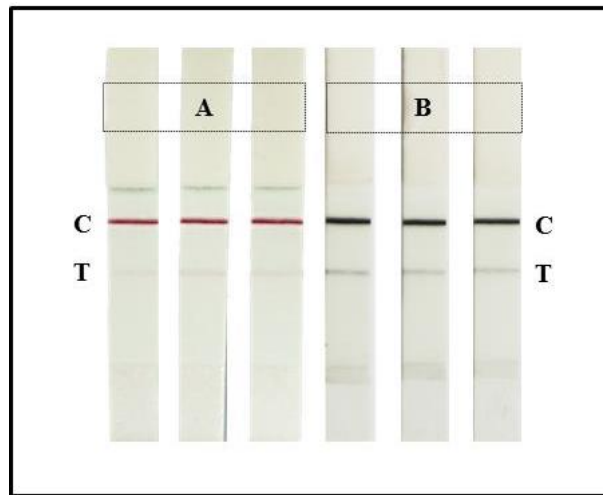


Fig. 5. Comparison of the test lines obtained in a Lateral Flow Immunoassay Dipstick for PSA (0.5 ng/mL). A) Antibody labelled with AuNP (40nm). B) Silver enhancement signal using the immersion method.

2.5. Calibration curve with silver enhancement

Several standards were prepared by spiking the buffer solution with various concentrations of PSA, and they were assayed by the test strip. Detection limit for the first step (AuNP-HS8 as label) was 0.5 ng/mL by eye-naked. To improve detection limit, the tested strip was dipped in the silver enhancer solution. Using this approach, 0.1 ng/ml of PSA was easily detected by naked-eye. Very low non-specific binding is shown in the absence of PSA in the silver enhancement step. The line intensities were recorded before and after the silver enhancement using the HP scan and the intensities were measured using ImageJ software. Results are comparatively shown in Figure 6.

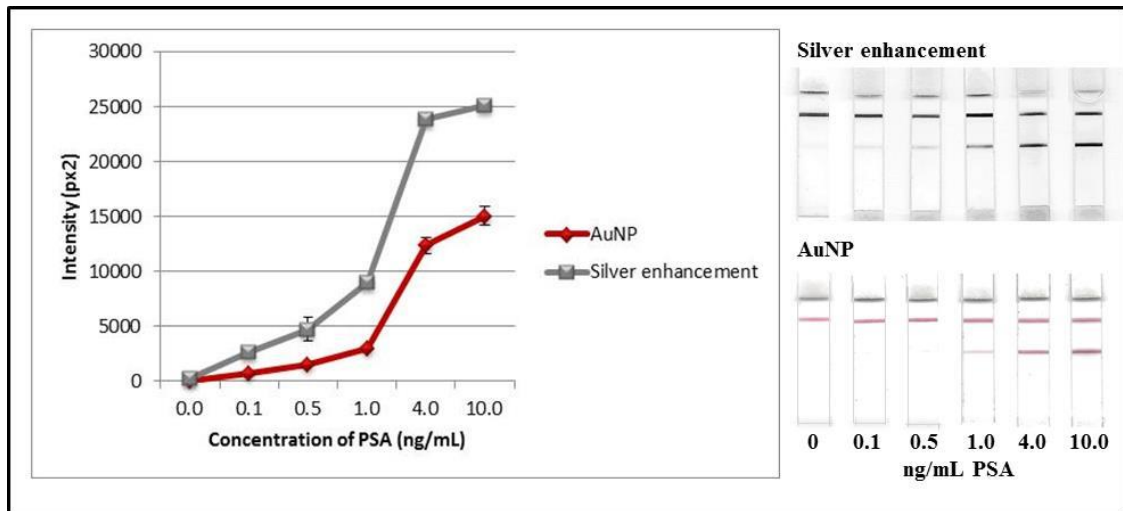


Fig. 6. Detection of PSA with varying concentrations by LFIA Dipstick and the silver enhancement by immersion. The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate runs. Representative example of results obtained in the strips before and after the silver enhancement process is shown on the right.

3. Conclusion

An enhanced lateral flow immunoassay was successfully developed using different silver staining and one dual gold method as signal amplification strategy to detect PSA. The best results were obtained when the strip was dipped in a second step in a solution containing silver nitrate and hydroquinone/citrate buffer in proportion 1:1. A 3-fold improvement in sensitivity with a detection limit of 0.1 ng/mL of PSA could be achieved by using this approach. The proposed method is simple, convenient, and low cost. The performance of the assay was simple and can be completed in 20 minutes. This study demonstrated a proof-of-concept of different LFIA amplification procedures, which could be potentially used in other applications.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

Founding from project CTQ2013-47396-R is acknowledged. M. Oliveira-Rodríguez thanks FICYT for her pre-doctoral grant.

References

- [1] J. Gordon, G. Michel. Analytical Sensitivity Limits for Lateral Flow Immunoassays. *Clin. Chem.* 54 (2008) 1250-1251.
- [2] GA. Posthuma-Trumpie, J. Korf J, A. van Amerongen. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 393 (2009) 569-582.
- [3] RH. Shyu, HF. Shyu, HW. Liu, SS. Tang. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon* 40 (2002) 255-258.
- [4] S. Goudarzia, A. Ahmadi, M. Farhadi, SK. Kamrava, F. Mobarrez, K. Omidfar. A new gold nanoparticle based rapid immunochromatographic assay for screening EBV-VCA specific IgA in nasopharyngeal carcinomas. *J. Appl. Biomed.* 13 (2015) 123-129.
- [5] J. Liang H. Liu, C. Lan, Q. Fu, C. Huang, Z. Luo, T. Jiang, Y. Tang. Silver nanoparticle enhanced Raman scattering-based lateral flow immunoassays for ultra-sensitive detection of the heavy metal chromium. *Nanotechnology* 25 (2014) 495501.
- [6] CW. Yen, H. de Puig, JO. Tam, J- Gómez-Márquez, I. Bosch, K. Hamad-Schifferli, L. Gehrke. Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. *Lab Chip* 15 (2015) 1638-1641.
- [7] JH. Cho, EH. Paek, IH. Cho, SH. Paek. An enzyme immunoanalytical system based on sequential cross-flow chromatography. *Anal Chem* 77 (2005) 4091-4097.
- [8] ZX. Zou, J. Wang, H. Wang, YQ. Li, Y. Lin. An integrated electrochemical device based on immunochromatographic test strip and enzyme labels for sensitive detection of disease-related biomarkers. *Talanta* 94 (2012) 58-64.
- [9] MR. Akanda, HA. Joung, V. Tamilavan, S. Park, S. Kim, MH. Hyun, MG. Kim, H. Yang. An interference-free and rapid electrochemical lateral-flow immunoassay for one-step ultrasensitive detection with serum. *Analyst* 139 (2014) 1420-1425.
- [10] C. Liu, Q. Jia, C. Yang, R. Qiao, L. Jing, L. Wang, C. Xu, M. Gao. Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Sensitive Pesticide Detection by Using Fe₃O₄ Nanoparticle Aggregates as Color Reagents. *Anal Chem* 83 (2011) 6778-6784.
- [11] DB. Wang, B. Tian, ZP. Zhang, JY. Deng, ZQ. Cui, RF Yang, XY. Wang, HP. Wei, XE. Zhang. Rapid detection of Bacillus anthracis spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detection system. *Biosens. Bioelectron.* 42 (2013) 661-667.

- [12] D. Liu, Y. Huang, S. Wang, K. Liu, M. Chen, Y. Xiong, W. Yang, W. Lai. A modified lateral flow immunoassay for the detection of trace aflatoxin M1 based on immunomagnetic nanobeads with different antibody concentrations. *Food Control* 51 (2015) 218-224.
- [13] F. Cimaglia, A. Aliverti, M. Chiesa, P. Poltronieri, E. De Lorenzis, A. Santino, LA. Sechi. Quantum dots nanoparticle-based lateral flow assay for rapid detection of *Mycobacterium* species using anti-FprA antibodies. *Nanotechnology Development* 2 (2012) e5.
- [14] X. Li, D. Lu, Z. Sheng, K. Chen, X. Guo, M. Jin, H. Han. A fast and sensitive immunoassay of avian influenza virus based on label-free quantum dot probe and lateral flow test strip. *Talanta* 100 (2012) 1–6.
- [15] X. Cao, Y. Ye, S. Liu. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing *Anal Biochem* 417 (2011) 1-16.
- [16] K. Omidfar, S. Kia, S. Kashanian, M. Paknejad, A. Besharatie, S. Kashanian, B. Larijani. Colloidal Nanogold-Based Immunochromatographic Strip Test for the Detection of Digoxin Toxicity. *Applied Biochem and Biotechnology* 160 (2010) 843-855.
- [17] D. Tang, J.C. Saucedo, Z. Lin, S. Ott, E. Basova, I. Goryacheva, S. Biselli, J. Lin, R. Niessner, D. Knopp. Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 514-518.
- [18] C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosens. Bioelectron.* 40 (2013) 412-416.
- [19] IH. Cho, A. Bhuniac, J. Irudayaraj. Rapid pathogen detection by lateral-flow immunochromatographic assay with gold nanoparticle-assisted enzyme signal amplification. *International Journal of Food Microbiology* 206 (2015) 60–66.
- [20] K. Omidfar, F. Khorsand, MD. Azizi. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosens. Bioelectron* 43 (2013) 336-347.
- [21] DJ. Chiao, RH. Shyu, CS. Hu, HY. Chiang, SS. Tang. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 37-41.

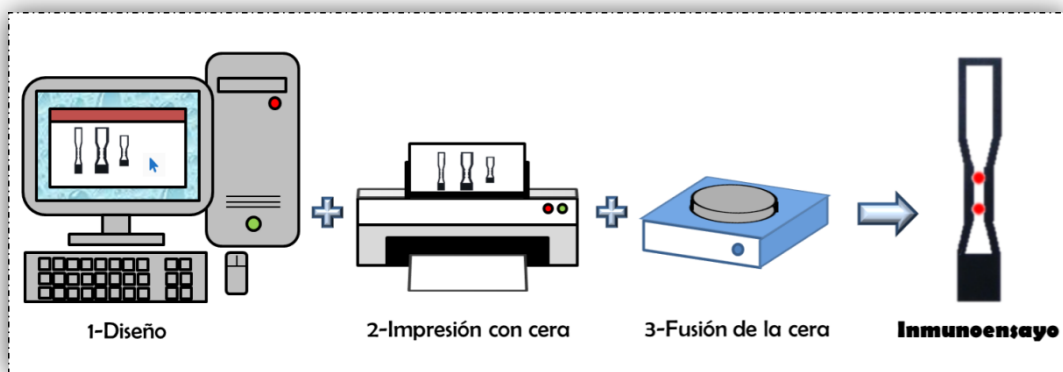
- [22] W. Yang, XB. Li, GW. Liu, BB. Zhang, Y. Zhang, T. Kong, JJ. Tang, DN. Li, Z. Wang. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3710–3713.
- [23] DH. Choi, SK. Lee, YK. Oh, BW. Bae, SD. Lee, S. Kim, YB. Shina, MG. Kim. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1999-2002.
- [24] N. Wiriyachaiorn, W. Maneeprakorn, C. Apiwat, T. Dharakul. Dual-layered and double-targeted nanogold based lateral flow immunoassay for influenza virus. *Microchim Acta* (2015) 182: 85-93.
- [25] G. Shen, S. Zhang, X. Hu. Signal enhancement in a lateral flow immunoassay based on dual gold nanoparticle conjugates. *Clinical Biochemistry* 46 (2013) 1734–1738.
- [26] J. Zhu, N. Zou, D. Zhu, J. Wang, Q. Jin, J. Zhao, H. Mao. Simultaneous Detection of High-Sensitivity Cardiac Troponin I and Myoglobin by Modified Sandwich Lateral Flow Immunoassay: Proof of Principle. *Clinical Chemistry* 57 (2011) 1732–1738.
- [27] R. Liu, Y. Zhang, S. Zhang, W. Qiu, Y. Gao. Silver Enhancement of Gold Nanoparticles for Biosensing: From Qualitative to Quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews* 2014; 49: 121-138.
- [28] D. Hernández-Santos, MB. González-García, A. Costa-García. Electrochemical determination of gold nanoparticles in colloidal solutions. *Electrochim. Acta* 46 (2000) 607-615.
- [29] G. Martínez-Paredes, MB. González-García, A. Costa-García. Screen-printed electrodes for electrochemical DNA detection, in M. Oszos (Eds.), *Electrochemical DNA biosensors.*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, 2012, pp. 291-328.
- [30] S. Thobhani, S. Attree, R. Boyd, N. Kumarswami, J. Noble, M. Szymanski, RA. Porter. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of Immunological Methods* 356 (2010) 60-69.
- [31] P. Chun. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays, in RC. Wong, HY. Tse (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay*, Springer, New York, 2009, pp. 82-83.

**3.1.4. Abstract extendido: “Diseño de sistemas “point-of-care”
utilizando la *tecnología de la impresión con cera*”**

Roche Diagnostics Informa

Diploma de innovación tecnológica y gestión en el laboratorio clínico

Selección 10as Jornadas-2014: 61-62





Diseño de sistemas “point-of-care” utilizando la tecnología de la impresión con cera

Myriam Oliveira Rodríguez^{1,2}

1-Hospital San Agustín, Camino de Heros 6, 33401, Avilés (Spain)

2-Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

1. Introduction

La tecnología de biosensores se ha desarrollado significativamente, especialmente en el campo biomédico y medioambiental. En comparación con los grandes equipos de laboratorio, los biosensores son generalmente rápidos, sensibles, selectivos, de uso sencillo y no requieren tediosos pretratamientos de muestras (1). Los inmunoanálisis de flujo lateral (LFIA, de su acrónimo inglés lateral flow immunoassay) constituyen la alternativa más sencilla para el análisis descentralizado y presentan un gran número de aplicaciones clínicas. A pesar de los avances realizados siguen sufriendo limitaciones de rendimiento analítico debido principalmente a problemas de sensibilidad y reproducibilidad (2). La microfluídica basada en papel ha aparecido como una tecnología emergente que utiliza papel como sustrato a través de la creación de patrones complejos de canales hidrófilos y barreras hidrofóbicas mediante el uso de técnicas de modelado (3). Estos dispositivos analíticos integran las capacidades multiplex de microfluídica con la flexibilidad y la simplicidad de la tecnología de LFIA. Una de las técnicas de modelado empleadas es la impresión con cera, donde un patrón de cera se imprime en una hoja de papel usando una impresora de tinta sólida comercialmente disponible. El método es sencillo, rápido y sólo requiere de una impresora de tinta sólida y una placa calefactora. Además el coste por dispositivo es de casi cero, característica que hace a esta técnica muy atractiva (4).

2. Objetivo

El objetivo del trabajo es diseñar un inmunoanálisis de flujo lateral en papel utilizando la tecnología de impresión con cera y comparar los resultados obtenidos con un inmunoanálisis de flujo lateral en formato *dipstick*. Como sistema modelo se utilizará el antígeno prostático específico total (PSAt), biomarcador más establecido para la detección del cáncer de próstata.

3. Material y métodos

3.1. Materiales

Anticuerpos monoclonales de ratón anti-PSA producidos por Healthsens S.L. (Oviedo, España). Anticuerpo anti-IgG policlonal de ratón de Sigma-Aldrich (España). Solución estándar de PSA basada en suero humano, calibrada frente a 1st IS 96/670 obtenida de Monobind Inc. (USA). Nanopartículas de oro (AuNP) de 40-nm de BBInternational (Reino Unido).

Membrana de nitrocelulosa (UniSart CN95) de Sartorius (España). Papeles compatibles con la impresora (Hi-Flow Plus 75, Merk Millipore (Germany) y Whatman n°1 (USA)). Almohadilla de muestra (Merk Millipore (Germany)), almohadilla absorbente (Whatman, USA) y tarjetas autoadhesivas para montaje de test rápido de flujo lateral (MDI, India).

3.2. Instrumentación

Impresora de cera Xerox ColorQube 8570 (Xerox Corporation, EE.UU.), placa calefactora, guillotina de filo rodante para material plástico (Kodak, USA).

3.3. Experimental

3.3.1. Diseño de LFIA mediante impresión con cera

Se diseñaron patrones de barreras hidrofóbicas utilizando el procesador de imagen Adobe Illustrator (Figura 1A). La cera fue impresa en papel cromatográfico Whatman n° 1 y Hi-Flow Plus 75 de Millipore utilizando la impresora de tinta sólida Xerox ColorQube 8570. El papel impreso se coloca sobre una placa calefactora de forma que la cera funde y se extiende a través del grosor del papel.

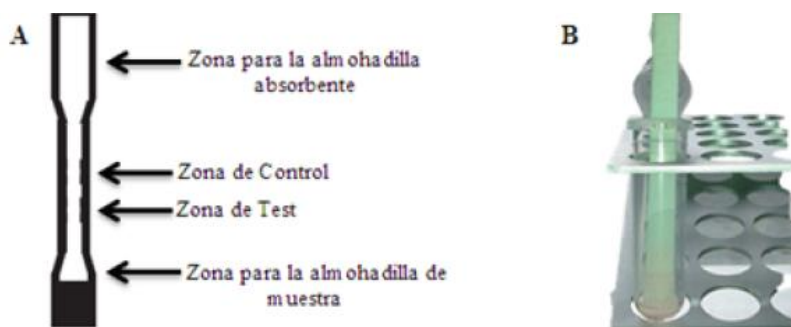


Fig. 5 A) Diseños de LFIA usando la tecnología de impresión en cera. B) LFIA en formato dipstick.

3.3.2. Preparación de las tiras de LFIA

En el caso del LFIA en formato dipstick la almohadilla de conjugado y la almohadilla absorbente se colocan una a cada lado de la membrana de nitrocelulosa, solapándose unos 2 mm con ella. Las tarjetas autoadhesivas sirven como soporte para ensamblar los componentes. A continuación se cortan tiras individuales de aproximadamente 5 mm de ancho con una guillotina. En el caso de las tiras de papel impresas en cera, para ensamblar los componentes se emplea un celo de doble cara o un spray adhesivo. En ambos tipos de tiras, se dispensan con una micropipeta los reactivos de captura (anti-PSA) y de control (anti-IgG), ambos en concentración de 1g/L, y se dejan secar en una estufa a 37°C durante 20 minutos.

3.3.3. Procedimiento del LFIA

El LFIA en formato *dipstick* se llevó a cabo en tubos *ependorf* por inmersión de la tira anteriormente fabricada (Figura 1B). 5µL de conjugado oro-anticuerpo anti-PSA se añade al tubo *ependorf* junto a la muestra en distintas concentraciones. Después de 10 min, se registran las intensidades de los puntos con una cámara fotográfica de teléfono móvil.

En el caso del papel impreso en cera se han seguido dos estrategias para la adición de la muestra: a) Inmovilización de 5 µL de conjugado oro-anticuerpo anti-PSA en la almohadilla de muestra y posterior adición de 50 µL de muestra y b) mezcla previa de la muestra con el conjugado en un tubo *ependorf* y adición de la mezcla a la almohadilla de muestra.

4. Resultados

4.1. Optimización del LFIA en formato dipstick

Se llevó a cabo la optimización de la cantidad de anticuerpo de captura, con el fin de realizar el análisis con el menor coste posible de anticuerpo sin comprometer la sensibilidad del sistema. Para ello se probaron distintos volúmenes de anticuerpo de captura (0,3, 0,4 y 0,5 μL), obteniéndose mejores resultados en el caso de 0,5 μL . A continuación, se procedió a realizar ensayos con distintas concentraciones de muestra (0-10 $\mu\text{g/L}$), observándose que los cambios de color en la zona baja de concentraciones no eran muy significativos. Teniendo en cuenta la tendencia actual de disminuir los límites de detección, se realizaron pruebas con el fin de garantizar una escala de color en esa zona baja de concentraciones, fijándose finalmente como anticuerpo de captura 0,5 μL de concentración de 0,5 g/L . En estas condiciones se puede obtener un buen calibrado de PSA_t en concentraciones de 0,5-10 $\mu\text{g/L}$.

4.2. Diseño del LFIA usando la tecnología de la impresión en cera

Se diseñaron canales de cera con distintas dimensiones de la zona de detección, con el fin de conseguir una buena sensibilidad en el menor tiempo posible. Para ello se probaron canales de 2, 3 y 4 mm de anchura, y se probaron distintas longitudes del canal. Estos diseños fueron evaluados tanto en papel Whatman n°1 como en Hi-Flow. Los resultados mostraron que con anchuras pequeñas, no se produce una buena difusión de la muestra por el canal. Tanto en el caso de canales de 3 y 4 mm, la realización del ensayo es correcta pero la velocidad de flujo en el canal más ancho es mayor, lo que se traduce en una menor sensibilidad. A la vista de los resultados, las dimensiones seleccionadas fueron de 3 mm de anchura y 17 mm de longitud, completándose el test en aproximadamente 5 minutos. A continuación se analizó la influencia de la naturaleza del papel, empleándose uno de celulosa pura (Whatman n°1) y otro de éster de celulosa (Hi-Flow). Los test realizados presentaron mejores resultados en el caso del papel Hi-Flow, debido principalmente a que el rendimiento del proceso de inmovilización de los anticuerpos en el papel es mejor en el éster de celulosa. No obstante, las pruebas realizadas con distintas concentraciones de muestra sólo permitieron detectar 4 y 10 $\mu\text{g/L}$, por lo que no se pudieron mejorar los resultados obtenidos mediante el LFIA

convencional. En cuanto a la forma de adición de la muestra, los mejores resultados se obtuvieron cuando la muestra se mezcló previamente con el conjugado en el tubo.

5. Discusión

Con este trabajo se ha pretendido iniciarse en el desarrollo de sistemas basados en papel, con el fin de diseñar prototipos que puedan salvar las limitaciones presentes en los LFIA y disminuir los costes de la fabricación de dispositivos. Aunque no se ha podido superar el límite de detección conseguido en el LFIA en formato dipstick, los resultados son prometedores y se han introducido mejoras respecto a sistemas ya publicados (5). Se ha visto que el papel utilizado es un factor limitante para la obtención de buenos resultados. La celulosa pura presenta la ventaja de ser un substrato asequible económicamente y fácilmente disponible, pero tiene una baja eficacia en la inmovilización de proteínas. Por este motivo, se han llevado a cabo experimentos utilizando otros papeles compatibles con la técnica de impresión en cera propuesta.

El Hi-Flow ha mostrado resultados prometedores y se seguirá trabajando en este punto para desarrollar una plataforma analítica con buenas características de sensibilidad, reproducibilidad y al menor coste posible.

Por lo que respecta al LFIA convencional, el siguiente paso será la fabricación de tiras en serie, utilizando para ello instrumentación más sofisticada, por ejemplo con el uso de un sistema dispensador de reactivo para la inmovilización del anticuerpo de captura en líneas (Isoflow, Imagen Technology); desarrollo de un sistema multianalito, añadiendo un anticuerpo de captura específico de PSA libre, y la detección semicuantitativa o cuantitativa, mediante densitometría óptica o por acoplamiento a un sistema electroquímico, con el fin de poder llevar a cabo un cribado más exhaustivo del cáncer de próstata, utilizando para ello el ratio PSA libre/PSAt.

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas al término del presente trabajo de investigación y de acuerdo con los objetivos propuestos han sido las siguientes:

Se ha desarrollado un LFIA en formato dipstick para la detección del biomarcador de cáncer de próstata PSA_t, llegando a detectar 0,5 µg/L empleando como detección nanopartículas de oro y como muestra estándares basados en sueros humanos.

Se ha iniciado la investigación en el diseño de dispositivos en papel utilizando la tecnología de la impresión en cera.

Se han utilizado dos sustratos distintos para la impresión en cera (celulosa y éster de celulosa), obteniéndose mejores resultados en el caso del éster de celulosa, con detección de 4 µg/L de PSA_t en una muestra basada en suero humano.

Agradecimientos

Agradecer al Dr. Rafael Venta, por su apoyo y por darme la oportunidad de asistir al curso de Innovación Tecnológica y Gestión en el Laboratorio Clínico. A Agustín Costa, Catedrático del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, por la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su grupo de investigación de Inmuno electroanálisis, de la que forma parte este trabajo. A la Dra. Carmen Blanco, por su apoyo, confianza y orientación en mi trabajo diario. Agradecimientos al proyecto CTQ2013-47396-R.

Bibliografía

1. Ge X., Mohamed-Asiri A., Du D., Wen W., Wang S., Lin Y. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. *TrAC* 2014; 58: 31-39.
2. O'Farrell B. Lateral Flow Immunoassay systems: evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. *The immunoassay handbook*. 2nd Ed. D. Wild, Elsevier Science 2013.
3. W. Martinez A. Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis* 2011; 3(23): 2589-2592.
4. Carrilho E., Martinez A.W., Whitesides G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal Chem.* 2009; 81: 7091-7095.
5. Abe K., Kotera K., Suzuki K., Citterio D. Inkjet-printed paperfluidic immunochemical sensing device. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 885-893.

3.2. Capítulo II: Acoplamiento de inmunoensayos de flujo lateral a sensores basados en medidas magnéticas

- ∞ Artículo: “High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles”
- ∞ Artículo: “Scanning sensor for quantitative reading of PSA magnetic immunoassays”

La elección de la marca en el desarrollo LFIA es un proceso crítico. Hasta la fecha, las marcas más comúnmente utilizadas en los sistemas de flujo lateral son las nanopartículas de oro coloidal (AuNPs) y las partículas de látex⁹. La mayoría de los sistemas que utilizan estas marcas son cualitativos por interpretación visual. Y, aunque se han desarrollado algunos lectores que permiten llevar a cabo una medida cuantitativa, sólo las nanopartículas en la parte superior de la membrana contribuyen significativamente a la señal. En consecuencia, la señal generada por debajo de la superficie se pierde inevitablemente, traduciéndose en una disminución de la sensibilidad.

Las bolas magnéticas (ferromagnéticas, paramagnéticas o partículas superparamagnéticas) se utilizan principalmente en métodos de separación, pero también se pueden usar como marcas para detectar un analito específico. Esto permite detectar un anticuerpo conjugado con nanopartículas magnéticas en la línea de test por medio de la señal magnética, presentando como ventaja que tanto las partículas que están en la parte superior como las que se encuentran por debajo de la superficie de la membrana se pueden medir, contribuyendo a un aumento significativo de la sensibilidad. Además, otra ventaja adicional es que estas marcas son estables en el tiempo y, por lo tanto, las tiras podrían volver a analizarse si fuera necesario. A pesar de que se han desarrollado diferentes sistemas de medida, sólo dos productos comerciales están disponibles en este momento para la detección de partículas magnéticas en LFIA, los lectores magnéticos de MagnaBioSciences¹⁰ y Magnasense Technologies¹¹. Típicamente, estas plataformas se basan en la generación de un campo magnético alterno que excita las partículas, y que a su vez producen su propio campo magnético, detectable por las bobinas del instrumento de medida.

En este capítulo, realizado en colaboración con el Grupo de Investigación y Desarrollo de Materiales Magnéticos de la Universidad de Oviedo, se presenta el desarrollo de un LFIA basado en el empleo de partículas superparamagnéticas acoplado a un lector de impedancia. Aunque el principio físico que se encuentra tras esta detección (publicado

9 O'Farrell, B., 2009. Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems. In: Wong, R. and Tse, H. (Eds.), Lateral Flow Immunoassay. Humana Press, New York, Chapter 1, pp. 1-33.

10 Disponible en: <http://www.magnabiosciences.com/>

11 Disponible en: <http://magnasense.com/>

por el Grupo de Investigación y Desarrollo de Materiales Magnéticos^{12,13}) es de nuevo la inducción electromagnética, la principal ventaja aquí es que no se requiere un campo magnético externo, reduciéndose la complejidad del sensor.

3.2.1. Acoplamiento del sensor a las tiras de flujo lateral: optimización de la señal

Para poner a punto el sistema, se probaron diferentes nanopartículas magnéticas, de diferente naturaleza y tamaño, e inicialmente se empleó el sistema biotina-avidina para verificar que el sensor magnético permitía la detección de las partículas presentes en la línea de test.

3.2.2. Detección cuantitativa de PSA

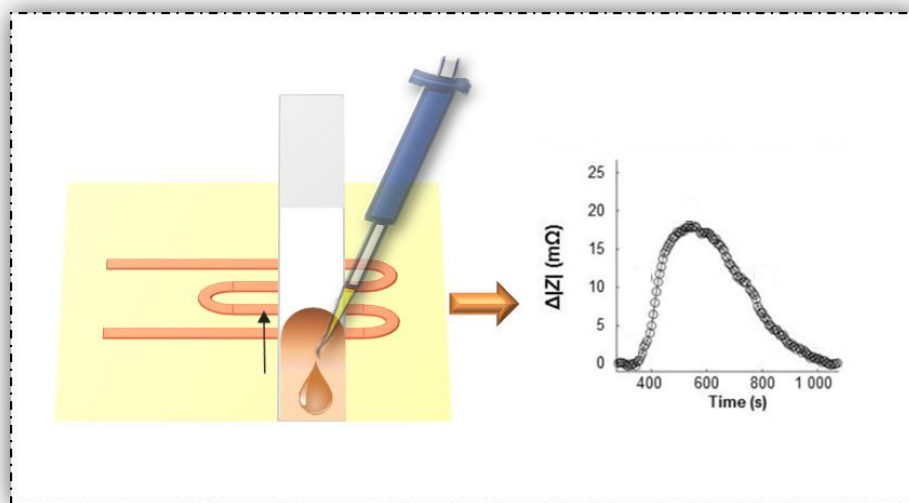
Los ensayos realizados en el apartado anterior, permitieron concluir que las partículas más pequeñas (10 nm) contribuían de manera significativa a la señal. Por ello, estas partículas fueron las seleccionadas para conjugar al anticuerpo de detección en el desarrollo del LFIA magnético. Debido a que la unión directa del anticuerpo a las nanopartículas no producía ningún tipo de señal en la línea de test en presencia del analito, posiblemente debido a que el sitio de unión al antígeno se encontraba impedido, se optó por llevar a cabo una conjugación asistida por biotina-avidina. La conjugación, por tanto, se realizó por medio de enlaces covalentes y haciendo uso del sistema biotina-avidina para conseguir una mayor accesibilidad al sitio de unión del anticuerpo. De nuevo en este caso se seleccionó el PSA como analito.

12 Lago-Cachón, D., Rivas, M., Martínez-García, J.C., García, J.A. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology* 2013; 24: (24) 245501-245507.

13 Rivas, M., Lago-Cachón, D., Martínez-García, J.C., García, J.A., Calleja, A.J. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sensors & Actuators A* 2014; 216: 123-127.

3.2.3. Artículo 2: “High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles”

Journal of Magnetism and Magnetic Materials (en revision)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Magnetism and Magnetic Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmmm

High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles

David Lago-Cachón¹; Montserrat Rivas^{1,*}; José C Martínez-García¹; Myriam Oliveira-Rodríguez²; M. Carmen Blanco-López²; José A García²

1- *Dpto. de Física, Universidad de Oviedo, Edificio Departamental Este, Campus de Viesques, 33204 Gijón, Spain*

2- *Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain*

ABSTRACT

Lateral flow assay is one of the simplest and most extended techniques in medical diagnosis for point-of-care testing. Although it has been traditionally a positive/negative test, some work has been lately done to add quantitative abilities to lateral flow assay. One of the most successful strategies involves magnetic beads and magnetic sensors. Recently, a new technique of superparamagnetic nanoparticle detection has been reported, based on the increase of the impedance induced by the nanoparticles on a RF-current carrying copper conductor. This method requires no external magnetic field, which reduces the system complexity. In this work, nitrocellulose membranes have been installed on the sensor, and impedance measurements have been carried out during the sample diffusion by capillarity along the membrane. The impedance of the sensor changes because of the presence of magnetic nanoparticles. The results prove the potentiality of the method for point-of-care testing of biochemical substances and nanoparticle capillarity flow studies.

KEYWORDS: magnetic measurements; lateral flow assay; magnetic nanoparticles; sensors

1. Introduction

Lateral Flow Assays (LFA) are simple devices used to detect the presence of an analyte. LFA are widely spread especially for the home pregnancy tests, but also used for several other qualitative ones. The amount of the analyte can be estimated by measuring the color intensity of the strip line. Magnetic Lateral Flow Assays (M-LFA) are intended to improve the sensitivity and reproducibility in the estimation of the analyte. M-LFA require a magnetic sensor and using magnetic labels instead of coloured particles. Most used magnetic labels are superparamagnetic nanoparticles (SPMN), that is, sufficiently small nanoparticles whose magnetization randomly flip direction under the influence of temperature.

Different magnetic recording techniques have been proposed for M-LFA, like resonant coil magnetometers [1], giant magnetoresistance based sensors [2,3] or planar coils [4]. Several works have been done in the detection of several biological entities, like allergens in food samples [5], tumor markers [6], human hormones [7], bacteria [8], parasites [9] or heart damage markers [10]. In the absence of an external magnetic field, the magnetization of SPMN appears to be zero in average, therefore all these methods require the application of an external magnetic field in order to magnetize the SPMN for the sensors to detect theirs to the applied field.

In this paper, the feasibility of a recently discovered superparamagnetic particles detection method [11] is analyzed for its use as a M-LFA. This method detects the SPMN due to the eddy-current induced by the vibrating particles in a conductor surface, through which a high frequency current is circulating. The main advantage of this Radio Frequency Lateral Flow Assays (RF-LFA) method over the previous M-LFA is that an external magnetic field is unnecessary. The RF-LFA sensor is analyzed for continuous flow measurements during the LFA using membranes with one capture line.

2. Materials and methods

2.1. Magnetic particles

Two different kinds of SPMN have been used. One kind is magnetite coated with poly(acrylic acid), dispersed in water (Nanogap SL FeO-2204W) at a nominal

concentration of 2 % w/w (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), and with a mean diameter of $10.0 \text{ nm} \pm 2.5 \text{ nm}$. This product exhibits superparamagnetic behavior at room temperature, with a saturation magnetization of 50 emu/g. The other kind is fluidMAG-Streptavidin (Chemicell), a starch matrix containing superparamagnetic magnetite nanoparticles, with hydrodynamic diameter around 100 nm, weight of volume 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 40 emu/g of saturation magnetization, and whose superparamagnetic nanoparticles have $12.3 \text{ nm} \pm 20 \%$ mean diameter [12]. Pattern samples with different concentration of both SPMN were prepared depositing and drying onto a $10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ blotting paper, 20 μm thick.

2.2. Nitrocellulose membranes

Nitrocellulose membranes (UniSart CN95) were purchased from Sartorius (Spain). Other materials used were: glass fiber sample pads (GFCP001000, Millipore, Germany) and absorbent pads (Whatman, USA). Biotin-conjugated bovine serum albumin (BSA) to form the detection line was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection line. The sample buffer consisted of 9.55 mM PBS pH 7.4 (Amresco K812) with 2% Tween 20.

The biotin-conjugated BSA at a concentration of 2 mg/mL in mQ water was spotted onto the Nitrocellulose Membrane (NM) to form the detection line using the IsoFlow reagent dispensing system, being the width of the capture line around 0.6 mm. The detection pad was dried for 1 h at 37°C , and the nitrocellulose membrane was cut into 25 mm long and 14 mm wide.

2.3. Impedance measurements

Impedance measurements were performed by means of a Precision Impedance Analyzer Agilent 4294A, using the 16048G test leads and customized printed circuit board. Impedance was continuously measured in single frequency mode as a function of time. Data acquisition and instrument control were done by a computer using National Instruments LabVIEW.

During measurements, frequency and exciting voltage were fixed at 110 MHz and 500 mV respectively, as it was previously proved that the maximum sensitivity is obtained

at such values [11]. In order to decrease the noise level, bandwidth was set at 5 (measurement accuracy maximized) and the point averaging factor to 16.

The sensing printed circuits have been manufactured on a copper-clad laminate FR-4 by machining using LPKF ProtoMat E33 circuit board plotter. In this paper, the sensing element is a meander-line structure with four parallel 12 mm long, 0.25 mm wide and 35 μm thick, conducting lines separated 0.25 mm (see Figure 1). The total width of the sensing area is 2 mm, the same than the width of the dried samples and twice the width of the capture line of the lateral flow assay.

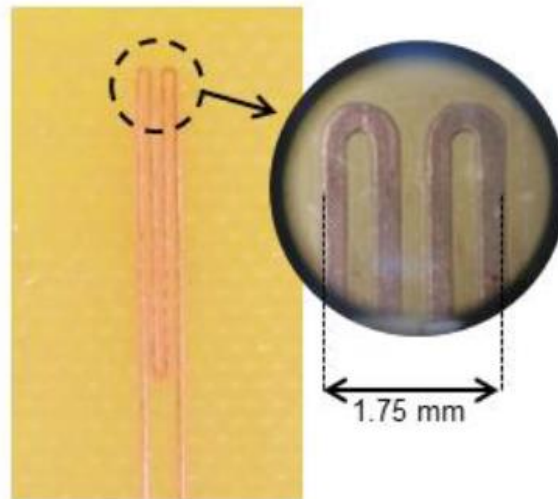


Fig. 6 Photographs of the sensing circuit

When measuring the pattern samples of SPMN a rectangular glass slot of 10.0 mm \times 0.3 mm is installed over the sensing area and the samples are horizontally inserted in the slot until the SPMN are located just over the sensing element [13].

We define *Signal*, as the variation of the magnitude ($|Z|$) and the phase (ϕ) of the impedance under the presence of nanoparticles.

$$\Delta|Z| = |Z|_{NP} - |Z|_0$$

$$\Delta\phi = \phi_{NP} - \phi_0$$

We define *Resolution* as the minimum mass of nanoparticles detectable by our system, expressed by the following equation:

$$Resolution = \frac{\sigma_{noise}}{\Delta A} * m$$

Where ΔA is the signal produced by the nanoparticles when measuring variable A , which can be either $|Z|$ or ϕ ; σ_{noise} is the standard deviation of the noise of such variable and m is the mass of nanoparticles in the sample.

2.4. Continuous flow measurement

When measuring during continuous flow, the NM is glued over the sensor, carefully positioning the yet invisible capture line over the sensing meander line. The plastic layer incorporated to the NM prevents the fluids to directly get in touch with the sensor. Finally, sample pad and absorbent pad are installed with an overlap between them and the NM of around 2 mm.

Ferrofluid FeO-2204W were diluted 1:2 in Phosphate Buffer Saline (PBS) in order to have both SPMN fluids at the same concentration (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Samples were carefully deposited drop by drop. As the micropipettes have metallic components and can interfere with the measurements, the analyzer is temporally stopped for a short time and the measurement restarted using the LabView software.

Every experiment has been started depositing a drop of buffer to wet the membrane over the sensor. Later, SPMN were deposited on the sample pad close to the NM and more buffer was added on the opposite side of the sample pad, resulting in the SPMN being pushed forwards by the buffer. Impedance measurements were done from the first deposition until the uncaptured particles passed through the sensor, as shown in Figure 2.

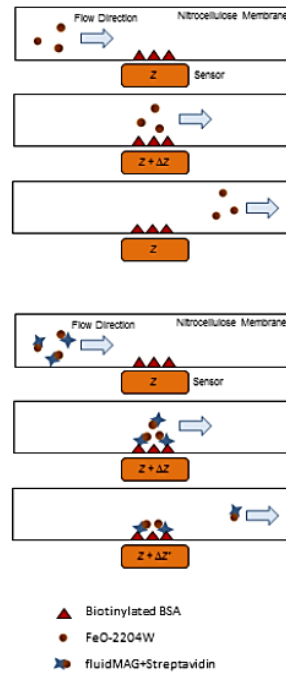


Fig. 7 Diagram representing the flow inside the nitrocellulose membrane and the signal produced by the SPMN.

3. Results and discussion

Pattern samples were measured and data are shown in Table 1. First conclusion is that the signal of the magnitude of the impedance, $\Delta|Z|$, is better than the signal of the phase of the impedance, $\Delta\phi$. Smaller quantities of SPMN can be detected from the magnitude, therefore, only it will be considered in the following. Secondly, the FeO 2204-W nanoparticles present higher signal than the fluidMAG-Streptavidin.

	FeO 2204-W	fluidMAG-Streptavidin
Mass of MP	650 $\mu\text{g} \pm 5\%$	650 $\mu\text{g} \pm 5\%$
$\Delta Z $	529.5 ± 0.7 m Ω	353.6 ± 0.7 m Ω
Resolution $ Z $	0.86 μg	1.3 μg
$\Delta\phi$	-155.4 ± 0.7 m $^\circ$	-51.8 ± 0.7 m $^\circ$
Resolution ϕ	2.9 μg	8.8 μg

Table 1 Data acquired by measurements of pattern samples

The impedance of the sensing element depends not only on its geometry and dimensions but also on the dielectric constant of the materials around it [14]. When the air over the sensor is replaced with any other dielectric material ($\epsilon_r > \epsilon_0$), its impedance decreases, as Z is proportional to the inverse of the square root of the relative permittivity in any case.

$$Z \propto \frac{1}{\sqrt{\epsilon_r}}$$

When the NM is wet, the buffer saline displaces the air inside the membrane, so the relative permittivity notably increases producing a fall in the impedance value, as can be observed in Figure 3. It is worth mentioning that when depositing the first drop, the impedance does not change appreciatively until the buffer wets the NM near the sensor line, and that the impedance does not change any further after the NM fraction over the sensing element is filled with buffer instead of air. As the buffer advances by capillarity inside the NM, it pushes away all the air inside it, avoiding any bubble formation. When the NM volume is fully filled, the addition of more buffer does not change the amount of it over the sensor, so the relative permittivity remains unaltered and no $\Delta|Z|$ is detected. Any further change must be then attributed to the presence of SPMN.

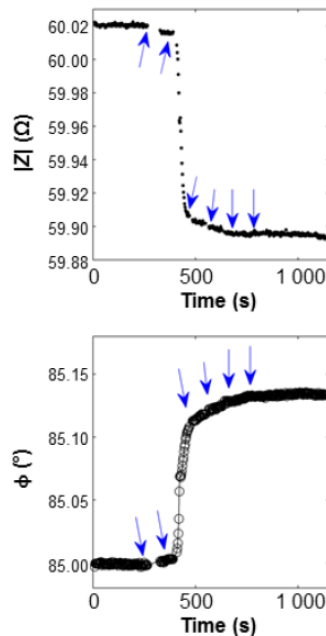


Fig. 8 Impedance variation caused by the depositing of 20 μ L drops of buffer.

From Figure 3 it is deduced that a minimum volume of 40 μL of buffer is needed to guarantee the required moisture of the NM. For the ongoing experiments, 60 μL of buffer have been dropped before depositing the SPMN.

FeO-2204W nanoparticles are coated with poly(acrylic acid), an hygroscopic polymer that confers high stability to the particles and avoids binding to the nitrocellulose fibers or to the biotinylated albumin of the capture line. Figure 4 presents the measurement after depositing 10 μL of FeO-2204W fluid (100 μg of magnetite particles). The particles diffused through the sample pad and the NM at an irregular and unknown concentration (see images in Figure 4). When the first SPMN arrived to the surroundings of the sensing element the impedance started increasing slowly at the beginning, until achieving a maximum signal of 18 $\text{m}\Omega$. As the particles kept flowing, the membrane over the sensor got clearer at the same rate than the signal decreased until getting back to the initial value. As expected, no appreciable binding of FeO-2204W at the capture line is observed. Knowing that 650 μg of the nanoparticles produced 530 $\text{m}\Omega$ (see Table 1), it can be estimated that the maximum mass of nanoparticles at a time over the the sensor was 22 μg .

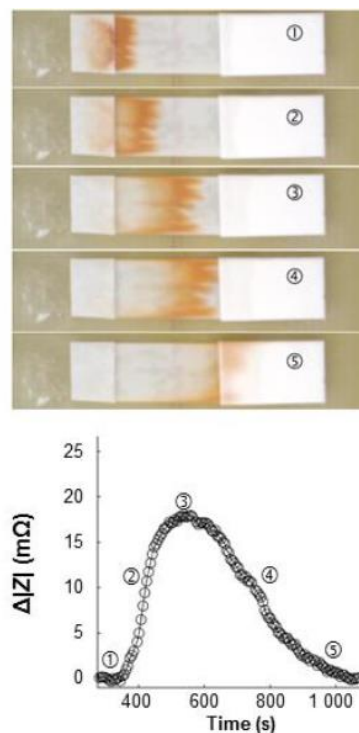


Fig. 9 Signal of nanoparticles FeO-2204W and pictures of the membrane showing the correlation of nanoparticles position related to the sensor and the signal measured.

Figure 5 shows the experiment performed with fluidMAG-Streptavidin. These particles have great affinity for the biotinylated albumin due to biotin-streptavidin bond. Again, 10 μL of the SPMN sample were deposited (100 μg of particles). These particles flowed over the sensor increasing the measured impedance but not as much as FeO-2204W (as expected from measurements of Table 1). A maximum signal of 6 $\text{m}\Omega$ was measured, and it was also observed that the impedance does not return to the initial value but it shows a constant remnant value of around 2 $\text{m}\Omega$. The pattern sample of 650 μg produced a signal of around 354 $\text{m}\Omega$, so it can be estimated that 3.7 % of the fluidMAG-Streptavidin bounded to the capture line.

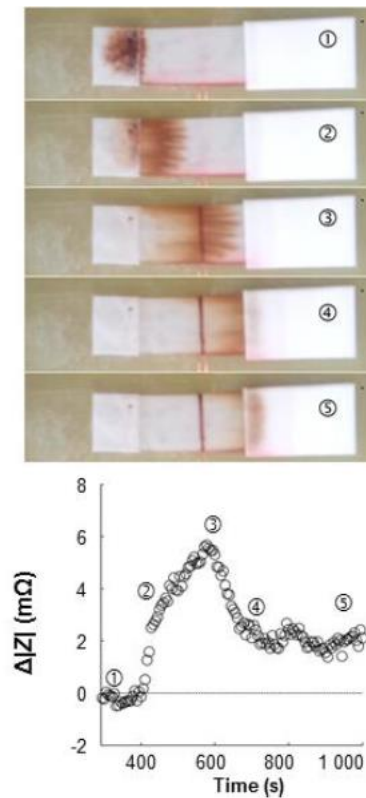


Fig. 10 Signal of nanoparticles fluidMAG-Streptavidin flowing over the sensor

4. Conclusions

A novel magnetic dynamic lateral flow test for the detection of superparamagnetic nanoparticles is described. The RF-LFA can detect the signal of the SPMN in the proximity of the sensor, allowing to monitor the flow of SPMN through the

nitrocellulose membrane. If a capture line is dispensed on the NM, the sensor allows to measure the amount of SPMN that are captured. Although superparamagnetic nanoparticles have been used, it is unnecessary to apply an external magnetic field to measure the magnetic signal of the particles. It has been demonstrated that the detection principle is useful in affinity tests. Therefore, it can be extended to a wide range of applications in biomedical or environmental fields.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

This work was partly supported by the Spanish government projects MINECO-13-MAT2012-33405 and MINECO-13-CTQ2013-47396-R, and Principality of Asturias project GRUPIN14-037. M. Oliveira-Rodríguez thanks FICYT (Asturias, Spain) for a grant, and D. Lago-Cachón thanks Instituto Universitario de Tecnología Industrial de Asturias and the council of Gijón for grant SV-14-GIJÓN-1.10.

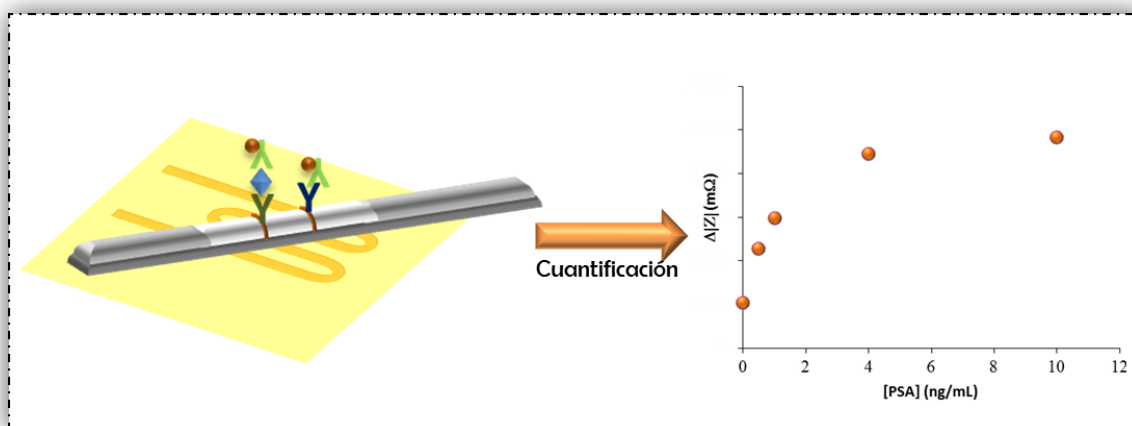
References

- 1 J. Eveness, J. Kiely, P. Hawkins, P. Wraith, and R. Luxton, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 139, 538 (2009)
- 2 K. Tanton, D. Johnson, P. Guire, E. Lange and M. Tondra, *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1679 (2009)
- 3 C. Marquina, J. M. de Teresa, D. Serrate, J. Marzo, F. A. Cardoso, D. Saurel, S. Cardoso, P. P. Freitas, and M. R. IBarra, *J. Magn. Magn. Mater.* 324, 3495 (2012)
- 4 J. J. Mäkiranta and J. Lekkala, XVIII IMEKO World Congresss (2006)
- 5 C. Zheng, X. Wang, Y. Lu and Y. Liu, *Food Control* 26, 446 (2012)
- 6 J. M. Barnett, P. Wraith, J. Kiely, R. Persad, K. Hurley, P. Hawkins and R. Luxton, *Biosensors* 4, 204 (2014)
- 7 Y. Wang, H. Xu, M. Wei, H. Gu, Q. Xu, and W. Zhu, *Mat. Sci. Eng. C* 29, 714 (2009)
- 8 D.-B. Wang, B. Tian, Z.-P. Zhang, X.-Y. Wang, J. Fleming, L.-J. Bi, R.-F. Yang, and X.-E. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* 67, 608 (2015)

- 9 S. Handali, M. Klarman, A. N. Gaspard, X. Fan Dong, R. LaBorde, J. Noh, Y.-M. Lee, S. Rodriguez, A. E. Gonzalez, H. H. Garcia, R. H. Gilman, V. C. W. Tsang, and P. Wilkins, *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 631 (2010)
- 10 Q. Xu, H. Xu, H. Gu, J. Li, Y. Wang, and M. Wei, *Mat. Sci. Eng. C* 29, 702 (2009)
- 11 D. Lago-Cachón, M. Rivas, J. C. Martínez-García and J. A. García, *Nanotechnology* 24, 245501 (2013)
- 12 M. Angelakeris, Z.-A. Li, D. Sakellari, K. Simeonidis, M. Spasova and M. Farle, *EPJ Web of Conferences* 75, 08002 (2014)
- 13 M. Rivas, D. Lago-Cachón, J. C. Martínez-García, J. A. García and A. J. Calleja, *Sensor Actuat A-Phys* 216 (2014) 123–127
- 14 D. M. Pozar, In *Microwave Engineering* edited John Wiley & Sons, Inc. 2nd edition (1998), p.162

3.2.4. Artículo 3: “Scanning sensor for quantitative reading of PSA magnetic immunoassays”

En preparación



Under preparation

Scanning sensor for quantitative reading of PSA magnetic immunoassays

David Lago-Cachón, Myriam Oliveira-Rodríguez, Carmen Blanco-López, Montserrat Rivas, José C. Martínez-García, Amanda Moyano, María Salvador, José Á. García

1. Introduction

Developing an accurate and user-friendly diagnostic device for point-of-care (POC) applications is one of the most challenging objectives in the clinical field. Devices for POC analysis should be portable, low cost, easy to use and allow immediate clinical decision-making [1]. Lateral flow immunoassay (LFIA) is one of the most successful and POC-amenable formats since it is simple, rapid and a very appropriate technology to apply to a wide range of fields [2]. Most lateral-flow tests have been designed for semi-qualitative threshold assays which generate a color signal that can be read by naked-eye without the need for an instrument. Although the color readout approach is simple, direct and user-friendly, it may cause difficulties when an accurate measurement has to be given [3]. This is the case in the diagnosis of some diseases, such as prostate cancer. Prostate cancer is the second most common cancer in men worldwide. Despite its known lack of specificity, prostate-specific antigen (PSA) is still the most clinically accepted biomarker used in the detection, staging and post therapy for prostate cancer [4]. For consensus, a PSA level of 4.0 ng/mL has been defined as the upper normal limit. However, recent studies have shown that most men diagnosed with prostate cancer have levels of serum PSA in the range of 2.5-10.0 ng/mL [5,6]. These data create the challenge of setting lower limit cut-off points for normal serum PSA levels, and consequently, the need of devices that provide higher sensitivity and more accurate quantitative results. This approach may be achieved by coupling the LFIA with an appropriate transducer. To date, the most commonly used particulate detector reagents in lateral flow systems are colloidal gold (AuNPs) and monodisperse latex. Using these labels, quantitative analytical data can be collected by measuring color intensity by densitometry or reflectance. However, only nanoparticles on top of the membrane

contribute significantly to the signal. Therefore, the signal generated beneath the surface is inevitably missed, making them less sensitive [7]. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) can be used as labels on LFIA due to their brown color. This color produced at the test line can be measured by an optical strip reader, but also the magnetic signals coming from SPIONs within the entire volume of membrane can be detected and recorded with a proper magnetic reader [8]. Moreover, the surface of SPIONs can be functionalized with functional groups which allow their coupling to antibodies by covalent bounds. Some studies have been reported using SPIONs as labels in LFIA [9,10]. Typically, these platforms are based on the generation of an alternating magnetic field which excites the particles, which in turn produce their own magnetic field, detectable by the sensing coils of the apparatus.

Recently, a novel detection method based on the use of SPIONs has been developed [11,12]. Although the physical principle which lies beneath this detection is again the electromagnetic induction, in this case it is the thermally excited oscillation of the magnetic moments of the particles, typical of their superparamagnetic character, which produces the sensor signal. Therefore, no external magnetic field is required, which is a remarkable advantage to reduce the overall complexity of the sensor. In this work, this technique is used to detect SPIONs-labelled PSA immobilized in LFIA.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Mouse monoclonal anti-PSA antibody (human kallikrein 3/PSA, catalog # MAB13442) and goat polyclonal anti-PSA antibody (human kallikrein 3/PSA biotinylated, catalog # BAF1344) were purchased from R&D Systems (USA). Anti-mouse IgG, N-hydroxy-sulfosuccinimide (sulfo-NHS), 1-ethyl-3-[3-di-methylpropyl]carbodiimide (EDC), bovine serum albumin, biotin-conjugated bovine serum albumin and Tween-20 were purchased from Sigma-Aldrich (Spain) and Neutravidin by Thermo Fischer Scientific (USA). PSA standard solution, calibrated against International Standard 96/670 was obtained from Monobind Inc. (USA). Polyacrylic acid coated magnetite nanoparticles with 10 nm diameter were produced by NanoGap (NGAP NP FeO 2204-W, Spain).

Nitrocellulose membranes (UniSartCN95) were purchased from Sartorius (Spain). Other materials used were: glass fiber sample pads (GFCP001000, Millipore,

Germany), backing cards (KN-V1080, Kenoshatapes, Netherlands) and absorbent pads (Whatman, USA). Based on previous results, the sample buffer selected consisted of 10 mM PBS pH 7.4 with 0.05% Tween-20 and 1% BSA.

2.2. Equipment

An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection and control lines (Dispense rate 0.100 $\mu\text{L}/\text{mm}$). A guillotine Fellowes Gamma (Spain) was used to cut the strips.

2.3. Nanoparticle-antibody conjugation protocol

SPIONs-antiPSA complexes were prepared using biotin-neutravidin interactions. The polyacrylic acid coated nanoparticles surface was modified with neutravidin using the EDC/NHS chemistry. Thus, 2 μL of SPIONs were suspended in 100 μL of freshly made EDC/NHS solution (1 mg/mL EDC and 1 mg/mL NHS in 10 mM PBS pH 7.4) and stirred for two hours. Then, 120 μL of neutravidin (3 mg/mL) were added to the activated nanoparticles and the mixture was shaken for two hours. Thereafter, the suspension was washed by centrifugation (three minutes at 3000 rpm) with 10 mM borate buffer pH 8.8. Then, 10 μL of biotinylated anti-PSA were added and the mixture was stirred for 30 min. Finally, the antibody-conjugated SPIONs were blocked in 10 mM borate buffer pH 8.8 containing 3% BSA for 30 min, whereupon the suspension was washed again by centrifugation (three minutes at 5000 rpm), obtaining a final volume of conjugated of 150 μL .

2.4. Characterization of nanoparticles conjugates by dynamic light scattering (DLS)

Size distribution and ζ -potential assays were carried out with a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He-Ne laser ($\lambda=633$) for monitoring the coating of the particles with neutravidin. A total of three readings were performed at 25°C. Each reading was composed of 15 measurements of the backscattering (173°) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis.

2.5. Preparation of the immunostrips

The LFIA was carried out in a dipstick format. Figure 1 illustrates schematically the test strips components. Capture anti-PSA antibody and anti-IgG (both at a concentration of 1 mg/mL) were immobilized onto the plastic-backed membrane with the IsoFlow dispenser forming the test and control lines, respectively. After printing, the membrane was dried for 20 min at 37°C. Then, the sample pad and the absorbent pad were placed as shown in Figure 1 with an overlap between them of around 2 mm. Subsequently, the complete strip was laminated into individual 4 mm strips.

Following the same scheme, 2 mg/mL of biotin-conjugated bovine serum albumin were immobilized on other membrane with the IsoFlow dispenser, to make sure that the first step of the conjugation of the SPIONs, the coating with neutravidin, was carried out in the correct way.

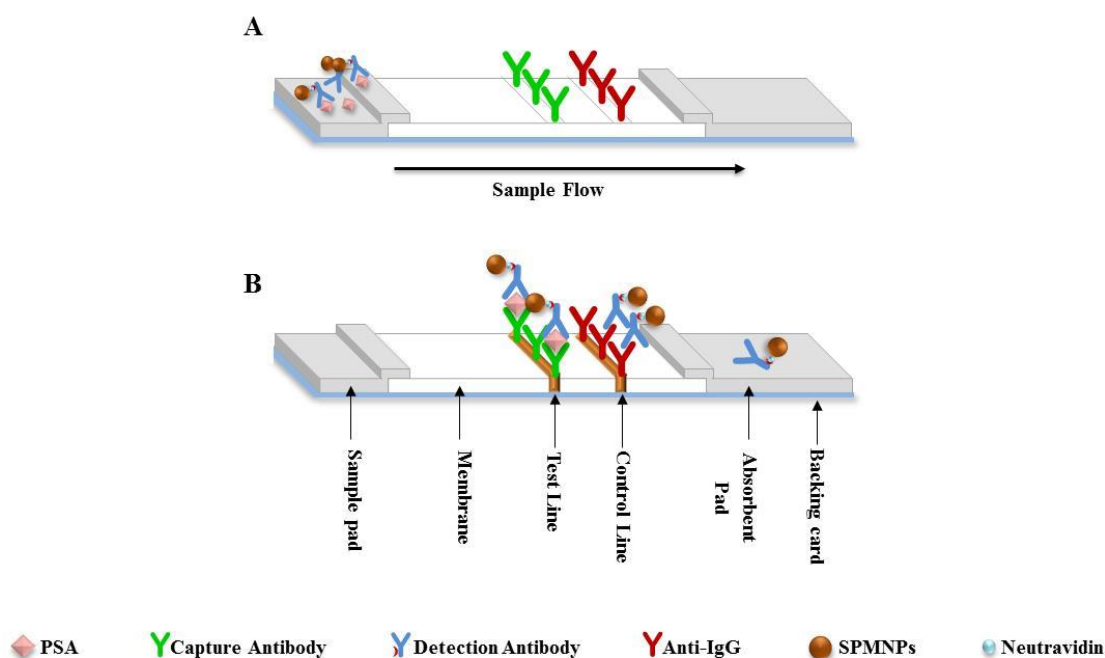


Fig. 1 Schematic illustration of the Lateral Flow Immunoassay (LFIA). (A) Specific antibodies against prostate specific antigen (PSA) (Test Line) and anti-IgG antibodies (Control Line) are immobilized on the membrane. (B) PSA forms a complex with SPMNPs-conjugated antibodies and is captured onto the membrane by the immobilized antibodies. LFIA system consists of sample pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad. All components are bound together layer-to-layer and assembled on a plastic adhesive backing card.

2.6. Assay procedure

PSA standard solutions at concentrations of 0, 0.5, 1, 4 and 10 ng/mL were prepared by diluting a PSA stock solution in the sample buffer. For dipstick analysis, samples were transferred into a microtube containing 20 μL of antibody-conjugated SPIONs and homogenized (final volume 100 μL). The sample pad of the strip was then introduced into the microtube where the sample was allowed to run flow for 10 min. The performance of the immunostrip relied on non-competitive assay formats. All the assays were performed in triplicate.

2.7. Scanning impedance sensor

The sensing head consists of a meander-line printed on a copper-clad laminate FR-4 by a LPKF ProtoMat E33 circuit board plotter. A detail of the copper tracks is shown in Fig. 1. The copper layer is 35 μm thick while the width is 120 μm in the straight portions (10 mm long which is really the sensing area on top of which the sample is slid) and 250 μm in the curved ones (to ensure continuity in these more delicate regions). Micropositioning and scanning of the sample is achieved by a home adapted 3D printer (Prusa i3 by Createc 3D) with a tolerance of 50 μm in the three axes. Special care was taken in removing any metallic part or placing it far enough from the sensing area to avoid any interference coming from electromagnetic mutual interactions.

Magnitude and phase of the impedance of the sensing head are continuously monitored by a Precision Impedance Analyzer (Agilent 4294A) using 16048G test leads and 500mV/20MHz exciting voltage.



Fig. 2 Detail of the copper tracks (left) and photograph of the measuring system.

Sample and absorbent pads are removed from the immunoassay strip which is then pasted onto a microscope slide attached to the micropositioning system. In such way, the strip can be slid over the sensing head while the latter's impedance is measured so the increase of impedance produced by the presence of the SPIONs is recorded (the physical principle of the detection can be found elsewhere [11]). Fig. 3 shows the magnitude of the impedance during the scanning of a LFIA strip in steps of 50 μm . The peaks of the test (left) and control (right) lines can be distinguished (are clearly distinguishable from the base line). The cumulative integral of this signal (with respect to the reference of the base line) provides a quantitative measurement of the amount of SPIONs which can be calibrated in terms of concentration of protein.

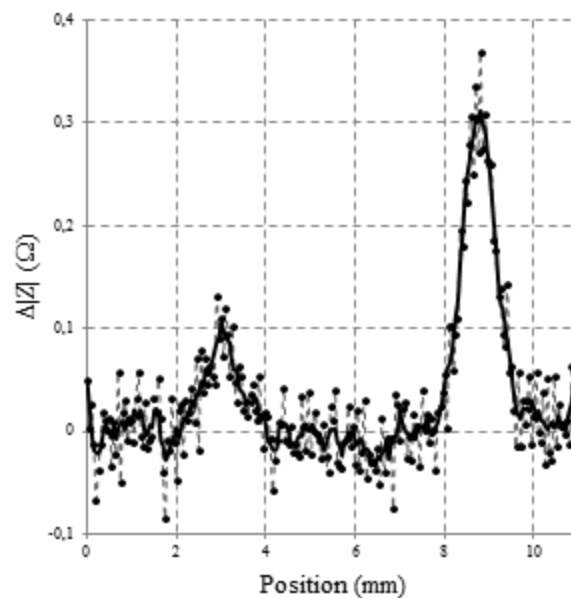


Fig. 3 Scan of a LFIA corresponding to a concentration of 10 ng PSA/mL and showing the increase of impedance of the control line (left) and test line (right).

2.8. Color intensity measurement

The line intensities were also recorded optically. All the immunostrips were photographed by a smartphone camera and the optical density was measured using ImageJ 1.48v software. The detailed protocol has been adapted from elsewhere [13].

3. Results

3.1. Checkup of SPIONs coating with neutravidin

The critical step in the conjugation protocol of the SPIONs is the modification of their surface with the neutravidin, as if the nanoparticles could aggregate or the biotinylated-antibody may not bind to the nanoparticles in the following step. For this reason, two different experiments were carried out in order to confirm the correct modification of SPIONs with neutravidin. First, Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were carried out. The results showed that the hydrodynamic diameter of the nanoparticles changed from 31.54 nm (PDI= 0.130) to 75.71 nm (PDI= 0.175) after the conjugation with neutravidin (Figure 4A).

Additionally, strips with biotin immobilized were tested with the SPIONs-coated neutravidin using as running buffer 10 mM PBS pH 7.4 with 0.05% Tween-20. The presence of a line onto the membrane served to verify the proper coating of the magnetic nanoparticles (Figure 4B).

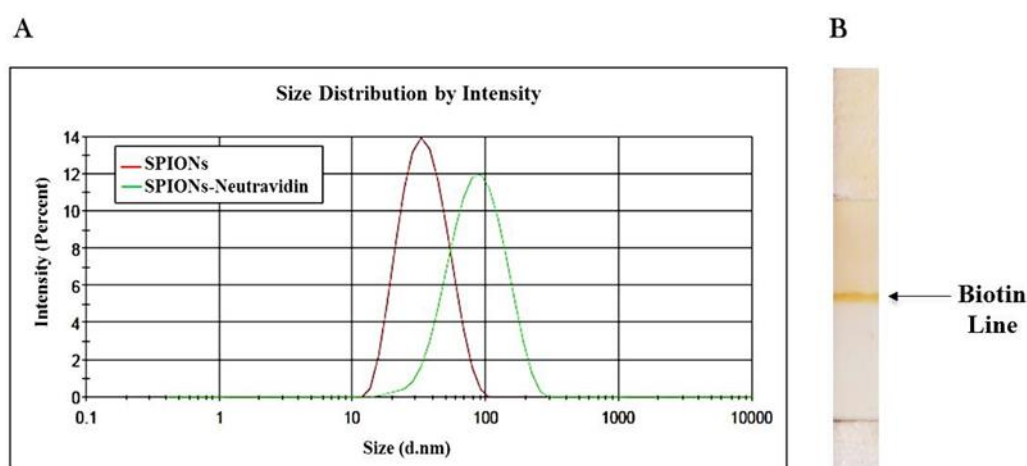


Fig. 4 Checkup of SPIONs coating with neutravidin. A) Hydrodynamic size distribution profile of SPIONs before (red line) and after the coating with neutravidin (green line). B) Photograph of the strip of lateral flow assay with biotin immobilized onto the membrane as test line, running the SPIONs-coated neutravidin to check the proper conjugation.

3.2. Reading of Magnetic lateral flow immunoassay

An increasing relationship between the concentration of PSA and the magnetic signal was found (Figure 5). The curve shape is similar to a logarithmic one, as usual for LFIA. This absence of linearity takes place when the concentration of analyte is high

enough to block most capture antibodies of the test line. The signal of samples without PSA presents a small positive signal higher than the error bars (representing the standard deviation). This can be attributed to steric effects that could avoid the highest functionalized particles to flow through the micropores of the nitrocellulose membrane. In any case, quantification can undoubtedly be done up to the highest concentration (10 ng/mL).

This result has been validated by the optical method (also displayed in the Figure 5), obtaining a similar behavior. Optical signal depends of the brightness of the surroundings when the photograph is done. Quantification cannot be achieved with a sample alone, being necessary to do a proper calibration of the color intensity at exactly the same conditions. The magnetic sensor, on the other hand, is related with the superparamagnetic behavior of the particles. As oscillating magnetic moments presence are highly uncommon in nature, calibration process remain unaltered (and so on the accuracy of the system) for long periods of time.

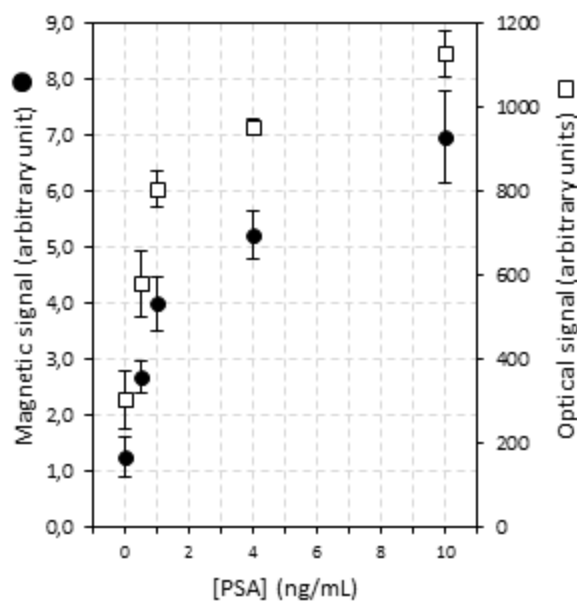


Fig. 5. Magnetic signal (left axis) and optical signal (right axis) of the LFIA as function of the concentration of prostate specific antigen (PSA).

4. Conclusions

SPIONs have been functionalized to bind specifically to PSA. Also, LFIA has been performed for different concentrations of PSA, obtaining an increasing relation between protein concentration and magnetic signal. Results have been validated by a different

quantification method. Despite the novelty of the SPIONs detection system, it has been demonstrated its ability to quantify PSA within the concentration range of clinical interest.

References

- [1] Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J., Estrela, P., & O’Kennedy, R. (2015). Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. *Biosensors*, 5(3), 577-601.
- [2] O’Farrell B. Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 1-33
- [3] O’Farrell, B. Lateral Flow Technology for Field Based Applications–Basics and Advanced Developments. *Topics in Companion Animal Medicine* 2015. In Press
- [4] Saini, S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology*, 1-10.
- [5] Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Crowley, J. J. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *New England Journal of Medicine*, 350(22), 2239-2246.
- [6] Kanyong, P., Rawlinson, S., & Davis, J. (2016). Immunochemical Assays and Nucleic-Acid Detection Techniques for Clinical Diagnosis of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*, 7(5), 523.
- [7] Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: *Lateral Flow Immunoassay*. Wong, R. and Tse H. Eds.; Humana Press, New York; 2009; pp 75-93.
- [8] Quesada-González, D.; Merkoçi, A., Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens and Bioelectron* 2015, 73, 47-63.
- [9] Wang, Y., Xu, H., Wei, M., Gu, H., Xu, Q., & Zhu, W. (2009). Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 714-718.
- [10] Oh, S., Anandakumar, S., Lee, C., Kim, K. W., Lim, B., & Kim, C. (2011). Analytes kinetics in lateral flow membrane analyzed by cTnI monitoring using magnetic method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160(1), 747-752.
- [11] Lago-Cachón, D., Rivas, M., Martínez-García, J.C. & García, J.A. (2013). *Nanotechnology* 24, 245501-245507.
- [12] Rivas, M., Lago-Cachón, D., Martínez-García, J.C., García, J.A., Calleja, A.J. (2014). *Sensors & Actuators A* 216, 123-127.
- [13] Miller, L. (2010, November 4). Analyzing gels and western blots with ImageJ. Retrieved July 12, 2016, from <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>

3.3. Capítulo III: Diseño de plataformas microfluídicas basadas en Lab-on-a-Disc

≈ Artículo: “Design of a Lab-on-a-disc platform for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”

La medida de pequeñas trazas de moléculas fisiológicamente activas (por ejemplo, lípidos, medicamentos, otros productos químicos sintéticos y metales) es fundamental tanto para los análisis clínicos como ambientales. La mayoría de las moléculas pequeñas se pueden analizar usando técnicas de análisis muy sofisticadas, incluyendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC), y la espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP). Sin embargo, estos métodos requieren etapas de purificación largas, personal experimentado, y los instrumentos y reactivos son caros. Los inmunoensayos ofrecen una alternativa a estos métodos de instrumentos intensiva. De hecho, durante la última década, el desarrollo y aplicación de los inmunoensayos ha seguido creciendo exponencialmente, convirtiéndose en una de las metodologías más comunes en el diagnóstico clínico y de la investigación en ciencias de la vida, ya que proporcionan una alternativa fácil, simple y sensible para la determinación precisa de la concentración analítica¹⁴.

3.3.1. ELISA

Los inmunoensayos se basan en el empleo de un anticuerpo, o mezcla de anticuerpos, para el reconocimiento del analito. Estos ensayos se pueden aplicar tanto al análisis de ligandos de bajo peso molecular como a fármacos macromoleculares, y en áreas tan importantes como la cuantificación de biomarcadores en el diagnóstico y progresión de una enfermedad o en la inmunogenicidad de fármacos.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es la configuración de inmunoensayo más ampliamente utilizada. Por definición estricta, un ensayo ELISA abarca cualquier inmunoensayo en fase sólida en el que, en función del formato de ensayo, un anticuerpo o antígeno es inmovilizado, y con una enzima implicada en el proceso de generación de la señal. Dado que la molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato, la señal generada se encuentra muy amplificada. Los ELISAs están diseñados para detectar y cuantificar péptidos, proteínas, anticuerpos, hormonas y otros tipos de moléculas.

La habilidad de desarrollo de ELISAs caseros para proporcionar pruebas fiables y baratas para el cribado de un gran número de muestras ha sido una atracción irresistible

14 Ban, B., Blake, D. A. Recombinant Antibodies and Non-Antibody Scaffolds for Immunoassays. *Advances in Immunoassay Technology*, Dr. Norman H. L. Chiu (Ed.), InTech.; 2012

para un sin fin de investigadores y bioquímicos clínicos que cuentan con presupuestos limitados. Sin embargo, este desarrollo suele ser una tarea notablemente compleja, que requiere de conocimiento y habilidades multidisciplinares.

Típicamente, un ELISA se lleva a cabo en placas de 96 pocillos (o 384 pocillos) fabricadas de poliestireno, donde se unen de forma pasiva los anticuerpos, cuando se trata de un formato tipo sándwich igual que se explicó en la introducción general para los LFIAs. Un procedimiento de ensayo básico implica la inmovilización del anticuerpo, bloqueo, etapas de lavado y la generación y medida de la señal. Una vez inmovilizado el anticuerpo y eliminado el reactivo en exceso, las áreas del pocillo que no han sido recubiertas deben bloquearse con una proteína inerte para prevenir uniones inespecíficas. A continuación, la muestra se añade al pocillo y se incuba para que el analito se una al anticuerpo. Debe tenerse en cuenta que el elemento más importante del ensayo es una interacción altamente específica antígeno-anticuerpo. Finalmente, si existe disponibilidad, la reacción es cuantificada por un anticuerpo específico conjugado a un enzima, que junto con un sustrato, induce un cambio de color proporcional a la concentración de analito. Debido a que no siempre es posible disponer de anticuerpos conjugados a enzimas, en ocasiones es necesario utilizar otras estrategias de detección, por ejemplo el uso de un anticuerpo secundario conjugado al enzima, lo que introduce etapas al proceso. Cada uno de los pasos anteriores debe ir seguido de una etapa de lavado para eliminar el exceso de reactivos, excepto la última etapa de generación del color.

Por otro lado, para llevar a cabo el diseño de un ensayo ELISA casero para un uso particular, deben de llevarse a cabo etapas de desarrollo, optimización y validación. En la primera etapa, la de desarrollo, se seleccionan los elementos clave del ensayo, como los anticuerpos y antígenos, la formulación de los reactivos para la inmunorreacción y el sistema de generación de la señal. En la etapa de optimización, se prueban y se titulan los elementos clave para maximizar el rendimiento y lograr situaciones de equilibrio, por ejemplo, entre conveniencia y capacidad analítica, o entre la señal del blanco y de la muestra. Por último, en la etapa de validación, se verifica el método para la aplicación requerida¹⁵.

15 He, J. Practical Guide to ELISA Development. In: The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques, 4th ed.; Wilde D., Ed.; Elsevier Ltd; 2013; pp 381-394.

Todas estas etapas necesarias para el diseño y la ejecución del ensayo hace que los ELISAs, a pesar de sus características de sensibilidad y especificidad, sean técnicas laboriosas y largas. Además, los requerimientos en cuanto a instrumentación y personal experimentado, hacen que estos ensayos no sean adecuados para su uso POC.

Debido a estos inconvenientes, con el propósito de llevar a cabo diagnósticos rápidos, de alto rendimiento, y en el punto de atención, se han llevado a cabo estrategias de miniaturización de los ensayos ELISA empleando para ello inmunosensores con transducción electroquímica, plataformas *Lab-on-a-Chip* (laboratorio en un chip) y *lab-on-a-disc*. En este capítulo se propone el empleo de la tecnología de la microfluídica centrífuga para el desarrollo de un sistema ELISA automático en el que se reduzcan los volúmenes de reactivos y los tiempos, con una única etapa manual para la adición de la muestra, y con todas las etapas integradas en un disco, desde la separación de las células rojas de la sangre, hasta la detección final.

3.3.2. Control de los fluidos en lab-on-a-disc

La integración de inmunoensayos en sistemas de microfluidos permite un control preciso de los fluidos en todo el proceso de ensayo al mismo tiempo que se reduce el consumo de reactivo. Además, las pequeñas dimensiones de los canales y de las cámaras permiten reducir los tiempos de incubación, ya que se facilita el transporte de masa. La implementación de estos ensayos en los discos requiere un exhaustivo control de las diferentes etapas, como por ejemplo la liberación secuencial de reactivos prealmacenados en el disco. Estos procesos generalmente se controlan mediante el empleo de válvulas, que pueden ser activas o pasivas, como ya comentó anteriormente¹⁶.

Las válvulas activas son aquellas que se pueden activar o desactivar por una fuente externa. Las más comúnmente utilizadas son las válvulas de cera de parafina, que pueden ser fundidas fácilmente mediante un láser de infrarrojos.

Dentro de las válvulas pasivas, se encuentran las válvulas capilares, las hidrofóbicas y los sifones¹⁷. Estos últimos, son muy empleados y se caracterizan porque la reducción de la velocidad de giro del disco permite que la presión capilar en la parte de entrada del

16 Smith, S., Mager, D., Perebikovskiy, A., Shamloo, E., Kinahan, D., Mishra, R., Torres Delgado, S.M., Kido, H., Saha S., Ducrée J., Madou, M., Land K., Korvink, J.G. CD-Based Microfluidics for Primary Care in Extreme Point-of-Care Settings. *Micromachines* 2016; 7(2): 22.

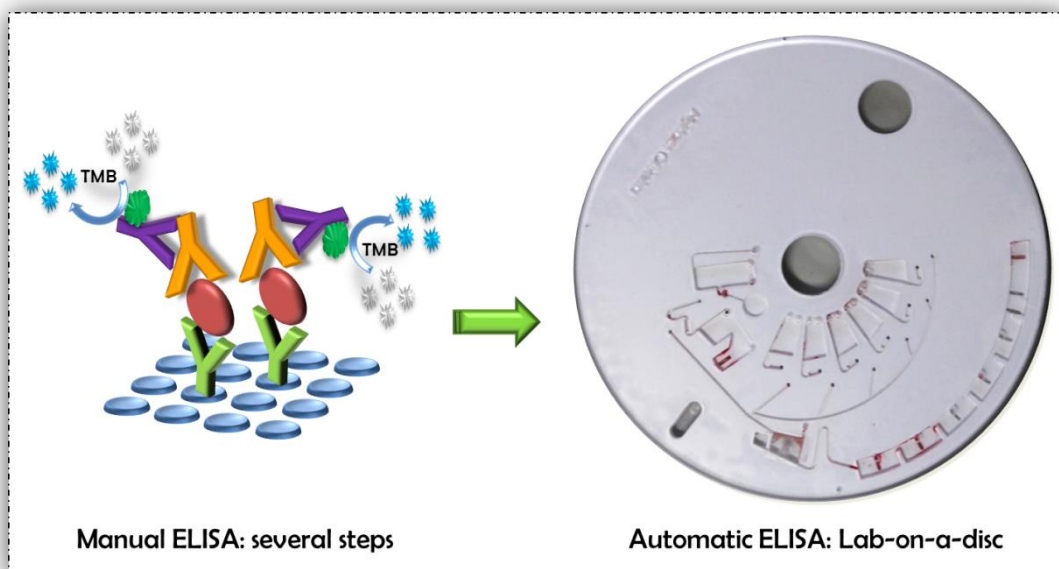
17 Tang, M., Wang, G., Kong, S. K., Ho, H. P. A Review of Biomedical Centrifugal Microfluidic Platforms. *Micromachines* 2016; 7(2): 26.

sifón supere la fuerza centrífuga, impulsando así la salida del líquido. En este capítulo, el control de las diferentes etapas de adición de reactivos y de incubación se llevará a cabo mediante el empleo de un sifón combinado con el uso de películas solubles, que se rompen cuando entran en contacto con un líquido, permitiendo que el líquido pase a través de la válvula. Para controlar la secuencia de etapas, estas válvulas estarán conectadas con canales de aire y una cámara neumática que, por cambios en las presiones, producirán la liberación de los diferentes reactivos en el momento correspondiente.

3.3.3. Artículo 4: “Design of a Lab-on-a-disc platform for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”

Resultados sin publicar

Este trabajo fue realizado en Dublin City University y en el Biomedical Diagnostic Institute (BDI), en colaboración con el Dr. Mishra y el Dr. Kinahan y bajo la supervisión de los Profesores R. O’Kennedy y J. Ducreé.



Unpublished results

Design of a Lab-on-a-disc platform for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. Introduction

Over the past decade, the development and applications of immunoassays have continued to grow exponentially. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), typically carried out in a 96-well microtiter plate, provides an ideal tool for a wide range of studies in many biological and medical laboratories because it supplies high specificity and high sensitivity. However, typical sandwich-type ELISAs require a multistep process of incubation, mixing, and washing, and large volumes (20-200 μL) of analyte and reagents, making the whole process complicated and time consuming, in such a way that it often takes from several hours to two days to carry out one assay [1,2]. Thus, there is an increasing need for the development of simple devices that allow for a one-step assay protocol for rapid analysis and, when it is possible, portable and inexpensive for their use in limited-resources settings [3]. Microfluidic lab-on-a-chip and in particular centrifugal lab-on-a-disc systems, have emerged as a potential alternative to integrate laborious biochemical and immunochemical assay procedures onto a single, automated device and at low cost [4]. Integration of immunoassays into lab-on-a-disc networks allows more precise control of fluidics over the assay process, while also reducing reagent consumption. Additionally, the small chamber and channel dimensions reduce incubation times by facilitating improved mass-transport due to shorter diffusion lengths [5]. A range of biological assays such as immunoassays [6,7], cell lysis and homogenization [8], DNA analysis [9], and classification of bioparticles [10] have been demonstrated on a centrifugal microfluidic platform. A particular challenge on centrifugal platforms is the implementation of the rotationally controlled and sequential release of multi on-board liquids. Because of that, valving structures are fundamental in enabling sequential fluidic processing required to perform complicated assays, properly retaining sample fluidics and reagents until needed. As during spinning all liquids are subject to the same radial force field, valves have to be opened selectively

in time and space for implementing sequential and parallel process steps [5,11]. Many early-stage lab-on-a-disc systems have introduced capillary barriers or siphons to monitor flow control. More recently, sacrificial valves were introduced to overcome the limitations of passive valving and to increase centrifugal microfluidic capabilities for expanded use. These valves can be switched on or off by external sources during an assay, such as a laser beam. Within this type, dissolvable films (DF) sacrificial valving systems have attracted much attention. DFs, based on water-soluble materials, will breakdown when a liquid is introduced to their surface, eventually allowing liquid to pass through the valve [12]. The dissolution times of the DFs depend on the specific mixture of the constituents. With this approach, an event-triggered valve configuration can be achieved, cascading a multi-step liquid handling sequence which is independent of external stimulus or the disc rotational frequency. For that, this valving technology utilizes the arrival of an ancillary liquid at one location on the disc to prompt the release of another liquid residing at another, distant location on the disc through a connecting pneumatic channel [13].

Using dissolvable films, we present here the integration of an automatic multi-step system which would allow performing an ELISA system. The disc would encompass all the process necessities such as plasma separation from whole blood, incubation with capture antibodies, multiple buffer washes and routing of post-reaction enzymatic substrate to an optical measurement chamber performed on the disc in its entirety based on event-triggered rotational flow control. To demonstrate sequential release and more advanced network capabilities, the disc is preloaded with dyed water, simulating sample (whole blood), wash buffer and the different reagents needed to carry out the ELISA protocol.

2. Material and methods

a. Disc manufacture and assembly

The microstructured disc was designed using the SolidWorks 2013 (Dassault systems, USA) and consisted of an eight layered structure composed of four layers of polymethylmethacrylate (PMMA) and four layers of pressure sensitive adhesive (PSA) (Adhesives Research, Limerick, Ireland). All features on the PMMA layers (Disc OD 130 mm, 1.5 mm, thick vents, reservoirs, router components) were laser ablated (30-W

CO₂ laser, Epilog, USA). Small features such as microchannels were created from voids cut in PSA (86 μm thick) using a knife-cutter (Graphtec, Yokohama, Japan).

Figure 1 show the layers disposition. Layer 1 (PMMA) consisted of loading vents. Layer 2 (PSA) consisted of the bulk of the microchannels connecting the reservoirs containing the sequence of unit operations of the ELISA. Layer 3 (PMMA) provided large reservoirs and through-holes which act as vertical vias. Layer 4 (PSA) and 5 sandwiched the DF tabs, working as cover and support respectively. Layer 6 (PMMA) contained the through-holes which acted as vertical vias. The lower air channels PSA layer (layer 7) included the pneumatic connections that were the core of the event-triggered structure allowing the release of reagents, buffer washes and the routing fluid on the disc. Finally, layer 8 (PMMA) acted as mechanical backing. All microchannels were 500 μm wide.

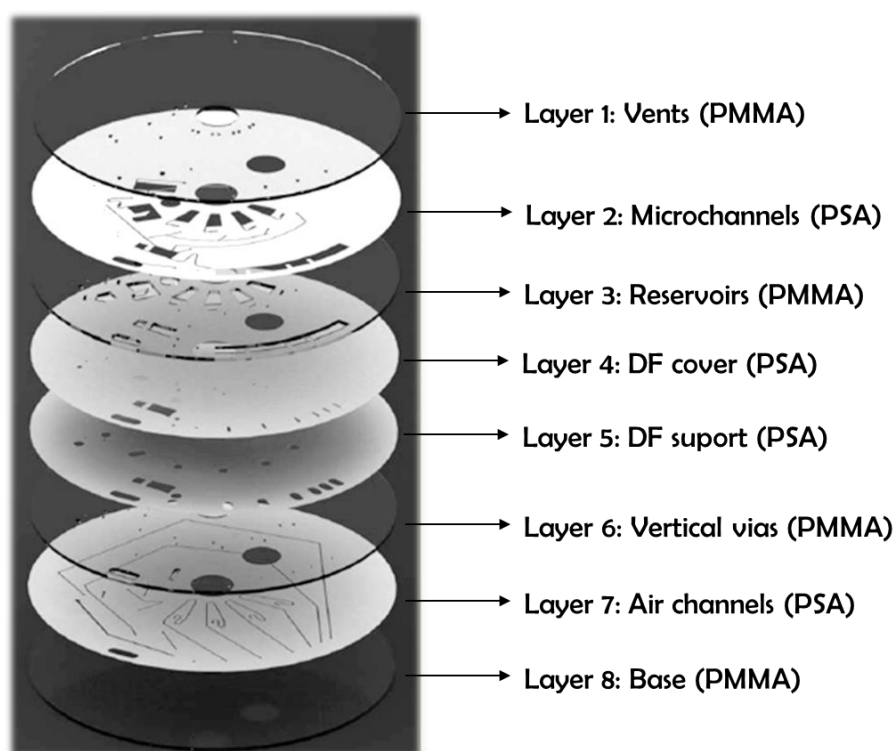


Fig. 11 Detail of disc assembly. The disc is manufactured from eight layers which are assembled into a multi-layer architecture. The discs were assembled on an alignment jig and were rolled using a laminating machine.

b. Dissolvable film tabs

As the dissolvable films are non-adhesive, they were attached to double-sided pressure sensitive adhesive (PSA) to create sticky tabs [11]. Two tab geometries were used for the dissolvable films, circular for load film (LF) and slot-shaped for control film (CFs).

The valving mechanism depends on the balance between the centrifugally induced pressure head and a critical yield pressure which needs to be determined experimentally. As the centrifugal pressure head increases, the liquid plug can move farther into the pneumatic chamber, thus making harder for the surface tension to sustain the liquid volumen. At the so-called burst frequency, the liquid proceeds into the pneumatic chamber to dissolve the CF membrane and hence open the valve. Then, an ancillary liquid vents the pneumatic chamber, permitting the main liquid to advance and to wet and then dissolve the LF. The main liquid now exits through the newly created opening [11]. Valves can be configured to open in a serial cascade. This sequential release configuration, similarly of electrical circuits, can be further expanded to provide logical flow control elements.

c. Hardware instrument and experimental setup

The disc were placed on a spin stand setup, which contained a computer-controlled motor (Faulhaber Minimotor SA, Switzerland) that precisely modulated the rotational frequencies of the microfluidic device. Control of the motor was enabled using a custom LabVIEW program (National Instruments, USA) interfaced with a data acquisition system. A stroboscopic light source (Drelloscop 3244, Drello, Germany) and a sensitive, shortexposure time camera (Pixelfly, PCO, Germany) and the motor are synchronized using custom electronics visualize the hydrodynamics on the rotating discs [14].

3. Results and discussion

a. Volume metering for whole blood processing

The first step in many clinical diagnosis analyses is the separation of red blood cells from blood plasma as certain cellular components can interfere with the measurements. As plasma proportion may vary between individuals, liquid volume metering is essential to achieve proper plasma volumes for diagnostic assays ensuring reproducible

results on the disc. Metering is most often accomplished through manipulating hydrophobic or capillary valving strategies and motor frequency to stop or move fluid [15]. In this work, volume metering was achieved through the simple use of an overflow channel connected to a fluidic chamber (Figure 2). Once the red blood cells fraction was separated from the plasma by density means and the plasma chamber has been filled to the radial level of the overflow channel, any additional fluid is routed to a waste channel. This waste reservoir was designed to release the plasma from the principal chamber *via* a CF (DF2).

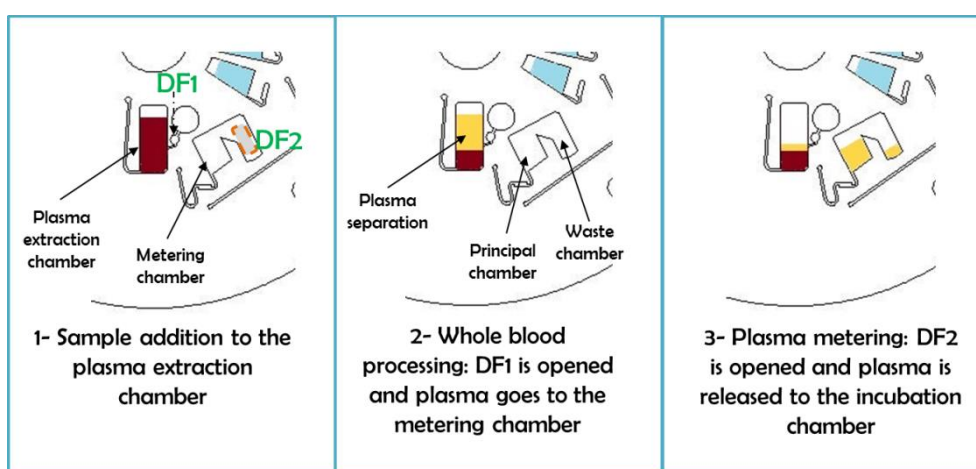


Fig. 12 Whole blood processing and plasma metering process. A simple overflow channel connected to a waste chamber provides a defined sample volume.

To evaluate the metering process and to optimize the sample volumes, dyed water was added to the plasma extraction chamber and the disc started to spin. With this experiment was demonstrated the success of the sequential DF valves and found the volume needed to carry out the serial process. Thus, a 140 μL blood sample is centrifuged for 5 minutes in the separation chamber to extract a plasma volume of 40 μL , ensuring enough overflow to open the DF2 and allowing the plasma to circulate toward the incubation chamber.

b. Reaction chamber optimization

Several designs of the reaction chamber and air valves and siphons connected to them were tested in order to promote the reagents mixing, the retention of the reagents in the incubation times and their release once ended the reaction. The different designs proposed are shown in Figure 3. They were changing in function of the requirements determined experimentally. The first approach consisted on a symmetric chamber (Fig. 3-1). However, with this design, the incubation time could not be controlled correctly. So, a different reaction chamber, with two unequal shapes interconnected was introduced (Fig. 3-2). With this proposal, the incubation step was well established except that some liquid was remained in the left-chamber and the reservoir could not be emptied completely. Thus, several changes were carried out in the siphon, air valve, and finally to the own chamber until the entirely process worked in a proper manner (Fig. 3-3, 3-4 and 3-5).

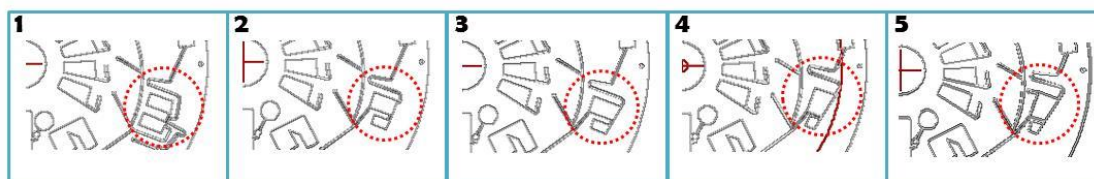


Fig. 13 Incubation chamber optimization. 1) First approach with a symmetric chamber. 2) Changes in the chamber shape. 3) Changes in the siphon. 4) New change in the chamber and siphon. 5) Changes in the air valve.

c. Disc design and evaluation of networks and process

A fully operational microfluidic routing of a fluid using a DF membranes is demonstrated in Figure 2 (Sample processing) and 4 (incubation, washes and detection steps). The purpose is to route a biological fluid from the plasma extraction chamber to the detection chamber by the sequential dissolution of the DFs. All the steps were tested using dye water as sample and reagents.

In typical sandwich-type ELISA, the capture antibody is immobilized onto a solid phase of a plastic well. The assumption here is that the incubation chamber contains beads coated with the capture antibody. Thus, once the plasma was metered (dye water in these experiments), the defined volume would be incubated with the preloaded capture antibody coated-beads in the incubation chamber. During these steps, the mixing is

induced by pulsed compression/decompression of a pneumatic chamber connected to the reaction chamber (Figure 5).

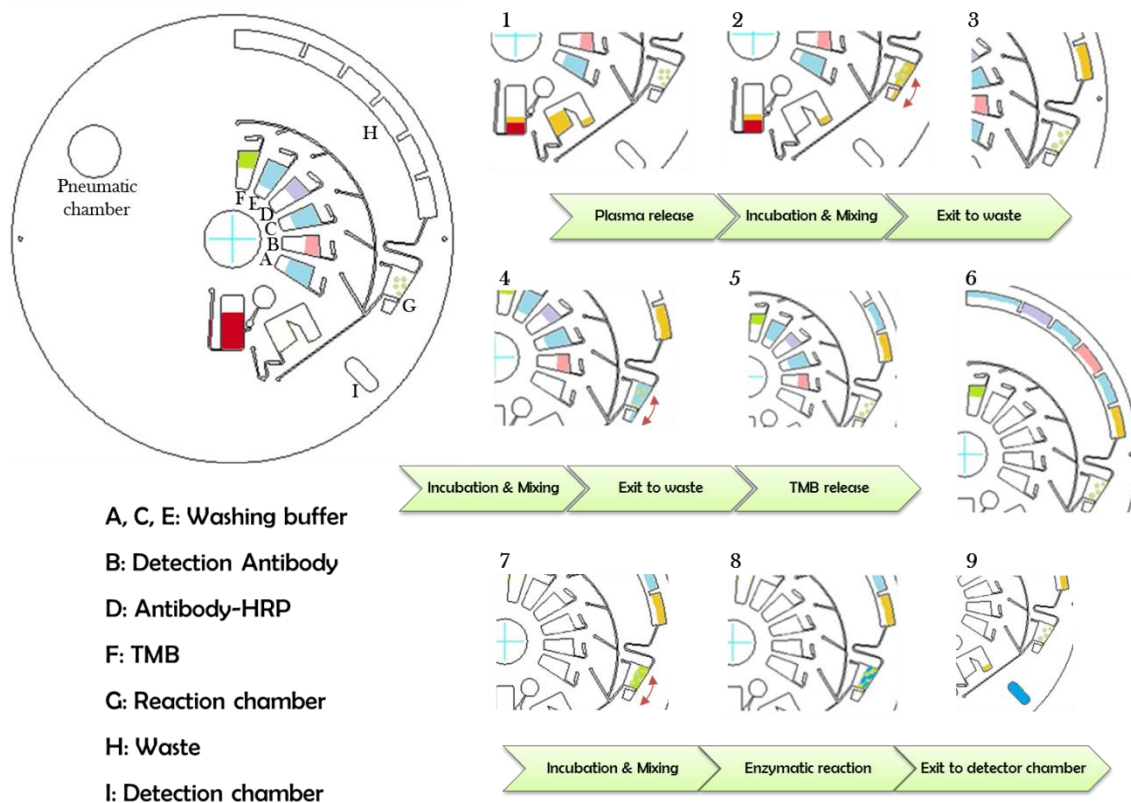


Fig. 14 ELISA miniaturization on a centrifugal microfluidic Lab-on-a-Disc platform with event-triggered flow. In these experiments, dye water was used as sample and reagents. On the left, the complete disc is represented. On the right, assay steps: 1) Plasma from the metering chamber is released to the reaction chamber. 2) Plasma is incubated with the preloaded capture antibody. 3) After the incubation time, plasma is driven to the waste, where a DF is dissolved and the reagent A can be released to the reaction chamber. 4) The complex antigen-antibody is washed. 5) After the incubation time, washing buffer is driven to the waste, where a DF is dissolved and the reagent B can be released to the reaction chamber. This process is repeated until reagent E is driven to waste. 6) When reagent E arrives to the waste, four DF are opened, which causes that TMB is released to the reaction chamber and that the channel to the detector chamber is also open. 7) Incubation of TMB with the enzyme. 8) Enzymatic reaction. 9) The enzymatic reaction product is released to the detector chamber as the spin frequency decreases.

Thereafter the beads are washed with the first buffer wash of 80 μl (Figure 4-A). This is followed by incubation of the beads with the detection antibody (40 μl , Figure 4-B) for a fixed period of time. Then, the second washing buffer (80 μl , Figure 4-C) is released and it is incubated with the beads. Next, 40 μl of the HRP tagged secondary antibody (Figure 4-D) are discharged. The final washing buffer (80 μl , Figure 4-E) is released and it is incubated with the beads. The last trigger after this wash, eventually releases

the enzymatic substrate TMB (40 μ l, Figure 4-F) and also opens the channel to the detection chamber. The TMB undergoes color change to blue and is driven to detection chamber, where the absorbance can be measured based on the use of LEDs.

With this design, all the assay steps can be performed automatically, controlled by the motor spinning frequency and the DFs, only with a manual step in the addition of the sample to the disc.

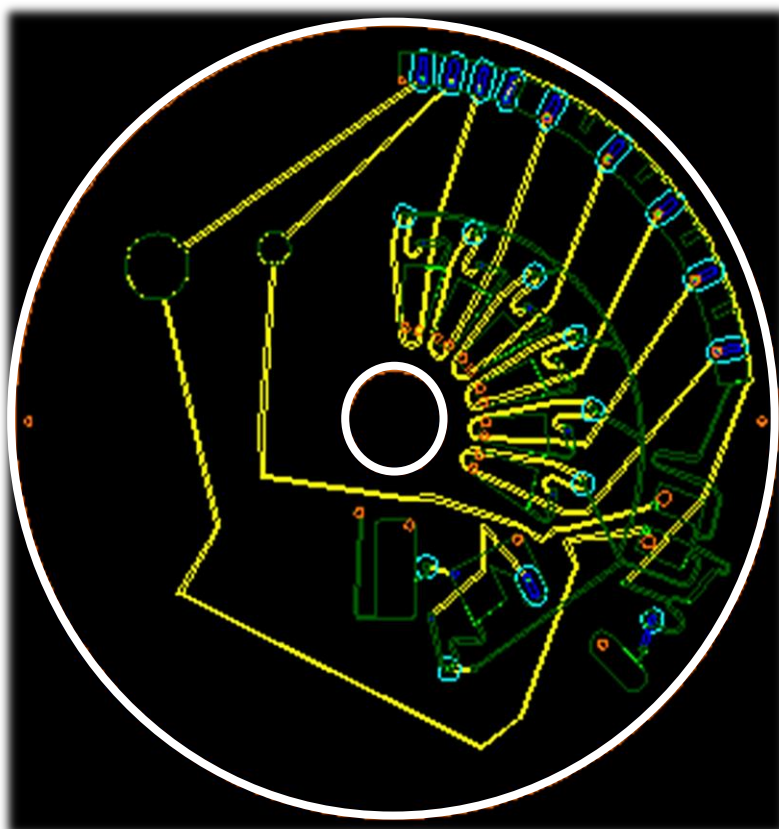


Fig. 15 Example of a lab-on-a-disc design with the layers overlapping. In yellow, the air channels. In green, reservoirs. In blue, dissolvable films. In orange, air valves. Here, it can be observed that the pneumatic chamber is connected to the reaction chamber to control the incubation time.

4. Conclusions

We have developed a fully automated lab-on-a-disc for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that could directly use the raw samples such as whole blood. We have successfully demonstrated that flow sequencing can be achieved on the disc-microfluidic platform by the event-triggered valves. The sequence of valve

openings is governed by the layout of the disc while the timing of valve actuation is automatically controlled by the interval required for liquid to move about the disc and to dissolve the DFs. Further experiments will be directed to the implementation of a real ELISA system, using their corresponding reagents, such as antibodies, to detect a target analyte. It will allow us to optimize the incubation time of the different steps, thus knowing the total analysis time.

Bibliography

- [1] Crowther, J. R. The ELISA guidebook. Humana Press: Totowa, NJ (2001)
- [2] Wild, D. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands (2013)
- [3] Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J., Estrela, P., O'Kennedy, R. Point-of-care diagnostics in low resource settings: present status and future role of microfluidics. *Biosensors*, 2015: 5(3), 577-601.
- [4] Erickson, D., Li, D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, 2004: 507(1), 11-26.
- [5] Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M., Lee, B. S., Park, J. M., Kim, J., Kim, K., Madou, M., Cho, Y. K. Centrifugal microfluidics for biomedical applications. *Lab on a Chip*, 2010: 10(14), 1758-1773.
- [6] Lee, B. S., Lee, Y. U., Kim, H. S., Kim, T. H., Park, J., Lee, J. G., Kim, J., Kim, H., Lee, W. G., Cho, Y. K. Fully integrated lab-on-a-disc for simultaneous analysis of biochemistry and immunoassay from whole blood. *Lab on a Chip*, 2011, 11(1), 70-78.
- [7] Nwankire, C. E., Donohoe, G. G., Zhang, X., Siegrist, J., Somers, M., Kurzbuch, D., Monaghan, R., Kitsara, M., Burger, R., Hearty S., Murrell, J., Martin, C., Rook, M., Barrett, L., Daniels, S., McDonagh, C., O'Kennedy, R., Ducrée, J. At-line bioprocess monitoring by immunoassay with rotationally controlled serial siphoning and integrated supercritical angle fluorescence optics. *Analytica chimica acta*, 2013: 781, 54-62.
- [8] Siegrist, J., Gorkin, R., Bastien, M., Stewart, G., Peytavi, R., Kido, H., Bergeron, M., Madou, M. Validation of a centrifugal microfluidic sample lysis and

homogenization platform for nucleic acid extraction with clinical samples. *Lab on a Chip* 2010: 10(3), 363-371.

[9] Sayad, A. A., Ibrahim, F., Uddin, S. M., Pei, K. X., Mohktar, M. S., Madou, M., Thong, K. L. A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016: 227, 600-609.

[10] Burger, R., Ducreé, J. Handling and analysis of cells and bioparticles on centrifugal microfluidic platforms. *Expert review of molecular diagnostics*, 2012: 12(4), 407-421.

[11] Gorkin III, R., Nwankire, C. E., Gaughran, J., Zhang, X., Donohoe, G. G., Rook, M., O'Kennedy, R., Ducreé, J. Centrifugo-pneumatic valving utilizing dissolvable films. *Lab on a Chip*, 2012: 12(16), 2894-2902.

[12] Tang, M., Wang, G., Kong, S. K., Ho, H. P. A Review of Biomedical Centrifugal Microfluidic Platforms. *Micromachines*, 2016: 7(2), 26.

[13] Kinahan, D. J., Kearney, S. M., Dimov, N., Glynn, M. T., Ducreé, J. Event-triggered logical flow control for comprehensive process integration of multi-step assays on centrifugal microfluidic platforms. *Lab on a Chip* 2014, 14(13), 2249-2258.

[14] Grumann, M., Brenner, T., Beer, C., Zengerle, R., Ducreé, J. Visualization of flow patterning in high-speed centrifugal microfluidics. *Review of scientific instruments*, 2005: 76(2), 025101.

[15] Gilmore, J., Islam, M., & Martinez-Duarte, R. Challenges in the Use of Compact Disc-Based Centrifugal Microfluidics for Healthcare Diagnostics at the Extreme Point of Care. *Micromachines*, 2016: 7(4), 52.

3.4. Capítulo IV: Diseño de inmunoensayos de flujo lateral y estrategias de sensibilización para la detección de vesículas extracelulares

- ∞ Artículo: “Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids”
- ∞ Artículo: “Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection”

Muchos métodos de diagnóstico empleados en la actualidad pueden resultar muy invasivos para el paciente, como en el caso de las biopsias, o no ser capaces de detectar la enfermedad antes de producirse un daño irreversible. Además, una vez diagnosticada, existen pocos métodos de seguimiento de la respuesta terapéutica capaces de establecer el éxito del tratamiento. Por ello, existe una necesidad urgente de encontrar métodos nuevos, no invasivos, para la estratificación y el seguimiento de los pacientes. En este sentido, las vesículas extracelulares (EV) y, dentro de este grupo los exosomas fundamentalmente, han surgido como una poderosa herramienta biomédica, ya que se encuentran presentes en muchos fluidos biológicos y su análisis pueden servir como una alternativa no invasiva a las pruebas de diagnóstico actuales¹⁸. El empleo de estas nanovesículas como biomarcadores se debe a que su composición depende de la célula que las produce, por lo que las proteínas y ácidos nucleicos presentes en ellas serán un reflejo del tipo y estado de la célula que las ha liberado¹⁹.

A pesar de que los exosomas son cada vez más reconocidos como entidades biológicas y terapéuticas importantes, sigue existiendo una falta de métodos estandarizados para su análisis. Esto es debido principalmente a dificultades técnicas en el desarrollo de métodos para su cuantificación, relacionadas con su pequeño tamaño y su heterogeneidad en la composición. Como ya se ha comentado en la introducción, en los últimos años se han desarrollado varias técnicas que han hecho posible la detección y caracterización de los exosomas (NTA, ELISA, citometría de flujo, etc.). No obstante, estos métodos suelen requerir de equipos sofisticados y caros o necesitar largos procedimientos, incrementando el tiempo de análisis²⁰. Como alternativa a estos métodos, en este capítulo se propone el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) para la detección de exosomas que, como ya se ha mencionado varias veces en anteriores ocasiones, es una poderosa herramienta para la detección rápida y de bajo coste de biomoléculas. Además, dado el pequeño tamaño de los exosomas, estos pueden fluir a través de la membrana hasta ser capturados por el anticuerpo inmovilizado en la línea de detección.

18 Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2013; 7 (5): 769-78.

19 Yáñez-Mó, M., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4:27066.

20 Sunkara, V., Woo, H. K., Cho, Y. K. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst* 2016; 141(2): 371-381.

A pesar del reconocimiento del LFIA como herramienta diagnóstica, no existen experiencias previas en la aplicación de estos sistemas para la detección de exosomas. Por ello, deberán llevarse a cabo todas las etapas para su desarrollo, desde la selección de anticuerpos mediante técnicas ELISA, hasta su validación con exosomas aislados de varias fuentes, incluida una fuente comercial. Como sistema de detección, se emplearán tetraspaninas, proteínas comúnmente utilizadas como marcadores de exosomas debido a su alta abundancia en prácticamente cualquier tipo de célula. Con el fin de optimizar la plataforma y para estar seguros de que la señal está producida por la presencia de exosomas y no por cualquier otro tipo de biomolécula presente en la muestra, se emplearán exosomas aislados mediante los métodos descritos a continuación.

3.4.1. Técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares

Existen una gran variedad de formas diferentes para aislar exosomas. La elección del protocolo dependerá de la procedencia de la muestra (medio de cultivo celular, líquido cefalorraquídeo, orina, plasma, u otro fluido biológico), la cantidad de muestra, y su aplicación después del aislamiento. Basándose en el principio de su separación, los métodos se pueden clasificar en tres tipos principales: aislamiento por densidad (centrifugación diferencial o mediante el uso de reactivos de precipitación), tamaño (como la cromatografía de exclusión) o de inmunoafinidad (por ejemplo mediante el empleo de bolas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos)²¹. En esta tesis se emplearán los métodos basados en densidad para el aislamiento de los exosomas.

Un problema de los métodos de aislamiento actuales es que no discriminan plenamente entre microvesículas y exosomas. Por ello, los últimos acuerdos sobre nomenclatura recomiendan el uso del término general EVs para referirse a las vesículas circulantes aisladas a partir de fluidos biológicos diferentes de los cuerpos apoptóticos.

3.4.1.1. Centrifugación diferencial

El estándar de oro y protocolo más empleado para el aislamiento y purificación de las EVs es la centrifugación diferencial. Esta técnica implica varias etapas de centrifugación y de ultracentrifugación para eliminar partículas, células y restos celulares que pueden interferir en los análisis posteriores. Este procedimiento implica tiempos largos para obtener las EVs aisladas, además de requerirse equipo especial

21 Peterson, M. F., Otoc, N., Sethi, J. K., Gupta, A., Antes, T. J. Integrated systems for exosome investigation. *Methods* 2015; 87: 31-45

(ultracentrífuga), que puede no estar disponible en un laboratorio corriente de entornos clínicos. Otros inconvenientes incluyen el aislamiento ineficiente y baja recuperación.

3.4.1.2. Métodos basados en reactivos de precipitación

Debido a los inconvenientes que presenta la centrifugación diferencial, varias compañías de biotecnología están trabajando actualmente en el desarrollo de estrategias rápidas y fáciles de aislar EVs a partir de fluidos biológicos. Una tecnología alternativa es el aislamiento de exosomas través de la precipitación usando polímeros. Estos reactivos reducen la solubilidad mediante la disminución de la hidratación de las EVs provocando así su precipitación. El uso de estos kits comerciales hace que las EVs puedan separarse a menores revoluciones con un rendimiento superior a la ultracentrifugación. El polímero empleado para la precipitación se disuelve una vez retirado el sobrenadante, al añadir agua o una reguladora acuosa para resuspender las EVs. El inconveniente de este método es que, dependiendo del tipo de muestra, algunos materiales no exosomales, como agregados de proteínas, puede co-aislar con las EVs, pudiendo interferir en su aplicación posterior.

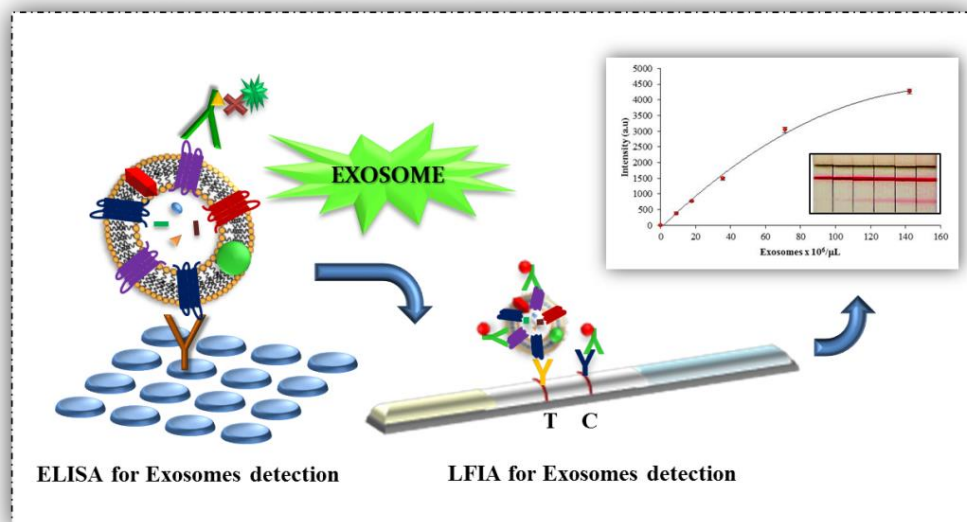
3.4.2. Técnicas de sensibilización

Una vez que se ha comprobado la validez del ensayo desarrollo para la detección de EVs, el siguiente paso necesario para cualquier plataforma de análisis es la introducción de mejoras para hacerla apta para la aplicación a la que va dirigida. En este caso, la situación ideal sería aquella en la que la sensibilidad del método fuera lo suficientemente alta para permitir detectar las EVs en los fluidos biológicos, pudiendo emplearse las tiras de flujo lateral en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad, al mismo tiempo que ser capaz de discriminar con precisión entre individuos sanos y enfermos. Una de las estrategias para la optimización de la sensibilidad pasa por el empleo de diferentes marcas, como ya se comentó anteriormente. Por este motivo, en este capítulo se explorará la posibilidad de emplear una marca distinta a las nanopartículas de oro (nanopartículas de carbón o magnéticas) con el fin de conocer el comportamiento de estas vesículas en presencia de diferentes marcas, dada la distinta naturaleza de estas EVs respecto a otros analitos generalmente analizados. Debe recordarse las dimensiones de estas vesículas (40-150 nm) y la presencia de una alta heterogeneidad de proteínas en su superficie, que varía no sólo entre EVs aisladas de diferentes fuentes, sino que también entre diferentes individuos. Por esta razón, el

último objetivo de este capítulo será desarrollar un LFIA que tenga en cuenta esta variabilidad, bien por la utilización de una combinación de anticuerpos en la misma línea de test, o por el empleo de líneas adicionales, simulando un formato multiplex.

3.4.3. Artículo 5: “Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids”

Journal of Extracellular Vesicles 2016, 5: 31803



Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids

Myriam Oliveira-Rodríguez¹, Sheila López-Cobo², Hugh T. Reyburn², Agustín Costa-García¹, Soraya López Martín³, María Yáñez Mo^{3,4}, Eva Cernuda-Morollón⁵, Annette Paschen⁶, Mar Valés-Gómez², M.C. Blanco-López^{1*}

¹*Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

²*Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC, Darwin, 3, Madrid, Spain*

³*Unidad de Investigación, Hospital St Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IS-IP), Madrid, Spain*

⁴*Departamento de Biología Molecular, UAM/IIS-IP, Madrid, Spain*

⁵*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain*

⁶ *Department of Dermatology, University Hospital Essen, University Duisburg-Essen, Essen, Germany.*

ABSTRACT

Exosomes are cell-secreted nanovesicles (40-200 nm) that represent a rich source of novel biomarkers in the diagnosis and prognosis of certain diseases. Despite the increasingly recognized relevance of these vesicles as biomarkers, their detection has been limited due in part to current technical challenges in the rapid isolation and analysis of exosomes. The complexity of the development of analytical platforms relies on the heterogeneous composition of the exosome membrane. One of the most attractive

tests is the immunochromatographic strips, which allow rapid detection by unskilled operators. We have successfully developed a novel lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of exosomes based on the use of tetraspanins as targets. We have applied this platform for the detection of exosomes purified from different sources: cell culture supernatants, human plasma and urine. As proof of concept, we explored the analytical potential of this LFIA platform to accurately quantify exosomes purified from a human metastatic melanoma cell line. The one-step assay can be completed in 15 min, with a LOD of 8.54×10^5 exosomes/ μL when a blend of anti-CD9 and anti-CD81 were selected as capture antibodies and anti-CD63 labeled with gold nanoparticles as detection antibody. Based in our results, this platform could be well suited to be used as a rapid exosome quantification tool, with promising diagnostic applications, bearing in mind that the detection of exosomes from different sources may require adaptation of the analytical settings to their specific composition.

KEYWORDS: Exosomes, Lateral Flow Immunoassay, ELISA, Rapid Test, In-vitro diagnostics.

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) consist of small, bubble-like membranous structures that are released from cells in 3 primary types: exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies (1) and play a pivotal role in intercellular communication. These vesicles have been studied over the years using a variety of isolation strategies and have been classified according to their distinct structural and biochemical properties. Exosomes are defined as 40-200 nm diameter (2) membrane vesicles of endocytic origin that are released by most cell types upon fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane (3,4). The protein content of exosomes has been extensively analyzed from different cell types and body fluids by mass spectrometry, Western blotting, flow cytometry and immunoelectron microscopy and includes both conserved and cell type specific proteins. All EVs contain proteins involved in membrane transport and fusion (Rab GTPases, Annexins), heat shock proteins (HSP60, HSP70, HSPA5 and HSP90), integrins and variable proportions of tetraspanins (CD63, CD81 and CD9) (**¡Error! Marcador no definido.**4-6). Moreover, EVs also contain a variety of nucleic acids including DNA, mRNA and miRNA. A recent comparative proteomic study between different subtypes of EVs (5) proposed that co-expression of CD63 with at least one other tetraspanin, CD9 and/or CD81, characterized exosomes of endosomal origin, also enriched in proteins involved in MVB biogenesis (e.g. TSG101), whereas other co-isolated small EVs bearing a single or no tetraspanins originated from other intracellular locations.

Exosomes and other EVs are present in many biological fluids, such as serum/plasma, urine, amniotic fluid, cerebrospinal fluid and saliva (7). Since they carry cell-specific signatures, EVs that are secreted into biological fluids have tremendous potential as biomarkers for prognosis and monitoring the response to treatment in a range of diseases including vascular disorders, autoimmune and hematologic diseases, and cancer (1,8). Moreover, analysis of EVs from body fluids may serve as a non-invasive alternative to the current diagnostic tests. In fact, early reports suggest that EVs may be of use as a ‘liquid biopsy’ (9). In general, higher EVs content has been found in patients with advanced cancer compared to healthy donors, although more studies are needed in this context (10,11).

Although this branch of science is growing very fast, there are still limitations in relation to isolation and purification technologies as well as to the ability to measure EVs sizes, concentration, and molecular content and only a few EV-based diagnostic assays are currently available (12-14). The “gold standard” and most commonly used protocol for EVs isolation and purification is differential centrifugation, which involves sequential centrifugation and ultracentrifugation steps (15). Recently, several alternative methods have been introduced for isolation and purification of EVs, including antibody-coated magnetic beads, microfluidic devices (16,17), precipitation methods and filtration technologies (8,18). After EVs isolation, many downstream applications require EVs quantitation. For this, researchers use a standard ELISA approach (8,10,19). As an alternative to ELISA, Lab-on-chip devices are useful techniques in clinical care for medical diagnosis, since they allow the use of small volumes of sample and shorter processing times, improve sensitivity and reduce clinical care costs. These miniaturized devices integrate microfluidic approaches that enables on-chip immun isolation and in situ protein analysis of EVs directly from patient plasma (20) and allow multiplex assays (21). Indeed, Chen et al (22) have developed a point-of-care (POC) system for microvesicle analysis using a paper-based ELISA device which enables the use of very low sample and reagent volumes and that is completed in ten minutes. The Lee and Weissleder group has developed small devices that allow quantification of EVs based on different physicochemical principles, such as nuclear magnetic resonance (23), Surface Plasmon Resonance (24) and electrochemical measurements combined with immunocapture (25).

Within the POC systems, lateral flow immunoassay tests (LFIA) represent a well-established technology which fulfills the characteristics of a rapid, simple, and cost-effective test capable of being performed by unskilled operators (26). LFIA is based on the recognition of one or more analytes (multiplex) of interest by using antibodies. These antibodies are immobilized on a nitrocellulose membrane and interact with the analyte when the sample is applied and flows by capillary action. In a sandwich format protein-target complexes and free capture antibodies, both labelled, accumulate in two defined regions forming the test and control line respectively. The main advantage compared with other immunoassays is that the entire test can be done usually in one step and in a few minutes (27). To the authors' knowledge, this type of test has not been developed for the detection of exosomes. This might reflect the difficulty of

dealing with vesicles of this size that have a heterogeneous composition on the membrane, in highly complex biological matrixes. However, LFIA have been successfully developed for analytes reaching a size of 1 μ m, such as spores or bacteria (28,29).

In this study, LFIA platforms for the detection of exosomes have been developed using tetraspanins as targets for capture and detection antibodies. Tetraspanins CD9, CD63 and CD81 are specially enriched in the membrane of exosomes (5,30), and they are often used as exosome biomarkers due to their high abundance in virtually any cell type. However, their single expression on an EV does not demonstrate its endosomal origin (5): the approach developed here allows to analyse specifically EVs bearing at least 2 of these 3 tetraspanins, and thus more specifically bona fide exosomes, rather than other EVs.

METHODS

Cell Culture

The human melanoma cell line Ma-Mel-86c was established from a stage IV metastatic lymph node lesion (31). Small tissue pieces were distributed in cell culture dishes, and outgrowing cells were split for the first time at 90% cell confluence. Melanoma cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, 10% Fetal Bovine Serum (FBS), and penicillin/streptomycin. Cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Tumor tissue was collected after approval by the institutional review board and patient informed consent.

Antibodies

Anti-tetraspanin antibodies used for ELISA and LFIA in this study have been previously characterized (32): anti-CD9 VJ1/20 (33); anti-CD63 Tea3/18 (34). Anti-CD81 5A6 was provided by Dr. S. Levy (Oncology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Antibodies were purified by affinity chromatography with Prot-G Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) and biotinylated with Sulfo-NHS Biotin (Pierce). Free biotin was eliminated by overnight dialysis against PBS buffer.

Tetraspanin antibodies used for Western blot (MEM-63, MEM-81, MEM-9) were obtained from Vaclav Horejci (Czech Republic).

Exosomes purification and evaluation of protein concentration

For exosome isolation, cells were cultured in medium supplemented with 0.5% exosome-free FBS for 3-5 days. Cells were centrifuged for 10 min at 200×g and exosomes purified by sequential centrifugation as previously described (35). Exosome-free FBS was prepared by ultracentrifugation of regular FBS, during 16-18 h at 100,000 x g followed by filter sterilization. Aliquots were prepared and kept frozen at -20°C.

Briefly, after centrifugation of cells, supernatants were centrifuged twice at 500×g for 10 min. Supernatants were pooled and centrifuged at 10,000×g for 30 min prior to exosomes isolation by ultracentrifugation at 100,000×g for 2 hours at 4°C (Beckman Instruments). Exosomes were resuspended in HEPES-buffered saline buffer (HBS: 10mM HEPES pH 7.2, 150mM NaCl).

Purified exosomes were supplemented with sucrose to a final concentration of 8% and frozen immediately at -80°C and lyophilized using a Flexi-Dry Lyophilizer (FTS Systems).

Lyophilized commercial exosomes purified from plasma (HBM-PEP) and urine (HBM-PEU) of healthy donors were purchased from HansaBioMed (Tallinn, Estonia) used in lateral flow immunoassays. The expression of the tetraspanins CD9, CD63 and CD81 was confirmed by Western blot and flow cytometry using respectively antibodies anti-CD9, anti-CD63 and anti-CD81 (HansaBioMed, Tallinn, Estonia) (Figures S1 and S2). Exosome pellets were resuspended in deionized water (MiliQ), following the manufacturer's instructions.

For analysis of protein concentration Bradford assays were performed, following the manufacturer's recommendations.

The concentration of Ma-Mel-86c exosomes was also determined by nanoparticle tracking analysis (NTA) in a Nanosight NS500 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). A 405-nm laser beam was used to highlight the particles, which act as point scatters. Analysis was performed using the NTA 3.1 software (Malvern). The

experiment was carried out at the laboratory of Dr. H. Peinado, Spanish National Centre for Oncological Research (CNIO).

Western Blot

Cell lysates were prepared by incubation in Tris pH 7.6 buffer containing 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40 and the protease inhibitors leupeptin and pepstatin for 30 min at 4°C. Nuclei were eliminated by centrifugation at 13,000×g. Lysates and purified exosomes were resuspended in Laemmli buffer and run on 12% SDS-PAGE gels. For detection of tetraspanins, samples were run under non-reducing conditions. Proteins were transferred to Immobilon-P (Millipore) membrane. The membrane was blocked using PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-T) and 5% non-fat dry milk. Tetraspanins were detected by incubation with the antibodies indicated above, followed by HRP-conjugated secondary antibody. Proteins were visualized using the ECL system (GE Healthcare).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Lyophilized exosomes were reconstituted and diluted 1:20 with PBS. Electron microscope examination of exosomes was carried out by floating a carbon-coated 400-mesh Formvar EM grid on top of one drop of freshly prepared exosomes (60 µg/mL in PBS) for about 1 min. The grid was then briefly washed with deionized water and floated on a drop of 2% uranyl acetate. Samples were examined using a Jeol JEM 1011 electron microscope operating at 100 kV with a CCD camera Gatan Erlangshen ES1000W. The experiment was carried out at the Electron Microscopy facility, Spanish National Centre for Biotechnology (CNB).

Size distribution and ζ -potential

Size distribution and ζ -potential assays were carried out with both fresh and lyophilized samples using a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He-Ne laser ($\lambda = 633$) for monitoring the conjugation process. Diluted (50 to 100-fold) fractions were loaded in the cell. A total of three readings were performed at 25°C. Each reading was composed of 15 measurements of

the backscattering (173°) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis.

ELISA FOR EXOSOME DETECTION

In order to test the recognition of different molecules in the same exosome sample, and before testing the LFIA system, different combinations of tetraspanin-specific antibodies were tested by ELISA. Ninety-six well plates (Falcon) were coated with the indicated antibodies (100 μ l at 5.0 μ g/mL) in either 100mM sodium borate buffer, pH 9 or 100mM sodium carbonate buffer, pH 9.6) overnight at 4°C. Wells were washed with HBS and blocked with 200 μ L/well (2% BSA in HBS) for 1 hour at 37°C. Following 3 washes, exosomes purified from Ma-Mel-86c cell culture supernatants were added (100 μ L/well) and incubated at 37°C for 2 hours. HBS was used as a negative control. After 3 washes with HBS, the indicated amount of secondary biotinylated-antibodies (anti-CD9, anti-CD81 or anti-CD63) was added and incubated for 1 hour at 37°C. After 3 washes with HBS, the plate was incubated with 100 μ L of HRP-conjugated streptavidin (Biolegend) diluted 1:2,000 at 37°C for 1 hour. After 3 final washes the reaction was developed with ABTS for 1 hour (Roche) and optical densities were recorded at 405 nm with a reference of 490 nm, using a Sunrise absorbance reader (Tecan).

LATERAL FLOW IMMUNOASSAY

40-nm gold nanoparticles (AuNP) were purchased from BBInternational (UK). Nitrocellulose membranes (HF07504XSS) and glass fiber sample pads (GF001000) were purchased from Millipore (Germany). Other materials used were: backing cards (KN-V1080, Kenoshatapes, Netherlands) and absorbent pads (Whatman, USA). The running buffer consisted of 10mM HEPES pH 7.4 with 150mM NaCl, 0.05% Tween-20 and 1% BSA.

An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection lines (Dispense rate 0.100 μ L/mm) and the strips were cut with a guillotine Fellowes Gamma (Spain).

Labelling antibody with colloidal gold

Anti-CD9 monoclonal antibody (Clone VJ1/20) and anti-CD63 monoclonal antibody (Clone Tea3/18) were conjugated to AuNP. In order to find the optimal concentration of the antibody to stabilize the gold nanoparticles, a gold colloid titration procedure was followed (36). In the case of anti-CD9, aggregation of gold nanoparticles occurred even though different concentrations of antibody and different buffers were tested. For this reason, two different conjugation protocols were carried out: (A) A non-covalent process for anti-CD63 and (B) a covalent protocol for anti-CD9.

(A) 100 μL of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD63 (Clone Tea3/18) were added to 1.5 mL of AuNP suspension. After shaking for 1 h, 100 μL of blocking solution (1 mg/mL BSA in PBS 10 mM, pH 7.4) were added to block the residual surfaces of antibody-colloidal gold conjugated. After 20 min of reaction, the mixture was centrifuged at 6,800 g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2mM borate buffer pH 7.4 with 10% sucrose and 1% BSA. The product (AuNPs-anti-CD63 conjugate) was then stored at 4°C until used.

(B) Conjugation of AuNP with anti-CD9 monoclonal antibody (Clone VJ1/20) was carried out using 3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate] (DTSSP) as a bi-functional cross linker, adapted from a previously reported procedure (37). 10 μL of 1 mM DTSSP were added to 1.0 mL of AuNP and mixed for 30 minutes. The suspension was then centrifuged at 3,300 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2 mM borate buffer (pH 8.9). Then, 15 μg of anti-CD9 was added to the AuNP, shaken for 1.5 hours and the solution centrifuged at 6,800 g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2 mM borate buffer containing 1% BSA. The product (AuNPs-anti-CD9 conjugate) was then stored at 4°C until use.

Preparation of immunostrips

The LFIA was carried out in a dipstick format. The nitrocellulose membrane (25 mm-wide) was incorporated into the plastic backing to give robustness to the membrane. The test zone of the strip was prepared dispensing a desired volume of 1 mg/mL anti-tetraspanin and anti-IgG to form the test and control lines respectively with the dispenser IsoFlow onto NC membrane at a dispensing rate of 0.100 $\mu\text{L}/\text{mm}$ and was

dried for 20 min at 37°C. The sample pad and the absorbent pad were then settled onto the backing card with an overlap between them of around 2 mm. The complete strip was cut into individual 4 mm strips.

Lateral Flow immunoassay procedure

For dipstick analysis, purified exosomes samples prepared in running buffer were transferred into the microtube containing AuNPs-antibody conjugate and homogenized (final volume 100 μ L). The dipstick was added and the sample allowed to run for 15 min. The performance of the immunostrip relied on non-competitive assay formats. Exosomes in the sample were sandwiched between an anti-tetraspanin antibody immobilized on the strip (Test line, T) and the AuNP-conjugated antibody. The unbound AuNP-conjugates migrated further to be captured with the anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) for system functional verification (Figure 1).

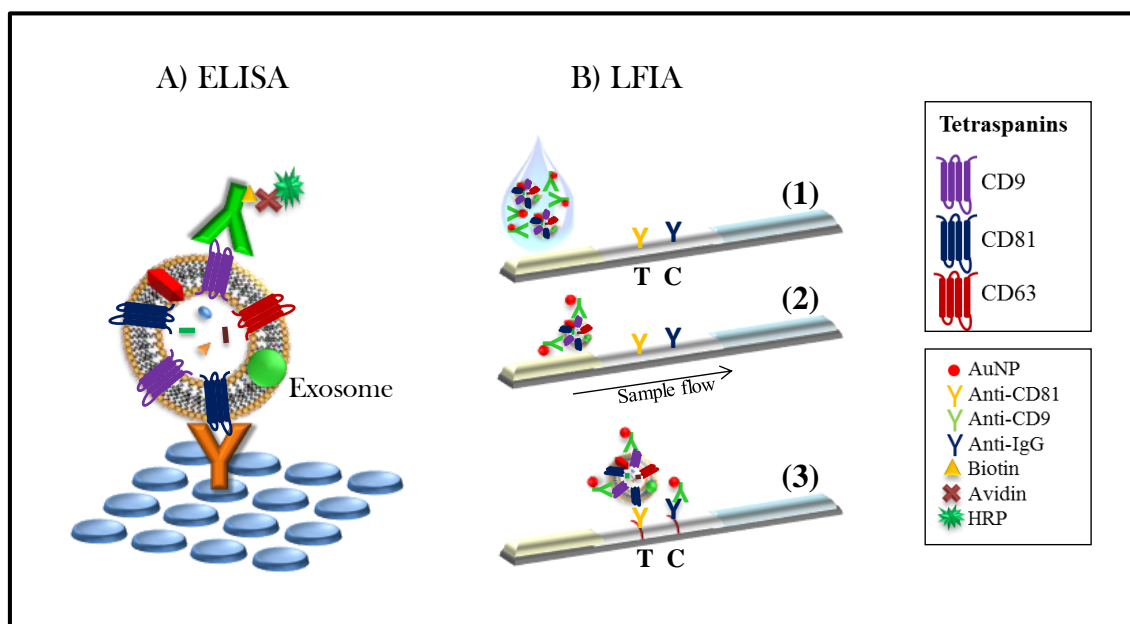


Figure 1. Schematic view of the experimental procedure for exosomes detection. A) Schematic representation of the ELISA set up for exosomes detection. Here, each reagent is added in sequential steps. **B) Schematic representation of the Lateral Flow Immunoassay Dipstick.** (1) Specific antibodies against tetraspanins (Test, T) and anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) are immobilized on the membrane. (2) Exosomes, if present in the sample, are detected by the detection probes (AuNP-conjugated antibodies). (3) The complexes flow and are captured onto the membrane by the immobilized antibodies.

RESULTS AND DISCUSSION

Exosome characterization

Exosomes purified from cell culture supernatants of the human melanoma cell line Ma-Mel-86c by sequential centrifugation were characterized for expression of different tetraspanins. Ma-Mel-86c exosomes were highly enriched in CD81 and CD9, but contained lower amounts of CD63 than whole cell lysates (Figure 2A). Visualization of the purified vesicles by TEM showed a round shape with a diameter ranging between 50-150 nm (Figure 2B). The average size recorded by dynamic light scattering (DLS) was 206 nm (PDI=0.290) for fresh samples and 177 nm (PDI=0.226) for lyophilized samples. The results showed a ζ -potential of -30 mV and -34 mV for fresh and lyophilized samples respectively, indicating that lyophilization did not cause exosome aggregation. Exosome size and stability during storage in fresh and lyophilized samples were analyzed, at 4°C and -20°C. The size of exosomes did not change during the first week of storage at 4°C in lyophilized samples but some aggregates appeared in fresh samples during that period of time (680 nm, PDI=0.587; ζ -potential: -12 mV) (Figure 2C). When samples were stored at -20°C, the exosomes remained stable for at least 9 months (data not shown). Both plasma and urine commercial exosomes were also analyzed by DLS (Figure S3).

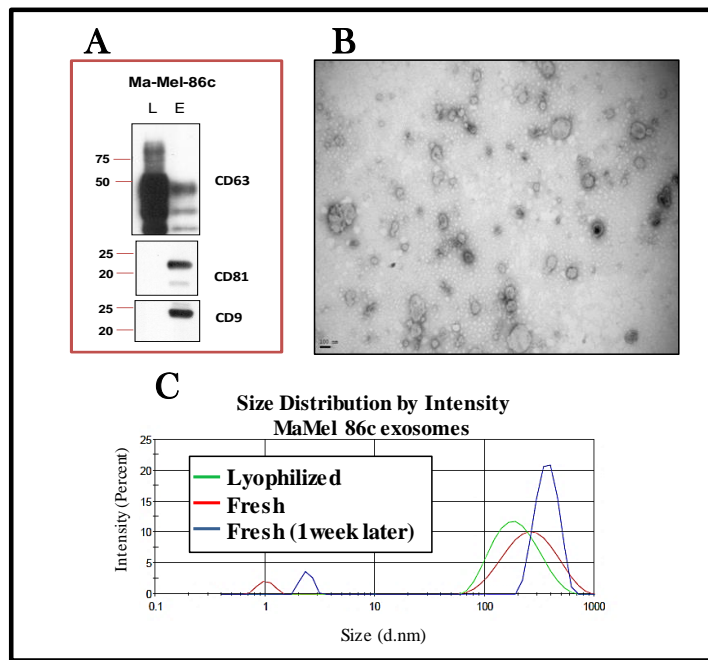


Figure 2. Metastatic melanoma exosome characterization. **A) Western Blot.** Ma-Mel-86c lysates (L) and exosomes (E) were prepared, run in SDS-PAGE and analysed by Western Blot using the indicated antibodies. **B) TEM image.** Exosomes from Ma-Mel-86c cells were negatively stained with 2% phosphotungstic acid and analyzed by electron microscopy. Bar: 100 nm. **C) Hydrodynamic size distribution profiles.** Lyophilized and fresh Ma-Mel-86c-derived exosomes (as indicated) were analysed in a Zetasizer for their size distribution. The graph shows one reading representative of three.

Exosomes detection by in house-ELISA

In order to test the availability of different tetraspanin epitopes simultaneously in the same sample of exosomes, several combinations of antibodies recognizing CD9, CD81 and CD63 were assayed in ELISA experiments with a constant concentration of exosomes derived from Ma-Mel-86c. Different concentrations of capture and detection antibodies were assessed and different wash and incubation buffers were also tested. Optimal results were obtained when the capture antibody was used at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 100mM sodium borate buffer, pH 9, while the exosomes were more stable in HEPES-buffered saline, both for washes and incubations. Different biotinylated antibody concentrations were also tested for detection. Biotinylated-anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (5A6) or anti-CD63 (Tea3/18) mAbs were compared as shown in Figure 3; the pair of antibodies that produced the best signal to noise ratio (sample/blank) was anti-CD81 as capture mAb and anti-CD9 (1:1000) for detection. Mixtures of several

antibodies against tetraspanins were tested as capture agents, but they did not improve the results obtained when anti-CD81 alone was used as capture antibody (data not shown).

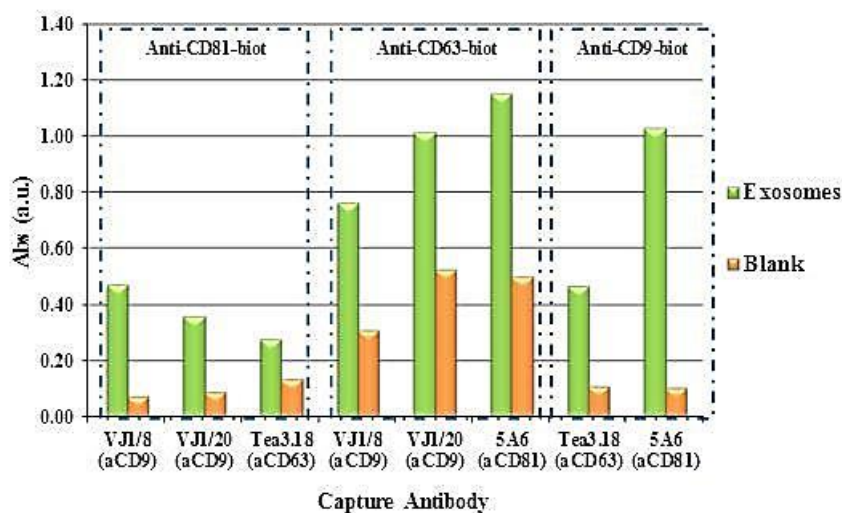


Figure 3. Comparison of exosome detection using different antibodies by ELISA. A constant concentration of Ma-Mel-86c-purified exosomes was used in ELISA experiments in which different combinations of capture and detection antibodies (indicated at the bottom and top of the figure respectively) were used. The concentrations used for the different capture (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and detection (anti-CD9 1:1000, anti-CD81 1:1000, anti-CD63 1:500) antibodies had been optimised in a different experiment. Blank wells had incubation with both capture and detection antibodies but not with exosome samples.

Different concentrations of exosomes purified from cell culture supernatants were tested using anti-CD81 capture antibody and biotinylated anti-CD9 detection antibody, showing a linear dose response in the range of 14 to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of exosomes (Figure 4).

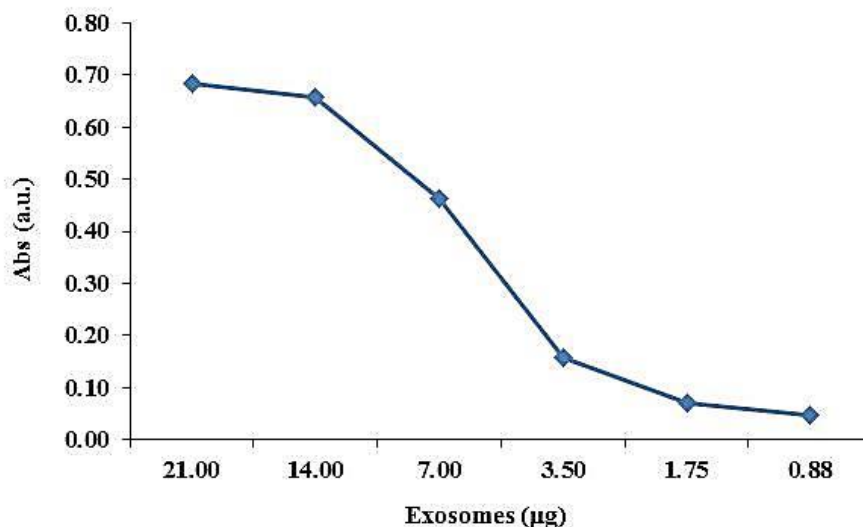


Figure 4. Titration of exosome detection by ELISA. Varying amounts of Ma-Mel-86c-derived exosomes were analysed by ELISA using anti-CD81 (5A6) as capture antibody and biotinylated-anti-CD9 (J1/20) as detection antibody. The data points are the average of two replicates.

Characterization of nanoparticle-mAb conjugates

Since the biotinylated anti-CD9 antibody (VJ1/20) was the most efficient detection antibody for exosomes in the ELISA experiments, this antibody was selected for detection for the lateral flow immunoassay. The protocol followed to conjugate the anti-CD9 antibody with AuNP is described in the Methods section.

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were carried out to confirm the conjugation reaction between the gold nanoparticles and the antibody. This technique allows monitoring the size variation of the nanoparticles after the conjugation reaction. The results show that the hydrodynamic size of the AuNP-anti-CD9 conjugate was 56 nm (PDI 0.172). To determine the stability of the conjugated antibody, ζ -potential measures were carried out. The results showed a ζ -potential of -17 mV for AuNP-anti-CD9, indicating that the conjugates had enough repulsion to keep the particles apart and, thus, were stable.

Lateral Flow immunoassay development

Initially, a LFIA system was developed following the optimal pattern obtained by ELISA. Thus, anti-CD81 monoclonal antibody (Clone 5A6) was dispensed onto the membrane as capture antibody and anti-CD9 monoclonal antibody (Clone VJ1/20) was conjugated with AuNP as detection probe. The system was tested with plasma exosomes and Ma-Mel-86c exosomes. Surprisingly, despite the ELISA results, this system was unable to detect exosomes isolated from melanoma cell culture supernatant. In contrast, exosomes isolated from human plasma could be detected with the naked eye at levels as low as 5 μg , by this LFIA system as shown in Figure 5.

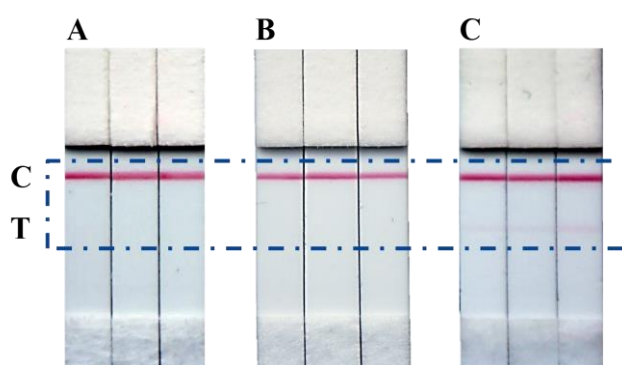


Figure 5. Photograph of the test strips of LFIA for melanoma cell culture supernatant and plasma exosomes using anti-CD81 as capture antibody and AuNP-anti-CD9 as detection probe. A) Blank: running buffer. B) Photograph of the strip after adding 20 μg of Ma-Mel-86c exosomes. C) Photograph of the strip corresponding to 5 μg of plasma exosomes (HBM).

Different competition events and steric effects may occur in ELISA and LFIA, that could explain this discrepancy. In ELISA, exosomes are captured by antibodies immobilized on a surface, so that epitopes on the opposite side of the exosome, would be available for binding with the detection antibody. In contrast, in LFIA, exosomes are first bound to the detection antibody, which is normally present in excess. This step occurs in the buffer solution, and therefore, the whole surface of the exosome is accessible to be covered by antibody. In the case of Ma-Mel-86c cells, exosomes are expected to be completely surrounded by antibody, since CD9 is especially abundant in these EVs (Figure 2A) and the CD81 capture antibody may not be able to access epitopes due to steric hindrance. In fact, when Ma-Mel-86c exosomes were present in

the assay, the intensity of the control line was in general lower than in the blank under the same conditions (Figure 5 A and B), suggesting that AuNP-CD9 had been depleted by an extensive binding to the exosome and, in consequence, there was less excess of antibody available to bind to the control line.

Therefore, the differences in protein composition, localization and density of tetraspanins at the exosome surface between these types of exosomes can markedly influence their detection in LFIA.

In view of these results, an alternative tetraspanin LFIA system was developed. ELISA data suggested that the antibody combination of anti-CD9 as capture and anti-CD63 as detection could also be functional, despite a higher background signal in ELISA (Figure 3). The conjugation of anti-CD63 antibody with AuNP was carried out following the protocol described in the Methods section, and the corresponding increase of hydrodynamic diameter over the naked AuNP and the absence of aggregates were checked by DLS. The results show that the hydrodynamic size of the AuNP-anti-CD63 was 64 nm (PDI=0.117), with a ζ -potential of -23 mV, suggesting that, as in the case of AuNP-anti-CD9, the complexes were stable.

This pair of antibodies (anti-CD9 as capture and anti-CD63 as detection) had a high background in the absence of exosomes, in ELISA, but not in the LFIA system. With this combination, we were able to detect exosomes from melanoma cell supernatants and human plasma (Figure 6 B and C). Moreover, this combination of anti-tetraspanin antibodies also allowed the detection of urine exosomes (Figure 6D), which have been reported to contain very small amounts of the tetraspanin CD81 (38). Exosome-depleted plasma was used as negative control (Figure 6E).

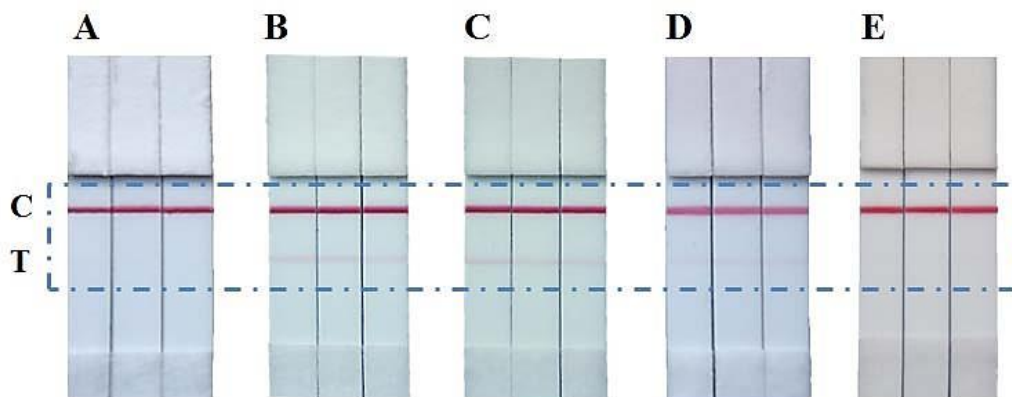


Figure 6. Photograph of the test strips of LFIA using anti-CD9 as capture antibody and AuNP-anti-CD63 as detection probe, corresponding to: A) Blank: running buffer. B) 20µg MaMel 86c exosomes. C) 20µg of plasma exosomes (HBM). D) 20µg of urine exosomes (HBM). E) Exosome-depleted plasma.

Given the recent discovery of EVs as potential biomarkers, convenient diagnosis devices need to be developed. The results shown in Figure 6 establish a proof-of-concept for the development of rapid tests for the detection of exosomes with clinical applications.

With the aim of giving an estimate of the analytical potential of these platforms, we have carried out a quantitation of how the increase of intensity at the test line varies with the concentration of exosomes. This correlation allows us to estimate the linear useful range and sensitivity of the measurements. Since most of the time the final end-user of the in-vitro test will not have information about the abundance of tetraspanin domains on the surface of the exosomes tested, the immunoassay was developed immobilising a mixture of anti-CD9 and anti-CD81 (1:1) at the test line, in order to ensure the capture at all the possible exosome sources, keeping AuNP-anti-CD63 as detection probe. This guarantees that our LFIA strip will be able to detect exomes purified from a wide range of fluids, although in the case of MaMel 86c exosomes this combination of mAbs in the test line did not show advantages against the use of anti-CD9 alone (Figure S4).

Once the test with exosomes purified from Ma-Mel-86c supernatants was run, the line intensities were recorded by scanning the images using a Lexmark 4800 scan and the optical density was measured using ImageJ 1.48v software. All the assays were

performed in triplicates and scanned in grey scale with a scan resolution of 2400ppp (Figure 7). The color of test lines displayed clear gradient according with the concentration of exosomes, although the test line started to saturate at quantities of 1.44×10^8 exosomes/ μL . Non-specific binding was not observed in absence of exosomes. The limit of detection (LOD), calculated from the calibration curve (the concentration corresponding to 3 times the standard deviation of the intercept) (39), was 8.54×10^5 exosomes/ μL .

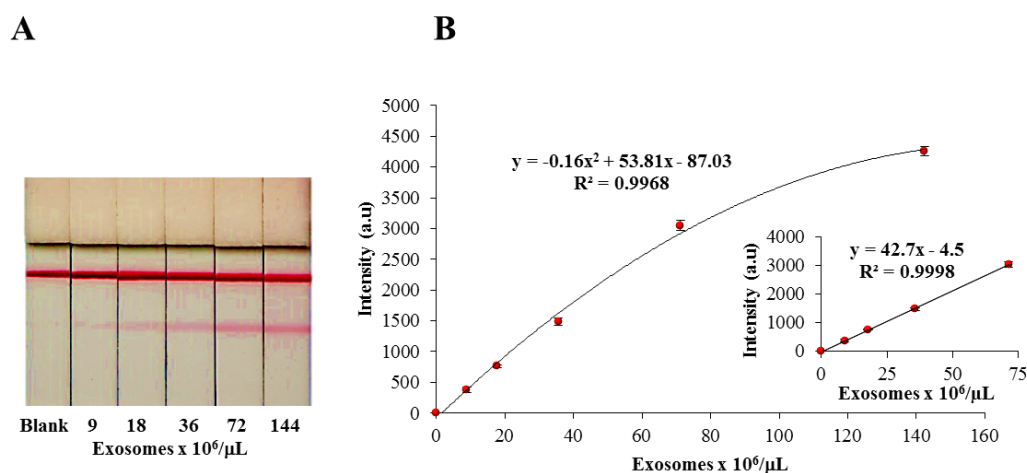


Figure 7. Effect of MaMel 86c purified exosomes concentration on the optical density by LFIA. A blend of anti-CD9 and anti-CD81 was used as capture antibodies and AuNP-anti-CD63 as detection probe. A) Representative example of results obtained in the strips. B) Calibration curve obtained at the LFIA device. The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate runs. Inset shows the expanded view of low concentration data and linear regression lines.

Our approach shows a positive correlation between concentration of exosomes purified from a melanoma culture and intensity of signal. Similar behavior is expected with exosomes from the commercial source or purified tissue fluid. Hence, up to our knowledge, this is the first time that such a novel method for the detection of exosomes had been developed (13,14). Although the analytical features described here lay the ground for the development of clinical applications at screening, diagnostics or prognostics, the aim of this manuscript was to introduce for the first time the use of LFIA to detect vesicles and more work should follow to improve the applications in a POC setting. In any case, in order to have a POC, clinically suited device, specific markers for specific diseases, when appropriately described, should also be included in

the LFIA device. It is possible that EVs will be associated in aggregates with proteins from the culture media or plasma materials (40), but in this work it has been proven that they can be captured by tetraspanins immobilized on nitrocellulose, as the sample solution flows through the strip, and the immunocomplex can be detected by means of another labelled tetraspanin.

CONCLUSIONS

In this study, we have described an in-house ELISA to detect exosomes purified from cell culture supernatants and developed several lateral flow immunoassay to detect exosomes from cell culture supernatants as well as for a commercial source of exosomes previously enriched from human plasma and urine. Here, we have presented a novel lateral flow with a wide range of applications. This assay has been applied for the detection of exosomes purified from a metastatic melanoma cell line, with a LOD of 8.54×10^5 exosomes/ μL . The assay is easy to conduct, including by unskilled operators, and the results can be checked in 15 minutes. This work was carried out taking into account the heterogeneous composition of exosomes, in order to achieve a universal wide-broad application LFIA system. With this aim, we have chosen to use a blend of anti-CD9 and anti-CD81 as capture antibodies to detect exosomes from different sources. However, we have shown too that a specialized LFIA for a specific exosome subpopulation could be developed. In this sense, strips with anti-CD9 alone as capture antibody and AuNP-anti-CD63 as detection probe lead to better results for Ma-Mel-86c melanoma cell lines.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. V. Horejsi and Dr. Sánchez-Madrid for the gift of antibodies; Dr. H. Peinado for the use of NanoSight; and the electron microscopy service at the CNB. Funding from projects CTQ2013-47396-R, SAF2012-32293,

SAF2014-58752-R, BFU2014-55478-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), FC15-GRUPIN14-022 (Regional Government of Asturias) and S2010/BMD-2326- INMUNOTHERCAN (Regional Government of Madrid) is acknowledged. M. Oliveira-Rodríguez thanks FICYT for her pre-doctoral grant.

REFERENCES

1. Gyorgy B, Szabo TG, Paszto M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68 (16): 2667-88. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.
2. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
3. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200 (4): 373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138.
4. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010; 73 (10): 1907-20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
5. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113 (8): E968-E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
6. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 2013; 32 (3-4): 623-42. doi: 10.1007/s10555-013-9441-9.
7. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2013; 7 (5): 769-78. doi: 10.2217/bmm.13.63.
8. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ, Integrated systems for exosome investigation. *Methods* 2015; 87: 31-45. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.015.
9. Santiago-Dieppa DR, Steinberg J, Gonda D, Cheung VJ, Carter BS, Chen CC. Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy' in glioblastoma patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14 (7): 819-25. doi: 10.1586/14737159.2014.943193.
10. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabro L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and

caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4 (4): e5219. doi: 10.1371/journal.pone.0005219.

11. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnicka-Worms D, Kalluri R. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523 (7559): 177-82. doi: 10.1038/nature14581.

12. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Tigges J, Toxavidis V, Ericsson M, Distel RJ, Ivanov AR, Skog J, Kuo WP. Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol* 2012; 3: 354. doi: 10.3389/fphys.2012.00354.

13. Sunkara V, Woo HK, Cho YK. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst* 2016;141(2): 371-81. doi: 10.1039/c5an01775k.

14. Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst* 2016;141(2): 450-60. doi: 10.1039/c5an01610j.

15. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck, AE, Trachtenberg AJ, Soria CE, Oquin S, Bonebreak CM, Saracoglu E, Skog J, Kuo WP. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* 2013; 394 (10): 1253-62. doi: 10.1515/hsz-2013-0141.

16. Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, Carter BS, Breakefield XO, Toner M, Irimia D. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 2010; 10 (4): 505-11. doi: 10.1039/b916199f.

17. Davies RT, Kim J, Jang SC, Choi EJ., Gho YS, Park J. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip* 2012; 12 (24): 5202-10. doi: 10.1039/c2lc41006k.

18. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, Zocco D, Lari E, Radano G, Muhhina J, Fondelli C, Gavrilova J, Chiesi A. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* 2015; 87: 46-58. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.05.028.

19. Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, Nakagawa H. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 2014; 4: 6232. doi: 10.1038/srep06232.

20. He M, Crow J, Roth M, Zeng Y, Godwin AK. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab Chip* 2014; 14 (19): 3773-80.

21. Vaidyanathan R, Naghibosadat M, Rauf S, Korbie D, Carrascosa LG, Shiddiky MJ, Trau M. Detecting exosomes specifically: a multiplexed device based on alternating current electrohydrodynamic induced nanoshearing. *Anal Chem* 2014; 86 (22): 11125-32. doi: 10.1021/ac502082b.

22. Chen C, Lin BR, Hsu MY, Cheng CM. Paper-based devices for isolation and characterization of extracellular vesicles. *J Vis Exp* 2015; (98): e52722. doi: 10.3791/52722.
23. Issadore D, Min C, Liong M, Chung J, Weissleder R, Lee H. Miniature magnetic resonance system for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip* 2011; 11(13): 2282-2287. doi: 10.1039/c1lc20177h.
24. Im H, Shao H, Park YI, Peterson VM, Castro CM, Weissleder R, Lee H. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5):490-5. doi: 10.1038/nbt.2886.
25. Jeong S, Park J, Pathania D, Castro CM, Weissleder R, Lee H. Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano* 2016; 10(2):1802-9. doi: 10.1021/acsnano.5b07584.
26. Gordon J, Michel G. Analytical sensitivity limits for lateral flow immunoassays. *Clin Chem* 2008; 54 (7): 1250-1. doi: 10.1373/clinchem.2007.102491.
27. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393 (2): 569-82. doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.
28. Wang DB, Tian B, Zhang ZP, Deng JY, Cui ZQ, Yang RF, Wang XY, Wei HP, Zhang XE. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detection system. *Biosens Bioelectron* 2013; 42: 661–7. doi: 10.1016/j.bios.2012.10.088.
29. Zhang L, Huang Y, Wang J, Rong Y, Lai W, Zhang J, Chen T. Hierarchical Flowerlike Gold Nanoparticles Labeled Immunochromatography Test Strip for Highly Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Langmuir* 2015; 31: 5537-44. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00592.
30. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014, 5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442
31. Zhao F, Sucker A, Horn S, Heeke C, Bielefeld N, Schrörs B, Bicker A, Lindemann M, Roesch A, Gaudernack G, Stiller M, Becker JC, Lennerz V, Wölfel T, Schadendorf D, Griewank K, Paschen A. Melanoma lesions independently acquire T-cell resistance during metastatic latency. *Cancer Res.* 2016 Jun 3. pii: canres.0008.2016. [Epub ahead of print]
32. Gordón-Alonso M, Yáñez-Mó M, Barreiro O, Álvarez S, Muñoz-Fernández MA, Valenzuela-Fernández A, Sánchez-Madrid F. Tetraspanins CD9 and CD81 Modulate HIV-1-Induced Membrane Fusion. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 5129-5137. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5129.
33. Yanez-Mo M, Tejedor R, Rousselle P, Sanchez-Madrid F. Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins. *J Cell Science* 2001; 114: 577-87. PubMed 11171326.

34. Peñas PF, García-Díez A, Sánchez-Madrid F, Yáñez-Mó M. Tetraspanins are Localized at Motility-Related Structures and Involved in Normal Human Keratinocyte Wound Healing Migration. *J of Invest Dermatol* 2000; 114: 1126–35. PMID: 10844555.
35. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 2010; 70(2): 481-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1688.
36. Thobhani S, Attree S, Boyd R, Kumarswami N, Noble J, Szymanski M, Porter RA. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J Immunol Methods* 2010; 356 (1-2): 60-9. doi: 10.1016/j.jim.2010.02.007.
37. Driskell JD, Jones CA, Tompkins SM, Tripp RA. One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles. *Analyst* 2011; 136 (15): 3083-90. doi: 10.1039/c1an15303j.
38. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Armengo MP, Menezes-Neto A, Del Portillo HA, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracel Vesicles* 2015; 4, 27369, doi: 10.3402/jev.v4.27369.
39. Miller N, Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* Pearson Education Limited, 2000. p. 121-23.
40. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlág B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás E, “Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection” *Sci Rep*. 2016, 18;6:24316. doi: 10.1038/srep24316.

Supporting information

for

Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body-Fluids

Myriam Oliveira-Rodríguez¹, Sheila López-Cobo², Hugh T. Reyburn², Agustín Costa García¹, Soraya López Martín³, María Yáñez Mo^{3,4}, Eva Cernuda-Morollón⁵, Annette Paschen⁶, Mar Valés-Gómez², M.C. Blanco-López^{1*}

¹*Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

²*Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC, Darwin, 3, Madrid, Spain*

³*Unidad de Investigación, Hospital St Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IS-IP), Madrid, Spain*

⁴*Departamento de Biología Molecular, UAM/IIS-IP, Madrid, Spain*

⁵*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain*

⁶ *Department of Dermatology, University Hospital Essen, University Duisburg-Essen, Essen, Germany.*

Table of contents

- 1. Figure S1:** FACS analysis of commercial exosomes.
- 2. Figure S2:** Western Blot analysis of commercial exosomes.
- 3. Figure S3:** Hydrodynamic size distribution profiles of different exosomes used.
- 4. Figure S4.** Comparison of capture antibodies by LFIA.

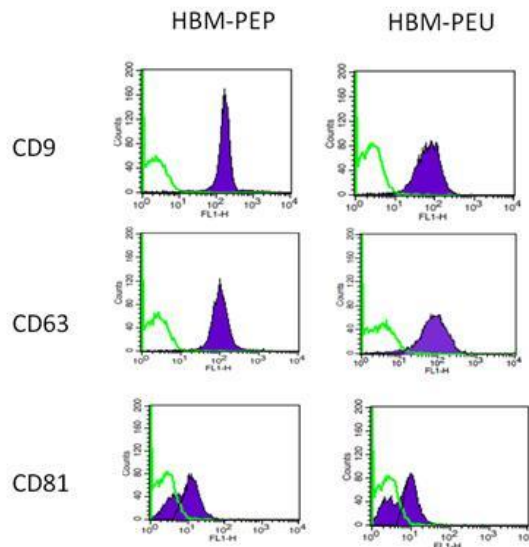


Figure S1. FACS analysis of CD9, CD63 and CD81 expression on plasma (HBM-PEP) and urine (HBM-PEU) purified exosomes. Green line, isotype control. Purple line, the indicated antibody.

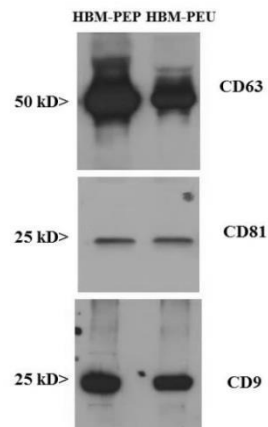


Figure S2. Western Blot analysis of CD63, CD81 and CD9 expression on 20 µg of exosomes purified from plasma (HBM-PEP) and urine (HBM-PEU) using respectively antibodies anti-CD63, anti-CD81 and anti-CD9 (HansaBioMed, Tallinn, Estonia).

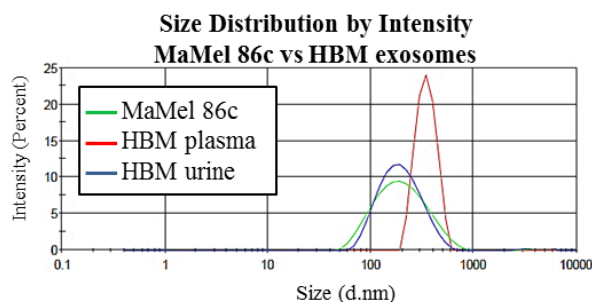


Figure S3. Hydrodynamic size distribution profiles of different types of exosomes (Ma-Mel- 86c, plasma and urine exosomes from healthy donors). The graph shows one reading representative of three. Data shown an average size of 311 nm (PDI=0.072) and 174 nm (PDI=0.270) for exosomes purified from plasma and urine of healthy donors (HBM), respectively.

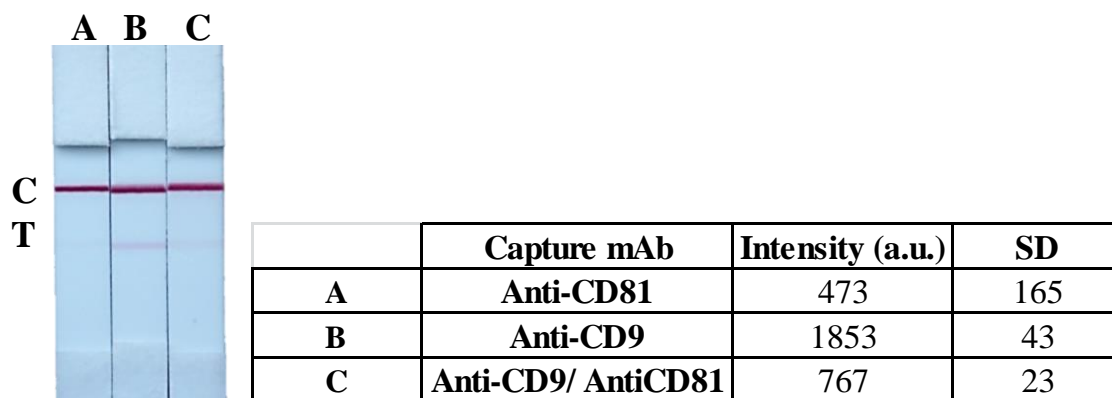
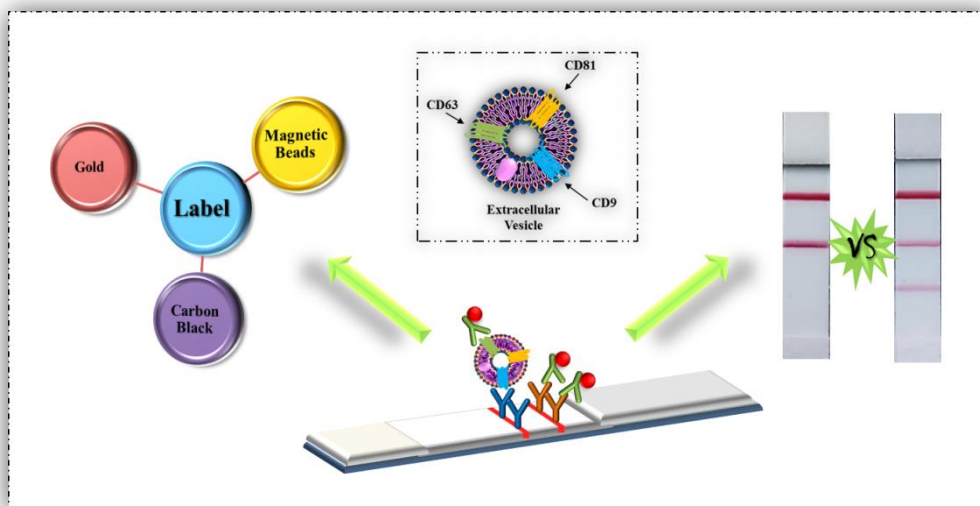


Figure S4. Comparison of capture antibodies by LFIA using 1.78×10^7 exosomes/ μL of the melanoma cell line Ma-Mel-86c. All the assays were performed in triplicate and were scanned in grey scale and optical densities measured using ImageJ 1.48v software. Capture mAb: A) Anti-CD81. B) Anti-CD9. C) Blend of anti-CD9 and anti-CD81. Mixtures of antibodies in the test line did not improve the results obtained when anti-CD9 alone was used as capture antibody.

3.4.4. Artículo 6: “Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection”

Biosensors and Bioelectronics 87(2017) 38–45





Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection

Myriam Oliveira-Rodríguez¹, Esther Serrano-Pertierra², Agustín Costa García¹, Soraya López Martín³, María Yáñez Mo^{3,4}, Eva Cernuda-Morollón⁵, M.C. Blanco-López^{1*}

¹*Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

²*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain*

³*Unidad de Investigación, Hospital St Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IS-IP), Madrid, Spain*

⁴*Departamento de Biología Molecular, UAM/ CBM-SO, Madrid, Spain*

⁵*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain*

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-bound nanovesicles delivered by different cellular lineages under physiological and pathological conditions. Although these vesicles have shown relevance as biomarkers for a number of diseases, their isolation and detection still has several technical drawbacks, mainly related with problems of sensitivity and time-consumed. Here, we reported a rapid and multiple-targeted lateral flow immunoassay (LFIA) system for the detection of EVs isolated from human plasma. A range of different labels (colloidal gold, carbon black and magnetic nanoparticles) was compared as detection probe in LFIA, being gold nanoparticles that showed better results. Using this platform, we demonstrated that improvements may be carried out by incorporating additional capture lines with different antibodies. The

device exhibited a limit of detection (LOD) of 3.4×10^6 EVs/ μ L when anti-CD81 and anti-CD9 were selected as capture antibodies in a multiple-targeted format, and anti-CD63 labeled with gold nanoparticles was used as detection probe. This LFIA, coupled to EVs isolation kits, could become a rapid and useful tool for the point-of-care detection of EVs, with a total analysis time of two hours.

KEYWORDS: Extracellular Vesicles, Lateral Flow Immunoassay, Point-of-Care, Nanoparticles, Multiple-targeted detection

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are considered to be important mediators in intercellular communication. They are delivered by different cell types under physiological and pathological conditions and can be found in different biological fluids (Yáñez-Mó et al., 2015). According to their size, composition, or origin EVs are generally referred to microvesicles (MV, in the range of 1000 nm) and exosomes (40-150 nm) (They et al., 2002; Gyorgy et al., 2011). As current purification methods do not fully discriminate between microvesicles and exosomes, the general term EVs will be used here to refer to the circulating vesicles isolated from biological fluids different from apoptotic bodies. It has been shown that the concentration and composition of EVs is altered in a number of diseases (Melo et al., 2015; Zhang et al., 2015), including vascular disorders (Belting and Christianson, 2015), neurodegenerative diseases (Russo et al., 2012), and cancer (Azmi et al., 2013). Thus, EVs show a great potential for their use as a noninvasive biomedical tool, serving as biomarkers for diagnostic, prognosis and monitoring response to treatment in certain diseases (Properzi et al., 2013; De Toro et al., 2015). This aspect has triggered recent researches on the development of portable analytical platforms (Vaidyanathan et al., 2014; Jeong et al., 2016). Two major challenges for the detection of EVs are the achievement of short real-time detection and sensitivity in bioanalysis. To reduce the time required for target detection, a minimal amount of sample manipulation is essential. Although ultracentrifugation (UC) is generally regarded as the “gold standard”, for isolating EVs, it is time-consuming, requires special equipment and some studies from the literature have demonstrate inconsistencies in reproducibility and low recoveries. Besides UC, other methods such as ultrafiltration, antibody-coated magnetic beads and polymer-based precipitation have been used. Precipitation reagents, which are commercially available, reduce hands-on time and the requirements for specialized expensive equipment (Sunkara et al., 2016). In addition, it has been reported that this method provides a higher yield compared to other isolation methods (Caradec et al., 2014). Challenges exist not only in the isolation, but also in the detection of EVs. Immunochromatographic assay, also called lateral flow immunoassay (LFIA), is a powerful tool for rapid and low-cost on-site detection of biomolecules (Posthuma-Trumpie et al., 2009). The overall format of LFIA uses the same rationale than ELISA, where immobilized capture antibody or antigen is bound onto a solid phase nitrocellulose membrane instead of a plastic well. The advantage here is the fact that the

entire test can be done in one-step and in a few minutes, unlike the procedure involved at the multiple-step ELISA (Eltzov et al., 2015). The sensitivity of the detection method has to be high enough to eliminate the need for target amplification and enrichment steps, while being able to accurately discriminate between healthy individuals and patients. However, even though LFIA has been successfully applied to numerous systems, it shows limitations in high sensitivity applications (Linares et al., 2012). Thus, great efforts have been made to improve the performance of LFIA using different labels. The choice of the optimal label (e.g. gold nanoparticles, colored latex beads, magnetic particles, carbon nanoparticles, quantum dots, organic fluorophores, enzymes, liposomes, etc.) in the LFIA development process is critical. Therefore, a comparison of the performance and sensitivities of different labels could be used to significantly optimize the detection limit of the end product. Easy conjugation with biomolecules, stability over longer period of time and easy visualization are desirable features for a good label. Markers which give direct signal are preferable in LFIA because of less time consumption and reduced procedure (Eltzov et al., 2015; Huang et al., 2016).

Currently, the most commonly used particulate detector reagents in lateral flow systems are colloidal gold (AuNPs) and monodisperse latex. In naked-eye assays, it is often possible to increase sensitivity using AuNPs rather than colored latex particles, because of their optical properties and the smaller size of the AuNPs (typically in the range of 20-40 nm) a higher packing density can be achieved on a test line (O'Farrell, 2009). Additionally, the optical signal obtained from AuNPs can be amplified by deposition of silver, AuNPs and enzymes (Gao et al., 2016; Rodríguez et al., 2016). Despite of these characteristics, in a comparison study performed by Linares et al. (Linares et al., 2012) for sensitivities of labels commonly used in LFIA, carbon nanoparticles were ranked above AuNPs and latex beads, exhibiting a limit of detection ten times lower.

Carbon nanoparticles, also known as carbon black (CB), are strongly dark colored nanoparticles that exhibit a high signal-to-noise ratio (black signal on a white background), a factor which helps to obtain good parameters of sensitivity, working range and limit of detection. The sensitivity of LFIA employing carbon black is reported to be comparable to ELISA. Other advantages attributed to carbon nanoparticles are the very low cost of the starting material, the ease of preparation, and the stability of the conjugates (Posthuman-Trumpie et al., 2012; Quesada-Gonzalez et al., 2015; Sajid et al., 2015).

Most LFIA tests using these labels are qualitative by visual interpretation, and only nanoparticles on the top of the membrane contribute significantly to the signal. Consequently, the signal generated beneath the surface is inevitably missed, making them less sensitive. Magnetic nanoparticles (MNPs), as previously mentioned, can be used as labels on LFIA due to their brown color (Liu et al., 2011; Quesada-Gonzalez et al., 2015). This color produced at the test line can be measured by an optical strip reader, but also the magnetic signals coming from MNPs within the entire volume of membrane could be detected and recorded with a magnetic flow reader (Wang et al., 2009). In addition, MNPs are suitable to achieve preconcentration and purification of the analyte in a sample by means of magnetic separation, which is useful to enhance markedly the sensitivity (Lei and Ju, 2013). Despite these advantages, it is known that signal intensities are usually related to the size of the MNPs, i.e., the larger the MNPs, the higher the responses. Thus, even though nitrocellulose membranes contain pores with widths in the range of micrometers, the biggest MNPs, combined with large analytes such as spores, bacteria or EVs, could block the pores, obstructing the flow of the conjugates across the membrane (Quesada-Gonzalez et al., 2015).

We have previously demonstrated the potential of LFIA for detection of EVs using AuNP (Oliveira-Rodríguez et al., 2016). However, in the light that the label optimization could yield the sensitivity necessary to be used as a diagnostic tool, herein we evaluated the use of three different labels: gold nanoparticles (AuNPs), carbon black (CB) and magnetic nanoparticles (MNPs). Furthermore, since EVs are highly heterogeneous so that they express different set of proteins on the surface, the use of more than one test line immobilizing different antibodies may allow multiple-targeted detection and consequently increase number of binding sites. Thus, once established the optimal label, the sensitivity of multiple-targeted detection was compared to that obtained from the conventional LFIA based on single-targeted detection.

2. Material and Methods

2.1. Reagents and equipment

Anti-tetraspanin antibodies in this study have been previously characterized: anti-CD9 VJ1/20 (Yanez-Mo et al., 2001); anti-CD63 Tea3/18 (Peñas et al., 2000). Anti-CD81 5A6 was provided by Dr. S. Levy (Oncology, Stanford University School of Medicine,

Stanford, CA). Anti-mouse IgG was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). 40-nm gold nanoparticles (AuNP) were purchased from BBIInternational (UK). Carbon Black (Special Black 4 Powder) was acquired from Orion Engineered Carbons GmbH (Germany). Magnetic beads of 100-nm with a magnetite core and polyacrylic acid coating were purchased from Chemicell GmbH (fluidMAG-PAS, Germany). Bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich. Other reagents used in this study were of analytical grade. Nitrocellulose membranes (HF07504XSS) and glass fiber sample pads (GF001000) were purchased from Millipore, Germany. Other materials used were: backing cards (KN-V1080, Kenoshatapes, Netherlands) and absorbent pads (Whatman, USA).

An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection lines (dispense rate 0.100 $\mu\text{L}/\text{mm}$) and the strips were cut with a guillotine Fellowes Gamma (Spain). A portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used to quantify the intensity of the test line by reflectance measurements.

2.2. Enrichment of extracellular vesicles from human plasma

All plasma collection and preparation protocols were approved by the Ethics Research Committee of the Hospital Universitario Central Asturias (Oviedo, Spain). 4.5 mL of blood were obtained from healthy volunteers in sodium citrate vacutainer™ tubes. Whole blood was then centrifuged at 1,550 g and subsequently at 3,200 g for 30 mins to separate platelet free plasma.

EV-enriched fractions from 320 μL of plasma were isolated by ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution according to the manufacturer's instructions (System Biosciences Inc., Mountain View, CA, USA). The EVs pellet was resuspended in HEPES 10 mM, pH 7.4.

To determine the size distribution and concentration of the plasma-derived EVs, NanoSight LM10 instrument (Malvern, Worcestershire, UK) and NTA 3.1 analytical software were used. Samples were diluted 1:5000 in HEPES to achieve measured particle concentration 10^6 to $10^9/\text{mL}$. A total of three readings were performed. The experiments were carried out at Nanovex Biotechnologies S.L. (Spain).

2.3. Nanoparticle-antibody conjugation protocols

Gold nanoparticles

In order to find the desirable concentration of the antibody to stabilize the gold nanoparticles, a gold colloid titration procedure was followed (Thobhani et al., 2010). 100 μL of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD63 (Clone Tea 3/18) were added to 1.5 mL of AuNP suspension. After shaking for 1h, 100 μL of blocking solution (1 mg/mL BSA in PBS 10mM, pH 7.4) were added to block the residual surfaces of antibody-colloidal gold conjugated. After 20 mins of reaction, the mixture was centrifuged at 6,800 g for 20 mins. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2mM borate buffer pH 7.4 with 10% sucrose and 1% BSA. The product (AuNPs-anti-CD63 conjugate) was then stored at 4°C until used.

Carbon Black

The conjugation of carbon nanoparticles (CB) with anti-CD63 (Clone Tea 3/18) was carried out according to the literature with some variations (O’Keeffe et al., 2003). 30 mg of carbon were suspended in 3 mL of MilliQ water and sonicated on ice for 10 mins using a Optic Ivymen System CY-500 Ultrasonic (40% amplitude, 20 kHz). The resulting 1% (w/v) carbon suspension was five-fold diluted in 5 mM borate buffer pH 8.8 and sonicated for 5 mins. Next, 87.5 μg of anti-CD63 was added to 250 μL of the diluted carbon suspension and stirred for 3 hs at room temperature. After incubation, the solution was washed three times with 5mM borate buffer pH 8.8, 1% BSA by centrifugation at 13,000 g for 15 mins. After the final wash, the pellet was resuspended in 500 μL of 100 mM borate buffer pH 8.8 with 1% BSA and stored at 4 °C until use (CB-anti-CD63 conjugate).

Magnetic beads

Magnetic nanoparticles (MNPs) were coupled with anti-CD63 (Clone Tea 3/18) following the instructions provide by the manufacturer. Briefly, the MNPs (160 μL) were activated with EDC and incubated for 10 mins at room temperature with gentle stirring. Then, 20 μg of anti-CD63 (Clone Tea 3/18) were added to the mixture and incubated for 2 hs at room temperature with shaking. 1% BSA in 10 mM PBS pH 7.4 (200 μL) was used to block the surface residues on the MNPs for 1 h at room temperature. The MNPs-anti-CD63 conjugates were isolated using a magnet and

washed twice with PBS. After the final wash, the conjugate was dispersed in storage buffer consisting in PBS with 1% BSA.

2.4. Characterization of nanoparticles conjugates by dynamic light scattering (DLS)

Size distribution and ζ -potential assays were carried out with a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He–Ne laser ($\lambda=633$) for monitoring the conjugation process. A total of three readings were performed at 25°C. Each reading was composed of 15 measurements of the backscattering (173°) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis.

2.5. Preparation of immunostrip

The LFIA was carried out in a dipstick format. The nitrocellulose membrane (25 mm-wide) was incorporated into the plastic backing to give robustness to the membrane. The test zone of the strip was prepared dispensing a desired volume of 1 mg/mL anti-tetraspanin and anti-IgG (dispensing rate of 0.100 $\mu\text{L}/\text{mm}$) to form the test and control lines respectively with the IsoFlow dispenser onto NC membrane and was dried for 20 mins at 37°C. The sample pad and the absorbent pad were then settled onto the backing card with an overlap between them of around 2 mm. The complete strip was cut into individual 4 mm strips. Once the test was run, the signal intensity was measured as reflectance in the ESE Quant LR3 lateral flow strip reader.

2.6. Lateral Flow immunoassay procedure

For dipstick analysis, EVs samples diluted in the running buffer were transferred into the microtube containing the label-antibody conjugate (10 μL AuNPs-anti-CD63, 1 μL CB-anti-CD63 or 5 μL MNPs-anti-CD63, respectively) and homogenized (final volume 100 μL). The dipstick was added and the sample allowed to run for 15 mins. The performance of the immunostrip relied on a non-competitive assay format (Figure 1). The recognition label reacts with the EVs to form a label-EV complex, and then the complex is captured in the test zone via interactions between the analyte and the corresponding capturing antibody immobilized on the strip (Test line, T). The free conjugate labels exceeding the test zone are then captured by the anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) for functional verification of the system.

3. Results and discussion

3.1. Extracellular vesicles characterization

NanoSight LM10 instrument was used to determine the size distribution and concentration of the plasma purified EVs. For the three samples tested, the number of EVs ranged from $6.85\text{-}7.35 \times 10^9$ particles/ μL . The size average of the EVs from nanoparticle tracking analysis was 150 nm (Figure S1).

3.2. Antibody selection for lateral flow immunoassay

To optimize a LFIA for detection of EVs, the first approach is to select the capture and detection antibodies. Although the EVs protein composition varies with the cell and the tissue of origin, one of the most abundant protein families that are found on EVs comprises the tetraspanins, including CD9, CD63 and CD81 (Andreu and Yañez-Mo, 2014). The method chosen for selecting and screening antibodies was an ELISA test reported in a previous work (Oliveira-Rodríguez et al., 2016). Thus, we utilized anti-CD9 as an EV-capture antibody when single-targeted LFIA was carried out and both anti-CD9 and anti-CD81 for multiple-targeted detection. Anti-CD63 was selected as detection antibody and therefore, conjugated to the different labels (Figure 1).

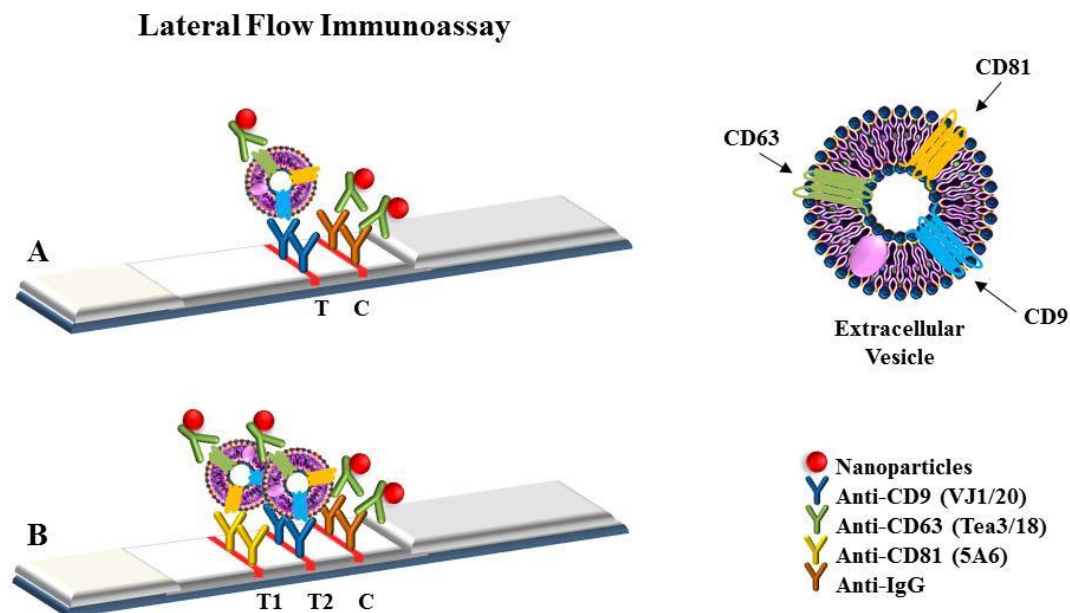


Fig. 1. Simplified schematic representation of the Lateral Flow Immunoassay Dipstick. (A) Specific antibodies against tetraspanin CD9 (Test, T) and anti-mouse immunoglobulin antibodies (Control, C) are immobilized on the membrane. Extracellular vesicles, if present in the sample, are detected by the detection probes (AuNPs-anti-CD63, CB-anti-CD63, MNPs-anti-CD63). (B) Multi-targeted LFIA. Two specific antibodies against tetraspanins are immobilized on the membrane (anti-CD81, T1; anti-CD9, T2). The complex composition of the extracellular domains vesicles is simplified by representing only one of each type of the most abundant membrane domains.

3.3. Characterization of nanoparticles conjugates

The conjugation of the particulate labels with anti-CD63 was monitored by measuring the hydrodynamic particle sizes and surface charges with DLS. The results showed that the hydrodynamic sizes of the conjugates were 64 nm (PDI 0.140), 153 nm (PDI 0.081), and 129 nm (PDI 0.165) for AuNPs-anti-CD63, CB-anti-CD63 and MNPs-anti-CD63, respectively (Figure 2). To determine their stability, ζ -potential measurements were carried out. The ζ -potential of -23, -34 and -25 mV for AuNPs-anti-CD63, CB-anti-CD63 and MNPs-anti-CD63, respectively, indicated that the conjugates had enough repulsion to keep the particles apart and therefore to be stable in the colloidal suspension.

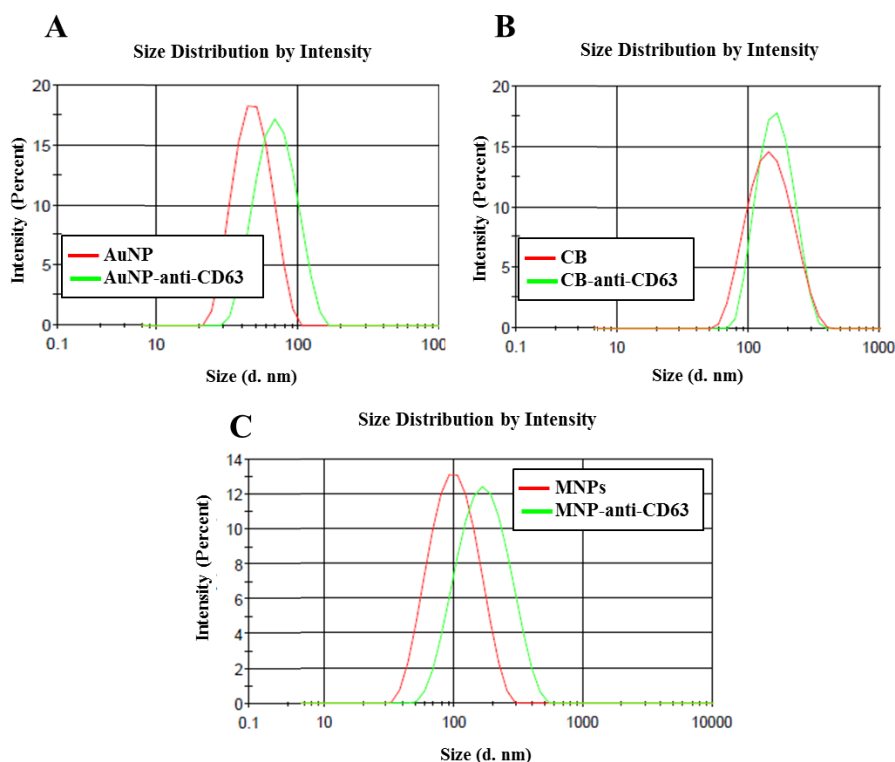


Fig. 2. Hydrodynamic size distribution profiles of different labels before and after the conjugation with anti-CD63 antibody. (A) Gold nanoparticles. (B) Carbon Black. (C) Magnetic Nanoparticles.

3.4. Lateral Flow immunoassay development and labels comparison

The first set of experiments was designed to compare the analytical potential of these three labels, AuNPs, CB and MNPs, in terms of linear useful range and sensitivity of the measurements. Before performing the test, an optimization of the running buffer was necessary in order to minimize any non-specific binding between probed particles and assay materials without compromising the signal intensities. In both AuNPs and CB

the best running buffer consisted of 10 mM HEPES pH 7.4 with 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 and 1% BSA. In the case of MNPs, 3% BSA was necessary in order to avoid unspecific binding of the particles to the test line when EVs were not present in the sample. Analytical sensitivities with each detection probe were compared by analyzing dose-response curves with increasing concentrations of EVs in the sample. EV-depleted plasma, obtained as the plasma supernatant after ExoQuick precipitation, was used as negative control. The total time required for the tests was 15 minutes. Line intensities were recorded by a reflectance reader for LFIA (Figure 3). The LOD values for the labeling reagents tested, calculated from the calibration curve (the concentration corresponding to 3 times the standard deviation of the interception divided by the slope (Miller and Miller, 2005)), are summarized in Table 1. Although some studies have demonstrated that polymer-based precipitation methods can co-isolate non-vesicular contaminants and that the presence of the polymer material may not be compatible with down-stream analysis (Taylor and Shah, 2015), the ExoQuick™ reagent used here allowed the flow of the sample through the nitrocellulose membrane and the detection of EVs in the LFIA platform.

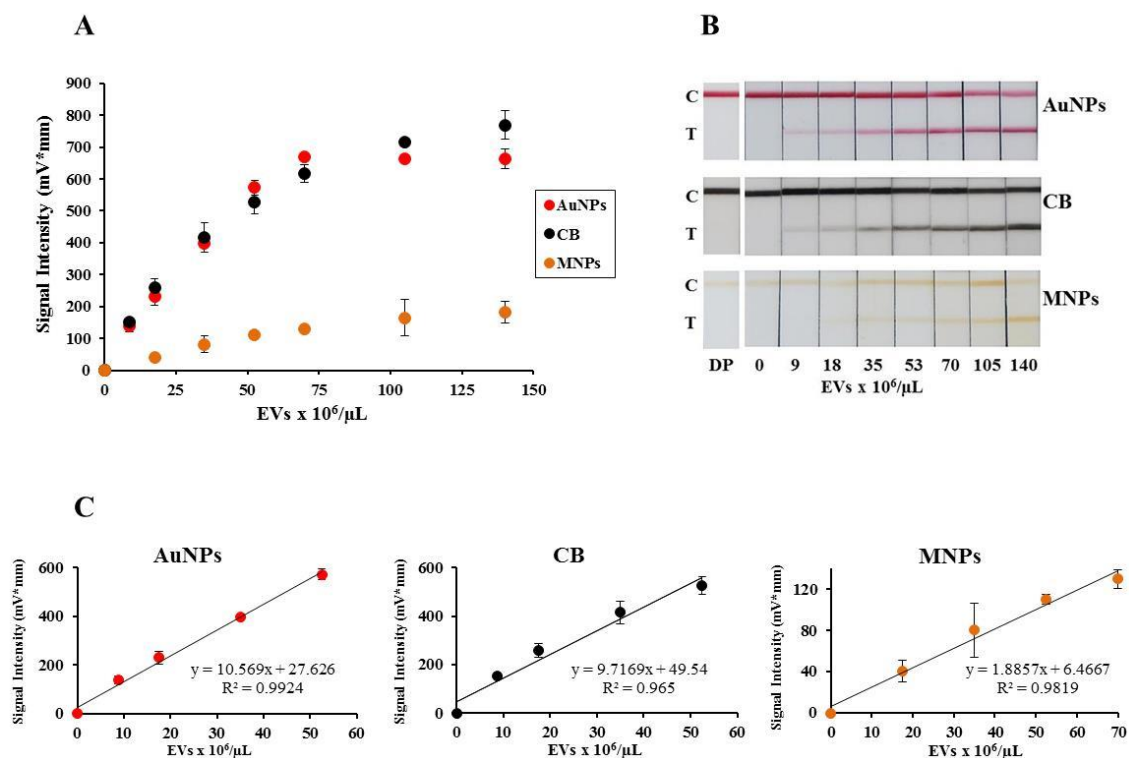


Fig. 3. Detection of different concentrations of plasma purified extracellular vesicles (EVs) by LFIA and using anti-CD9 and anti-CD63 as capture and detection antibodies respectively. (A) Calibration curve obtained at the LFIA strip reader. The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate runs (B) Representative example of results obtained in the strips. DP: depleted-plasma (C). Expanded view of low concentration data and linear regression lines. From left to right: AuNPs, CB and MNPs. The reproducibility of responses ($n=3$) in the linear range was also studied, and relative standard deviations (RSD) of 2-12% for AuNPs and CB, and 5-33% for MNPs were obtained.

	Slope (EVs/μL)	LOD (EVs/μL)	Regression Coefficient R ²
AuNPs	$1,1 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^6$	0,992
CB	$9,7 \times 10^{-6}$	$9,2 \times 10^6$	0,965
MNPs	$1,9 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^7$	0,982

Table 1. Comparison of the different LODs obtained with the LFIA using different labels: AuNPs, CB and MNPs.

As shown in Figure 3, no visual test line was observed on the test zone in the negative control (DP) or in sample solutions without EVs with any of the nanoparticles. In all the cases, the test line intensity correlated with the concentration of EV up to saturation. The lowest visually detectable concentration, by naked-eye, was 9×10^6 EVs/μL for

AuNPs and CB. However, with MNPs this low concentration could not be detected either visually or with the strip reflectance reader. The intensities recorded for these particles in the range of the concentrations studied were much lower than those for AuNPs and CB, perhaps due to the weak color produced in the test line, which gave lower contrast with the white membrane. Moreover, as previously described Wang et al. (Wang et al., 2015), MNPs of this size form a retention-like line with large analytes just at the end of the sample pad during the test, especially when more than one epitope on the surface is recognized by the detection probe. This effect was observed here and it increased with the concentration of EVs (Figure 4). For these reasons, MNPs were discarded as labels for the detection of EVs and therefore, AuNPs and CB were compared with the aim of optimizing the sensitivity of this rapid test.

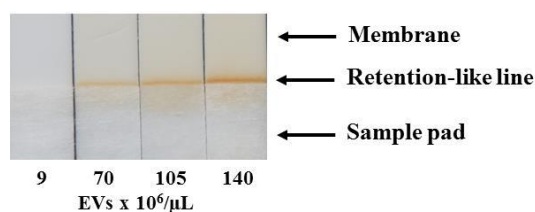


Fig. 4. Retention-like line produced in the LFIA for the detection of extracellular vesicles (EVs) when MNPs-anti-CD63 is used as detection probe. The effect is higher as the concentration of extracellular vesicles is increased.

Although the study performed by Linares et al (Linares et al., 2012) concluded that CB had remarkably the highest signal performance compared with other labels, in our particular system eye-detection for CB provides a similar result to that of AuNPs (Figure 3B). This discrepancy could be due to steric hindrance caused by the size of the analytes in this case, that could be of less extent in the case of the AuNPs because of their smaller diameter. It is also possible that the reagents involved in EV isolation affect the signal of AuNPs and CB at a different extent. Comparing the dose-response curve of these two labels, a similar behavior is observed, with less saturation in the case of CB. Taking into account the fitting in their linear range (Figure 3C) and the better LOD of AuNPs (4.5×10^6 EVs/ μL) respect to CB (9.2×10^6 EVs/ μL) (Table 1), in addition to other factors such as the time required for the immune-conjugation and the experimental requirements, AuNPs were chosen as label for EVs detection and used for the subsequent studies.

3.5. Multiple-targeted detection: optimization of antibody disposition

Once the best label was chosen, further experiments were carried out in order to find out the potential of using a multi-targeted platform instead of the conventional LFIA. For that purpose, two different test lines were dispensed onto the membrane, one of anti-CD9, as in previous experiments, and an additional one of anti-CD81. First, it was important to determine whether the disposition of the test lines could influence the final result. At this stage, capture lines were drafted with three aligned dots; presenting either anti-CD9 or anti-CD81 as the first detection line (Figure 5).

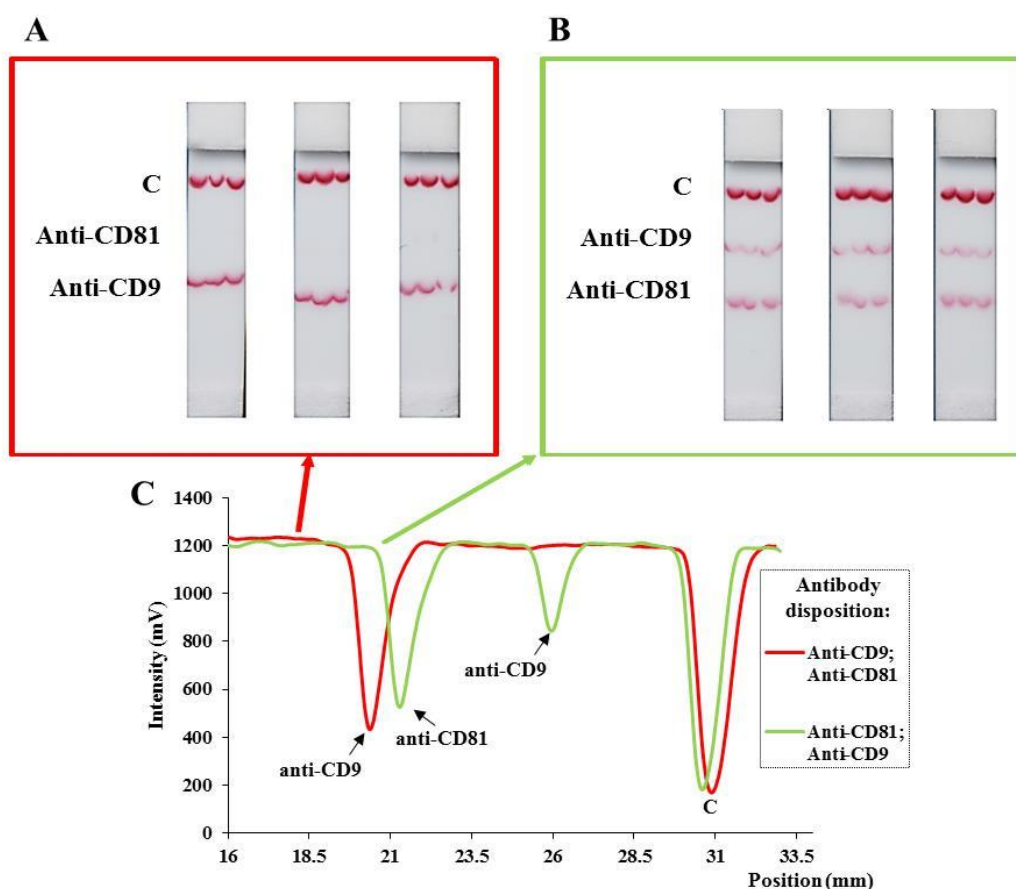


Fig. 5. Optimization of antibodies disposition in the test lines for multi-targeted detection. A) Photograph of the strips when anti-CD9 was working as the first test line. B) Photograph of the strips when anti-CD81 was working as the first test line. C) Example of signal profiles with reflectometric measurement of AuNPs using ESE Quant LR3 strip reader. The data points were obtained in triplicate and using 8.8×10^7 EVs/ μ L.

As shown in Figure 5, when anti-CD9 was placed as the first test line, no signal was observed in the detection line of anti-CD81 indicating that all the EVs had been captured by the anti-CD9. However, if anti-CD81 was settled before, signal appeared in

both anti-CD81 and anti-CD9. These results may suggest that EVs derived from plasma used in this work express higher surface levels of tetraspanin CD9 than CD81, being therefore retained in the line with anti-CD9 and with no visible detection line with anti-CD81 (Figure 5A).). Alternatively, CD81 may be present only on the surface of a subset of EVs. In view of these results, adding anti-CD81 as second test line do not provide any advantage and, therefore, the system chosen was that shown in Figure 5B (anti-CD81 and anti-CD9 as first and second test lines, respectively).

3.6. *Multiple-targeted detection: comparison with conventional LFIA*

Based on the results obtained in the Section 3.6, the test zone of the strip was prepared dispensing a desired volume of 1 mg/mL of anti-CD81 and anti-CD9 to form the first and second test lines respectively and anti-IgG as control line with the IsoFlow dispenser. To examine the signal modification using two test lines, the detection of EVs at different concentrations ($9-140 \times 10^6$ EVs/ μ L) on this multiple-targeted LFIA was compared with the conventional LFIA based on the single detection of CD9 (Figure 6). Figure 6A shows no signal in the negative control (EV-depleted plasma). At low concentrations, anti-CD81 captured fewer EVs than anti-CD9, but this proportion was reversed as the concentration of analyte was increased (Figure 6B).

To compare the analytical potential of this multiple-targeted platform with the conventional LFIA, the sum of signal intensities produced in both detection lines was considered as the total signal for the EVs added to the strip. As it is shown in Figure 6C, signal amplification is obtained when the multiple-targeted system is used. The relationship between concentration of EVs in the sample and the peak intensities can be fitted to a linear regression at low concentrations (Figure 6D), with a tendency to saturation above 70×10^6 EVs/ μ L. Although naked-eye detection in the proposed multiple-targeted platform is similar to the conventional LFIA, the LOD estimated with the instrumental reader goes down to 3.4×10^6 EVs/ μ L and the detection range is broader, keeping the same analysis time (15 minutes). Moreover, complementary information about abundance of EVs populations can be obtained using this multiple-targeted approach.

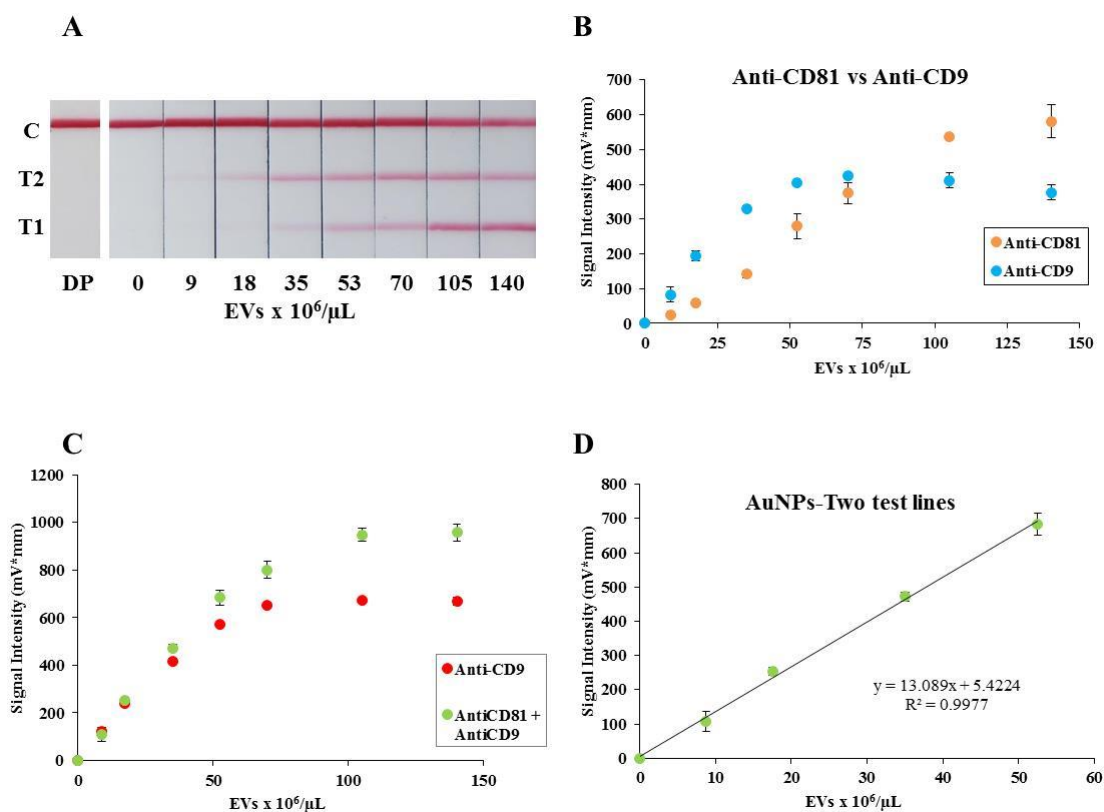


Fig. 6. Detection of different concentrations of plasma purified extracellular vesicles by multi-targeted LFIA using anti-CD81 (T1) and anti-CD9 (T2) as capture antibodies and AuNPs-anti-CD63 as detection probe. (A) Representative example of results obtained in the strips. DP: depleted-plasma (B) Detection lines behavior with the increasing of EV concentration in the multi-targeted system. (C) Calibration curve obtained at the LFIA device. The results obtained with the multi-targeted system (green spots) were compared with the conventional LFIA (red spots). The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate runs. (D) Expanded view of low concentration data and linear regression line. The reproducibility of responses ($n=3$) in the linear range with multi-targeted detection was also studied, and relative standard deviations (RSD) of less than 5% was obtained in all the concentrations except in the smallest one, where the RSD was 27%.

Although, as shown in double strip LFIA experiments, the plasma EVs used for this work express both CD9 and CD81, some studies have shown that CD9 is not expressed in all B-cell lymphoma cells types (Oksvold et al., 2014) or TF-1-derived vesicles (Crescitelli et al., 2013). Other authors have reported that urine EVs contain very small amounts of the tetraspanin CD81 (Lozano-Ramos et al., 2015). In our previous work (Oliveira-Rodríguez et al., 2016), we have successfully developed a novel LFIA for the detection of EVs purified from different sources by ultracentrifugation. Using anti-CD9 as capture and anti-CD63 as detection antibodies we were capable of detecting EVs from melanoma cell culture supernatants, human plasma and urine. Taking this into account, the multiple-targeted LFIA system may allow the detection of a broader range of EVs incorporating more potential pairs of antibodies, and therefore it could be used

as a more universal assay. In addition, this LFIA platform leaves open the possibilities to change or add capture antibodies in order to investigate other populations of EVs or to detect a concrete disease marker.

4. Conclusion

In this study we optimized the antibody labelling for our prototype of EVs detection by LFIA. For this purpose, we labelled the detection antibody (anti-CD63) with three different colored particles: gold nanoparticles, carbon black or magnetic nanoparticles. Based on characteristics such as the LOD, fitting in the linear range or the time needed for the immune-conjugation, AuNPs were chosen as the best label for EVs detection by LFIA. Using these nanoparticles, we compared the sensitivity of multiple-targeted detection to the conventional LFIA based on single-targeted detection of CD9. For this purpose, an additional line of CD81 was dispensed onto the membrane. Both detection systems had similar naked-eye detection and the same analysis-time. Nevertheless, the multiple-targeted system reported benefices, as the better LOD, the broader detection range and the possibility of detecting EVs expressing different tetraspanins on their surface. Therefore we have demonstrated that the LFIA platform for the detection of EVs may be improved not only optimizing the label, but also by incorporating more potential capture antibody lines. Furthermore, the isolation of EVs with commercial kits coupled to our detection system allows the entire process can be performed in two hours.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Sánchez-Madrid for the gift of antibodies. Funding from projects CTQ2013-47396-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), FC15-GRUPIN14-022 (Regional Government of Asturias) is acknowledged. M. Oliveira-Rodríguez thanks FICYT for her pre-doctoral grant.

References

- Andreu, Z., Yáñez-Mó, M., 2014. *Front Immunol*, 5, 442.
- Azmi, A. S., Bao, B., Sarkar, F. H., 2013. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32 (3), 623-642.
- Belting, M., Christianson, H. C., 2015. *J. Intern. Med.*, 278, 251-263.
- Caradec, J., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., Guns, E., 2014. *Clin. Biochem.*, 47 (13), 1286-1292.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabo, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E.I., Lötvall, J., 2013. *J. Extracel. Vesicles*, 2, 20677.
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., Mongini, C., 2015. *Front Immunol*, 6, 203.
- Eltzov, E., Guttel, S., Low Yuen Kei, A., Sinawang, P. D., Ionescu, R. E., Marks, R. S., 2015. *Electroanalysis*, 27, 2116-2130.
- Gao, X., Xu, L. P., Wu, T., Wen, Y., Ma, X., Zhang, X., 2016. *Talanta*, 146, 648-654.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E.I., 2011. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68 (16), 2667-2688.
- Jeong, S., Park, J., Pathania, D., Castro, C. M., Weissleder, R., Lee, H., 2016. *ACS Nano*, 10 (2), 1802-1809.
- Lei, J., Ju, H., 2013. *Signal Amplification Using Nanomaterials for Biosensing*. In: Tuantranont, A. (Eds.), *Applications of Nanomaterials in Sensors and Diagnostics*. Springer Berlin Heidelberg, Chapter 2, pp. 17-41.
- Linares, E. M., Kubota, L. T., Michaelis, J., Thalhammer, S., 2012. *J. Immunol. Methods*, 2012, 375, 264-270.
- Liu, C., Jia, Q., Yang, C., Qiao, R., Jing, L., Wang, L., Xu C., Gao M., 2011. *Anal. Chem.*, 83 (17): 6778-6784.
- Lozano-Ramos, I., Bancu, I., Oliveira-Tercero, A., Armengol, M. P., Menezes-Neto, A., Del Portillo, H. A., Lauzurica-Valdemoros, R., Borràs, F. E., 2015. *J. Extracel. Vesicles*, 4, 27369.
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M.F., Piwnicka-Worms D., Kalluri, R., 2015. *Nature*, 523, 177-182.
- Miller, N., Miller, J.C., 2005. *Calibration methods: regression and correlation*. In: *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Pearson Education Limited, London, 5 edition, Chapter 5, p. 121-23.
- O'Farrell, B., 2009. *Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems*. In: Wong, R. and Tse, H. (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay*. Humana Press, New York, Chapter 1, pp. 1-33.
- O'Keefe, M., Crabbe, P., Salden, M., Wichers, J., Van Peteghem, C., Kohen, F., Pieraccinif, G., Monetif, G., 2003. *J. Immunol. Methods*, 2003, 278 (1), 117-126.

- Oksvold, M. P., Kullmann, A., Forfang, L., Kierulf, B., Li, M., Brech, A., Vlassov, A. V., Smeland, E. B., Neurauder, A., Pedersen, K. W., 2014. *Clinical Therapeutics*, 36 (6), 847-862.
- Oliveira-Rodríguez, M., López-Cobo, S., Reyburn, H. T., Costa-García, A., López Martín, S., Yáñez-Mo, M., Cernuda-Morollón, E., Paschen, A., Valés-Gómez, M., Blanco-López, MC., Submitted. *J. Extracel. Vesicles*.
- Peñas, P. F., García-Díez, A., Sánchez-Madrid, F., Yáñez-Mó, M., 2000. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 114, 1126–35.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., van Amerongen, A., 2009. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2), 569-582.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Wichers, J. H., Koets, M., Berendsen, L. B., van Amerongen, A., 2012. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2), 593-600
- Properzi, F., Logozzi, M., Fais, S., 2013. *Biomark. Med.*, 7 (5), 769-78.
- Quesada-González, D., Merkoçi, A., 2015. *Biosens. Bioelectron.*, 73, 47-63.
- Rodríguez, M. O., Covián, L. B., García, A. C., Blanco-López, M. C., 2016. *Talanta*, 148, 272-278
- Russo, I., Bubacco, L., Greggio, E., 2012. *Am. J. Neurodegener Dis.*, 1, 217-225.
- Sajid, M., Kawde, A. N., Daud, M., 2015. *J. Saudi Chemical Society*, 19, 689-705.
- Sunkara, V., Woo, H. K., Cho, Y. K., 2016. *Analyst*, 141 (2), 371-381.
- Taylor, D. D., Shah, S., 2015. *Methods*, 87, 3-10.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. *Nat. Rev. Immunol.*, 2 (8), 569-579.
- Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., Kumarswami, N., Noble, J., Szymanski, M., Porter, R. A., 2010. *J. Immunol. Methods*, 2010, 356 (1-2), 60-9.
- Vaidyanathan, R., Naghibosadat, M., Rauf, S., Korbie, D., Carrascosa, L. G., Shiddiky, M. J., Trau, M., 2014. *Anal. Chem.*, 86 (22), 11125-11132.
- Wang, Y., Xu, H., Wei, M., Gu, H., Xu, Q., Zhu, W., 2009. *Mater. Sci. Eng. C*, 29, 714-718.
- Wang, D. B., Tian, B., Zhang, Z. P., Wang, X. Y., Fleming, J., Bi, L. J., Yang, R. F., Zhang, X. E., 2015. *Biosens. Bioelectron.*, 67, 608-614.
- Yáñez-Mó, M., Tejedor, R., Rousselle, P., Sánchez-Madrid, F., 2001. *J. Cell Science*, 2001, 114, 577-87.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel M., Heegaard, N. H. H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E. M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötval, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-‘t Hoen, E. N. M., 46, Nyman, T. A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, E., del Portillo, H. A., Reventós J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Stampe Ostenfeld, M., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S. G., Vasconcelos, M. H., Wauben, M. H. M., Olivier De Wever, 2015. *J. Extracel. Vesicles*, 4, 27066

Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13, 17–24.

Supporting information

for

Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection

Myriam Oliveira-Rodríguez¹, Esther Serrano-Pertierra², Agustín Costa García¹, Soraya López Martín³, María Yáñez Mo^{3,4}, Eva Cernuda-Morollón⁵, M.C. Blanco-López^{1*}

¹*Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

²*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain*

³*Unidad de Investigación, Hospital St Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IS-IP), Madrid, Spain*

⁴*Departamento de Biología Molecular, UAM/ CBM-SO, Madrid, Spain*

⁵*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain*

Table of contents

1. Figure S1: Extracellular vesicles (EVs) characterization by nanoparticle tracking analysis (NTA).

2. Figure S2: Compatibility of the LFIA platform with the Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen).

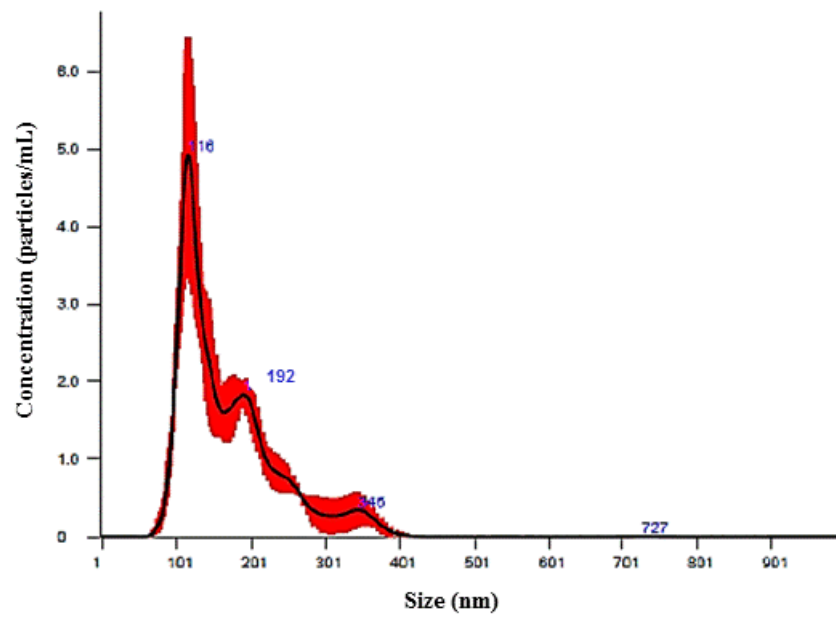


Fig. S1. Extracellular vesicles (EVs) characterization. Representative NTA of EVs isolated from human plasma using ExoQucikTM precipitation solution.

Enricment of extracellular vesicles from human plasma with Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen)

We also checked the compatibility of the LFIA platform with other precipitation reagents. Thus, EV-enriched fractions from plasma was obtained using Invitrogen total exosome isolation reagent (Invitrogen, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The EVs pellet was resuspended in HEPES 10 mM, pH 7.4. EVs samples diluted in the running buffer were transferred into the microtube containing 10 μ L AuNPs-anti-CD63 conjugate and homogenized (final volume 100 μ L). EVs-depleted plasma, obtained as the plasma supernatant after precipitation was also tested. Both single and multiple-target systems were used.

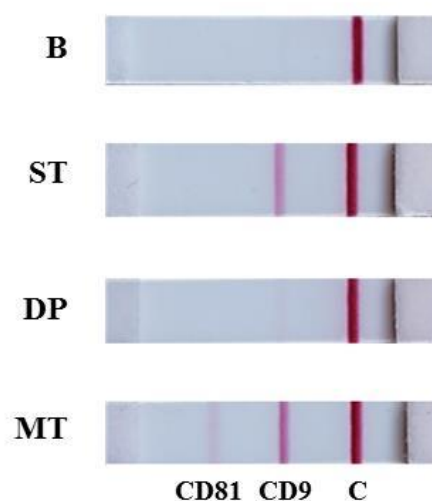


Fig. S2. Photograph of the test strips of LFIA using single and multiple-targeted for the detection of EVs obtained using Invitrogen reagent. **B:** Blank, running buffer. **ST:** single targeted (anti-CD9 as capture antibody). **DP:** EVs-depleted plasma. **MT:** multiple-targeted (anti-CD81 and anti-CD9 as capture antibodies). A weak line is observed when EVs-depleted plasma is tested, related with the kit precipitation yield.

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

4.1. CONCLUSIONES

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han desarrollado varios sistemas de análisis rápidos, sensibles, con aplicación *point-of-care* y que podrían ser empleados de forma sencilla por personal no experimentado. Aunque las conclusiones han sido expuestas al término de cada uno de los estudios realizados, de una manera general se pueden resumir las siguientes ideas principales:

- 1- Se ha desarrollado un inmunoensayo de flujo lateral en formato *dipstick* para la detección del PSA. Con el fin de obtener una mayor sensibilidad se han explorado diferentes estrategias. De ello, se podrían destacar las siguientes observaciones:
 - i. Una amplificación de la señal mayor de las nanopartículas de oro se obtuvo al emplear una secuencia de dos pasos: una vez finalizado el test para el análisis de la muestra, la tira se sumergió en una disolución que contenía una sal de plata y un agente reductor. El límite de detección fue de 0,1 ng/ml, un orden de magnitud inferior.
 - ii. El inmunoensayo optimizado en las tiras de flujo lateral pudo trasladarse a un sistema en papel diseñado a partir de la tecnología de impresión con cera. Aunque esta estrategia es potencialmente útil con el fin de desarrollar estrategias para el acoplamiento con transductores electroquímicos, no se han alcanzado los límites de detección visuales obtenidos en el LFIA convencional.
- 2- Se ha demostrado el acoplamiento de las tiras de flujo lateral a un sensor basado en medidas magnéticas mediante el empleo del sistema biotina-estreptavidina y de un LFIA para la detección de PSA. La señal obtenida con este sensor en la línea de test fue directamente proporcional a la concentración de PSA en la muestra.
- 3- Se ha descrito el proceso de fabricación de un ensayo ELISA automático en un disco que podría integrar todas las etapas de análisis y ser empleado para muestras de sangre total. Se ha demostrado que la sucesión de las etapas puede ser controlada mediante el empleo de sifones y películas solubles.
- 4- Se ha desarrollado un inmunoensayo de flujo lateral en formato *dipstick* para la determinación de vesículas extracelulares. De los procesos de optimización llevados a cabo se puede concluir:

- i.** La combinación de anticuerpos que produjo mejores resultados en el ensayo ELISA no ha podido utilizarse en el LFIA al no ser posible detectar la señal en presencia de las vesículas. Por ello, el mejor par de anticuerpos para la detección de las vesículas extracelulares aisladas de diferentes fuentes (sobrenadantes de cultivos celulares y plasma y orina humana) se encontró empíricamente en las tiras.
- ii.** La utilización de reactivos de precipitación para el aislamiento de las vesículas extracelulares ha permitido la disminución de los tiempos de análisis respecto al empleo de la centrifugación diferencial, siendo compatible con el análisis con LFIA posterior y con una determinación POC real.
- iii.** El empleo de nanopartículas de oro presentó ventajas respecto al uso de otras nanopartículas como marcas.
- iv.** La introducción de un sistema multidetección presentó beneficios respecto al empleo de una única línea de detección, como un mejor LOD (3.4×10^6 EVs/ μ L), un rango de detección más amplio y la posibilidad de detectar vesículas extracelulares con diferente expresión de tetraspaninas en su superficie.

4.2. CONCLUSIONS

Within this PhD Thesis several rapid and sensitive analysis systems, able to be used by unskilled operators and with point-of-care applications have been developed. Although the conclusions have been exposed at the end of each chapter, the main ideas can be summarized as follows:

- 1- A lateral flow dipstick immunoassay has been developed for the detection of PSA. In order to improve the sensitivity, different strategies have been explored. Among them, the following remarks could be highlighted:
 - i. The highest amplification of the gold nanoparticles signal was obtained in a two step sequence: following the sample run at the dipstick, this was immersed in a solution containing a silver salt and a reducing agent. The limit of detection was 0,1 ng/ml, one order of magnitude lower.
 - ii. The immunoassay optimized in the lateral flow strips can be moved to a paper system designed by wax printing technology. Although this strategy is potentially useful with a view to develop strategies for coupling with electrochemical transducers, the visual detection limits obtained in the conventional LFIA have not been reached.
- 2- The coupling of the lateral flow strips with a magnetic measurement-based sensor was demonstrated by using the biotin-streptavidin system and a LFIA to detect PSA. The signal obtained with this sensor at the test line was directly proportional to the concentration of PSA in the sample.
- 3- The manufacturing process of an automatic ELISA on a disc which could integrate all stages of analysis and be used for whole blood samples has been described. It has been shown too that the sequence of steps can be controlled by the use of siphons and dissolvable films.
- 4- A lateral flow dipstick immunoassay for the determination of extracellular vesicles has been developed. For process optimization carried out, it can be concluded that:
 - i. The combination of antibodies which produced better results in ELISA could not be used in LFIA due to their inability to produce the signal in the presence of vesicles. The best pair of antibodies for detection of extracellular vesicles isolated from different sources (cell culture

supernatants and human plasma and urine) was found empirically with the strips.

- ii.** The use of precipitation reagents for isolation of extracellular vesicles has allowed decreasing analysis times regarding the use of differential centrifugation, being compatible with the LFIA downstream analysis and a real POC determination.
- iii.** The use of gold nanoparticles presented advantages regarding the use of other nanoparticles as label.
- iv.** The introduction of a multi-targeted system reported benefits regarding the use of a single detection line, such as better LOD (3.4×10^6 EVs/ μ L), a broader detection range and the possibility of detecting extracellular vesicles expressing different tetraspanins on their surface.

4.3. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como se ha comentado, las vesículas extracelulares en general, y los exosomas en particular, están emergiendo como potentes herramientas diagnósticas. Por ello, puede esperarse que el siguiente paso para demostrar el potencial de la plataforma de LFIA desarrollada en esta Tesis Doctoral sea su aplicación a muestras de pacientes. En este sentido, pueden considerarse dos estrategias diferentes para trabajos futuros:

≈ **Estudio de casos y controles:** aplicación del LFIA desarrollado a muestras de pacientes diagnosticados de una enfermedad concreta, y comparación de los resultados obtenidos con controles sanos. Este trabajo se ha comenzado a abordar seleccionando para ello muestras de sangre de pacientes recién diagnosticados de esclerosis múltiple y comparándolos con voluntarios sanos, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, se han obtenido resultados prometedores al comparar muestras de líquido cefalorraquídeo extraído de dos grupos de pacientes diagnosticados de esta misma enfermedad, con diferente pronóstico, y respecto a un grupo control. Dado que la extracción de líquido cefalorraquídeo es considerado como un procedimiento invasivo, se seguirá trabajando para obtener resultados en sangre, quizás seleccionando una mejor cohorte de pacientes.

≈ **Empleo de biomarcadores específicos:** otra alternativa es la búsqueda de un biomarcador específico de una enfermedad. Esto permitiría desarrollar un ensayo multiplex en el que, además de determinarse la concentración de EVs, podría emplearse para diagnosticar una enfermedad concreta. No obstante, esta línea de trabajo vendría condicionada por la disponibilidad de anticuerpos específicos.

Otras ideas para trabajos futuros van orientadas hacia la mejora de los sistemas presentados en esta Tesis, como es sistema en papel para la detección de PSA o la aplicación del ensayo ELISA automático en un disco a un sistema concreto.

4.4. FUTURE PROSPECTS

As previously mentioned, extracellular vesicles in general, and exosomes in particular, are emerging as powerful diagnostic tools. Therefore, it can be expected that the next step to demonstrate the potential of the LFIA platform developed in this PhD Thesis is to apply it to patient samples. In this sense, two different strategies can be considered for future work:

- ≈ **Case-control study:** application of the developed LFIA to sample of patients diagnosed with a specific disease, and comparing the results obtained with healthy controls. This work has been just addressed by selecting blood samples from patients newly diagnosed with multiple sclerosis against healthy volunteers, with no statistically significant differences. However, promising results have been obtained by comparing cerebrospinal fluid samples taken from two groups of patients diagnosed with this disease, with different prognoses, to a control group. Since the extraction of cerebrospinal fluid is considered an invasive procedure, it will continue to work to obtain results in blood, maybe by selecting a better patient cohort.

- ≈ **By specific biomarkers:** Other alternative is to search a specific disease biomarker. This would allow developing a multiplex assay in which, in addition to determining the concentration of EVs, could be used to diagnose a particular disease. However, this experimental line will depend on the availability of specific antibodies.

Other ideas for future works are oriented towards improving the systems presented in this PhD Thesis, such as the paper-based system for the detection of PSA or the application of the automatic ELISA assay on a disc to a particular system.

5. ANEXOS

5.1. ANEXO I: TÉCNICAS INSTRUMENTALES

5.1.1. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

La dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS) es una de las técnicas más populares para determinar el tamaño de las partículas, además de servir como una herramienta de análisis rápido y sencillo para controlar los procesos de bioconjugación²². Las partículas en suspensión en un líquido se encuentran en continuo movimiento como resultado de colisiones aleatorias con moléculas de disolvente, fenómeno conocido como movimiento Browniano. Este movimiento provoca la difusión de partículas a través del medio y hace que cuando una luz láser incide sobre la muestra, ésta se disperse en diferentes intensidades. De acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1), el coeficiente de difusión (D), determinado a partir de las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con el tiempo, es inversamente proporcional al diámetro hidrodinámico de la partícula (d). Cuanto más pequeña sea una partícula, más rápida se moverá y mayores serán las fluctuaciones en la intensidad²³.

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (1)$$

Donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del líquido de la solución.

Debe de tenerse en cuenta en esta técnica que, el diámetro hidrodinámico de la partícula no sólo depende del tamaño de la partícula "núcleo", sino que la partícula suele ir acompañada de una pequeña capa de moléculas de disolvente. Esto hace que en la mayoría de los casos los tamaños obtenidos mediante esta técnica sean superiores a los que se miden con un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

De esta técnica cabe destacar que su éxito se debe principalmente a que requiere pequeños volúmenes de muestra, es rápida y sencilla y una característica importante, es no invasiva, por lo que no se produce la destrucción de la muestra²⁴.

22 Jans, H., Liu, X., Austin, L., Maes, G., Huo, Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal Chem.* 2009; 81(22): 9425-9432.

23 Malvern Instruments Technical Note. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Consultado en Agosto de 2016. Disponible en: <http://www.malvern.com/es/support/resource-center/>

24 Palmieri, Vet al. Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *J Nanopart Res.* 2014; 16(9): 1-8.

5.1.2. POTENCIAL ZETA

Las partículas en una suspensión coloidal o emulsión por lo general llevan una carga eléctrica. El potencial zeta (ζ -potencial), es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas en suspensión. Para la determinación del ζ -potencial, se mide el movimiento de las partículas cargadas en el líquido entre dos electrodos al aplicar un campo eléctrico, obteniéndose el dato de dicho potencial a partir de la movilidad electroforética (U_E) aplicando la ecuación de Henry (Ecuación 2).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (2)$$

Donde ε es la constante dieléctrica, $f(ka)$ la función de Henry y η la viscosidad del líquido.

Para que las partículas permanezcan estables, éstas deben estar electrostáticamente estabilizadas, presentando un potencial zeta finito, por lo general mayor que 20 a 30 milivoltios (mV)²⁵.

5.1.3. WESTERN BLOT

El Western Blot (WB), también conocido como transferencia de proteínas o inmunotransferencia, es una técnica analítica empleada para separar e identificar las proteínas en una muestra determinada. En esta técnica, una mezcla de proteínas se separa en base a su peso molecular y, por lo tanto, por el tipo, mediante una electroforesis en gel. Una vez separadas, las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente, donde quedarán accesibles para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación. En la mayoría de los casos se trata de anticuerpos, pero también pueden ser lectinas, receptores, ácidos nucleicos o cualquier otro ligando. El anticuerpo no unido se elimina por lavado, dejando sólo el anticuerpo unido a la proteína de interés. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. Como los anticuerpos sólo se unen a la

25 Bruce B. Weiner. Measuring the Size & Surface Charge of Exosomes, Microvesicles & Liposomes. Application Note. Brookhaven instruments. Consultado en Agosto de 2016. Disponible en: <http://www.brookhaveninstruments.com/literature/library/>

proteína de interés, únicamente debería observarse una banda visible. El espesor de esa banda se puede utilizar para una estimación de la cantidad de proteína presente^{26,27}.

26 Mahmood, T., Yang, P.C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012; 4(9): 429.

27 Kurien, B.T., Scofield, R.H. Western blotting. *Methods* 2006; 38(4): 283-293.

5.2. ANEXO II: FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS

Tabla A: Factor de impacto (Impact Factor, IF) de las revistas en las que aparecen publicados los artículos recogidos en esta Tesis Doctoral.

Revista	Año	IF	IF medio últimos 5 años	Área	Ránking	Estado
Talanta	2015	4.035	3.749	Qímica Analítica	Q1	Publicado
Journal of Extracellular Vesicles*	2016	No disponible. Incluido en ESCI				Publicado
Biosensors & Bioelectronics	2015	7.476	6.675	Qímica Analítica	Q1	Publicado
Journal of Magnetism & Magnetic Materials	2015	2.357	2.234	Electrónica, óptica y materiales magnéticos	Q1	En revisión

*Revista oficial de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) y ISEV-Américas. Revista de menos de 5 años. Se prevee IF para el 2017 de 9.7. Las citas son rastreadas por medio de la Web of Science en ESCI (*Emerging Sources Citation Index*).