



Universidad de Oviedo

Facultad de Químicas

Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

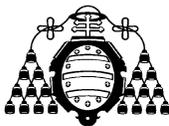
Trabajo Fin de Máster

***Desarrollo de un Inmunoensayo de Flujo
Lateral para la detección de PSA***

Lucía Blanco Covián

Tutor: M^a Carmen Blanco López

Julio 2013, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de
Química Física y Analítica

M. Carmen Blanco López, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA,

Que el presente trabajo titulado “DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL PARA LA DETECCIÓN DE PSA” ha sido realizado por Lucía Blanco Covián en el Departamento de Química Física y Analítica bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 10 de julio de 2013,

M^a Carmen Blanco López

Deseo expresar mi agradecimiento:

A María del Carmen Blanco López, Dra. del Departamento de Química Física y Analítica y Directora de este Trabajo Fin de Máster, por el su gran apoyo, confianza, interés y acertados consejos, que han hecho posible este trabajo.

A Agustín Costa García, Catedrático del Departamento de Química Física y Analítica, por guiarme, aconsejarme y confiar en mi trabajo.

A los integrantes del grupo de investigación del Catedrático Agustín Costa García, en especial a Myriam Oliveira Rodríguez.

A la empresa Healthsens S.L, y en especial a Graciela Martínez.

A Marisol Covián Martino y Manuel Ángel Blanco González, mis padres, por apoyarme en todo momento y confiar en mí ciegamente.

A Ignacio García Velasco, mi novio, por animarme y tranquilizarme a lo largo de este año.

A mis compañeros de Máster, por ayudarme en todos los problemas que me han surgido durante este año.

A mis amigas, y en especial a Sonia García Ramiro y Romina Fernández Sierra, por estar siempre a mi lado, y amenizarme las tardes de estudio y laboratorio.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Dispositivos de análisis para diagnóstico clínico.....</i>	2
1.2. <i>Inmunoensayos de Flujo Lateral (LFIA).....</i>	5
1.2.1. <i>Contexto y aplicaciones.....</i>	5
1.2.2. <i>Los inmunoensayos de flujo lateral.....</i>	5
1.2.3. <i>Diseño de un inmunoensayo de flujo lateral.....</i>	7
1.2.4. <i>Tipos de ensayo de flujo lateral.....</i>	8
1.2.4.1. <i>Ensayos Competitivos.....</i>	9
1.2.4.2. <i>Ensayos Sándwich.....</i>	10
1.3. <i>Antígeno Prostático Específico (PSA) como biomarcador de cáncer de próstata.....</i>	11
1.4. <i>Ensayos para PSAtotal.....</i>	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. EXPERIMENTAL.....	19
3.1. <i>Materiales y Reactivos.....</i>	19
3.1.1. <i>Materiales generales.....</i>	19
3.1.2. <i>Materiales adicionales.....</i>	19
3.1.3. <i>Reactivos y Disoluciones.....</i>	20
3.1.4. <i>Observaciones.....</i>	21
4. DISCUSION DE RESULTADOS.....	23
4.1. <i>Diseño del inmunoensayo.....</i>	23
4.2. <i>Selección de los Materiales y Optimización del flujo.....</i>	24
4.2.1. <i>Selección de la membrana.....</i>	24
4.2.2. <i>Almohadilla de muestras o “Sample pad”.....</i>	27
4.2.3. <i>Almohadilla conjugada o “Conjugate Pad”.....</i>	28

4.2.4.	<i>Almohadilla Absorbente o “Absorbent Pad”</i>	30
4.2.5.	<i>Disolución de Arrastre</i>	31
4.2.6.	<i>Selección de la marca para la señal visual</i>	32
4.3.	<i>Protocolo de Ensayo</i>	33
4.3.1.	<i>Preparación de Tiras de Ensayo.</i>	33
4.3.2.	<i>Estabilización del oro coloidal</i>	36
4.3.2.1.	<i>Ensayo de estabilización del oro coloidal</i>	37
4.3.3.	<i>Conjugación Au-Ac*</i>	40
4.3.4.	<i>Optimización del protocolo de ensayo</i>	40
4.3.5.	<i>Adaptación del Inmunoensayo</i>	42
4.3.6.	<i>Optimización de la concentración de anticuerpo inmovilizado sobre la membrana</i>	43
4.4.	<i>Estudio del efecto de la concentración de la muestra</i>	46
4.5.	<i>Modificación del protocolo de inmovilización del anticuerpo conjugado</i>	48
4.6.	<i>Influencia del protocolo de ensayo en la selección final de la membrana óptima.</i>	50
4.7.	<i>Mejora de la sensibilidad del ensayo</i>	51
4.7.1.	<i>Inmersión de la tira de ensayo en una disolución de plata</i>	52
4.7.2.	<i>Ensayo inmunocromatográfico sándwich de plata y disolución reductora</i>	54
4.7.3.	<i>Adición de la disolución de Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada.</i>	57
4.7.4.	<i>Doble almohadilla conjugada</i>	58
4.7.5.	<i>Conclusiones: comparación de los resultados</i>	59
5.	CONCLUSIONES	62
6.	FUTURAS PERSPECTIVAS	64
7.	BIBLIOGRAFIA	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dispositivos de análisis para diagnóstico clínico

Los avances en Química Analítica han revolucionado las posibilidades de diagnóstico clínico. En este campo, los análisis tienen gran valor pronóstico (evolución de una enfermedad y respuesta a una terapia), y etiológico (búsqueda de las causas de una enfermedad) y son fundamentales para el establecimiento de factores de riesgo. Para cubrir estas necesidades existen muchos métodos basados en distintos principios fisicoquímicos e inmunoensayos.

Sin embargo, la elección del método depende no sólo de la naturaleza del analito y del rango de concentraciones a cubrir, sino también del lugar donde es conveniente realizar el análisis: laboratorio central o lugar cercano al paciente¹. En la bibliografía inglesa los **dispositivos de diagnóstico** para uso descentralizado o de “punto de atención”, se engloban bajo la denominación “*Point-Of-Care*”. En este trabajo se utilizará el acrónimo **POC** para referirse a ellos de aquí en adelante.

En el desarrollo de estos dispositivos lo que impera es la portabilidad y la necesidad de adaptación a un perfil de usuario no especializado en análisis. Por tanto, es frecuente que otras características analíticas tales como precisión, exactitud, o incluso un valor cuantitativo en muchos casos, pasen a un segundo lugar, siempre que se consiga una sensibilidad y selectividad adecuadas para tomar decisiones inmediatas sobre el problema clínico a resolver². Otras cualidades inherentes a este concepto de dispositivo de análisis son: fácil uso, rápidos, baratos, portátiles y sensibles³, y en muchos casos, desechables.

En el contexto económico actual, existe un gran interés en descongestionar servicios hospitalarios centrales y llevar el análisis cerca del paciente. Sin embargo, son todavía limitados los tests que se pueden realizar mediante plataformas POC. La Figura 1 muestra la simplificación del proceso analítico cuando se usan estas plataformas.

En la bibliografía se pueden encontrar varios artículos de revisión sobre usos y desarrollo de dispositivos POC⁴. Estos incluyen **biosensores, inmunoensayos de flujo lateral** y sistemas basados en microfluídica (**μ -TAS**, micro-Total Analysis Systems). Estos últimos ofrecen grandes posibilidades, ya que se pueden diseñar de manera que se integren todos los pasos de un proceso de análisis (separación, reacción, detección...) en un solo instrumento, y usan cantidades muy pequeñas de muestra y reactivos. Sin embargo, todavía están un tanto alejados de la comercialización.

Laboratorio Central



Test Point Of Care

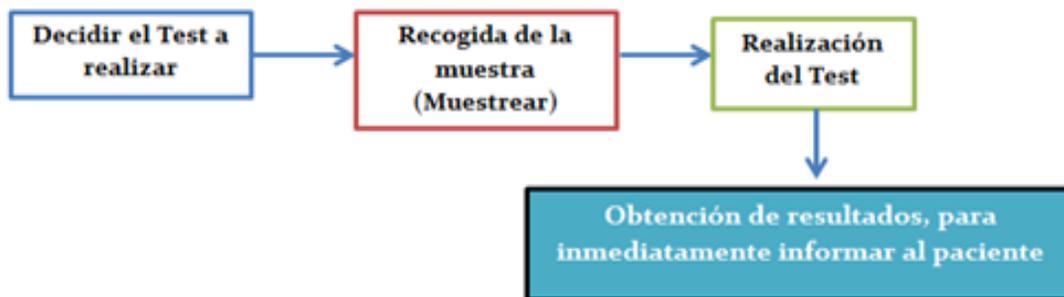


Figura 1. Simplificación del proceso de pruebas clínicas en situaciones ambulatorias utilizando dispositivos de análisis POC frente a métodos de laboratorio⁵

Los biosensores son dispositivos de pequeño tamaño en los que un elemento de reconocimiento de naturaleza biológica (anticuerpo o antígeno, para un inmunosensor) se acopla con un transductor, el cual transforma el reconocimiento molecular en una señal útil.

Los sensores de glucosa son el ejemplo más representativo, que ha dominado el mercado de monitorización de la diabetes en los últimos 20 años (Figura 2).



Figura 2 Biosensor de determinación de Glucosa en sangre

Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) o inmunocromatográficos constituyen la alternativa más sencilla para análisis POC. Son tiras de papel en las que se inmoviliza un biorreactivo de interés. Posteriormente, la muestra y otros reactivos se mueven por capilaridad a unas zonas preparadas como “zona de prueba” y “zona de control” donde se desarrolla una mancha coloreada o dos.

El sistema más conocido es el test del embarazo (Figura 3), que es un ejemplo claro de la cercanía a la comercialización de estos dispositivos y su rápida aceptación.



Figura 3 Test de embarazo. Detecta la presencia de la hormona hCG en orina/suero, a través de una membrana porosa la cual se divide en tres zonas: a) almohadilla conjugada con anticuerpo anti-hCG monoclonal y oro coloidal o partículas de latex, b) anticuerpos monoclonares de captura anti-hCG para la línea Test y c) anticuerpos policlonales de cabra para la línea control

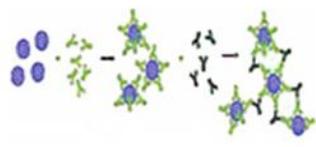
Este trabajo fin de master se ha centrado el estudio de los principios utilizados en los LFIA con una doble objetivo: por un lado, adquirir formación en una tecnología de interés en la industria del sector del análisis clínico, y por otro lado, iniciar una línea de investigación en el Grupo de Inmuno electroanálisis, buscando desarrollar una nueva generación de dispositivos POC en papel que supere las limitaciones analíticas de los ya desarrollados hasta la fecha. Se utilizará como sistema problema modelo la construcción de un LFIA para la detección del biomarcador de cáncer de próstata usado para cribado de muestras: el antígeno prostático específico total (PSA-t).

1.2. Inmunoensayos de Flujo Lateral (LFIA)

1.2.1. Contexto y aplicaciones

Principalmente, existen tres ensayos rápidos para la determinación de proteínas: ensayos de aglutinación, ensayos de inmunofiltración e inmunoensayos de flujo lateral, los cuales se resumen en la Tabla 1. Estos ensayos son muy utilizados ya que constan de una detección visual y un número reducido de pasos de ensayo.

Tabla 1 Principales ensayos para la determinación de proteínas

<p>Ensayos de Aglutinación</p>	<p>Agregación de eritrocitos a un pequeño volumen de muestra. Las partículas se encuentran recubiertas con anticuerpos o antígenos específicos al analito de la muestra</p>	
<p>Ensayos de Inmunofiltración</p>	<p>La muestra junto con varios reactivos y soluciones de lavado se filtran de forma secuencial a través de una membrana porosa que contiene manchas o líneas de anticuerpos inmovilizados.</p>	
<p>Inmunoensayos de flujo lateral</p>	<p>Migración de la muestra a través de unas tiras de nitrocelulosa, que poseen dos líneas de anticuerpos inmovilizados</p>	

1.2.2. Los inmunoensayos de flujo lateral

Este tipo de test cumple los requisitos propuestos en 2004 por la Organización Mundial de la Salud para desarrollar el dispositivo POC “ideal”⁶. Estas se pueden resumir con el acrónimo inglés *ASSURED* que corresponde a:

- 1 Asequible (Affordable). De fácil acceso para la población en riesgo.
- 2 Sensible (Sensitive). De alta capacidad para detectar muestras positivas.
- 3 Específico (Specific). De alta capacidad para detectar muestras negativas
- 4 De fácil uso (User friendly). Sin necesidad de formación previa.
- 5 Rápido (Rapid) Para permitir tomar decisiones inmediatas, y Robusto (Robust). Para transportarlo y distribuirlo sin que se altere su funcionamiento.
- 6 Sin instrumentación (equipment-free).
- 7 Distribuible a los que lo necesitan, incluso países en vías de desarrollo. (Delivered to end-users).

Los inmunoensayos de flujo lateral pueden ser considerados una extensión de los ensayos de aglutinación y de inmunofiltración de proteínas, con las siguientes características: están más adaptados a usuarios no especializados, y a la comercialización o distribución de test de análisis. Desde el punto de vista analítico, son también más sensibles⁷. Todo esto ha motivado el interés por desarrollar este tipo de test para determinación de otras proteínas y ácidos nucleicos de interés clínico y alimentario. La Tabla 2 recoge algunos ejemplos:

Tabla 2 Ejemplos de tipo de Test de LFIA desarrollados

<i>Analito</i>	<i>Método</i>	<i>Aplicación</i>	<i>LD</i>	<i>Categoría</i>	<i>Referencia</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Sándwich ICA, usando como marcador oro coloidal</i>	<i>Detección de Salmonella en huevos (crudos)</i>	10^7 CFU.ml ⁻¹	<i>Bacterias Patógenas</i>	8
<i>Listeria</i>	<i>Sándwich NALFIA, usando como marcador carbono coloidal</i>	<i>Productos lácteos para la nutrición de los niños</i>	10 CFU..25ml ⁻¹	<i>Bacterias Patógenas</i>	9
<i>Anticuerpos contra Trichinella</i>	<i>Antígeno marcado con oro coloidal</i>	<i>Triquinosis (también llamada triquinosis o triquiniasis)</i>	100% de positivos	<i>Agentes infecciosos</i>	10
<i>Albúmina en suero</i>	<i>Anticuerpo o antígeno marcado fluorescentemente</i>	<i>La albúmina como un biomarcador para la diabetes</i>	12,2 a 60 g L ⁻¹	<i>Trastornos metabólicos</i>	11
<i>Prueba genérica de sulfonamidas</i>	<i>Anticuerpo marcado con oro coloidal</i>	<i>Residuos de antibiótico en los huevos y músculos de pollo</i>	10-40 mg L ⁻¹	<i>Componentes Tóxicos</i>	12
<i>hCG en la orina</i>	<i>Anticuerpo primario etiquetado con carbono coloidal</i>	<i>Determinación de la presencia de hCG (prueba de embarazo)</i>	10 mUI ml ⁻¹	<i>Aplicaciones varias</i>	13

*Nota: CFU= Colony-forming units; ICA= Ensayos inmunocromatográficos(Immunochromatographic assay); NALFIA=Inmunoensayo de flujo lateral de ácido nucleicos (Nucleic acid lateral flow immunoassay)

Así mismo en los últimos años han surgido empresas en el campo del diagnóstico clínico que ofrecen un catálogo de test inmunocromatográficos, o la posibilidad de “diseño a la carta” del test para el problema de interés. Algunas de estas empresas son:

Tabla 3 Algunas empresas dedicadas a la fabricación y desarrollo de LFIA en el campo del diagnóstico

Empresa	Página Web	Actividad
Creative-diagnostics	http://www.creative-diagnostics.com	Anticuerpos, antígenos, componentes innovadores de diagnóstico, reactivos esenciales del ensayo y LFIA a demanda
Biotem	http://www.biotem-antibody.com/	Anticuerpos monoclonales, antisueros, purificación de anticuerpos y modificación y desarrollo de LFIA
Lateral flow assay diagnostics manufacturer	http://www.forsitediagnostics.com/	Desarrollo y fabricación de LFIA para la salud, los sectores veterinario y fitosanitario
Dmv Diagnostik	http://www.dmv.es/	Pruebas de diagnóstico rápido : Prueba de gestación: <i>Relaxina</i> Test de ovulación : <i>LH</i> <i>Prueba Dermatofito</i>
Bio-Quimik, S.A	http://www.bio-quimik.com/	Reactivos diagnósticos para la salud humana y animal. LFIA

1.2.3. Diseño de un inmunoensayo de flujo lateral

Un inmunoensayo de Flujo lateral (LFIA) se considera una prueba de detección visual, tanto para un analito, como para varios. Estos ensayos se basan en la migración de un fluido a través de unas tiras de nitrocelulosa, las cuales normalmente se suelen colocar sobre un soporte de plástico. El ensayo que se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Inicialmente se realiza la inmovilización de reactivos en una membrana o tira de papel.
2. Posteriormente se añade la disolución de la muestra en una zona formada por una almohadilla absorbente conocida por el nombre de almohadilla de muestra o *Sample Pad*.

3. El fluido migra a través de esta almohadilla hasta llegar a una zona con otro tipo de papel, conocido como almohadilla conjugada o *Conjugate Pad*, en donde se ha inmovilizado el anticuerpo conjugado (marcado con partículas coloreadas como oro coloidal o microesferas de latex).
4. A continuación la muestra sigue migrando a través de la membrana hasta llegar la zona de captura, donde el complejo analito anticuerpo-conjugado se une a anticuerpos inmovilizados, produciendo una línea visible. Pasada esta línea la muestra continua migrando hasta que llega a la zona de control, donde un exceso de anticuerpo conjugado se une y produce una segunda línea visible, conocida como línea de control que es la que nos indica que la muestra ha migrado a través de la membrana, como se deseaba.
5. Si al final del ensayo se observan dos líneas, esto será indicativo de un resultado positivo, y una sola línea un resultado negativo (Fig. 4). La formación de las dos líneas de color de diferentes intensidades pueden ser utilizadas para la interpretación cualitativa o semicuantitativa.

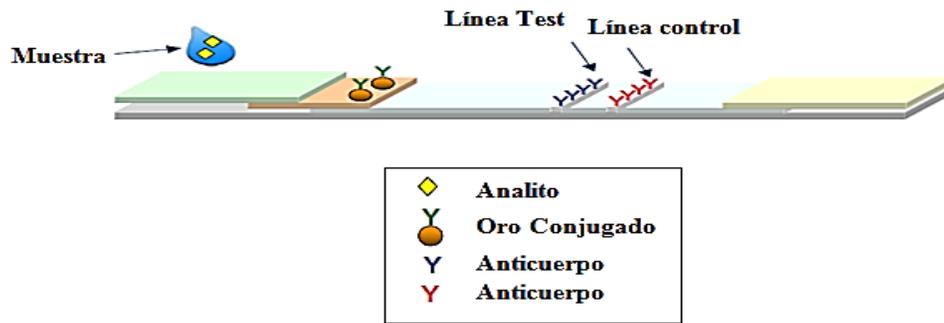


Figura 4 Inmunoensayo de Flujo Lateral¹⁴

1.2.4. Tipos de ensayo de flujo lateral

El LFIA es un ensayo diseñado principalmente para confirmar la presencia o ausencia de un determinado analito en una muestra¹⁵. Sobre la membrana utilizada para el ensayo, se colocaran los receptores específicos contra dicho analito.

1.2.4.1. Ensayos Competitivos

Existen varios formatos de reconocimiento descritos para los LFIA, estos formatos se eligen en función del analito. Cuando el analito es de bajo peso molecular y tiene sólo un epítopo, es decir, es un hapteno, únicamente capaz de unirse a un único anticuerpo específico, el formato se limita a un **ensayo de diseño competitivo**.

A continuación se describe el ensayo, tanto para un resultado positivo, como para uno negativo.

Ensayos competitivos positivos



Los anticuerpo conjugados, se encuentran saturados del antígeno presente en la muestra, lo que impide su unión con los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la línea de test.

Los anticuerpos conjugados, seguirán migrando a través de la tira, hasta quedarse retenidos sobre los anticuerpos inmovilizados de la línea control.

A diferencia de lo que se solía esperar, en un **ensayo competitivo positivo**, la aparición, de una única línea, la línea de control, nos informa de la presencia del antígeno en la muestra.

Ensayos competitivos Negativos:



En el caso del test negativo, el antígeno no está presente en la muestra, lo que permite que el anticuerpo conjugado pueda ser capturado, por los anticuerpos específicos inmovilizados sobre la línea de test. El exceso de este anticuerpo seguirá migrando hasta la línea control, en donde también se retendrá.

Por lo tanto, en un **ensayo competitivo negativo**, observaremos las dos líneas características de un LFIA, tanto la línea control, como la línea test.

1.2.4.2. Ensayos Sándwich

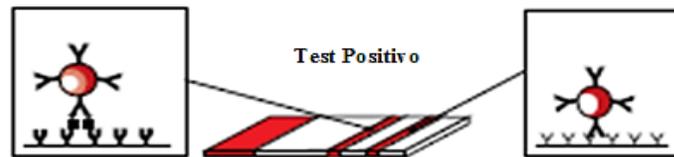
Para los analitos que tienen más de un epítopo, se suele aplicar un formato de ensayo sándwich.

En este formato se prepara la línea de test utilizando un anticuerpo específico del analito inmovilizado sobre la membrana. A continuación, se aplica a esta una disolución que contiene un segundo anticuerpo conjugado (antianalito) y al analito.

El analito en la muestra se unirá inicialmente al segundo anticuerpo y a medida que el flujo avanza por la membrana, uno de sus epítomos libres se une al anticuerpo inmovilizado en la línea de prueba¹⁶.

En este tipo de ensayos se utilizan anticuerpos primarios y secundarios. Los anticuerpos primarios suelen ser los que se inmovilizan sobre un sustrato sólido para capturar el analito. Los anticuerpos secundarios serán los que contienen las marcas que proporcionan la indicación (visual, normalmente), de una reacción de unión entre el analito y anticuerpos primarios

Ensayos Sándwich Positivos:



Si el antígeno está presente en la muestra, se unirá, tanto al anticuerpo conjugado como al anticuerpo de captura inmovilizado sobre la línea test de la membrana

El exceso de anticuerpo conjugado, seguirá migrando a través de la membrana hasta quedar retenido sobre la línea control. Ocurriendo esto, tanto si el antígeno está presente o no.

En este tipo de ensayos, la presencia de dos líneas (control y test) nos informan de que el test realizado es positivo.

Ensayos Sándwich Negativos:



Si el antígeno no está presente en la muestra, el anticuerpo conjugado únicamente será capaz de unirse a los anticuerpos inmovilizados sobre la línea control.

Cuando esto ocurre, estamos ante un test negativo.

1.3. Antígeno Prostático Específico (PSA) como biomarcador de cáncer de próstata

Como se ha indicado anteriormente, en este trabajo se usará un inmunoensayo tipo sándwich para PSA total, como sistema problema modelo para desarrollar un test inmunocromatográfico de utilidad clínica. Se trata de un problema de gran interés, ya que el cáncer de próstata es el segundo cáncer más diagnosticado en los hombres y el quinto cáncer más común en general¹⁷. Además de ser una de las principales causas de mortandad en hombres de entre 55 y 80 años, después del cáncer de pulmón. Esto se debe a que los síntomas aparecen tardíamente, cuando la enfermedad se encuentra ya muy avanzada y no existe una terapia eficaz una vez que ha producido la metástasis.

Por tanto actualmente existe la necesidad de encontrar dispositivos POC fiables para poder realizar la prueba clínica del cáncer, detectando el carcinoma en sus primeras etapas de desarrollo¹⁸. Se ha establecido que la glucoproteína PSA (Prostate Specific Antigen) de aproximadamente 33 kDa¹⁹, es un marcador tumoral de diversos tipos de cáncer²⁰ y especialmente para el cáncer de próstata porque el tejido cancerígeno produce diez veces más PSA que el tejido sano. Su análisis en muestras de suero ha resultado ser la mejor herramienta para el diagnóstico rutinario y monitorización de la enfermedad sobre todo en sus primeras etapas.

Este análisis de PSA permite detectar un mayor número de casos de cáncer que cualquier otro parámetro aislado y es más seguro (especialmente para las primeras etapas de desarrollo) que el procedimiento convencional mediante tacto rectal practicado por los urólogos.

La PSA se encuentra en el suero en forma libre o complejada con inhibidores extracelulares algunos de los cuales son la α 1-antichymotrypsina (ACT), la α -protease inhibitor (API), la proteína C inhibidora (PCI), la α -2-macroglobulina (AMG) o la proteína del embarazo (PZP).

La proporción de los distintos complejos PSA-inhibidor es diferente dependiendo del tipo de fluido biológico que se analice. En suero y sangre aproximadamente el 90% de la forma complejada está unida a α 1-antichymotrypsin (PSA-ACT). Por tanto, se asume que el contenido total de PSA en sangre o suero es la suma de ambas formas de PSA, detectables de manera inmunológica.

Los niveles normales en sangre de PSA total en los varones sanos son muy bajos por debajo de 4 ng/mL. Los valores de referencia para el punto de corte del PSA sérico varían según la raza y la edad del individuo. De esta forma, unos niveles de PSA séricos de 4 ng/mL pueden considerarse elevados en una persona de 50 años y ser normales en una de 80 años²¹. Por ello los urólogos utilizan valores de referencia en función de la edad. Aunque los criterios de referencia están siendo continuamente revisados y actualizados, el protocolo actual se puede resumir a continuación:

Existen tres rangos de concentraciones de PSA total (tPSA) con diferentes riesgos a la hora de establecer la probabilidad de que un paciente tenga cáncer de próstata y la necesidad de realizar una biopsia de próstata para confirmarlo²².

- Para una concentración de tPSA menor de 4 ng/mL se asume que el riesgo de cáncer de próstata es muy bajo.

Sin embargo, recientes resultados recogidos en Estados Unidos muestran que el 22% de los hombres con una concentración en el rango 2,6-4 ng/mL tienen un cáncer de próstata encubierto, la mayoría de los cuales lo tienen localizado en el órgano y, por tanto, curable²³. Estos datos han sido confirmados también por estudios realizados en Europa²⁴.

Basándose en estos estudios y en otros se ha sugerido que la concentración de tPSA se baje a 2,5 ng/ml.

- Si los niveles se encuentran entre 4 y 10 ng/mL, nos encontraríamos en un rango conocido como zona gris de diagnóstico, esto es debido a que entre este rango de concentraciones no podemos obtener una información suficiente de si se trata de un aumento de concentración debido a un cáncer de próstata o a otra patología, como pueden ser por ejemplo, una hipertrofia benigna de próstata (BPH) enfermedad que consiste en el agrandamiento de la próstata, o una prostatitis en donde se produce una inflamación de la glándula prostática, ambas enfermedades no cancerígenas, pero que hacen aumentar la concentración de PSA en sangre. En este caso es necesario detectar la PSA libre (fPSA).
- Si los niveles de PSA son mayores de 10ng/mL, la posibilidad de padecer un cáncer de próstata es del 70% y aumenta conforme los niveles de PSA se incrementan²⁵. Obteniéndose concentraciones mayores de PSA en el plasma, de manera proporcional al aumento de la masa tumoral presente. En estos casos es recomendable llevar a cabo una biopsia de próstata para confirmar el diagnóstico.

El protocolo seguido actualmente en los hospitales de Asturias recomienda hacer un cribado de las muestras con una concentración de PSA total por encima de 4 ng/mL. En estos casos, se deberá cuantificar la PSA libre (presente en la sangre sin uniones proteicas) y estudiar la relación de sus concentraciones. El riesgo de padecer cáncer de próstata aumenta a medida que la relación entre PSA libre y PSA total es menor al 25%. Por tanto, un dispositivo barato, portátil y de fácil uso permitiría el cribado inicial de muestras de individuos sanos, lo que supondría ya de por sí un gran ahorro para el sistema nacional de salud.

1.4. Ensayos para PSAtotal

El primer inmunoensayo para PSA, era un ensayo de tipo sándwich ligado a enzimas (ELISA)²⁶. En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de inmunoensayos diferentes para la detección de PSA, basados en diferentes protocolos de detección^{27,28}, así como otros inmunoensayos basados en Microscopia de Fluorescencia, Espectroscopia por resonancia de plasmones superficiales (SPR) o Espectrometría Raman de superficie mejorada (SERS)^{29,30,31}. También se han desarrollado inmunosensores con transducción óptica^{32,33,34} electroquímica^{35,36,37,38} y piezoeléctrica^{39,40,41}.

Cabe destacar dentro de los inmunoensayos para la detección de PSA, el gran desarrollo que están teniendo los basados en membranas inmunocromatograficas, o inmunoensayos de flujo lateral con detección capacitativa, colorimétrica o electroquímica^{47,42, 43}. En este trabajo nos hemos centrado en los LFIA de detección colorimétrica.

En la Tabla 4 se muestra un resumen de las características que presentan los diferentes ensayos utilizados para la determinación de PSA, desde el punto de vista del lugar de realización y el tipo de usuario.

Tabla 4 Características de los ensayos para PSA total

Ensayo	Realización	Manejo
Inmunoensayos PSA	Laboratorio central	Personal Especializado
Inmunosensores PSA	Uso descentralizado, lugar cercano al paciente	Personal Especializado
Inmunoensayo de Flujo lateral	Uso descentralizado, lugar cercano al paciente	Cualquier persona

El inmunoensayo de flujo lateral, presenta las mejores características en cuento a los requisitos que deben cumplir los dispositivos de diagnóstico POC, ya que son portátiles y se adaptan a la necesidad de un perfil de usuario no especializado en el análisis.

Aunque este inmunoensayo es el mejor desde este punto de vista, también presenta algunas limitaciones. Algunas de ellas quedan recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5 Ventajas e inconvenientes de los inmunoensayos de Flujo lateral (LFIA)

Ventajas	Inconvenientes
Ensayo de una etapa, sin etapa de lavado	Sin etapa de lavado posible
Rápido, de bajo coste y bajo volumen de muestra	Resultados cualitativos o semicuantitativos
Reducción del tiempo ensayo	La respuesta se correlaciona negativamente con la concentración en formato competitivo
Procedimiento de prueba simple	Volumen de la muestra imprecisa, reduce la precisión
Sensible para las proteínas, haptenos y ácidos nucleicos	Formato de un solo paso sin posibilidad de mejorar la respuesta de la enzima
Aplicaciones en POC , Formato versátil	Obliga a una buena preparación del anticuerpo o secuencia de hibridación de ácido nucleico
Vida útil prolongada y sin la necesidad de refrigerar, los lotes más grandes se puede preparar con antelación	Obstrucción de los poros debido a componentes de la matriz
A menudo no es necesario el pretratamiento de la muestra si se trata de un fluido	Tratamiento previo de la muestra obligatorio cuando la muestra no es un fluido
Respuesta cualitativa o semicuantitativo	Necesidad de hacer ensayos cuantitativos

2. OBJETIVOS

Este trabajo fin de master representa los **primeros pasos** en el grupo de investigación de Inmuno electroanálisis en el inicio de una nueva línea de investigación centrada en el **desarrollo de dispositivos basados en inmunocromatografía o inmunoensayos de flujo lateral**. Por tanto, el **objetivo principal** es **formarse en la metodología que se sigue en el desarrollo de estos test**.

Como **sistema modelo** se ha elegido el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral para la **detección de PSA total**. Se trata de un problema clínico apropiado, ya que requiere el cribado por encima de un valor de corte. Además el grupo tiene experiencia previa en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para este biomarcador, y la disponibilidad de anticuerpos estaba garantizada. También permite explorar las posibilidades de multidetección, usando un diseño de inmunoensayo que permita diferenciar PSA libre y total.

Como **objetivos específicos** se han fijado los siguientes:

1. **Diseñar un inmunoensayo para PSA total y acoplar distintos materiales y reactivos** para formar una tira de papel que permita la **detección visual** del inmunoensayo en un tiempo adecuado.
2. Fijar un **sistema de control** que asegure el buen funcionamiento del test.
3. **Desarrollar un protocolo básico** para la preparación de las tiras de inmunoensayos de flujo lateral.
4. Explorar **estrategias de mejora de la sensibilidad**.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y Reactivos

3.1.1. *Materiales generales*

- ✓ Vasos de precipitados de 100 ml
- ✓ Matraces aforados de 100, 50 y 25 ml
- ✓ Placas Petri

3.1.2. *Materiales adicionales*

- ✓ Micropipetas de volumen máximo 1, 10, 100 y 1000 μl
- ✓ Membranas de nitrocelulosa de tamaño de poro 5,8,10 y 15 μm procedentes de mdi (Advanced Microdevices, India)

Las características de estas membranas se muestran en la tabla 6

Tabla 6 Características de las membranas

	5 μm	8 μm	10 μm	15 μm
<i>Grosor (μm)</i>	98	110	101	104
<i>Punto de burbuja* (<i>psi</i>)</i>	14,5	9,4	6,7	5,4
<i>Unión de proteína ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>(Albúmina de suero bovino ,BSA pH7)</i>	48,4	47,0	44,8	43,0
<i>Velocidad de absorción para 2,5 cm de distancia (s)</i>	76	54	46	36

*Presión necesaria para forzar a pasar el aire a través de una membrana húmeda.

- ✓ Almohadillas de fibra de vidrio (GFB-R4(0,35) y GFB-R7L(0,6)) procedente de mdi
- ✓ Almohadilla de Poliester (PTR-5) procedente de mdi
- ✓ Almohadilla absorbente de fibra de vidrio (MT1-MT2) procedente de mdi
- ✓ Placas Petri de plástico
- ✓ Tubos Eppendorf
- ✓ Papel cromatografico (10x30cm) (Whatman 1)
- ✓ Guillotina para cortar papel

3.1.3. *Reactivos y Disoluciones*

- ✓ Ácido Bórico (*Sigma, España*)
- ✓ Cloruro de Sodio (*Merck, Alemania*)
- ✓ D(+)- Sacarosa (*Vwr, Prolabo, Belgica*)
- ✓ Tiosulfato de sodio (*Probus-Vwr, España*)
- ✓ Trisodio citrato dihidratado (*Merck, Alemania*)
- ✓ Hidroquinona (*Sigma, España*)
- ✓ Nitrato de Plata (*Merck, Alemania*)
- ✓ Suero de Albumina Bovina (*Sigma, España*)
- ✓ Oro coloidal de 80, 40 y 20 nm (*BB international, UK*)
- ✓ Metanol (*Emsure, Merck, Alemania*)
- ✓ Acido orto-fosfórico 85% (*Vwr, Prolabo, Belgica*)
- ✓ Disolución reguladora de Boratos 10mM, 10% Sacarosa, pH= 7,4
- ✓ Disolución reguladora de Fosfatos (PBS) 10mM, pH 7,4
- ✓ Disolución reguladora de Fosfatos (PBS) 10mM, 3% Metanol, pH= 7,2
- ✓ Disolución reguladora de Citrato 0,5M, 3% Hidroquinona, pH=4
- ✓ Las disoluciones acuosas han sido preparadas con agua desionizada (Milli-Q)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de captura (Anti-Psa^l) (HS-5) (*Healthsens, España*)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de detección (Anti-Psa^t y Anti-Psa^f) (HS-8) (*Healthsens, España*)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de ratón IgG de control (*Sigma, España*)
- ✓ Muestra patrón PSA total humana, 1.100ng/ml, alícuotas en el congelador de 20 µl en disolución de 0,1 M Tris-HNO₃ pH=7,2

3.1.4. *Observaciones*

➤ **Nitrato de Plata:**

Las disoluciones de plata, deben mantenerse tapadas, ya que son sensibles a la luz. Por esta razón, es conveniente preparar una disolución nueva, cada vez que se quiera realizar el ensayo.

Estas precauciones, deben tenerse en cuenta en todos los ensayos en los que utilizemos disoluciones de plata

➤ **BSA:**

Preparar la disolución cada día, ya que la albumina de suero bovino es una proteína que se degrada rápidamente, perdiendo sus propiedades.

➤ **Oro Coloidal:**

Mantener la disolución en un lugar frío, evitando los cambios bruscos de temperatura, ya que pueden dar lugar a la precipitación o aglutinación de las partículas de oro coloidal.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Diseño del inmunoensayo

La Figura 5 muestra las posibilidades de selección de anticuerpos a la hora de diseñar un inmunoensayo para PSA.

El anticuerpo monoclonal anti-PSA total (HS-5) se usará como anticuerpo de captura, inmovilizado en la zona test de la membrana. El formato de ensayo competitivo es empleado normalmente sólo en el caso de analitos con un peso molecular bajo o que presenten un solo determinante antigénico. En este trabajo se realizará un ensayo tipo sándwich (no competitivo) usando también el anticuerpo monoclonal HS-8. Este anticuerpo (de revelado o de detección) está dirigido contra epítomos que están libres tanto en la PSA que circula libre como en la PSA que circula complejada. Estos reactivos corresponderían a los anticuerpos negro y azul en el esquema de la Figura 5). Este sería por tanto el diseño adecuado para extender el ensayo en un trabajo futuro a la determinación de las dos especies: PSA libre y total. En este último caso, habría una segunda zona de captura formada por un segundo anticuerpo de captura (anti-PSA libre, de color verde en la Figura 5). Para obtener una señal colorada correspondiente que confirme la presencia de analito, este anticuerpo se conjuga con oro coloidal.

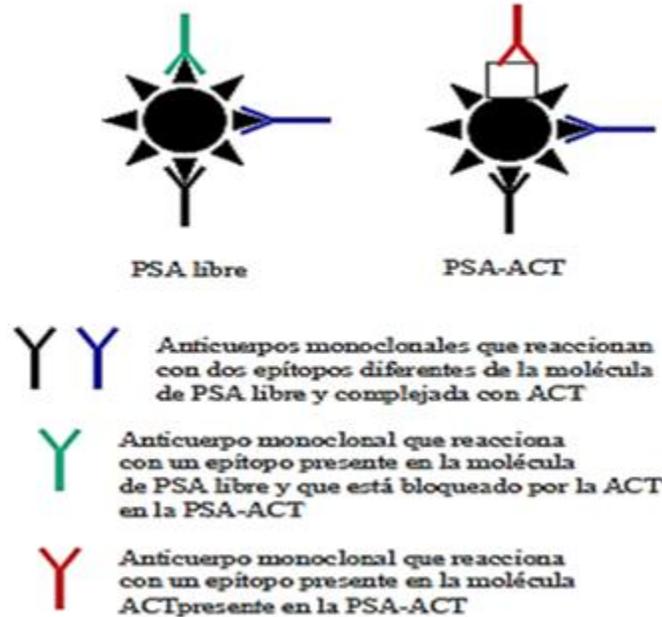


Figura 5 Esquema de las distintas posibilidades de enlace con anticuerpos de la molécula de PSA

4.2. Selección de los Materiales y Optimización del flujo

La tira de ensayo a la que acoplaremos el inmunoensayo consta de cuatro partes principales: zona de aplicación de la muestra, zona de inmovilización del anticuerpo conjugado, membrana y zona absorbente. Cada una de ellas se diseña utilizando un material laminado, de naturaleza diferente según la aplicación. Exceptuando la zona de membrana, donde se desarrolla un color cuando se inmoviliza alguna especie (sándwich o anticuerpo) marcada con alguna partícula coloreada, las demás zonas tienen la misión de absorber líquidos. Por ello, en la bibliografía inglesa se designan con la palabra “*pad*”, que en español se puede traducir como almohadilla o cojinetes. Se disponen normalmente como se muestra en la Figura 6.

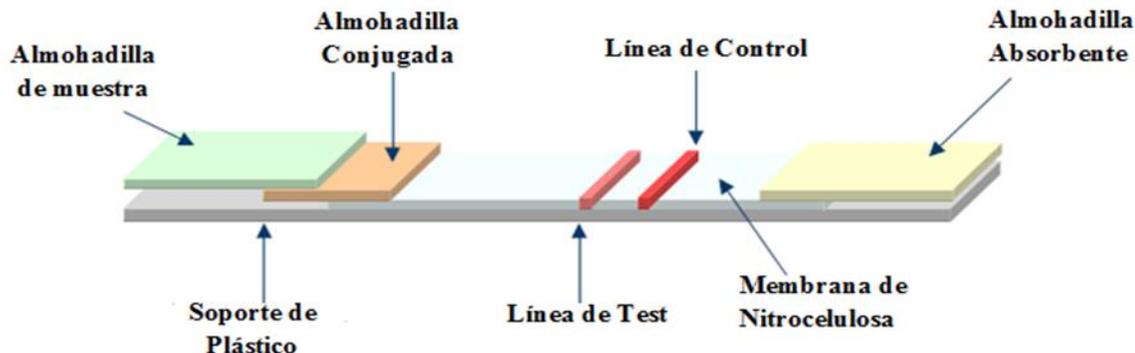


Figura 6 Tira de ensayo

4.2.1. *Selección de la membrana*

La membrana ocupa probablemente el papel más importante dentro del inmunoensayo. Los factores más importantes a la hora de seleccionar la membrana son los siguientes:

- Tipo de membrana
- Velocidad de flujo capilar y tiempo de flujo capilar.
- Tamaño de poro

Tipo de membrana. El nivel de unión de las proteínas puede variar considerablemente entre diferentes tipos de membranas. Su capacidad de captura depende de su área superficial, que es función del tamaño de poro, la porosidad, el grosor, etc. Normalmente las membranas que se usan para inmovilizar y retener anticuerpos son de materiales

hidrofóbicos, como nitrocelulosa. En todo caso, la membrana debe proporcionar suficiente unión irreversible de las proteínas para permitir visualizar una mancha colorada de con la suficiente intensidad y de forma clara y aguda en las zonas test y de control, pero al mismo tiempo, el nivel de interacción no específica debe ser bajo para poder interpretar mejor los resultados.

En función de su naturaleza los materiales más usados son:

- *Nitrocelulosa* (alta capacidad de unión de proteína).
- *Acetato de celulosa* (baja capacidad de unión de proteína)
- *Fibra de vidrio* (no permite unión de proteína)

Otros polímeros que se están introduciendo en el mercado son fluoruro de polivinilideno y polietersulfona para unión hidrofóbica de proteínas, o nylon modificado para uniones electrostáticas iónicas. Aunque en algún caso se ha usado también una modificación de membranas de polietileno, que muestran propiedades hidrofílicas y alta capacidad de unión de proteína bajo ciertas condiciones experimentales⁴³. En este trabajo nos hemos basado en la tendencia más general en la bibliografía, y hemos escogido membranas de nitrocelulosa^{44,45,46}. En ellas la captura de proteínas es debida a interacción electrostática⁴⁷ entre los grupos polares que se muestran en la Figura 7.

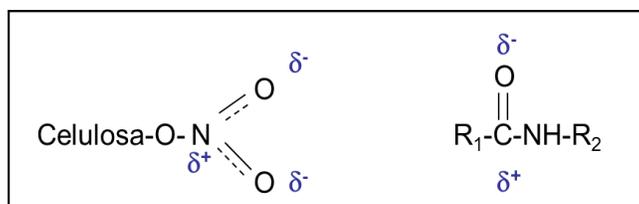


Figura 7 Grupos polares de la nitrocelulosa y las proteínas

Velocidad de Flujo capilar. Es la velocidad a la que se mueve el frente de flujo cuando se aplica líquido en un extremo. Es difícil de medir porque disminuye exponencialmente a medida que el líquido avanza. En la mayoría de los casos no se puede usar la mayor velocidad de flujo capilar porque implica una pérdida de sensibilidad, que a veces puede ser recuperada aumentando el reactivo de detección y el reactivo de captura, pero implica un mayor coste, mayores señales de fondo y pérdida de especificidad.

La mayor parte de los fabricantes no facilitan este dato, pero se puede estimar a partir del **tiempo de flujo capilar**. Este es el tiempo que se requiere para que el líquido recorra una determinada longitud de membrana. Se mide en *s/cm* y es inversamente proporcional a velocidad de flujo capilar.

Tamaño de poro. Se define como el diámetro del poro de mayor tamaño en la dirección de filtración, es decir, a través del plano de la membrana. En controles de calidad rutinarios, se mide como el punto de burbuja: la presión requerida para forzar el paso de aire a través de una membrana húmeda. Por tanto, a medida que aumenta el tamaño, disminuye el punto de burbuja, pero no se puede establecer una relación lineal. En este razonamiento hay que tener en cuenta también que el dato proporcionado por el fabricante correspondiente al tamaño de poro no da una idea de la distribución de tamaños, y está más relacionado con la proporción de poros de mayor tamaño.

Con estos criterios, y según información del fabricante, las membranas con tamaños de poro seleccionadas (5, 8, 10 y 15 μm) permiten abarcar el rango más corriente de velocidades de flujo utilizados en el desarrollo de estos inmunoensayos, por lo que no se probaron otros materiales.

De los datos de la Tabla 7, se puede deducir que los tiempos de flujo capilar correspondientes son:

Tabla 7 Tamaño de poro de la membrana y tiempo de flujo capilar

<i>Tamaño de poro (μm)</i>	5	8	10	15
<i>Tiempo de flujo capilar (s/cm)</i>	30,4	21,6	18,4	14,4

Por tanto, la menor velocidad de flujo corresponde a la membrana de 5 μm , y la mayor a la de 15. Por lo tanto, la porosidad servirá para controlar la velocidad de flujo, que a su vez es crítica para diseñar con éxito el dispositivo de diagnóstico.

Empíricamente se ha determinado que la cantidad de analito efectiva en la muestra es inversamente proporcional al cuadrado de la velocidad de flujo. En un inmunoensayo de flujo lateral, sólo hay flujo en una dirección. Por tanto, si el antígeno pasa de largo la zona donde se encuentra inmovilizado el anticuerpo de captura, ya no se podrá enlazar. Como consecuencia, la concentración efectiva de Ag disminuye cuando aumenta el cuadrado de la velocidad de flujo, porque se disminuye el tiempo de contacto entre las dos especies que deben reaccionar en la zona de captura.

La cantidad de complejo formado, R se puede expresar como:

$$R = k [Ac] [Ag]$$

Ecuación 1

Siendo **k** una constante relacionada con la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Esta expresión indica que **R** (y por tanto la sensibilidad) será mayor cuanto mayor sea **k**, y las concentraciones de anticuerpo de captura y antígeno.

Por otro lado, la velocidad de flujo capilar se puede controlar mediante la distancia en la que se aplica la línea test, ya que disminuye cuando aumenta la distancia del frente de la muestra desde el punto de aplicación. Cuanto más alejada esté, menor será la velocidad de flujo, y la concentración efectiva de analito mayor, con lo que habrá más sensibilidad, pero el análisis requerirá más tiempo. Se debe buscar un compromiso entre esta distancia y el tiempo requerido para el análisis. En este trabajo se decidió aplicar el anticuerpo de captura siempre a la misma distancia (0,7 mm desde la zona del conjugado), y estudiar el efecto de la velocidad de flujo mediante la porosidad.

Otro aspecto a tener en cuenta respecto a cómo afecta la que la velocidad de flujo a la detectabilidad está relacionada con la facilidad con la que se extiende el líquido por la membrana. Por tanto, cuando se usan membranas de velocidad de flujo alta, la señal se expande sobre un área más ancha, lo que hace que la señal se visualice peor. En este trabajo se observó también el efecto de la velocidad de flujo en la detectabilidad y los resultados se discutirán posteriormente en la sección 4.3.5 y 4.6.

Las membranas seleccionadas son suministradas con una película polimérica de soporte en uno de los lados (trasero), lo que le da rigidez mecánica y evita la contaminación con otros reactivos con los que pudiera entrar en contacto durante su uso o preparación

4.2.2. Almohadilla de muestras o “Sample pad”

El test se inicia por absorción de la muestra en esta almohadilla y continúa transportándola a través de los puntos de aplicación de los reactivos correspondientes.

Es importante que no haya retención de material proteico en este punto, y por tanto en este trabajo se seleccionaron materiales de fibra de vidrio para este componente, al igual que en otros trabajos de la bibliografía. Su misión más importante es controlar la distribución uniforme de la muestra a través de la almohadilla conjugada, o “*conjugate pad*”. También se encarga de controlar la velocidad a la cual entra el líquido en el dispositivo, evitando así su colapso. Para ello se selecciona el material óptimo atendiendo a su **volumen muerto**. De acuerdo a este dato, proporcionado por el fabricante, se calculó la cantidad de muestra a utilizar tomando como referencia un tamaño de almohadilla en forma de rectángulo, de 0,5 cm x 2,5 cm. El área de esta pieza, cortada con guillotina para controlar de forma reproducible las dimensiones, es de 1,25 cm².

Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8 Volumen de muestra a aplicar sobre la almohadilla de muestra

Material	Volumen muerto ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)	Área (cm^2)	Volumen de muestra a aplicar (μl)
GFB-R4(0,35)	34,6	1,25	43,25
GFB-R7L(0,6)	53,8	1,25	67,25

Se seleccionó el material de referencia GFB-R4(0,35) porque permite trabajar con un volumen de muestra menor. Se redondeó a 50 μl de muestra, y se comprobó que efectivamente, volúmenes mayores hacían que se perdiera muestra por los extremos del punto de aplicación.

Esta almohadilla de muestra o “*Sample pad*” se puede utilizar también para realizar múltiples tareas relacionadas con algún tipo de tratamiento de muestra. Por ejemplo, cuándo se encuentra impregnada con componentes tales como proteínas (como la albúmina), detergentes o tensoactivos (como SDS o Tween 20 en una concentración muy baja), potenciadores de la viscosidad, y sales tampón, puede ayudar a aumentar la viscosidad de la muestra, mejorar la capacidad de la muestra para solubilizar al reactivo de detección, evitar que el conjugado y el analito se unan de manera inespecífica a cualquiera de los materiales intermedios, que no sean ni la línea de control ni la de test e incluso, modificar la naturaleza química de la muestra de modo que sea compatible con la formación de inmunocomplejos en la línea de test y en la línea de control.

4.2.3. Almohadilla conjugada o “Conjugate Pad”

La almohadilla conjugada puede realizar múltiples tareas, la más importante, es la transferencia uniforme del reactivo de detección y de la muestra sobre la membrana. En general se debe buscar un material que permita que el anticuerpo conjugado se seque sin que se dañe, y que se libere rápidamente cuando la muestra se ponga en contacto con él (naturaleza hidrofílica).

Para que una almohadilla conjugada sea ideal, debe poseer los siguientes puntos:

- Baja interacción inespecífica. Ya que si el reactivo de detección o analito se une a la almohadilla conjugada, no estará disponible para formar el complejo inmunológico en la línea test, por lo tanto se produciría una reducción de la señal y de la sensibilidad.

- Flujo constante. El material se debe depositar en la membrana uniformemente para que no aparezcan roturas en las líneas de test y control al producirse una alteración en el flujo que pueda provocar una canalización del mismo.
- Volumen muerto constante. La cantidad de reactivo de detección que se añade a la almohadilla conjugada, depende del volumen muerto de esta. Si este varia puede variar la intensidad de la señal, aunque el resto de reactivos este en la misma cantidad.
- Baja cantidad de contaminación o componentes que puedan pasar a la membrana a través del fluido.
- Buena manejabilidad y capacidad de compresión.

A la hora de calcular la cantidad de reactivo de detección que debe poseer la almohadilla conjugada debemos tener en cuenta 3 consideraciones importantes:

1. La cantidad de reactivo debe ser la suficiente como para unirse a la línea test y existir en exceso para unirse a la línea control.
2. Se debe tener en cuenta el tamaño de oro coloidal al cual se une el reactivo de detección realizando antes previamente una optimización de su conjugación.
3. La concentración de reactivo de detección se calcula a partir de la cantidad de reactivos de captura que se encuentran en la línea test

La almohadilla que vamos a utilizar durante el proyecto es de poliéster, y al igual que hicimos con la almohadilla de muestra, con la almohadilla conjugada también podemos calcular la cantidad de reactivo de detección que es capaz de soportar, para además cumplir con las consideraciones anteriormente citadas.

Para ello necesitamos de nuevo, el volumen muerto de la almohadilla utilizada (en nuestro caso es de 21,2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) y las dimensiones que vamos a utilizar (0.5x0.5cm).

Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9 Volumen de anticuerpo conjugado a aplicar sobre la almohadilla conjugada

Material	Volumen muerto ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)	Área (cm^2)	Volumen de muestra a aplicar (μl)
PTR-5	21,2	0,25	5,3

Con todo esto, podemos realizar la aproximación a un volumen añadido de muestra de 5 μl . Para mejorar el rendimiento de la carga, la almohadilla conjugada debe secarse tan

rápidamente como sea posible, sin dañar el anticuerpo inmovilizado sobre ella. El secado debe hacerse rápido para minimizar la migración de las partículas en la matriz, ya que al no estar adsorbidas a la superficie de la almohadilla no hay fuerzas que las mantengan en su sitio, de modo que si el líquido se mueve, las partículas también tenderán a moverse. Además el material utilizado debe ser hidrofílico, con una estructura abierta que permita la rápida penetración de la muestra a su través.

Las opciones de secado pueden ser:

Secado al aire: solo debe ser utilizado con fines de I+D, no de producción a no ser que se realice en una sala con humedad controlada <15%. El secado al aire no debe considerarse completo ya que no logra evaporar el agua complejada con los azúcares y biomoléculas, pudiendo alterar la estabilidad a largo plazo.

37°C 1 hora: al aplicar calor durante el proceso de secado se ayuda a eliminar el agua complejada. Esta opción es válida para la mayoría de las aplicaciones, aunque ciertas biomoléculas pueden ser termolábiles y no resistir esta incubación.

Liofilización: aumenta la velocidad de evaporación, pero la congelación puede dañar la estructura de las partículas.

Secado a vacío: aumenta la velocidad de evaporación sin los efectos perjudiciales del liofilizado. Solo se requiere una bomba de vacío y una cámara de vacío

Una vez seco, debe almacenarse entre 4-20°C y con una humedad relativa < 15% para evitar que se adsorba humedad, lo que puede retrasar la resolubilización de las partículas. En este trabajo hemos elegido el secado en estufa (37°C, 1h), y el material seco se conservó siempre en placas Petri con gel de sílice para controlar el grado de humedad.

4.2.4. Almohadilla Absorbente o “Absorbent Pad”

Las almohadillas absorbentes se colocan en el extremo distal de la tira de ensayo.

Para esta almohadilla, se elige un material hidrofílico como la fibra de vidrio, al igual que el empleado en la almohadilla de muestra.

Su función es la de aumentar la cantidad de muestra que entra en la tira, dando lugar a un efecto de desagüe. Este aumento de volumen puede ser utilizado para lavar las partículas de reactivo de detección que no se ha unido a las líneas de control y test, con lo que reduce la señal visual de fondo. Por otro lado, evita el retroceso del líquido hacia la membrana, por lo que su capacidad de absorción debe ser mayor que el volumen de muestra empleado durante el ensayo.

En este trabajo, se seleccionó un material similar al usado en la almohadilla de muestra, cortándose un área de dimensiones aproximadas.

4.2.5. Disolución de Arrastre

Para poder elegir la disolución de arrastre más adecuada a la hora de trabajar, debemos tener en cuenta varios puntos, ya que dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar, algunos medios pueden ser mejores que otros. Se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- **pH:** Usar un buffer de pH 7 – 7.5 puede servir en la mayor parte de los casos, debido a que la mayoría de los anticuerpos tiene un pI entre 5.5 y 7.5. El hecho de utilizar un pH próximo a 7, hace que la solubilidad del reactivo disminuya, consiguiendo que se adsorba mejor sobre la membrana (ya que la membrana es hidrofóbica y la adsorción se realiza por fuerzas electrostáticas).
- **Alcohol:** Por otro lado, las ventajas de añadir una pequeña cantidad (1% - 10% v/v) de alcohol (IPA, EtOH, MeOH) como aditivo, proporciona una mejora de la consistencia disminuyendo la viscosidad y la tensión superficial y favoreciendo la entrada del líquido en la membrana. Además disminuye la repulsión electrostática y la solubilidad de las proteínas sin desnaturalizarlas o precipitarlas mejorando la adsorción en la membrana, al mismo tiempo que mejora el secado y fija la proteína.
- **Fuerza Iónica:** La solubilidad de una proteína típica aumenta en proporción directa con el contenido de sal del tampón de aplicación. Debido a que es deseable minimizar la estabilidad molecular de una proteína de captura en solución, la fuerza iónica de la solución deberá mantenerse tan bajo como sea posible.

Basándonos en la bibliografía y las características anteriormente citadas se ha seleccionado como disolución de arrastre durante todo el procedimiento, una reguladora de fosfatos, la cual se irá modificando de acuerdo a lo observado experimentalmente.

- ✓ Por un lado, inicialmente usamos una reguladora de fosfatos (PBS) 10mM de pH= 7,4.
- ✓ Con el fin de obtener mejores resultados, probamos a utilizar una reguladora de fosfatos (PBS) 10mM de pH= 7,2 + 3% MeOH

4.2.6. Selección de la marca para la señal visual

A la hora de seleccionar la marca ideal utilizada para los inmunoensayos de flujo lateral se deben tener en cuenta las siguientes características:

1. La capacidad de detección en múltiples métodos o tecnologías
2. El proceso químico empleado para la conjugación debe ser simple, para que los productos biológicos y químicos pueden conjugarse sin pérdida en su actividad.
3. De baja o ninguna unión no específica.
4. Estable en diversas condiciones químicas y de temperatura.

Las **partículas de látex**, son las primeras marcas que se utilizan en el inmunoensayo de flujo lateral, y se siguen manteniendo actualmente, debido a su versatilidad y bajo coste.

A estas partículas se les puede incorporar tintes de color y fluorescentes a través de una conjugación simple la cual consiste en una adsorción simple y acoplamiento covalente a través de los grupos amino, carboxilo, y grupos tiol.

Una gran ventaja que presentan las partículas de látex es que pueden ser fabricadas para incorporar varias características, haciéndolas susceptibles de detección por múltiples métodos (por ejemplo, partículas paramagnéticas que son fluorescentes y también de color).

El uso de **partículas coloidales de carbono** se considera uno de los métodos de marcaje más usados en inmunoensayos de flujo lateral ya que posee ventajas como, una buena estabilidad y alto contraste de color en una membrana, es bastante fácil de conjugar y económico (un bote de partículas de carbono tiene una duración de millones de ensayos).

En la actualidad, existen sólo unos pocos vendedores de partículas de carbono ya que el uso de carbono coloidal para ensayos de flujo lateral requiere un acuerdo de uso lo que lo hace menos atractivo que otras formas de marcaje. Además la conjugación de las proteínas sobre el carbono coloidal puede llevar un tiempo largo, de una o varias horas.

Las **marcas enzimáticas**, de uso tradicional, se han descartado porque implican añadir etapas de incubación con un sustrato para desarrollar un producto coloreado, lo que añadiría complejidad al ensayo.

El **Oro coloidal** es quizás la marca más utilizada hoy en día en los inmunoensayos de flujo lateral comerciales por muchas razones⁴⁸. Es bastante fácil de utilizar y de bajo coste, incluso se puede preparar en el laboratorio. El color es intenso, y no es necesario ningún proceso de desarrollo para la visualización.

Existen una gran variedad de protocolos en la bibliografía para su conjugación y aplicaciones.

Como marcador es muy estable, tanto en forma líquida o sólida y mantiene su color una vez que se ha teñido la membrana. Además, el oro coloidal en forma no conjugada y conjugada, se encuentran disponibles fácilmente para su comercialización.

A la vista de las grandes ventajas que aporta el oro coloidal, se decidió trabajar con estas partículas como marcador durante todo el proyecto.

4.3. Protocolo de Ensayo

Consultando diferente material bibliográfico, se ha llegado a desarrollar un protocolo de ensayo, el cual se pondrá en práctica tanto para construir la tira de ensayo, como para iniciar el ensayo.

Dicho protocolo ha sido elaborado teniendo en cuenta las características citadas anteriormente para la selección de los materiales.

4.3.1. *Preparación de Tiras de Ensayo.*

1. El primer paso que se debe hacer, es fijar los anticuerpos que constituirán los puntos de control y test sobre la tira.

La línea test, es conocida como la zona de captura. En esta zona es donde se une el complejo analito-anticuerpo-conjugado a los anticuerpos inmovilizados sobre la tira de ensayo, dando lugar a una línea o punto visible.

Pasado este punto, el exceso de complejo analito-anticuerpo-conjugado seguirá migrando hasta llegar a la zona de control, en donde se unirá a un segundo anticuerpo, conocido como anticuerpo de control, dando lugar a una segunda línea o punto visible en la membrana.

La existencia de estas dos líneas nos indica que el resultado del test realizado ha sido positivo y una sola línea, más concretamente, la de control, que el resultado ha sido negativo.

Para mejorar la sensibilidad, la línea test se coloca lo más lejos posible del origen, donde al ser menor la velocidad de flujo capilar la concentración de analito efectiva será mayor. Esto es debido a que cuanto menor sea la velocidad, mayor será el tiempo de flujo capilar cuando alcance la línea test, y por lo tanto mayor habrá sido el tiempo de contacto entre el analito presente en la muestra y el reactivo de detección.

Para fijar el punto de control utilizaremos anti-IgG de ratón, el cual es compatible con el anticuerpo de detección que vamos a utilizar, también desarrollado en ratón. Para la línea test, hemos usado anti-PSA^t (anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón).

En los procedimientos comerciales la deposición de los anticuerpos sobre la membrana se consigue usando un dispositivo dosificador para trazar las líneas una vez desarrollado el test.

Para iniciar el desarrollo, hemos considerado que en nuestro caso sería más apropiado usar alícuotas tomadas con una micropipeta, ya que permite dosificar mejor el reactivo, y es más sencillo de manejar.

En ambos casos, la inmovilización sobre la membrana se realizará, adicionando 0,5 µl de cada uno a la membrana tal y como se muestra en la Figura 8. Este volumen es lo suficientemente grande como para obtenerse una señal en forma de pequeños círculos fácilmente apreciable visualmente y lo suficientemente pequeño para no gastar en exceso ambos anticuerpos.

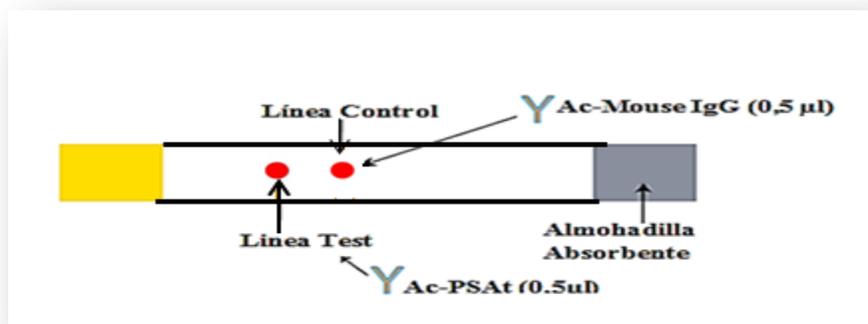


Figura 8 Inmovilización del anticuerpo puntos Test y Control

2. Una vez fijados los anticuerpos se deja secar la tira durante aproximadamente una hora a 37°C en una estufa, consiguiendo de esta manera evaporar el disolvente en el cual se encontraban disueltos y fijarlos directamente sobre la membrana para realizar el posterior ensayo.
3. Cuando la tira se encuentre totalmente seca, la bloqueamos con una disolución de Albumina de suero bovino (BSA) al 1%, sumergiéndola aproximadamente 15 minutos. De esta manera se evita la adsorción inespecífica que dificulta la visualización del resultado del ensayo.
Pasado este tiempo, lavamos la tira introduciéndola esta vez en una disolución reguladora de fosfatos (PBS 10mM y pH= 7,4), durante aproximadamente 3-5 minutos.
El motivo de realizar esta etapa de lavado, es prevenir que el exceso de bloqueante al secar cristalice y obstruya los poros.
Por último se deja secar de nuevo la tira durante una hora o más a 37°C, hasta que esta esté totalmente seca, ya que si la tira se encuentra húmeda, puede interferir a la hora de realizar el ensayo.
4. Una vez que la tira está seca, procedemos a su montaje: inicialmente se pega la almohadilla conjugada, la almohadilla de muestra y la almohadilla absorbente superponiéndose aproximadamente 1mm sobre la tira, tal y como se muestra en la Figura 6.

Una vez que la tira está montada, podemos iniciar nuestro ensayo:

5. Inicialmente, acondicionamos la tira añadiendo aproximadamente 20 µl de reguladora sobre la almohadilla de muestra.
Tras esta primera adición, añadimos 50µl de muestra la cual empezará a fluir a través de la tira.
6. En la almohadilla conjugada añadimos aproximadamente 5µl de la disolución de anti-PSA de detección conjugado con el oro coloidal (Au-Ac*).

El procedimiento de estabilización y conjugación del anticuerpo con el oro coloidal se describe en la siguiente sección.

Nota:

Este paso se puede hacer de dos maneras:

a) Adicionando directamente 5µl de disolución conjugada sobre la almohadilla

b) Sumergiendo la almohadilla en la disolución y dejando secar está en la estufa 30 min aproximadamente a 37°C

7. Por ultimo adicionaremos a la almohadilla de muestra 50µl de reguladora, para ayudar a arrastrar la disolución de muestra y anticuerpo conjugado.
8. A medida que el Au-Ac* avanza, irán apareciendo las líneas o puntos de detección y control.
9. Una vez terminado en el ensayo las tiras se dejan secar a temperatura ambiente dentro de una placa Petri de plástico, en las que, junto a las tiras introduciremos unas pequeñas bolsas de gel de sílice para controlar la humedad.

4.3.2. Estabilización del oro coloidal

Hoy en día, el material más utilizado como marcador del anticuerpo de detección en inmunoensayos de flujo lateral, es el oro coloidal^{49,50,51,52}

Un requisito indispensable antes de empezar a trabajar con dicho oro coloidal como marcador, es controlar su estabilidad en disolución, ya que, una suspensión estable asegura una distribución uniforme del conjugado en la preparación de la almohadilla conjugada.

El tamaño de las nanopartículas de oro puede ser controlado durante su fabricación. Existen varias publicaciones^{53,54} en las cuales se muestra que la sensibilidad del ensayo, era mayor a mayor tamaño de partícula utilizada, sin embargo, la estabilidad del coloide iba disminuyendo con partículas mayores de 40nm.

Durante este proyecto se ha realizado un estudio de la estabilidad de la conjugación del oro coloidal de diferentes tamaños con el anticuerpo-PSA de detección. Dispondremos de tamaños de oro de 20,40 y 80nm, por considerarse los tamaños de partícula más usados en diferentes protocolos de ensayos.

Antes de realizar la conjugación Au-Ac necesitamos determinar la mínima concentración de anticuerpo que estabiliza al oro.

Para ello preparamos en diferentes tubos eppendorffs las siguientes disoluciones:

- ✓ 250µl de Au y añadimos sobre ellos gota a gota 20µl de una disolución de Ac de detección de concentración creciente: 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25 mg/ml.
- ✓ Esta disolución se dejara reaccionar durante aproximadamente 5 minutos, y a continuación añadimos 100 µl de una disolución al 10% de NaCl.

Al añadir esta disolución se observara un cambio de color desde **azul**, que nos indica que el **oro no está estabilizado y da lugar a agregaciones de mayor tamaño**, a **rojo**, cuando **sí que lo está**.

El hecho de que las nanoparticulas de oro coloidal sean estables en suspensión es debido a la repulsión electrostática y la atracción de Van der Waals existente entre las partículas.

Al adicionarse sobre dicha suspensión sustancias iónicas (por ejemplo, NaCl), la fuerza de atracción entre las nanoparticulas, será mayor que la de repulsión, lo que lleva a la agregación de estas, dando lugar a un cambio visual de color de rojo a azul.

Al revestir las nanoparticulas de oro coloidal con nuestro anticuerpo de detección, ayudamos a la estabilización de estas previniendo su agregación.

Una vez realizado este procedimiento trabajaremos con una concentración superior a la correspondiente al primer tubo eppendorf de color rojo, para asegurarnos de esta manera la estabilización Au-Ac*.

4.3.2.1. Ensayo de estabilización del oro coloidal

Lo que se pretende conseguir con este ensayo de estabilización, es conocer, por un lado, la mínima concentración de anticuerpo de detección que estabiliza a un determinado tamaño de oro coloidal, y por otro seleccionar un tamaño de oro adecuado, considerando como tal, aquel que presente una mayor estabilidad en la unión con el anticuerpo utilizado, y que a su vez presente una mayor sensibilidad a la hora de la detección, en los inmunoensayos realizados.

Para esta prueba de estabilización utilizaremos como tamaño de partícula de oro los correspondientes a **80,40 y 20 nm**, y las concentraciones crecientes de Anticuerpo de detección: **0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25 mg/ml**.

Inicialmente se prueba a realizar una estabilización de nuestro anticuerpo de detección con **oro coloidal de 80nm**. Tal y como se muestra en la Figura 9. En el rango de concentraciones probado, no se observó estabilización.



Figura 9 Ensayo de estabilización con el oro coloidal de 80nm

Seguramente, con concentraciones más altas de anticuerpo se podrían llegar a encontrar una estabilización de las partículas de oro, pero para ello se debería gastar una cantidad muy elevada de anticuerpo, lo cual supondría un gasto económico importante.

El siguiente ensayo de estabilización se realizó con el **oro coloidal de 20nm**. Como se puede observar en la Figura 10, a partir del tercer tubo eppendorf ya se observa un color de disolución rojo intenso, lo que nos indica que a esa concentración de anticuerpo, el oro se encontraría estabilizado. Dicha concentración sería la correspondiente a 0,1 mg/ml.

Para poder trabajar con este tamaño de oro, utilizaremos una concentración en exceso de anticuerpo, aproximadamente un 10% superior que la del primer tubo eppendorf de color rojo, es decir, trabajaremos con una concentración de 0,15 mg/ml.

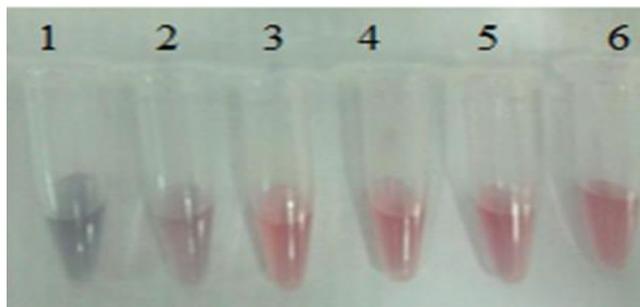


Figura 10 Ensayo de estabilización con oro coloidal de 20nm

Por último, al comprobar que con el oro coloidal de 20 nm la estabilización era buena, se decidió probar un tamaño de partícula un poco mayor, para asegurarnos una sensibilidad elevada. Para ello utilizamos **oro coloidal de 40nm**.

Observando la Figura 11, vemos que al igual que ocurría en el caso anterior, a partir del tercer tubo eppendorf el color de la disolución torna a rojo, lo que nos indica que el oro se encuentra estabilizado.

El tercer tubo corresponde a una concentración de anticuerpo de 0,1mg/ml, por lo tanto a la hora de trabajar, al igual que antes, utilizaremos un exceso de anticuerpo, para asegurarnos la estabilización del oro. Trabajaremos por tanto con una concentración de 0,15mg/ml.

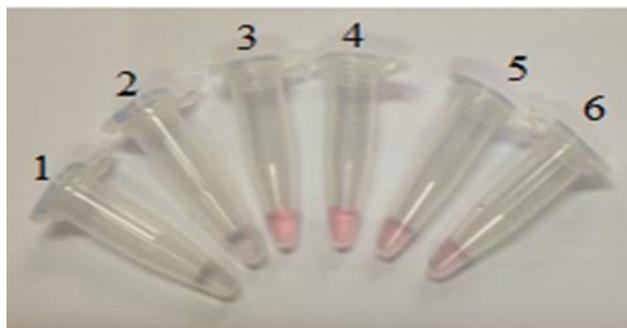


Figura 11 Ensayo de estabilización con oro coloidal de 40nm

Observando estos resultados, seleccionamos el **oro coloidal de 40nm como el óptimo** para realizar los ensayos, ya que la estabilización se consigue a una concentración de anticuerpo baja, lo que no supone un gran gasto económico de este a la hora de realizar la conjugación y además al ser un tamaño de partícula elevado, la sensibilidad obtenida a la hora de la detección será buena.

*4.3.3. Conjugación Au-Ac**

Una vez seleccionada la concentración de anticuerpo de detección que vamos a utilizar, procedemos a realizar su conjugación con las nanopartículas de oro, para poder realizar el ensayo.

El procedimiento seguido durante todo el proyecto será el siguiente:

1. Sobre 100µl de la concentración seleccionada de anticuerpo, añadimos 1,5 ml de oro coloidal. Esta suspensión se agita durante 20 minutos a 450 rpm
2. Pasado este tiempo, se le añade 100µl de una disolución de BSA al 1%
3. Tras esta última adición, centrifugamos la suspensión 20 minutos a 14.000 rpm
4. Como último paso, eliminamos el sobrenadante de la disolución, quedándonos con el precipitado formado tras la centrifugación y redisolvemos este en 300µl de una reguladora de boratos (10mM de pH=7,4) + 10% Sacarosa.
La adición de una pequeña cantidad de sacarosa a la reguladora de boratos, se realiza con el fin de estabilizar los reactivos inmovilizados sobre la almohadilla conjugada.
Al secar el anticuerpo quedaría retenido en el sólido depositado y cuando se pusiese de nuevo en contacto con la disolución, se liberaría reteniendo sus propiedades iniciales.
5. Una vez redisolto todo el precipitado, ya podemos trabajar con la disolución resultante, la cual poseerá un color rojo oscuro.

4.3.4. Optimización del protocolo de ensayo

Antes de comenzar con los ensayos para la detección de PSA^t, debemos realizar una prueba previa para asegurarnos de que el protocolo de ensayo diseñado es el correcto.

Como prueba, emplearemos un ensayo sándwich en el cual usaremos Anti-IgG de ratón como anticuerpo de control, IgG humana como muestra y Anti-IgG de ratón conjugado con oro coloidal de 40nm como anticuerpo de detección.

Para preparar las tiras, fijamos únicamente un punto de control con 0,5 μ l utilizando Anti-IgG (Mouse), en una concentración de 1mg/ml.

Tras dejar secar la tira y bloquearla, comenzamos con su montaje. En este ensayo se usaron los cuatro tipos de membrana de porosidades: 5, 8, 10 y 15 μ m.

Para poder llevar a cabo la conjugación del oro coloidal con el anticuerpo de detección anti-IgG, debemos realizar previamente el ensayo citado de estabilización, seleccionando de esta manera la concentración mínima óptima de anticuerpo que estabiliza al oro. En este caso, la concentración óptima de anticuerpo que utilizaremos será 0,15mg/ml.

Una vez seguido el protocolo de conjugación, para obtener la disolución conjugada, podemos comenzar el ensayo, usando una reguladora de PBS 10mm (pH=7,4) y IgG humana como muestra, en una concentración de 60ng/ml.

En la Figura 12, se puede ver, como el punto de control que esperábamos obtener se observa perfectamente en todos los tipos de membrana, por lo que podemos confirmar que el protocolo utilizado es el adecuado para ser usado en próximos ensayos.

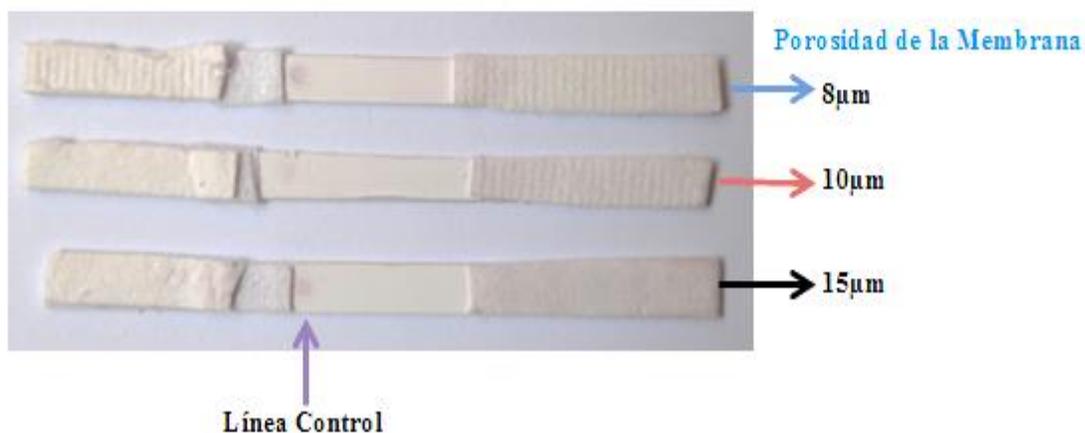


Figura 12 Fotografía de las tiras después de realizar el inmunoensayo de flujo lateral con IgG, con el fin de comprobar la validez del inmunoensayo

4.3.5. Adaptación del Inmunoensayo

Como ya se ha comentado, durante este proyecto realizaremos un inmunoensayo de flujo lateral tipo sándwich para la detección de PSA^t , como el que se muestra en la figura 2, en donde sobre la tira se inmovilizarán, el anticuerpo de captura (Anti- PSA^t (HS-5)), formando la línea test y el anticuerpo de control (Anti-IgG (mouse)), que dará lugar a la línea control.

Sobre la almohadilla conjugada se colocará una disolución de anticuerpo de detección (Anti- PSA^t (HS-8)) conjugado con oro coloidal de 40nm.

Por último sobre la almohadilla de muestra, se adicionará la muestra que fluirá a través de la tira de ensayo, si dicha muestra posee al analito específico para la detección, es decir PSA^t , este se unirá al anticuerpo conjugado, y posteriormente al anticuerpo de captura, dando lugar a la línea test.

El exceso de anticuerpo conjugado, seguirá fluyendo a través de la tira, hasta llegar al anticuerpo de control, donde se unirá formando la línea control.

El ensayo termina en el momento que se marcan las dos líneas, o únicamente la de control (en el caso de que el ensayo sea negativo) y el flujo llegue hasta la almohadilla absorbente, tal y como se muestra en la última imagen de la Figura 13.

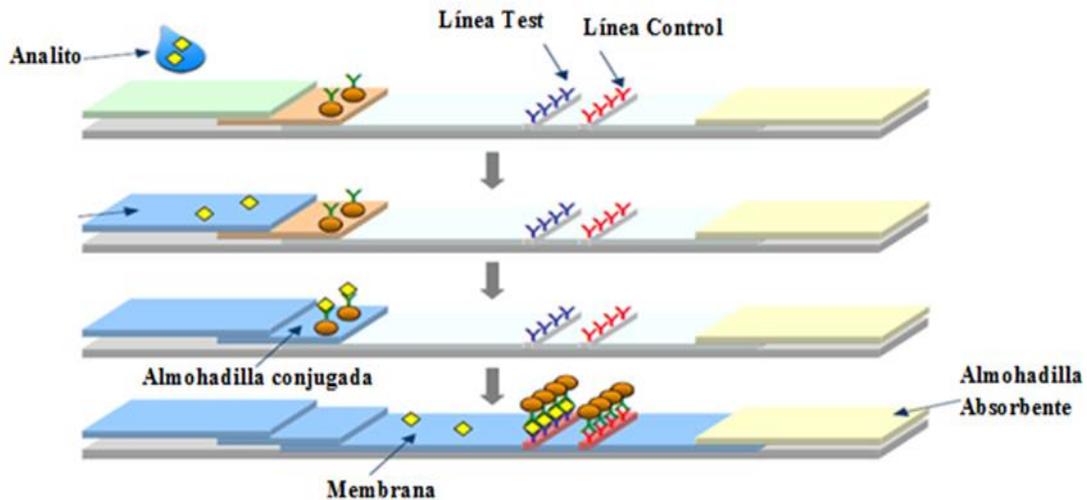


Figura 13 Esquema general de un LFI tipo sándwich para la detección de PSA^t

4.3.6. Optimización de la concentración de anticuerpo inmovilizado sobre la membrana

Siguiendo el protocolo indicado anteriormente tanto para la construcción de la tira, como para la conjugación del oro coloidal con el anticuerpo de detección, la primera prueba realizada consistió, en optimizar la mínima concentración tanto de anticuerpo de captura como de control sobre la membrana para obtener una buena detección.

Para ello probamos a fijar sobre las tiras (de diferentes tamaño de poro), 0,5µl, tanto para el anticuerpo de captura (HS-5), como para el anticuerpo de control (IgG-Mouse), ambos con una concentración de **0,1mg/ml**.

Una vez montada la tira procedemos a iniciar el ensayo, tal y como se indica en el protocolo, usando como **reguladora 10mM de PBS (pH=7,4)**.

Inicialmente trabajamos con PSA^t humana de una concentración de **60ng/ml**, por ser el calibrador en la zona alta de concentración usado en los análisis de rutina en los hospitales por métodos automáticos.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

- Como se puede observar en la Figura 14 tras la finalización del ensayo, únicamente se observa a simple vista un punto, el correspondiente a la línea control, el punto test es demasiado tenue para poder verse. Por este motivo deducimos que la concentración utilizada, para el anticuerpo de captura es demasiado pequeña, y en posteriores ensayos se probará a aumentarla.

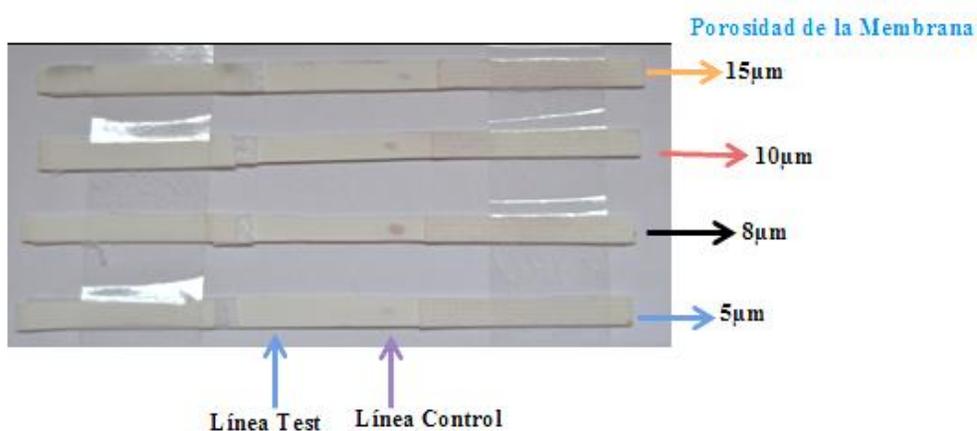


Figura 14 Revelado del ensayo con una concentración de anticuerpo de captura y control inmovilizados sobre la membrana 0,1mg/ml

A la vista de los resultados, hemos decidido aumentar la concentración fijada de anticuerpo de captura sobre la membrana a **1mg/ml**, y manteniendo la concentración del anticuerpo de control constante en **0,1 mg/ml**.

Consultando bibliografía⁵⁵, y con el motivo de aumentar la sensibilidad del ensayo, hemos decidido cambiar el buffer utilizado, por una **reguladora de 10mM PBS y 3% Metanol (pH=7,2)**. Existen indicios en la bibliografía que apuntan a una mejora de la sensibilidad del ensayo cuando se modifica la disolución de arrastre con una pequeña cantidad de alcohol. El alcohol, es el agente de coprecipitación más comúnmente utilizado ya que su presencia ayuda a humedecer la membrana, reduce cualquier carga estática que pueda tener, y tiene un efecto desestabilizador sobre la proteína en solución. Los niveles de entre 3 y 5% de metanol puede dar una mejora considerable en el rendimiento de una membrana utilizada para un inmunoensayo⁵⁶.

Teniendo en cuenta los puntos mencionados anteriormente, un tampón compuesto de fosfato de 10 mMol + 3% metanol a un pH= 7,2 se puede considerarse un buen punto de partida para el proceso de desarrollo del inmunoensayo.

En este caso los resultados obtenidos han sido los siguientes:

- Con la misma concentración de muestra patrón de 60ng/ml, en este caso, como podemos observar en la Figura 15, ya observamos las dos líneas que esperábamos obtener. La línea test, que nos indica que el resultado del ensayo ha sido positivo, y la línea control, que nos indica que el test se ha producido correctamente. A pesar de que se han obtenido las dos líneas deseadas, los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios, ya que la sensibilidad de la detección para la línea control, en este ensayo ha disminuido.

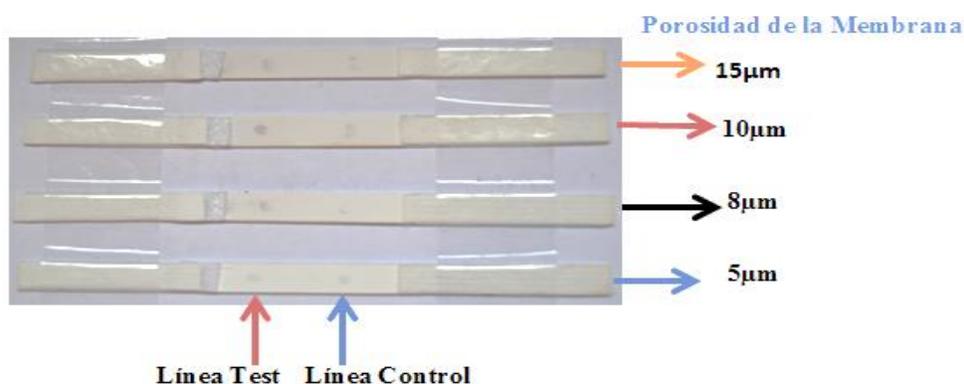


Figura 15 Revelado del ensayo con una concentración de anticuerpo de captura de 1mg/ml y de anticuerpo de control de 0,1 mg/ml.

La siguiente prueba realizada consistió, en aumentar la concentración del **anticuerpo de control** inmovilizado sobre la membrana a **1mg/ml**, y mantener constante la concentración de **anticuerpo de captura**, también en un **1mg/ml**.

❖ **Conclusión:**

*Para próximos ensayos, además de aumentar dicha concentración de anticuerpos, se ha decidido **descartar las tiras con un tamaño de poro de 5µm**. Esta decisión se ha tomado, en base a los resultados obtenidos en los ensayos hasta ahora realizados, ya que con este tamaño de poro, la sensibilidad de la detección es muy baja, en comparación con el resto de tiras, tal y como se puede observar en las figuras 14 y 15.*

Se cree que esto puede ser debido a que con este tamaño de poro, el flujo capilar es muy lento no permitiendo a la muestra ni al anticuerpo conjugado retenerse sobre los anticuerpos inmovilizados de la línea control y test.

Con las nuevas variaciones aplicadas, las cuales consistían en aumentar las concentraciones de los anticuerpos inmovilizados a 1mg/ml, los resultados obtenidos han sido positivos, tal y como se muestran en la Figura 16, donde se comprueba que se observan prácticamente con la misma sensibilidad la línea test y control del ensayo.

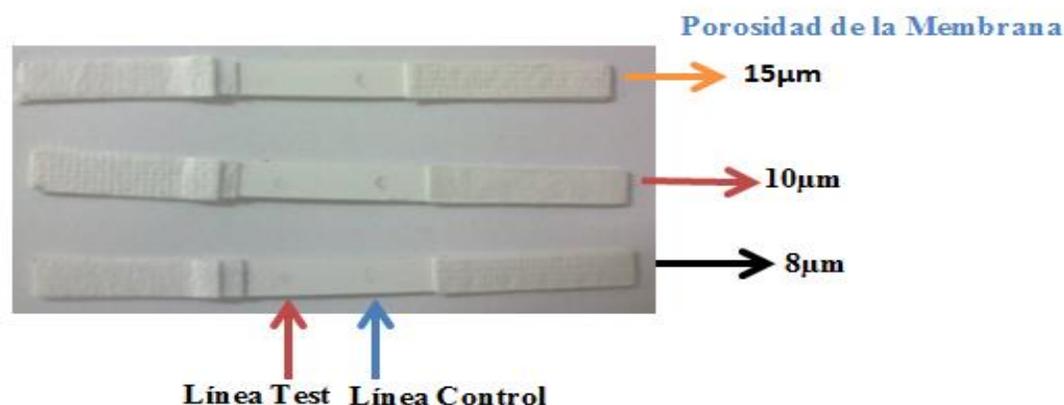


Figura 16 Revelado del ensayo con una concentración de anticuerpo de captura y control de 1mg/ml

❖ **Conclusión:**

A partir de este momento, para posteriores ensayos se trabajará con una concentración de anticuerpos inmovilizados, tanto de captura como de control de 1mg/ml y únicamente con las membranas de porosidad 15, 10 y 8µm.

4.4. Estudio del efecto de la concentración de la muestra

Con motivo de asegurar la fiabilidad del ensayo, se realizaron diferentes pruebas, en las cuales se abarcaban los 3 rangos de concentraciones de PSA total característicos para realizar pruebas clínicas en hospitales.

Las concentraciones utilizadas, para dichas pruebas clínicas se han citado anteriormente en el trabajo, y serán las siguientes: **10ng/ml, 4 ng/ml y 1ng/ml.**

Inicialmente, se probó a realizar el mismo protocolo que anteriormente, utilizando una concentración de muestra patrón de PSA^t humana en una concentración de **10ng/ml**, concentración máxima del rango conocido como zona gris de diagnóstico.

Tal y como se muestra en la Figura 17, el resultado del ensayo ha sido positivo, ya que somos capaces de observar las dos líneas que esperábamos (test y control), en una sensibilidad buena.

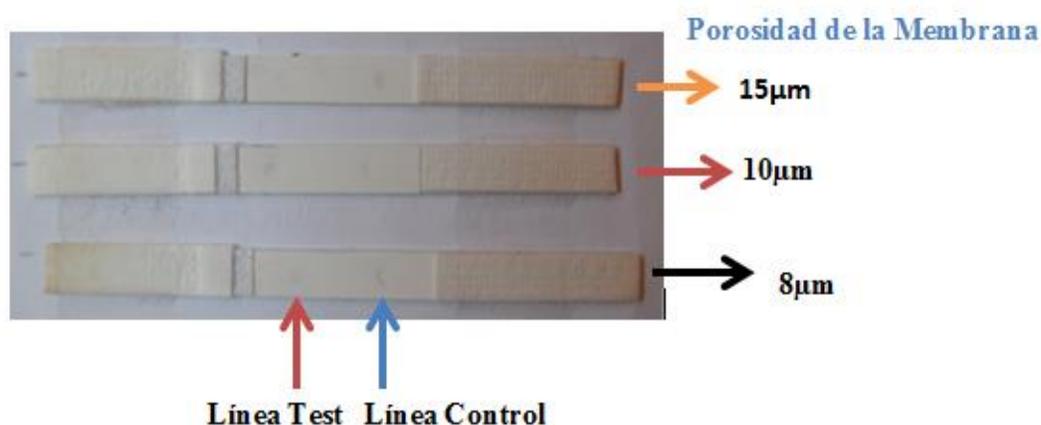


Figura 17 Revelado del ensayo para una concentración de muestra de 10ng/ml

La siguiente prueba se ha realizado disminuyendo la concentración de la muestra patrón a **4ng/ml**, ya que, dicha concentración, es la concentración mínima del rango conocido como zona gris de diagnóstico, por debajo de esta concentración el riesgo de cáncer de próstata es bajo, pero no inexistente.

Como se muestra en la Figura 18, al igual que en el caso anterior, el resultado ha sido positivo, ya que a pesar de utilizar una concentración muy baja, se siguen observando las dos líneas características del test, con una buena sensibilidad.

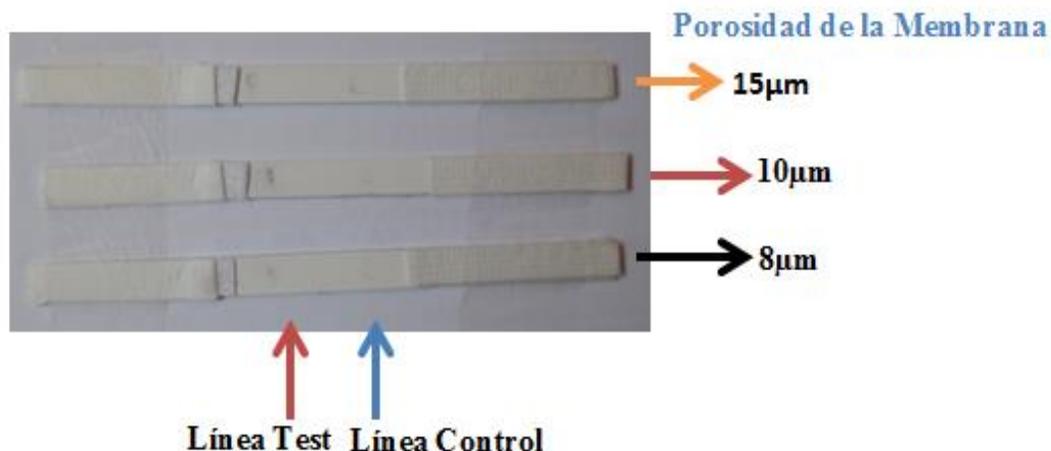


Figura 18 Revelado del ensayo para una concentración de muestra de 4ng/ml

Como última prueba, para caracterizar la influencia de la afinidad de los anticuerpos usados en la sensibilidad del ensayo, se ha decidido bajar la concentración de muestra patrón a **1ng/ml**.

El motivo de disminuir tanto la concentración es debido a que recientes estudios, ya citados anteriormente, muestran que el 22% de los hombres con una concentración de PSA^t detectada para el rango 2,6-4 ng/mL tienen un cáncer de próstata encubierto. Por dicha razón se están revisando los valores de referencia y se ha sugerido que la concentración de PSA^t en el test de control se baje a 2,5 ng/ml.

La decisión de utilizar una concentración de **1ng/ml** se ha tomado pensando, no únicamente en la comprobación de la posible detección con este tipo de ensayos, de concentraciones comprendidas entre dicho rango, sino que también incluso por debajo de este.

Como podemos observar en la Figura 19, la detección aún es posible, observándose a simple vista tanto la línea test, como la línea control.

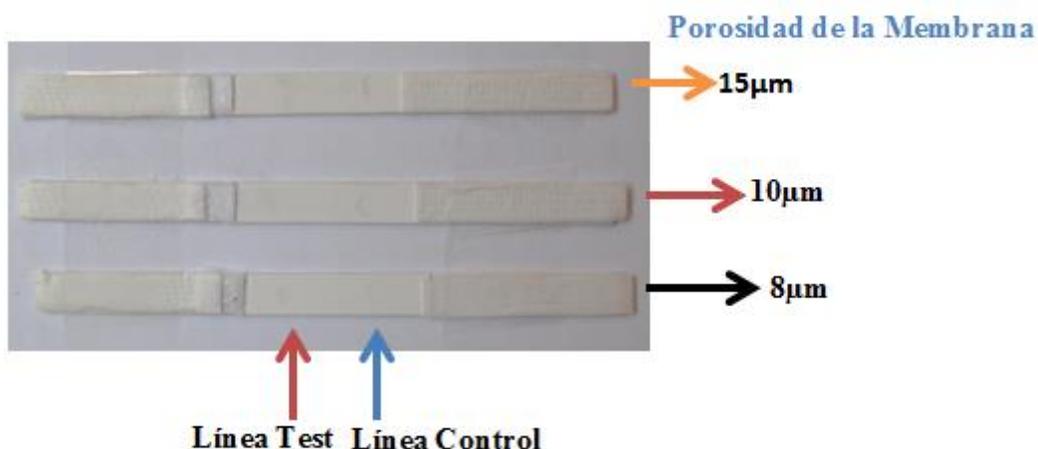


Figura 19 Revelado del ensayo para una concentración de muestra de 1ng/ml

4.5. Modificación del protocolo de inmovilización del anticuerpo conjugado

Hasta este momento, a la hora de realizar el ensayo hemos añadido directamente sobre la almohadilla conjugada, 5µl de disolución de anticuerpo conjugado con oro coloidal, obteniendo buenos resultados en la detección de las tiras.

En estos nuevos ensayos, vamos a evaluar la sensibilidad que presentaría la prueba, si la almohadilla conjugada se sumerge directamente en la disolución de anticuerpo conjugado. Lo que se pretende con este ensayo, es conseguir que la prueba sea totalmente reproducible, además este tratamiento presentaría ventajas en relación a la comercialización de estos dispositivos de diagnóstico, ya que minimiza el número de etapas a realizar por el usuario.

El protocolo a seguir será el siguiente:

1. Se sumerge la almohadilla conjugada, directamente y con cuidado en la disolución de anticuerpo conjugado con oro coloidal.
2. A continuación, se deja secar la almohadilla en la estufa a 37°C durante aproximadamente 30-45 min, hasta que esté totalmente seca.

La almohadilla presentará un color rojo oscuro una vez que este seca

3. Por último se monta la tira de la misma manera que lo estábamos haciendo hasta ahora.

Una vez montada, la tira presentara la forma que se muestra en la Figura 20.

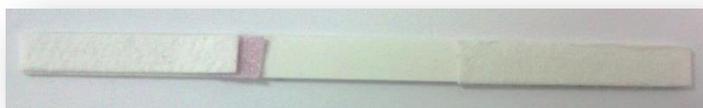


Figura 20 Tira de ensayo con anticuerpo conjugado inmovilizado sobre la almohadilla

4. Una vez montada la tira, acondicionamos la tira con la disolución de arrastre y adicionamos la muestra en la almohadilla de muestra.

Como siguiente paso, realizaremos las mismas pruebas de optimización de la concentración de muestra, para comprobar si el ensayo realizado de esta manera, sigue siendo igual de sensible que en el caso anterior.

Para ello probaremos de nuevo las concentraciones correspondientes a: **60ng/ml**, **10ng/ml**, y **4ng/ml**.

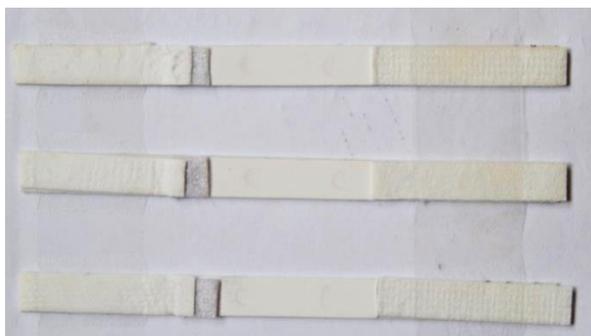


Figura 23 Revelado del ensayo utilizando una concentración de muestra de 60ng/ml, membranas de 15,10 y 8 μ m (de arriba a abajo)



Figura 21 Revelado del ensayo utilizando una concentración de muestra de 4ng/ml, membranas de 15, 10 y 8 μ m (de arriba abajo)



Figura 22 Revelado del ensayo utilizando una concentración de muestra de 10ng/ml, membranas de 10 y 8 μ m (de arriba abajo)

Como se observa en las Figuras 21,22 y 23, de esta manera, hemos perdido sensibilidad y reproducibilidad en el ensayo, ya que para una concentración de 10ng/ml los puntos observados son mucho más tenues que para una concentración de 4ng/ml, cuando debería ser lo contrario.

Esto es debido a que la disolución conjugada sobre la almohadilla no fluye a través de las diferentes tiras de igual manera, de ahí, que en algunas tiras se distinguen perfectamente las líneas test y control y en otras sean prácticamente inapreciables.

4.6. Influencia del protocolo de ensayo en la selección final de la membrana óptima

Con esta prueba y basándonos en los resultados obtenidos en pruebas anteriores, lo que se pretende, es seleccionar únicamente el tamaño de poro óptimo para la membrana.

Inicialmente, disponíamos de 4 tipos de membranas con tamaños de poro de: 5,8, 10 y 15 μm . En la primera prueba realizada, descartamos el tamaño de poro de 5 μm , por ser con la que peores resultados se obtenían en la detección.

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente, también podríamos descartar la membrana con tamaño de poro de 15 μm , ya que con ella la detección no era del todo buena. Esto podría deberse, a que el tiempo de ensayo es muy corto (entre 2-3 minutos), por lo que es posible que a una velocidad de flujo capilar tan elevada no se retengan de manera eficaz los analitos sobre el anticuerpo de captura. Esto reduce la sensibilidad del ensayo.

Por lo tanto realizamos ahora un ensayo de tiempo con las tiras de 8 y 10 μm , para seleccionar una de ellas como la tira optima de ensayo.

Para ello realizaremos un ensayo de detección de PSA^t, utilizando una muestra patrón de 60ng/ml, y adicionando 5 μl de anticuerpo conjugado sobre la almohadilla conjugada, los resultados obtenidos se muestra en la tabla 10.

Tabla 10 Ensayo de optimización de la membrana

Tamaño de Poro (μm)	Tiempo de Ensayo(min)	Detección
8	5 min	Muy buena
10	8 min	Buena
15	3min	Mala

Como podemos observar en la Tabla 10, con la membrana de tamaño de poro de 8µm, el ensayo se completa en menor tiempo que con la membrana de 10µm, además de observarse una mayor intensidad en la señal visual obtenida.

Por dichas razones, seleccionaremos la membrana con tamaño de poro de 8µm como la óptima para la realización de posteriores ensayos.

4.7. Mejora de la sensibilidad del ensayo

Debido resultados poco satisfactorios obtenidos a lo largo del ensayo anterior, se buscaron diferentes estrategias para conseguir la amplificación de la señal producida por el oro coloidal.

Una de las estrategias más eficaces y sencillas que se han encontrado consultando diferente bibliografía, es la amplificación de la señal del inmunoensayo utilizando una disolución de plata.

Con esta disolución se consigue una mejor apreciación visual de la mancha colorada que indica el final del ensayo. Esto es debido a que los iones de plata tienden a reunirse alrededor de las nanopartículas de oro coloidal, y por acción de un agente reductor, se produce la reducción de los iones Ag (I) a Ag (0).

Las nanopartículas de oro catalizan este proceso, por lo que se produce un cambio del color en la señal, pasando del rojo producido por el oro coloidal, al gris metálico de la plata. De esta manera, se consigue la amplificación de la señal, tal y como se muestra en la figura 24.

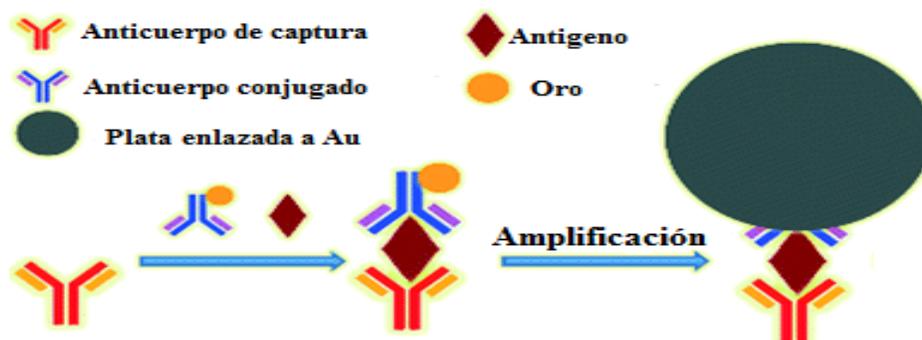


Figura 24 Amplificación de la señal visual con plata

Durante este proyecto se han utilizado cuatro estrategias diferentes a la hora de amplificar la señal con plata:

1. *Inmersión de la tira de ensayo en una disolución de plata,*
2. *Ensayo inmunocromatográfico sándwich de plata y disolución reductora,*
3. *Adición de la disolución de Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada*
4. *Adición de la disolución de Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada.*

El motivo de realizar estas cuatro estrategias diferentes es obtener una comparativa de los resultados obtenidos con cada una de ellas, para decantarnos por aquella en la que mejores resultados hayamos obtenido.

4.7.1. Inmersión de la tira de ensayo en una disolución de plata.

La primera prueba realizada, consiste en sumergir una tira de ensayo, ya revelada, en una disolución de plata.

El protocolo seguido para dicho experimento será el siguiente:

1. Preparamos inicialmente una disolución de Nitrato de plata al 0,3% (p/v), a la que llamaremos disolución **#1**.
2. Por otro lado, preparamos una reguladora de citrato 0,5M (pH= 4) que contiene 3% (p/v) de hidroquinona (agente reductor), a la que llamaremos disolución **#2**.
3. Una vez preparadas ambas disoluciones, las mezclamos utilizando el mismo volumen de cada una, disolución **#3**.
4. Antes de introducir la tira de ensayo, debemos lavar esta con abundante agua destilada, para ello, desmontaremos la tira, dejando únicamente la membrana.
5. Una vez lavada la tira, la introducimos en la disolución **#3** durante aproximadamente 2-5 minutos.

6. Tan pronto como se alcanza el nivel deseado de intensificación, sumergimos la tira en una disolución de Tiosulfato de sodio al 2,5% (p/v) durante aproximadamente 3-5 minutos, esta disolución actuara de bloqueante fijando la intensidad del color obtenido.
7. Por último se enjuaga la tira con agua destilada para eliminar los productos químicos que pudieran quedar.

Para los ensayos realizados, se han utilizado las tiras ensayadas en la prueba anterior, en concreto, las tiras de anticuerpo conjugado inmovilizado, muestra patrón de 10mg/ml y tamaño de poro de 10 y 8 μ m.

Los resultados obtenidos han sido favorables, tal y como se muestra en la figura 25. Tras la amplificación, somos capaces de distinguir tanto la línea test, como la línea control, cosa, que inicialmente era prácticamente imposible



Figura 25 Amplificación por inmersión en una disolución Plata. La concentración de PSA era de 10 ng/mL. Las membranas eran de 10 y 8 μ m

4.7.2. Ensayo inmunocromatográfico sándwich de plata y disolución reductora.

En esta segunda prueba de amplificación, se desarrolló un nuevo ensayo inmunocromatográfico al que llamaremos ensayo sándwich de plata y disolución reductora. El esquema del ensayo realizado se muestra en la Figura 26.

Sobre la tira de ensayo ya revelada, se coloca un papel cromatográfico básico (Whatman 1) impregnado con una disolución de Ag (I), y encima de éste, formando un sándwich, un nuevo papel del mismo tipo impregnado con una disolución reductora.

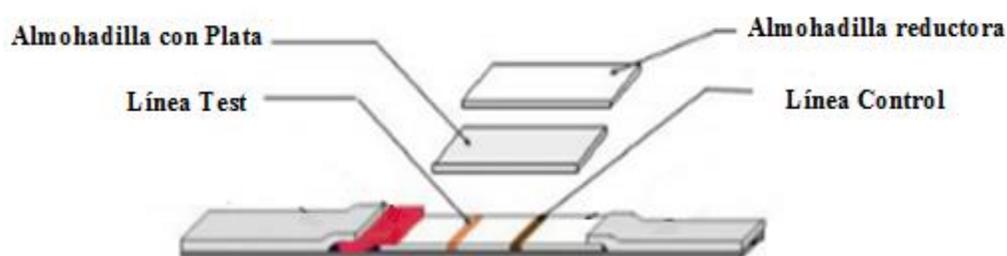


Figura 26 Ensayo inmunocromatográfico sándwich de plata y disolución reductora

Para esta prueba de ensayo, utilizaremos las tiras ya ensayadas anteriormente, con el anticuerpo conjugado inmovilizado en la almohadilla, y una concentración de muestra patrón de 60mg/ml.

El protocolo que se ha llevado a cabo durante este tipo de ensayos, está basado en la referencia [57].

1. Inicialmente debemos recortar dos tiras de papel cromatográfico de las mismas dimensiones que posee la tira la tira de ensayo.
2. Introducimos uno de los trozos de papel en una disolución de Nitrato de plata al 0,3% (p/v) durante aproximadamente 3-5 minutos.
3. Una vez pasado este tiempo, dejamos el trozo de papel secar en la estufa a 37°C durante una media hora, hasta que esté totalmente seco.

4. Por otro lado, introducimos el segundo trozo de papel, en una disolución reguladora de citrato 0,5M (pH= 4) que contiene 3% (p/v) de hidroquinona.
5. Cuando el papel sumergido en la disolución de nitrato de plata, ya está seco, se coloca sobre la tira ya ensayada y seca del ensayo.
6. A continuación, se saca el papel inmerso en la disolución reguladora, y se coloca sobre el papel impregnado con nitrato de plata, formando un sándwich.
7. Se dejan los papeles uno encima del otro durante aproximadamente 5 minutos.

Nota: Se debe vigilar el tiempo de ensayo, más tiempo del estipulado puede estropear la tira de ensayo.

Al retirar los papeles de la tira de ensayo, se ven de manera más nítida las manchas, por lo que podemos afirmar que sí que existe cierto grado de amplificación de la señal con respecto a la inicial producida con el oro coloidal, aunque este efecto sería mejorable. Es posible que el motivo de no observar una gran sensibilización sea que el papel cromatográfico no absorbe demasiada disolución de plata, y al secar se pierde gran parte de ella. Por tanto, en posteriores ensayos, se probará a utilizar almohadilla absorbente, en vez de papel cromatográfico

Por otro lado, vemos que una vez que la tira se encuentra totalmente seca, y en contacto con la luz, se ensucia por la presencia de la plata, tal y como podemos ver en la Figura 27. Esto se cree que puede ser debido a la unión de la plata con los restos de oro coloidal presentes en la tira durante la amplificación de la señal.



Figura 27 Tiras con anticuerpo conjugado inmovilizado y muestra de 60ng/ml, amplificadas con un formato sándwich de plata y disolución reductora. Tamaño de poro 15,10 y 8µm.

En la segunda prueba realizada, se han aplicado los cambios citados anteriormente, es decir, utilizando el mismo protocolo de ensayo, se ha usado, almohadilla absorbente en lugar de papel cromatográfico y tras la retirar las dos almohadillas (plata y reducción) se ha pasado reguladora de PBS, para limpiar la tira de ensayo.

En este caso los resultados obtenidos han sido mucho mejores. En la Figura 28 se muestra una tira sin amplificar, y tres amplificadas, la tira sin amplificar de un tamaño de poro de 8 μm y las amplificadas de 15, 10 y 8 μm , todas inicialmente ensayadas con anticuerpo conjugado inmovilizado sobre la almohadilla y muestra patrón de 60ng/ml.

Como se puede comprobar, la amplificación en la señal es notable a simple vista al retirar las tiras, por lo que podemos concluir que el hecho de utilizar almohadilla absorbente en vez del papel cromatográfico da lugar a mejores resultados.



Figura 28 Tiras con anticuerpo conjugado inmovilizado y muestra de 60ng/ml, amplificadas con un formato sándwich, según se retiran las almohadillas de plata y disolución reductora.

Por otro lado, a pesar de lavar las tiras una vez terminado el ensayo, al dejarlas secar, tanto tapadas, como al aire, se seguían manchando, aunque en menor medida. Esto disminuye la agudeza visual a la hora de observar las señales. Por lo tanto, como conclusión de este ensayo, podemos decir, que los resultados obtenidos en primer momento son buenos, pero se van degradando en un tiempo corto.

Por otro lado, en comparación con el ensayo anterior, este protocolo es mucho más laborioso, y necesita de un mayor tiempo de ensayo en su realización.

4.7.3. Adición de la disolución de Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada.

Con este tercer ensayo, se pretende manipular lo menos posible las tiras de ensayo y ahorrar tiempo, ya que no implica la necesidad de desmontarlas.

El protocolo de ensayo utilizado será el siguiente:

1. Una vez que las tiras de ensayo se encuentran reveladas, sobre la misma almohadilla absorbente, en la cual se encontraba inmovilizado el anticuerpo conjugado, se añaden 5µl de una disolución de nitrato de plata al 0,3% (p/v).
2. A continuación se añaden a la tira 50µl de en una disolución reguladora de citrato 0,5M (pH= 4) que contiene 3% (p/v) de hidroquinona, la cual actuara como disolución reductora en el ensayo.
3. Por ultimo añadimos 50µl de una disolución reguladora de PBS 10mM (pH= 7,4), para ayudar a iniciar el ensayo.

Los resultados obtenidos no han sido favorables, ya que la disolución de plata no fluía a través de la tira uniformemente, por lo que no se observó una buena amplificación de la señal.

Además, el hecho de dejar fluir la disolución de plata a través de la tira dará lugar a una mancha negra en la tira tal y como se muestra en la Figura 29.



Figura 29 Adición del Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada

4.7.4. Doble almohadilla conjugada

En esta última prueba, lo que se intenta conseguir es simplificar la manipulación de la tira de ensayo, con la idea de su futura comercialización. Para ello, se inmovilizan sobre la tira de ensayo dos almohadillas conjugadas.

En una se inmovilizará, la disolución conjugada, de anticuerpo de detección con el oro coloidal, y en la segunda, se inmovilizará la disolución de nitrato de plata. De esta manera se puede conseguir realizar el inmunoensayo de flujo lateral y su amplificación en un único paso.

La construcción de esta tira de ensayo será como la que se muestra en la Figura 30

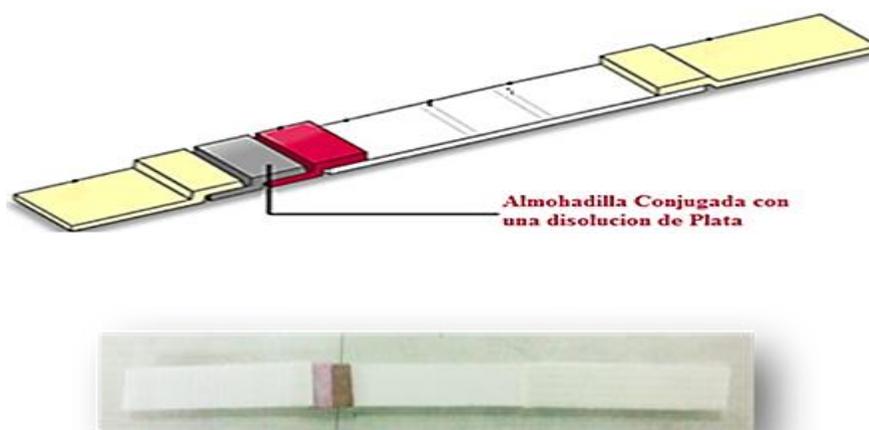


Figura 30 Doble almohadilla conjugada de oro y plata

El protocolo seguido para realizar el experimento es el que se cita a continuación:

1. El procedimiento seguido, tanto para inmovilizar los anticuerpos de captura y control sobre la tira, como para inmovilizar el anticuerpo conjugado con oro coloidal sobre la almohadilla conjugada, ha sido el mismo que hemos utilizado hasta ahora.
2. Para inmovilizar sobre la almohadilla la disolución de plata, sumergiremos la almohadilla cortada con las dimensiones características anteriormente citadas, en una disolución de Nitrato de plata al 0,3% (p/v).

3. Una vez sumergida, secamos la almohadilla en la estufa a 37 °C durante una media hora, hasta que esté totalmente seca
4. Por último montamos la tira, tal y como se muestra en la figura 19.
5. Para realizar el inmunoensayo de flujo lateral lo primero que hacemos es acondicionar la tira con 20µl de disolución reguladora de 10mm PBS, y 3% Metanol (pH=7,2).
6. A continuación adicionamos 50µl de muestra de 60ng/ml
7. Por último, añadimos en la tira, 50µl reguladora reductora de citrato 0,5M (pH= 4) que contiene 3% (p/v) de hidroquinona.

Los resultados obtenidos con esta prueba, no han sido muy favorables, ya que no somos capaces de observar ni la línea test ni la línea control. Esto puede ser debido, a que las almohadillas no estaban bien montadas sobre la tira, y no fluían por ella uniformemente.

Por otra parte, al estar tan secas, puede que necesiten más disolución reguladora para poder empaparse y difundir mejor la disolución inmovilizada sobre ellas.

4.7.5. Conclusiones: comparación de los resultados

A la vista de los resultados, podemos concluir que el mejor ensayo para la amplificación de la señal es el de inmersión de la tira en una mezcla de disolución de nitrato de plata y disolución reductora.

Aunque se seguirá investigando con ensayos con la doble almohadilla conjugada, ya que es el ensayo más adecuado a la hora de la comercialización.

La Tabla 11 resume los resultados obtenidos para la sensibilización con plata.

Tabla 11 Conclusiones obtenidas tras los ensayos de amplificación con plata

<i>Ensayo Realizado</i>	<i>Sencillez</i>	<i>Resultado</i>
Inmersión de la tira de ensayo en una disolución de Plata	Es muy sencillo ya que únicamente consiste en sumergir la tira en la mezcla de dos disoluciones preparadas previamente.	Positivo, se ven a simple vista tanto la línea test como la control.
Ensayo sándwich de plata y disolución reductora	Ensayo complejo y largo. Necesita manos expertas para su realización	Positivo, inicialmente, pero se deteriora con el tiempo
Adición de la disolución de Nitrato de Plata sobre la almohadilla conjugada.	Sencillo, los pasos a seguir serían los mismos que en procesos anteriores	Negativo, no se ve una gran amplificación de la señal
Doble almohadilla conjugada	Muy sencillo, y enfocado hacia la comercialización del dispositivo. No necesita manipulación para correr la tira ni amplificar la señal	Negativo, los parámetros utilizados no están optimizados

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al término del presente Trabajo Fin de Máster y de acuerdo con los objetivos propuestos han sido las siguientes:

1. Se ha conseguido desarrollar un protocolo básico para la preparación de las tiras de inmunoensayos de flujo lateral.
2. Se ha acoplado este protocolo a un inmunoensayo para la detección de PSA total que será adaptable a detección múltiple incluyendo PSA libre.
3. Los anticuerpos monoclonales utilizados tienen una gran afinidad por PSA total, puesto que se han podido detectar sin dificultad concentraciones de 1 ng/mL.
4. La membrana óptima para el ensayo ha sido papel de nitrocelulosa de 8 μm de porosidad, que permite el revelado con sensibilidad adecuada en 5 minutos aproximadamente.
5. La almohadilla de muestra de menor volumen muerto de las ensayadas es adecuada para la realización satisfactoria del ensayo, lo que permite utilizar sólo 50 μL de muestra.
6. El tamaño de nanopartículas de oro óptimo para la detección visual es de 40 nm.
7. De los 4 protocolos de sensibilización con plata ensayados el más ventajoso ha sido el que implica la inmersión de la tira de ensayo en una disolución de plata. El protocolo de “doble almohadilla conjugada” merece más estudios de optimización de las condiciones, porque sería el más sencillo para usuarios no especializados.

El trabajo desarrollado permite el inicio de una línea de investigación en este campo, buscando introducir mejoras en los dispositivos convencionales actuales.

6. FUTURAS PERSPECTIVAS

1. El inmunoensayo de flujo lateral desarrollado para PSA total se puede extender fácilmente a la determinación de PSA total y libre. Para ello se inmovilizaría anticuerpo de captura de PSA libre en otra zona test, cercana a la de captura de PSA tota. El anticuerpo conjugado elegido para el revelado puede reaccionar con ambas.
2. Se puede realizar una medida cuantitativa o semicuantitativa midiendo la densidad óptica de las manchas obtenidas en el revelado mediante técnicas y programas de procesado de imágenes.
3. Se probarán otros tipos de marcas como las enzimáticas (peroxidasa), partículas de látex o nanopartículas de carbono (nanotubos de carbono, o carbono amorfo).
4. Los inmunoensayos desarrollados se validarán tomando como referencia un kit de ensayos ELISA comercial, como puede ser el analizador Immulite 2000 para ensayos de PSA total.⁴³

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Erwin Schleicher. (2009) 393:1391–1392
- ² Axel Warsinke, (2009) 393:1393-1405
- ³ Ying Wan a, Yan Su a,*, Xinhua Zhu a,**, Gang Liu b, Chunhai Fan. (2013) Biosensors and Bioelectronics 47 1–11
- ⁴ (a)K.Lewandowski, Clin. Lab. Med. 29 (2009) 421. (b) J. Durner, Angew. Chem. Int. Ed., 49 (2010) 1026.
- (c)S.E.F.Melanson, Point Care, 10 (2011) 63
- ⁵ Von Lode P. (2005) Clin Biochem 38:591–606
- ⁶ D. Mabey, R.W. Peeling, A. Ustianowski, M.D. (2004) Nature Reviews Microbiology 2 231-240
- ⁷ Von Lode P. Jul (2005). Clin Biochem;38(7):591-606
- ⁸ Humphrey TJ. (1994) Int J Food Microbiol 2:31–40
- ⁹ Blaskoza M, Koet M, Rauch P, Amerogen AV (2009) Eur FoodRes Technol 229:867–874
- ¹⁰ Carter DJ, Cary RB.(2007) Nucleic Acids Res 35:1–11
- ¹¹ Zhang G-P, Guo J-Q, Wang X-N, Yang J-X, Yang Y-Y, Li Q-M, Li X-W, Deng R-G, Xiao Z-J, Yang J-F (2006) Vet Parasitol 137:286–293
- ¹² Wang X, Li K, Shi D, Xiong N, Jin X, Yi J, Bi D. (2007) J Agric Food Chem 55:2072–2078
- ¹³ Tanaka R, Yuhri T, Nagatani N, Endo T, Kerman K, Takamura Y, Tamiya E. (2006) Anal Bioanal Chem 385:1414–1420
- ¹⁴ Simon Attree. (2009) Bio-Diagnostics Meeting
- ¹⁵ Posthuma Trumpie, G.A., Korf, J. and Van Amerongen. A.. (2009) .A literature survey. Anal Bioanal Chen 393:569-582
- ¹⁶ van Amerongen A, van Loon D, Berendsen LBJM, Wichers JH..(1994) Clin Chim Acta 229:67–75
- ¹⁷ GLOBOCAN (2008)(IARC) , Section of Cancer Information. <http://globocan.iarc.fr>
- ¹⁸ V. Gubala, L.F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan, D. E. Williams.. (2012) Anal. Chem. 84. 487
- ¹⁹ r. molina, x filella, j. m. auge, j. m. escudero(2011) Utilidad clínica de los marcadores tumorales, estado actual y perspectiva de futuro iii.29
- ²⁰ E.P. Diamandis, (1996), 16(6C), 3983-3986
- ²¹ Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr .. (May 27, 2004). N Engl J Med 350 (22)
- ²² W.J. Catalona, Ds. Smith, T.L. Ratliff, et al., N. Engl. J. Med., (1991).324(17), 1156-1161
- ²³ W.J. Catalona, Ds. Smith, D.K. Ornstein, (1997), , JAMA, 277(18), 1452-1455
- ²⁴ F.H. Schroder, I. van der Crujisen-Koetar, H.J. de Kaning, A.N. Vis, R.F. Hoedemaeker, R. Kranse, J. Urol. (2000), Hippokratia 163(3), 806-812
- ²⁵ W.J. Catalona, D.S. Smith, T.L. Ratliff, J.W. Basler, (1993), JAMA, 270(8), 948-954
- ²⁶ Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L., Nishiura, T., Murphy, G.P., Chu, T.M., (1980). Cancer Res. 40, 4658–4662
- ²⁷ Chen, S., Xua, Y., Ip, M.P.-C., (1997). Clin. Chem. 43, 1459–1461
- ²⁸ Zhang, S., Du, P., Li, F., 2007b. Talanta 72, 1487–1493
- ²⁹ Kerman, K., Endo, T., Tsukamoto, M., Chikae, M., Takamura, Y., Tamiya, E., (2007). Talanta 71, 1494–1499
- ³⁰ Cao, C., Kim, J., Kim, B., Chae, H., Yoon, H., Yang, S., Sim, S., (2006). Biosens. Bioelectron. 21, 2106–2113
- ³¹ Grubisha, D.S., Lipert, R.J., Park, H.-Y., Driskell, J., Porter, M.D., (2003). Anal. Chem. 75, 5936–5943
- ³² O'Neil, P.M., Fletcher J.E. Stafford, C.G., Daniels, PB., Bacerese-Hamilton, (1995), T. Sens. Actuators B 29, 79
- ³³ Wu, G., Datar, R.H., Hansen, K.M., Thundat, T., Cote, R.J., MAjumdar, (2001) A., Nat. Biotech 19, 856-860
- ³⁴ Dimitris Kyprianou, Iva Chianella, Antonio Guerreiro n, Elena V. Piletska, Sergey A. Piletsky. 103(2013). Talanta, 160-166
- ³⁵ Sarkar, P., Pal, P.S., Ghosh, D., Setford, S.J., Tothill. I.E. (2002) int. J. Pharm., 238, 1
- ³⁶ Nancy V. Panini, Germán A. Messina, Eloy Salinas, H'ector Fernández, Julio Raba. (2008), Biosens. Bioelectron 23, 1145
- ³⁷ Liu, Y. (2008), Thin Solid films 516(8), 1803
- ³⁸ Priyabrata Sarkara, Partha S. Pala, Dipankar Ghosha, Steve J. Setfordb, Ibtisam E. Tothillb, May (2002). International Journal of Pharmaceutics, Volume 238, Issues 1–2, 15, Pages 1–9.
- ³⁹ J.H. Hwang .K.S., Park, J., Yoon, K.H, Yoon, D.S., Kim, T.S. (2005), Biosens. Bioelectron 20, 2157
- ⁴⁰ BoZhanh, XueZhang, Hui-hui Yan, Shi-jun Xu, Dai-hua Tang, Wei-ling Fu. (2007), Biosens. Bioelectron , 23, 19
- ⁴¹ Yanjun Dinga, Haixia Lua, Guorong Shib, Jia Liua, Guoli Shena,*, Ruqin Yua., (2008 Oct) Biosens Bioelectron. 15;24(2):228-32
- ⁴² Guodong Liu, Ying-Ying Lin, Jun Wang Hong Wu, Chien M Wai, Yuehe Lin., (2007), Anal. Chem. 79, 7644
- ⁴³ .Fernández-Sánchez, C. J. MaNeil, K. Rawson, O. Nilsson, , (2005) Journal of Immunological Methods(307) 1– 12
- ⁴⁴ Zhang G-P, Guo J-Q, Wang X-N, Yang J-X, Yang Y-Y, Li Q-M, Li X-W, Deng R-G, Xiao Z-J, Yang J-F (2006) Vet Parasitol 137:286–293
- ⁴⁵ Kim YM, Oh SW, Jeong SY, Pyo DJ, Choi EY (2003) Environ Sci Technol 37:1899–1904

- ⁴⁶ Jin S, Chang ZY, Ming X, Min CL, Wei H, Sheng LY, Hong GX (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12:198–201
- ⁴⁷ Fernández-Sánchez, C. J. MaNeil, K. Rawson, O. Nilsson .. (2004) Anal. Chem., 76, 5649-5656
- ⁴⁸ Chandler, J., Gurmin, T. and Robinson, N.. (2000) IVD Technology 6:37–49
- ⁴⁹ Wang S, Quan Y, Lee N, Kennedy IR (2006) J Agric Food Chem 54:2491–2495
- ⁵⁰ Nielsen K, Yu WL, Kelly L, Bermudez R, Renteria T, Dajer A, Gutierrez E, Williams J, Algire J, de Eschaide ST (2008) J Immunoass Immunochem 29:10–18
- ⁵¹ Kalogianni DP, Goura S, Aletas AJ, Christopoulos TK, Chanos MG, Christofidou M, Skoutelis A, Ioannou PC, Panagiotopoulos E (2007) Anal Biochem 361:169–175
- ⁵² Wang X, Li K, Shi D, Xiong N, Jin X, Yi J, Bi D (2007) J Agric Food Chem 55:2072–2078
- ⁵³ Henderson K, Stewart J (2002) J Immunol Methods 270:77–84
- ⁵⁴ Aveyard J, Mehrabi M, Cossins A, Braven H, Wilson R (2007) Chem Commun 2007:4251–4253
- ⁵⁵ Kevin D. Jones. March 1, (1999) Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes, Part 1: Principles
- ⁵⁶ Short Guide for Developing Immunochromatographic Test Strips (Bedford, MA: Millipore Corp., 1996).
- ⁵⁷ Yang Weia,1, Li Xiao-binga,1, Liu Guo-wena,* , Zhang Bing-binga, Zhang Yia,b, Kong Taoc, Tang Jia-jia a, Li Dong-naa, Wang Zhea,* . (2011). Biosensors and Bioelectronics 26 .3710–3713