

# ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## SISTEMA BIOSENSOR DE BAJO COSTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Sara Hernández Díaz

TUTOR/A: Sergi Morais Ezquerro

*Curso Académico: 2013-2014*

**VALENCIA, 1 de septiembre de 2014**

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



## RESUMEN

Aproximadamente la mitad de la población mundial corre el riesgo de contraer la malaria, y se calcula que en 2010 hubo 219 millones de casos. Detener y comenzar a reducir, en 2015, la incidencia de la malaria y otras enfermedades graves es una de las metas de uno de los Objetivos de Desarrollo del Milenio. La prevención y control de la infección es el modo de abordar esta meta. Estas acciones se ven facilitadas especialmente en los países de bajos ingresos, si se dispone de herramientas de diagnóstico de bajo coste, sensibles y selectivas. En este sentido, la tecnología de disco compacto presenta las capacidades que la hacen idónea para abordar el desarrollo de tests de diagnóstico con características para su aplicación en países en vías de desarrollo.

En este trabajo se plantea el desarrollo de un biosensor de bajo coste basado en tecnología de disco compacto para determinar la infección por malaria en suero sanguíneo humano. El sistema sensor se basa en la determinación de HRP2 del parásito *Plasmodium falciparum*, principal causante de la malaria. En este estudio se describe la optimización del ensayo sándwich en formato de microarray sobre un disco compacto. La evaluación y optimización de las variables críticas del ensayo como tampón de impresión, concentración de anticuerpo de captura y detector, tipo de marcaje, composición del medio reacción, tiempo de ensayo, etc. ha permitido desarrollar un ensayo sensible y selectivo para detectar malaria en sueros humanos en tiempos cortos (70min) y a costes bajos (< 0,5 €/muestra).

## PALABRAS CLAVE

Anticuerpo, antígeno, proteína HRP2, mosquito Anopheles, *Plasmodium falciparum*, biosensor, inmunoensayo, tecnología de disco compacto.

## SUMMARY

Approximately half of the world population runs the risk of contracting malaria and it has been calculated that in 2010 there were 219 million of cases. Stopping and begin to reduce, in 2015, the malaria incidence and other severe diseases is one of the goals of the Millenium Development Aims. Prevention and control of the infection is the way to address this goal. These actions are facilitated especially in low-incomes countries, if low cost, sensitive and selective tools are available. In this way, the compact disc technology presents the capability that makes it ideal for approach the diagnostic tests development with characteristics for its application in countries in process of development.

In this work has been raised the development of a low-cost biosensor based in compact disc technology in order to determine the malaria infection in blood serum. The sensor system consists in the *Plasmodium falciparum* parasite protein HRP2 determination, the main causative of malaria. In this study it's described the optimization of the sandwich assay for the microarray format on a compact disc. The evaluation and optimization of the assay's critical variables as the print buffer, capture and detection antibody concentration, kind of labeling, reaction medium composition, assay times... etc. has allowed the development of a sensitive and selective assay able to detect malaria in human serum in shorter times (70 min) and low-costs (<0,5 €/sample).

## KEY WORDS

Antibody, antigen, HRP2 protein, *Anopheles* mosquito, *Plasmodium falciparum*, bisensor, immunoassay, compact disc technology.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia la oportunidad de realizar este proyecto, así como a todos los compañeros del laboratorio, especialmente a Sergi Morais Ezquerro por su dedicación en mi formación.

Agradecer a todos mis amigos su apoyo durante todos estos años, hacen que saque lo mejor de mí cada día.

A mis compañeras de la carrera, por tantos momentos dentro y fuera de la Universidad.

Y por último, a mi familia, gracias a ellos todo esto ha sido posible.

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 La enfermedad .....	1
1.2 Pruebas de diagnóstico. Estado del arte .....	2
1.3 El vector: Anopheles .....	5
1.4 Plasmodium .....	6
1.5 Analito diana: HRP2.....	7
1.6 Inmunoensayo (IA) como método de diagnóstico.....	8
1.7 Tecnología de disco compacto .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>12</b>
3.1 Reactivos .....	12
3.2 Equipos .....	12
3.3 Protocolos .....	12
3.3.1 Protocolo de conjugación con partículas de oro coloidal.....	12
3.3.2 Protocolo de purificación de proteínas IgG de suero sanguíneo humano .....	13
3.3.3. Inmunoensayo sobre DVD para la detección de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	13
<b>4. Resultados</b> .....	<b>14</b>
4.1 Optimización del inmunoensayo.....	14
4.1.1 Concentración de anticuerpo de captura.....	14
4.1.2 Composición del tampón de impresión.....	14
4.1.3 Concentración de anticuerpo de detección y tiempos de incubación .....	15
4.1.4 Efecto matriz .....	15
4.2 Análisis de muestras reales.....	17
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Referencias</b> .....	<b>20</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución mundial de la malaria. Ratio de mortalidad por 100.000 habitantes.....	2
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del mosquito <i>Anopheles</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Distribución de las especies de <i>Plasmodium</i> en la Región Americana (2008-2012).....	6
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	7
<b>Figura 5.</b> (A) Curva de calibrado y (B) esquema de un inmunoensayo sándwich directo.....	9
<b>Figura 6.</b> a) Representación esquemática del sistema de detección. b) Imagen del prototipo utilizado como detector.....	10
<b>Figura 7.</b> Diseño de la micromatriz 4x4 en disco DVD.....	13
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la concentración de anticuerpo de captura para distintas concentraciones de proteína HRP2 en PBS-T.....	14
<b>Figura 9.</b> Influencia de la composición del tampón de impresión en la eficacia de inmovilización por adsorción.....	15
<b>Figura 10.</b> Evaluación del efecto matriz.....	16
<b>Figura 11.</b> A) Curva de calibrado para HRP2 B) Los paneles son las imágenes obtenidas tras la lectura del ensayo con el prototipo detector.....	17

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Técnicas diagnósticas: ventajas e inconvenientes.....	4
<b>Tabla 2.</b> Relación entre parasitemia y cantidad de HRP2 en plasma. Estudio de población.....	5
<b>Tabla 3.</b> Resultados obtenidos y comparación de datos.....	18

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La enfermedad

El Informe Mundial sobre el Paludismo 2013 resalta el progreso que se ha alcanzado hacia los objetivos mundiales para el control de la malaria establecidos para 2015 y describe los retos actuales para el control y eliminación de la malaria a nivel mundial.

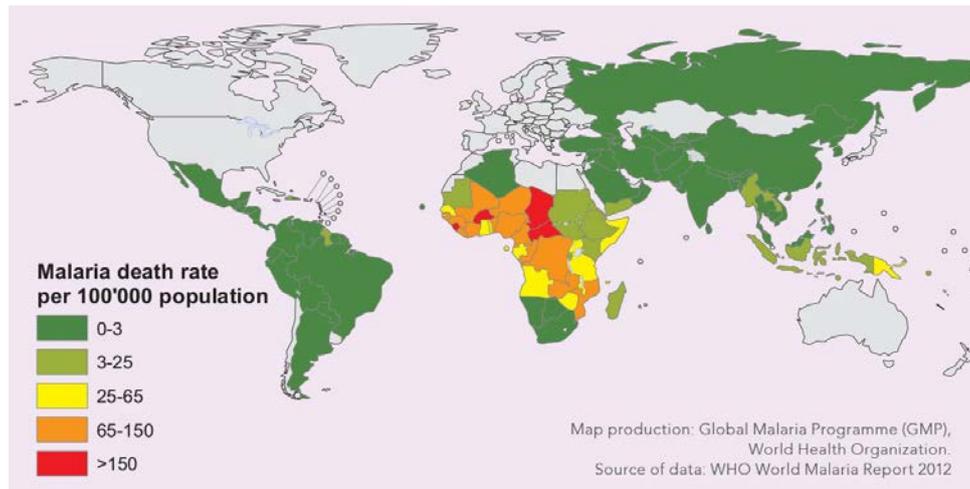
Desde el año 2000, la gran expansión en el financiamiento y cobertura de los programas de control de la malaria ha llevado a una reducción de su incidencia y mortalidad. Entre 2000 y 2012, las tasas estimadas de mortalidad por malaria a nivel mundial disminuyeron una media del 42% en todos los grupos de edad. Sin embargo, entre 2011 y 2012 disminuyó el ritmo de reducción de las tasas estimadas de mortalidad por malaria debido a que el financiamiento de los programas de malaria fue menos de la mitad de los cinco mil millones de dólares que se requieren a nivel mundial. Así, millones de personas en riesgo de contraer malaria todavía no tienen acceso a terapias de diagnóstico y a fármacos anti-maláricos. Como resultado, se estima que en 2012 ocurrieron 207 millones de casos y 627.000 muertes por malaria, la gran mayoría niños africanos. Existe una necesidad urgente de aumentar el financiamiento para el control de la malaria y ampliar la cobertura del programa de forma que puedan alcanzarse las metas internacionales para la reducción de los casos y muertes por malaria.<sup>1</sup>

África es actualmente la subpoblación más afectada, si bien la tasa de mortalidad por malaria según la OMS ha disminuido en más de un 45% a nivel mundial desde el año 2000 y en regiones africanas hasta en un 49% (Figura 1).<sup>2</sup> La parte optimista de este asunto es que es una enfermedad curable;<sup>3</sup> además forma parte de los objetivos del milenio de la OMS, concretamente el 6B, "haber detenido y comenzado a reducir, para el año 2015, la incidencia del paludismo y otras enfermedades graves".

La malaria o paludismo es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. Es causada por cinco especies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*; siendo *P. falciparum* la más extendida y a su vez la más mortal.

Los vectores de dicho parásito son diversas especies de la hembra del mosquito del género *Anopheles*, transmitiendo la enfermedad a través de su picadura. En el organismo humano, los parásitos se reproducen en el hígado para infectar después a los glóbulos rojos. Si la enfermedad no se trata a tiempo y adecuadamente, puede poner en peligro la vida de la persona infectada por la alteración del aporte sanguíneo a órganos vitales.<sup>4</sup>

Los síntomas más destacados de la enfermedad son la fiebre, cefaleas y vómitos, notables a los 15 días tras la picadura del mosquito. Actualmente, no existen vacunas que prevengan el paludismo; aunque sí tratamiento. Con la introducción de la cloroquina hacia mediados del siglo XX se produjo un descenso en la mortalidad por malaria. Por desgracia, a partir de los años 60 comenzaron a surgir cepas de *P. falciparum* resistentes a la misma que ha obligado al desarrollo de nuevas estrategias de manejo combinando derivados de artemisina e implementación de pruebas de diagnóstico rápido (RDT en inglés) que hacen pensar que erradicar la malaria en las próximas décadas sea una meta posible.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Distribución mundial de la malaria. Ratio de mortalidad por 100.000 habitantes.<sup>2</sup>

### 1.2. Pruebas de diagnóstico: estado del arte.

La mejor manera de combatir la malaria es evitar el contagio de dicha enfermedad. No obstante, una vez el individuo se ha infectado es importante disponer de métodos de diagnóstico rápidos, eficaces, accesibles y viables, así como de los medicamentos adecuados para combatir y paliar la enfermedad.<sup>5</sup>

La parasitemia se define como la cantidad de parásitos en sangre y debe conocerse previamente a la administración del fármaco. La detección microscópica del parásito en sangre ha sido el método utilizado durante décadas ya que es rápido e infalible si se realiza por personal muy entrenado. El método más común es el extendido; se hace un extendido de la muestra de sangre y se consigue una sola capa de células rojas, de manera que se observa una sola capa de glóbulos rojos, observándose los eritrocitos parasitados como los no parasitados. En este caso, se contabilizan el número de eritrocitos parasitados por campo y el resultado se da en porcentaje. Los niveles establecidos de parasitemia son los siguientes:<sup>6</sup>

- Parasitemia: 0,0001-0,0004% (5-20 p/μL). Es la mínima cantidad de parásitos para que la gota gruesa sea positiva; por debajo de este nivel no se detectan parásitos en sangre periférica.
- Parasitemia: 0,002% (100 p/μL): Los pacientes pueden ser sintomáticos.
- Parasitemia: 0,2% (10.000 p/μL). Los pacientes que ya han tenido una exposición previa a malaria van a presentar síntomas.
- Parasitemia: 2% (100.000 p/μL). Elevada posibilidad de que se trate de *P. falciparum*.
- Parasitemia: 2-10% (100.000-500.000 p/μL). Hiperparasitemia, malaria severa y alta probabilidad de muerte.

La carencia de recursos tecnológicos y facilidades médicas, así como la ausencia de personal cualificado en las áreas más afectadas da lugar a la interpretación de los resultados de forma errónea.

Otros métodos se basan en el marcaje de ADN del parásito con naranja de acridina u otras tinciones para después detectarlo mediante microscopio o bien mediante citometría de flujo.<sup>7</sup>

Existen también métodos de diagnóstico basados en la amplificación del ADN de *Plasmodium* mediante PCR convencional o isotérmica (LAMP).<sup>8</sup> La PCR convencional es un método específico capaz de detectar concentraciones parasitarias bajas mientras que la técnica LAMP es un método con un potencial interesante que está siendo evaluado con éxito en la actualidad.<sup>9</sup> Estos métodos de diagnóstico por sus características y necesidades instrumentales no son apropiados para su empleo en las zonas endémicas por malaria.

En las últimas décadas se han desarrollado múltiples pruebas de diagnóstico rápido capaces de detectar la presencia de los parásitos causantes del paludismo, utilizando un volumen de muestra de sangre pequeño (5-10 µL) en tiempos de ensayo cortos (< 30 min.), que además no requieren personal demasiado cualificado ni material de laboratorio aparatoso y caro.<sup>10</sup>

De acuerdo con los criterios de la OMS (1999), los RDTs deben ser capaces de detectar 100 parásitos por µL, lo equivale a 0,002% de parasitemia, debe tener un mínimo de sensibilidad del 95% comparado con la técnica de microscopía y un mínimo de especificidad de al menos un 90% para todas las especies de malaria. Estos métodos deben ser simples y fáciles de usar, con obtención de los resultados en cuestión de minutos, transportables y no requerir de fuente eléctrica, siendo muy útiles en las condiciones hostiles propias de las zonas más afectadas, así como para viajeros y turistas.<sup>11</sup>

La OMS aconseja el diagnóstico de la malaria previo al tratamiento, con el fin de administrar los medicamentos antipalúdicos apropiados. Así, por ejemplo, distinguir entre fiebre no-malárica y fiebre malárica es esencial para llevar a cabo varios objetivos, como son:

- Confirmar que se trata de malaria y no de otra patología en pacientes que presentan síntomas similares
- Administrar el tratamiento adecuado de la manera más precisa posible
- Monitorizar la incidencia de la prevalencia de la enfermedad, como tareas de prevención y evaluación de programas de salud

Esta confirmación requiere la realización de pruebas que demuestren la evidencia de la presencia del parásito en la sangre del paciente. El método más fiable pasa por el uso de microscopios de alta resolución, si bien en las zonas endémicas, donde más prevalece la enfermedad, no abundan dichos equipos de microscopía.

Para hacer frente a este desafío se están desarrollaron diferentes RDTs que permitan el diagnóstico a poblaciones sin acceso a técnicas más aparatosas y caras. Las principales características de estos dispositivos deben ser:

- Alta sensibilidad y selectividad analítica
- Rapidez
- Bajo coste
- Portabilidad
- Facilidad de uso

Los RDTs de malaria se han diseñado para detectar la presencia del antígeno del parásito en sangre humana. Algunos RDTs sólo detectan una especie (*Plasmodium falciparum*), normalmente por la detección de la proteína 2 rica en histidina (HRP2) o la enzima *Plasmodium* lactato deshidrogenasa (pLDH) como antígenos diana. Otros, detectan más de una especie, detectando tanto HRP2 como la aldolasa, antígenos "pan-específicos". La elección de

la RDT se rige por diversos factores, que incluyen qué especie de *Plasmodium* conviene detectar de acuerdo a la epidemiología de la zona donde se va a llevar a cabo el diagnóstico.

Las sensibilidades varían entre las diferentes dianas, pero son generalmente buenas para la proteína HRP2 de *Plasmodium falciparum*, con sensibilidades más altas que la detección de las enzimas pan-maláricas, es por eso que en la actualidad contribuyen a más del 90% de los RDTs.<sup>12</sup>

Un inconveniente común de estos métodos actuales es que sólo proporcionan información cualitativa. Es decir, no proporcionan datos acerca de la densidad del parásito en sangre, lo cual sería conveniente a la hora de administrar la medicación. Tras un diagnóstico positivo, si se quiere determinar la parasitemia, se debe hacer uso de la técnica de microscopía.<sup>12</sup> En la Tabla 1 se recogen las técnicas actualmente en vigor para la detección de la malaria, así como las ventajas e inconvenientes.

**Tabla 1.** Técnicas diagnósticas de malaria: ventajas e inconvenientes.

Tipo de técnica	Analito diana	Ventajas	Inconvenientes
<b>Gota extendida</b>	Parásito	Fácil realización Barata Diferenciación de especies Cuantitativa	Personal experto No detecta parasitemias bajas Difícil detección de parasitemias mixtas
<b>Centrifugación/tinción con naranja de acridina</b>	Parásito	Fácil realización No requiere personal especializado	Precisa de equipo adecuado No diferencia especies
<b>Inmunocromatografía</b>	HRP2	Fácil realización No requiere personal especializado Baja sensibilidad	Falsos positivos. No cuantitativa.
<b>Inmunocromatografía</b>	LDH	<i>Idem</i> que HRP-2	Baja sensibilidad
<b>PCR múltiple</b>	ADN	Detección de parasitemias bajas e infecciones mixtas.	Equipos caros y personal especializado.

En la bibliografía se ha documentado la relación directa entre la cantidad de HRP2 y el grado de parasitemia, que a su vez está relacionado, como se ha comentado anteriormente con la gravedad de la enfermedad (Tabla 2).

**Tabla 2.** Relación entre parasitemia y cantidad de HRP2 en plasma. Estudio de población (adaptada de Hendriksen *et al.*<sup>13</sup>)

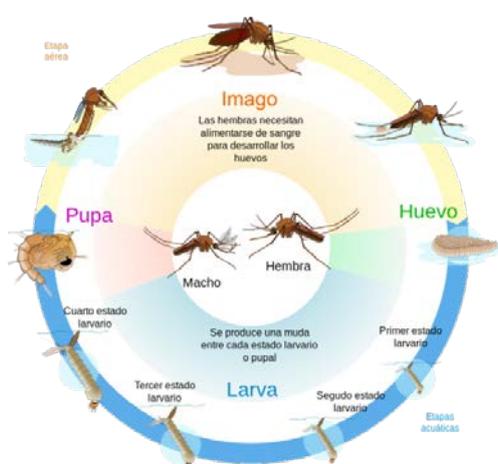
Características	Grupo 1: RDT-Controles negativos	Grupo 2: Portadores asintomáticos	Grupo 3: Malaria no complicada	Grupo 4: Malaria severa	Grupo 5: Malaria muy severa
Hemoglobina (g/dL)	11,3	10,3	9,8	4,8	6,5
Parasitemia (parásitos/μL)	145	1602	29836	28187	46619
Parasitemia (%)	0,003%	0,032%	0,596%	0,564%	0,932%
PfHRP2 (μg/L)	4 (1-11)	19 (15-23)	163 (137-119)	1510 (1180-1933)	1746 (1577-1934)

### 1.3. El vector: *Anopheles*

La malaria se transmite de manera exclusiva por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Dichas hembras se alimentan de fuentes de azúcar para obtener energía y de sangre para poder llevar a cabo la producción de sus huevos.

La intensidad de dicha transmisión depende de varios factores tales como la temperatura y humedad ambiental o si el insecto sobrevive el tiempo necesario para permitir que el parásito complete en ciclo en el huésped (10-18 días). A diferencia del humano, al mosquito no le repercute la presencia del parásito. Las aproximadamente 20 especies de *Anopheles* transmisoras de la enfermedad pican por la noche, especialmente las que tienen más importancia como vector. Estos mosquitos se crían en agua dulce estancada de zonas tropicales y subtropicales.

El ciclo de vida del mosquito *Anopheles* consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 2). Las tres primeras tienen lugar en el agua y duran entre 5 y 14 días que varían en función de la especie y de la temperatura ambiente. El mosquito *Anopheles* sólo actúa como vector transmisor de paludismo durante su edad adulta. Las hembras sólo sobreviven de 1 a 2 semanas una vez alcanzada dicha etapa.

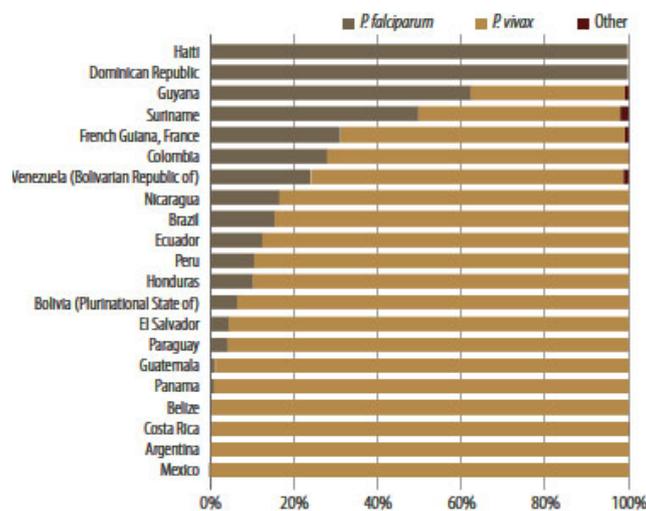


**Figura 2.** Ciclo de vida del mosquito *Anopheles*.

Los factores que afectan a la habilidad del mosquito para transmitir la enfermedad van desde su sensibilidad a los parásitos *Plasmodium* hasta su longevidad pasando por el grado en el cual prefiere alimentarse de humanos (antropofilia) o animales (zoofilia). Entender la biología de los mosquitos *Anopheles* puede ayudar a la hora de entender la transmisión del paludismo así como al diseño de estrategias de control adecuadas.<sup>4</sup>

#### 1.4. *Plasmodium*

De las alrededor de 150 especies identificadas de *Plasmodium*, sólo las adaptadas al hospedero humano tienen especial relevancia: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* (Figura 3).<sup>14,15</sup> De entre los 350 y 500 millones de episodios de paludismo mortales, que se estima que tienen lugar al año, la mayoría son causados por infección con *P. falciparum* y *P. vivax*, especialmente el primero. El vector que hace posible la transmisión es el mosquito *Anopheles*, ya introducido en el apartado anterior.

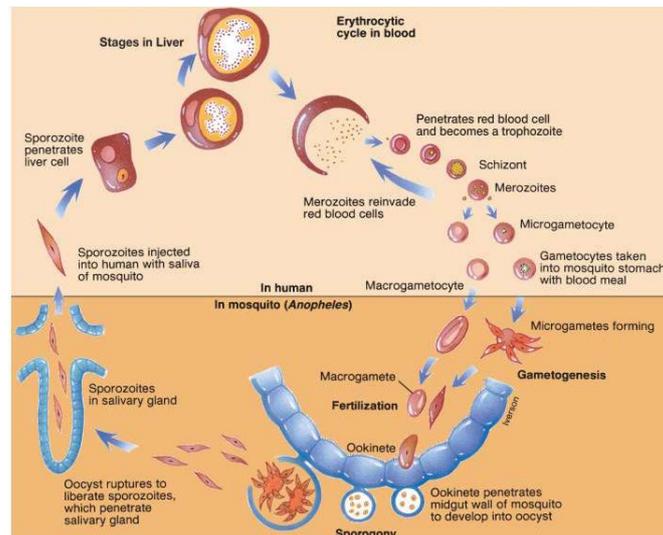


**Figura 3.** Distribución de las especies de *Plasmodium* en la Región Americana (2008-2012).<sup>1</sup>

El ciclo de vida de *Plasmodium* se divide en dos fases (Figura 4). La primera, asexual, tiene lugar en el hospedero humano; la segunda se da en el vector *Anopheles spp.*, ya introducido en el apartado anterior. En el humano, el ciclo empieza con la fase exoeritrocítica, cuando por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*, se introduce la forma infectante del parásito (esporozoíto) al torrente sanguíneo.

El siguiente paso es la migración de los esporozoítos al hígado, llevada a cabo en un período de tiempo de, aproximadamente, 30 minutos. Una vez en el hepatocito, tiene lugar la maduración tras un tiempo de incubación de 4 semanas, durante el cual dan paso a los esquizontes tisulares. Además, en las especies *P. vivax* y *P. ovale* existe otra forma del parásito, el hipnozoíto, donde el parásito permanece en forma latente dentro del hepatocito y es el responsable de las recaídas tras la infección primaria. Con la ruptura de los esquizontes tisulares, se liberan meronzoítos al torrente sanguíneo, iniciando la fase eritrocítica del ciclo (Figura 4). En ésta, los parásitos se adhieren e invaden los eritrocitos. Es aquí donde se desarrolla desde el estado de trofozoíto hasta esquizonte, el cual acumula merozoítos y luego se rompe, liberándolos para invadir a otros eritrocitos.<sup>4</sup> De hecho, la malaria sintomática está causada por la infección de los parásitos *Plasmodium* de los eritrocitos humanos, ya que estas células constituyen un ambiente peculiar para los parásitos. Evolutivamente, se ha adaptado

para adquirir la capacidad de remodelar la célula huésped mediante la exportación de cientos de proteínas con un amplio rango de funciones, la mayoría de las cuales están asociadas a virulencia e implicadas en la generación de un sistema novel de transporte en el eritrocito que promueve una mayor exportación. Además, tras estas modificaciones, el parásito puede ocultarse en una célula que, por la falta de un sistema de MHC, es prácticamente invisible inmunológicamente.<sup>16</sup>



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Plasmodium*. (Colegioamerica.edu.uy)

Una vez ya desarrollados los síntomas de la enfermedad, el ciclo sigue con su fase sexual, pues durante la fase eritrocítica, algunos trofocitos se diferencian en gametocitos femeninos o gametocitos masculinos. Estos gametocitos circundantes son los captados por el mosquito tras su picadura a una persona infectada. Una vez en el intestino del mosquito, éstos se fusionan para formar cigotos. Dichos cigotos se desarrollan a ooquinetos invasores, que tras pasar por los estadios de ooquiste y esporozoíto, se liberan y pasan a las glándulas salivares, desde donde pueden infectar al humano tras su picadura, reiniciando el ciclo.<sup>4</sup>

### 1.5. Analitos diana: HRP2

Las dianas más utilizada en las pruebas de diagnóstico rápido son la proteína 2 rica en Histidina (HRP2) específica de *P. falciparum* y dos enzimas pan-maláricas comunes en las rutas glicolíticas de todas las especies de *Plasmodium*: plasmodial lactato deshidrogenasa (pLDH) y aldolasa.<sup>17</sup>

Se han identificado al menos cinco proteínas asociadas a malaria en la superficie o junto al citoesqueleto de eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*: HRP1, HRP2, EMP1, EMP2 y EMP3).<sup>18</sup> HRP2 es una proteína de secreción y soluble que se identificó en todos los parásitos *P. falciparum*. Se encuentra también de manera concentrada en el citoplasma y membrana de los eritrocitos infectados, si bien al ser secretada por el parásito, también se encuentra en plasma sanguíneo y en medio de cultivo. HRP2 es producida y secretada por el parásito durante su crecimiento y desarrollo.

No se conoce en su totalidad la función exacta de HRP2, pero se cree que podría estar implicada en la polimerización de grupos hemo libres, tóxicos, para inactivarlos en forma de

hemozoína.<sup>19</sup> Se ha demostrado que la secuencia repetitiva de tres hexapéptidos (Ala-His-His-Ala-Ala-Asp), que aparece 33 veces en PfHRP2, puede ser el sitio de unión de grupos libres tóxicos hemo de esta proteína. El mecanismo exacto de polimerización se desconoce, pero se cree que podría facilitar el transporte de hemoglobina a la vacuola para, tras la degradación de la misma, catalizar la reacción de polimerización de los grupos hemo libres y tóxicos.<sup>20</sup>

La principal aplicación de la proteína rica en Histidina-2 es su empleo para la pronóstico de malaria mediante su detección en *P. falciparum* mediante un ensayo de captura con anticuerpo o un ELISA.<sup>21</sup> Los avances y mejoras en las técnicas inmunocromatográficas han permitido el desarrollo de un elevado número de métodos basados en la detección de HRP2. En el siguiente trabajo se va a llevar a cabo el reconocimiento de la proteína HRP2, la cual permitirá identificar la presencia de *P. falciparum*, la especie infectiva más mortal y común.

### **1.6. Inmunoensayo (IA) como método de diagnóstico**

El inmunoensayo es una técnica analítica basada en el reconocimiento específico y selectivo de un antígeno por parte de un anticuerpo. Esta técnica fue desarrollada por primera vez hace medio siglo por Yallow y Berson para la detección de la insulina en sangre.<sup>22</sup> Desde entonces, los inmunoensayos han sido utilizados en Química Clínica para la detección de innumerables compuestos como hormonas, fármacos, drogas y virus.

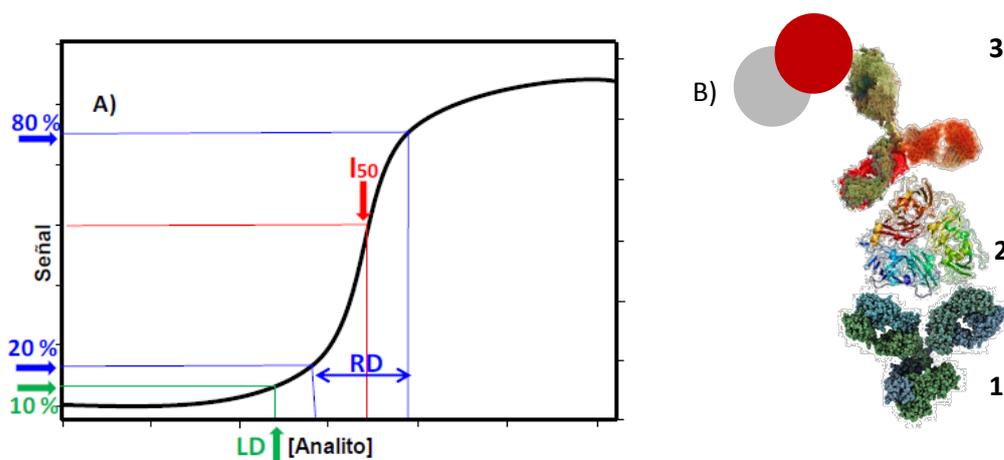
Los métodos inmunoquímicos se basan en el uso de anticuerpos, que se caracterizan por presentar en sus estructuras sitios de reconocimiento que les permiten establecer interacciones altamente específicas con los antígenos, cuya extensión depende de la intensidad de la interacción antígeno-anticuerpo.<sup>23</sup> Las principales ventajas analíticas de los inmunoensayos son la simplicidad y rapidez de las determinaciones, su alta sensibilidad y selectividad, así como el bajo coste en relación con los métodos cromatográficos de referencia, con resultados comparables;<sup>24</sup> además, la preparación de muestra es simple, tiene gran capacidad de trabajo y presentan posibilidad de automatización y aplicación para análisis de rutina en condiciones de campo.<sup>25</sup>

El hecho de que posean todas las ventajas ya descritas no significa que estén exentos de limitaciones. Los ensayos pueden verse afectados por multitud de factores, que van desde los medioambientales hasta el efecto matriz, pasando por la respuesta que el método pueda tener a compuestos análogos, metabolitos u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra (reactividad cruzada).<sup>26</sup> Es por eso por lo que se requiere trabajar en unas condiciones óptimas, condiciones que serán estudiadas en el presente trabajo con el fin de optimizar el inmunoensayo. Teniendo en cuenta conceptos generales, los inmunoensayos se pueden clasificar atendiendo a distintos factores. Así, según la interacción antígeno-anticuerpo, pueden ser homogéneos o heterogéneos. En el primero, la reacción inmunoquímica se produce con separación física entre el analito y el resto de componentes de la matriz; mientras que en el segundo sí que existe una interacción en la interfase entre el soporte sólido y la disolución, permitiendo la separación del analito del resto de la matriz.

Según el diseño, pueden ser competitivos o no competitivos. Si el analito compite con un homólogo marcado por los sitios específicos del anticuerpo, se trataría de ensayos competitivos; no obstante, si se usa un exceso de anticuerpo y se basa en la medida de los sitios ocupados, se trataría de ensayos sándwich o no competitivos. Éste último se emplea para la determinación de analitos de alta masa molecular con al menos dos sitios de unión.

Según el desarrollo, podría hablarse de inmunoensayo directo o indirecto en base a que la detección de la inmunointeracción se realice de forma directa o indirecta, respectivamente.

El tipo de inmunoensayo a realizar dependerá de la molécula a reconocer. Para este trabajo se ha optimizado un inmunoensayo heterogéneo, tipo "sándwich" o no competitivo y directo, para la determinación de HRP2. Con esta técnica se pretenden reconocer dos epítomos independientes de un mismo analito, cada uno de ellos con un anticuerpo; un anticuerpo de captura inmovilizado por adsorción en la superficie y un anticuerpo detector marcado con oro coloidal. Una de las propiedades de este tipo de ensayo es que la señal emitida es directamente proporcional a la concentración del antígeno y generalmente presenta sensibilidad debido a que la reacción se realiza con una cantidad no limitante de anticuerpo, permitiendo la detección de cantidades traza de analito (Figura 5).



**Figura 5.** A) Curva de calibración y (B) esquema de un inmunoensayo sándwich directo; 1: anticuerpo de captura; 2: analito diana; 3: anticuerpo detector marcado

A la hora de llevar a cabo un inmunoensayo se deben conocer los parámetros analíticos característicos como sensibilidad ( $I_{50}$ ), definida como la concentración de analito que reduce la señal máxima a la mitad; el intervalo de trabajo (RD), que se corresponde con el intervalo de concentración de analito que produce señales comprendidas entre el 80 y 20% de la señal máxima; y el límite de detección, siendo la concentración de analito que produce una inhibición de la señal del 10%.

### 1.7. Tecnología de disco compacto

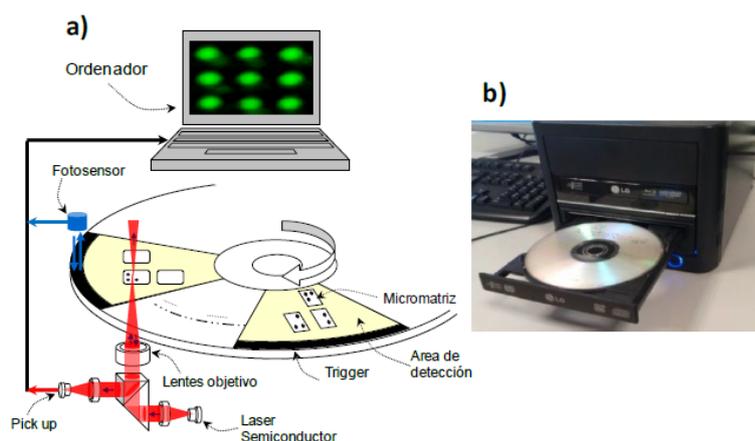
Entre las necesidades más importantes de las metodologías analíticas se encuentran la mejora de la sensibilidad, especificidad y rapidez de los ensayos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología que integra las prestaciones anteriormente mencionadas en una plataforma analítica accesible (CD/DVD convencional), con un sistema de detección sensible y portable (lector de CD/DVD comercial). Los ensayos realizados sobre esta plataforma se llevan a cabo en formato micromatriz, minimizando el gasto de reactivos y reduciendo considerablemente los tiempos de ensayo.

Los discos compactos están compuestos de una superficie de policarbonato de 1,2 mm de grosor recubierto con una capa metálica reflectiva de aluminio, plata u oro de 100 Å, protegido por una película de laca polimérica. Las características físicas del policarbonato presentan

múltiples ventajas para su uso como plataforma analítica. Se trata de un plástico muy hidrofóbico, con gran resistencia y estabilidad a altas temperaturas. Además de sus buenas propiedades ópticas, es fácilmente derivatizable químicamente y puede manipularse para crear dispositivos portátiles. Los discos compactos presentan una gran superficie de análisis ( $94 \text{ cm}^2$ ), lo que permite la inmovilización de un gran número de moléculas. Son sistemas rentables económicamente, dado que son distribuidos comercialmente a bajo coste (0,20 €/disco, aproximadamente). En esta categoría se incluyen los discos compactos (CD), DVDs, discos blu-ray, etc. Los CDs comerciales han mostrado ser plataformas eficaces para el desarrollo de ensayos bioanalíticos, dado que permiten tanto la adsorción pasiva como la inmovilización covalente de receptores biológicos.<sup>27</sup>

Los lectores de DVDs comerciales contienen un sistema óptico muy complejo formado por una fuente de luz láser (longitud de onda de 780 o 640 nm, respectivamente) que escanea un área de unos  $90 \text{ cm}^2$ . Un lector de CDs convencional es un dispositivo electrónico de consumo, muy sofisticado pero fabricado a gran escala, por lo que es económico (su precio oscila entre 20 y 300 €), y altamente competitivo frente a los escáneres comerciales de micromatrices (con un área máxima de escaneo es de  $18,75 \text{ cm}^2$ ), cuyo coste oscila entre los 30.000 y los 60.000 €.

En la literatura se ha descrito el uso de un dispositivo convencional lector/grabador de CDs para el registro de la imagen de una micromatriz, utilizando el diodo de luz del lector de CDs como la única fuente láser de barrido.<sup>28</sup> La medida del reconocimiento molecular se produce sin interrumpir la lectura normal del disco, alcanzando una sensibilidad del orden de  $\mu\text{g/L}$ . El esquema de registro completo se muestra en la Figura 6. El principio del sistema de detección se basa en la atenuación que sufre la intensidad del haz del láser reflejado, y que es detectada por el fotodiodo (pick-up) del grabador de discos durante la lectura del disco. La señal de reflexión se relaciona con la densidad óptica del producto de la reacción, que se correlaciona directamente con la concentración de analito. Las imágenes obtenidas del análisis de los discos son procesadas y analizadas mediante un programa informático desarrollado por el grupo de investigación.



**Figura 6.** a) Representación esquemática del sistema de detección. b) Imagen del prototipo utilizado como detector.

## 2.OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un sistema biosensor basado en la tecnología de disco compacto para la determinación cuantitativa de HRP2 de *Plasmodium falciparum* aplicable a la detección de malaria en zonas endémicas. Para lograrlo, se han planteado algunos objetivos parciales:

1. Optimización de las variables (composición y pH del tampón de impresión, concentración de anticuerpo anti-HRP2, tiempo del ensayo) que influyen en la sensibilidad y selectividad analítica del inmunoensayo.
2. Marcaje del anticuerpo detector con oro coloidal con el fin de reducir el número de etapas del ensayo, manteniendo su sensibilidad.
3. Análisis de muestras de suero fortificadas con HRP2.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Proteína HRP2 recombinante de *Plasmodium falciparum*, anticuerpo monoclonal de ratón anti HRP2 (anticuerpo de captura), anticuerpo policlonal de conejo anti HRP2 (anticuerpo detector). Suero sanguíneo humano proporcionado por el Hospital General de Valencia; partículas de oro de 5 nm; disolución de plata potenciadora del revelador compuesta por la disolución A (sal de plata) y B (iniciador de la reacción de reducción) y Tween 20. Como controles positivos se utilizaron inmunoglobulinas humanas purificadas y anticuerpo policlonal de cabra anti-IgGs humanas.

Los tampones empleados fueron básicamente tampón de impresión (Tris 0,1 M, pH 8.5) y tampón fosfato salino (PBS) 1X, con 0,05% de Tween 20 (PBS-T) como tampón de trabajo. Ambos fueron preparados con agua grado Milli-Q.

### 3.2. Equipos

Equipo de microimpresión marca BIODOT (Modelo AD1500, BioDot, INC., Irvine, CA) utilizado para dispensar el anticuerpo de captura en el disco en formato de micromatriz.

La lectura de los discos se realizó en un lector de CD/DVD estándar y las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante un software de tratamiento de imágenes desarrollado por el grupo de investigación.

La purificación de inmunoglobulinas G se realizó utilizando columnas de proteína A (Hi-Trap Protein A). La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría, utilizando NanoDrop 2000 Spectrophotometer.

### 3.3. Protocolos

#### 3.3.1. Conjugación de anticuerpos con partículas de oro coloidal de 5 nm.

1. Tomar 1,0 mL de oro coloidal 5 nm (1 OD) y dispensar en un vial de vidrio. Ajustar pH a 8,5 añadiendo gota a gota tampón carbonato (pH=9,6).
2. Añadir 100  $\mu$ L de una disolución que contiene 50  $\mu$ g de anticuerpo a conjugar (rabbit anti-human IgG) en tampón Tris 0,1 M pH=8,5.
3. Incubar con agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Transcurridos 30 min, añadir 100  $\mu$ L de tampón Tris 0,1 M pH=8,5 10% BSA (v/v) poco a poco y mantener en agitación durante 30 min.
5. Centrifugar a 14.000 rpm a 4 °C, durante 30 minutos.
6. Eliminar sobrenadante y resuspender con tampón Tris 0,1 M; pH=8,5.
7. Volver a centrifugar con las condiciones del punto 5.
8. Eliminar sobrenadante y resuspender con 100  $\mu$ L de tampón Tris 0,1 M pH=8,5; 1% BSA (v/v).
9. Medir la densidad óptica del conjugado de oro con el del Nanodrop.

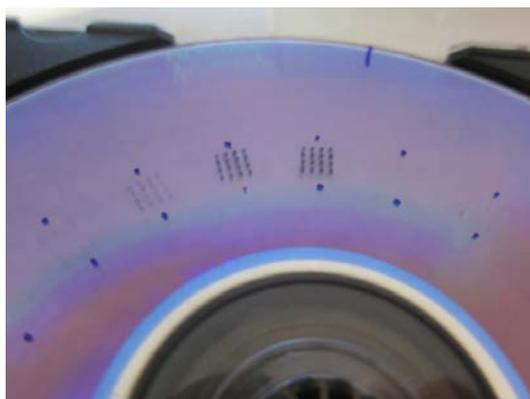
### 3.3.2. Purificación de IgGs de suero sanguíneo humano

1. Regular el flujo de la columna de inmunoafinidad a 1,0 mL/min (con PBS 2x).
2. Equilibrar primero PBS 2x durante 10 minutos.
3. Añadir 0,5 mL de suero sanguíneo.
4. Añadir de 10 mL de PBS.
5. Hacer pasar glicina 0,1 M; pH 2,7 y recoger 0,5 mL del eluido en viales que irán provistos con 25  $\mu$ L de tampón TRIS 1,0 M, pH 9,0.
6. Hacer pasar PBS 20 mM a pH 7,5 para reequilibrar la columna.

### 3.3.3. Inmunoensayo sobre DVD para la detección de *Plasmodium falciparum*

Las etapas del desarrollo del inmunoensayo fueron las siguientes:

1. Preparar la dilución de anticuerpo de captura en tampón de impresión.
2. Dispensar 50 nL de disolución de anticuerpo de captura mediante el equipo Biodot, imprimiendo un total de 20 matrices (4x4 puntos, separados 1 mm; ver Figura 7).
3. Dejar incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Lavar el disco con PBS-T y enjuagar con agua destilada.
5. Preparar diluciones en un rango de HRP2 (0-1,0  $\mu$ g/mL) en PBS-T
6. Dispensar 20  $\mu$ L sobre cada matriz y deja reaccionar durante 30 minutos. Volver a realizar punto 3.
7. Preparar la disolución de anticuerpo detector marcado con oro coloidal en PBS-T (1/500).
8. Dispensar 20  $\mu$ L sobre cada matriz y deja reaccionar durante 30 minutos. Volver a realizar punto 3.
9. Dispensar 1,0 mL de disolución potenciadora de plata. Distribuir la uniformemente en el disco con la ayuda de un cubre-disco transparente de 12 cm de diámetro. Dejar reaccionar 10 minutos.
10. Lavar el disco con agua destilada y secar.
11. Escaneado del disco con el lector de discos y el análisis de los datos.



**Figura 7.** Diseño de la micromatriz 4x4 en disco DVD. Cada disco contiene 20 micromatrices impresas, cada una de ellas utilizada para analizar una muestra.

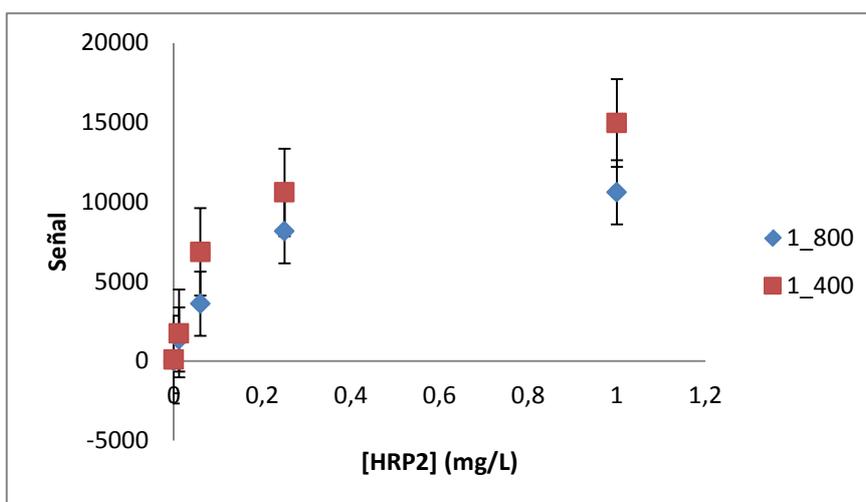
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Optimización del inmunoensayo

La puesta a punto del inmunoensayo sobre disco compacto requirió un estudio de optimización de las variables que afectan al ensayo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.

#### 4.1.1. Concentración de anticuerpo de captura

En primer lugar se evaluó la influencia de la concentración de anticuerpo anti-HRP2 en la señal analítica del inmunoensayo. Los discos se imprimieron con anticuerpo anti-HRP2 disuelto en tampón carbonato/bicarbonato (TC) 0,1 M a pH 9,6. Como condiciones de trabajo se utilizaron varias concentraciones de anticuerpo (5-40 mg/L) de anticuerpo de tapizado, y un rango de concentración de HRP2 entre 0 y 1,0 mg/L. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos para las concentraciones de anticuerpo de captura de 10 y 20 mg/L; dilución 1/800 y 1/400, respectivamente. Como se puede observar, Los mejores resultados en términos de sensibilidad y reproducibilidad (<15%) se obtuvieron imprimiendo el anticuerpo a una dilución 1/400 (20 mg/L). De acuerdo a estos resultados, se seleccionó esta concentración de anticuerpo para ensayos posteriores.

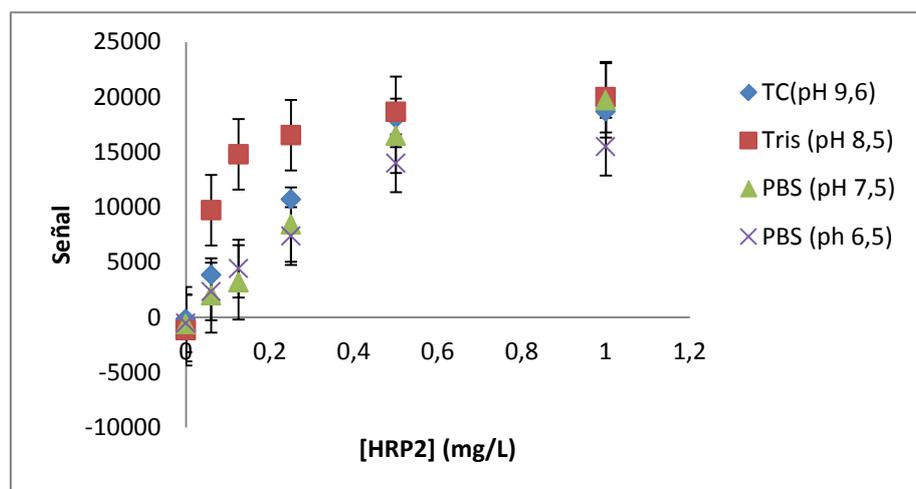


**Figura 8.** Evaluación de la concentración de anticuerpo de captura para distintas concentraciones de proteína HRP2 en PBS-T.

#### 4.1.2. Composición del tampón de impresión

Este estudio se llevó a cabo evaluando la influencia de la composición del tampón de impresión en la eficacia de inmovilización por adsorción, del anticuerpo anti-HRP2 sobre la superficie del disco. Los discos se imprimieron con anticuerpo anti-HRP2 disuelto en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, Tris 0,1 M, pH 8,5, PBS 10, pH 6,5 y 7,5.

Como condiciones de trabajo se utilizó 20 mg/L de anticuerpo de tapizado. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 9.** Influencia de la composición del tampón de impresión en la eficacia de inmovilización por adsorción.

Como se observa en la Figura 8, para una concentración de 1,0 ppm de HRP2 se alcanza la saturación para los tampones estudiados. No obstante, los mejores resultados en términos de sensibilidad se obtuvieron imprimiendo el anticuerpo disuelto en tampón Tris 0,1 M, pH 8,5, siendo este el tampón seleccionado para posteriores ensayos.

#### 4.1.3 Concentración de anticuerpo de detección y tiempo de incubación.

Tras fijar todos los parámetros anteriormente descritos, la última fase de la optimización del ensayo involucró el estudio de la concentración óptima de anticuerpo detector marcado. Para ello, se ensayaron diferentes diluciones (1/100-1/16.000) y tiempos de incubación (10-60 min). Los mejores resultados se obtuvieron en términos de sensibilidad (I50: 99,0  $\mu\text{g/L}$ ) y reproducibilidad (<15%), utilizando la dilución 1/500 de anticuerpo detector marcado y un tiempo de incubación de 30 min.

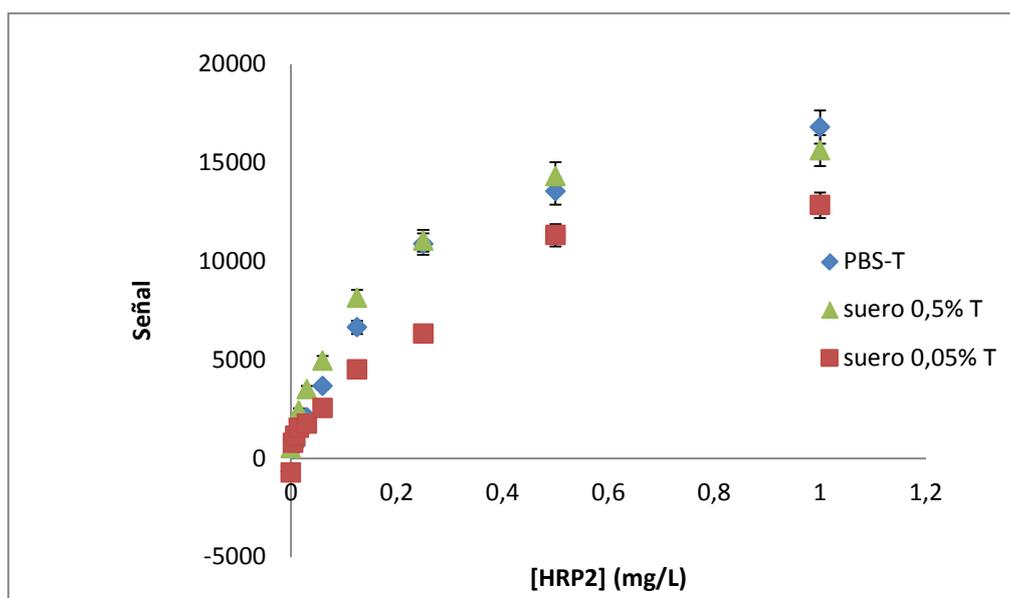
#### 4.1.4. Efecto matriz

El objetivo final del trabajo era la determinación de HRP2 en suero humano. Por ello, una tarea a desarrollar fue el estudio del efecto matriz y cómo ésta afectaba a la interacción antígeno/anticuerpo y por lo tanto en la sensibilidad del ensayo.

Para ello, el ensayo se llevó a cabo utilizando suero humano sin y acondicionado con diferentes porcentajes de tensoactivo Tween 20. En todos los casos, la muestra (suero o PBS-T) se fortificó con HRP2 en un intervalo de 0 a 1000  $\mu\text{g/L}$ . Como se observa en la Figura 10, los resultados indican que, efectivamente, existe un efecto matriz como consecuencia de distintos posibles factores que los componentes del suero ejercen sobre el inmunoensayo, como puedan ser interacciones con los componentes del mismo, efecto del ruido de fondo, etc. Los

resultados obtenidos con el suero sin acondicionar no se muestran en la figura dado que la señal ruido obtenida para una concentración de HRP2 de 1,0 mg/L no era detectable.

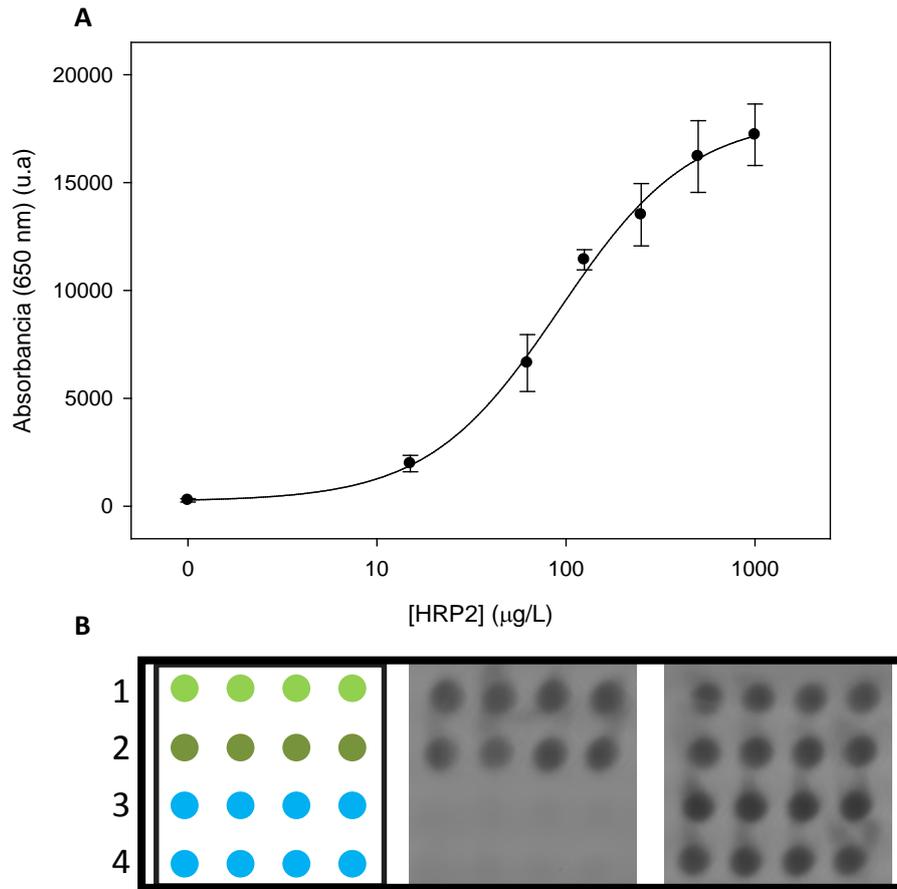
Los resultados obtenidos con suero acondicionado con 0,5% de Tween 20 (v/v) fueron similares a los obtenidos con PBS-T utilizado como referencia. Esto indica que en estas condiciones el efecto matriz no era significativo en el rango de concentración de HRP2 estudiado.



**Figura 10.** Evaluación del efecto matriz.

En la Figura 11 se muestra la curva de calibrado de HRP2 en suero acondicionado con Tween 20 en las condiciones optimizadas del ensayo. Los parámetros analíticos del inmunoensayo optimizado en disco compacto fueron:

1. Límite de detección 3,3  $\mu\text{g/L}$
2. Límite de cuantificación: 8,1  $\mu\text{g/L}$
3. Sensibilidad: 150: 99  $\mu\text{g/L}$
4. Intervalo de trabajo: 13,5-275  $\mu\text{g/L}$
5. Reproducibilidad en el intervalo de trabajo (4-16%)



**Figura 11.** A) Curva de calibrado para HRP2 (n=8). B) Los paneles son las imágenes obtenidas tras la lectura del ensayo con el prototipo detector. Los puntos de las filas 1 y 2 son los controles positivos y los puntos de las filas 3 y 4 se han obtenido imprimiendo anticuerpo de captura anti-HRP2. La concentración de HRP2 en los paneles del centro y de la derecha son cero y 1000  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

#### 4.2. Análisis de muestras reales

Tras la optimización de algunos parámetros del ensayo, se llevó a cabo un último apartado dedicado a establecer la aplicabilidad del método diagnóstico sobre muestras reales. No obstante, este apartado de análisis de muestras reales se ha realizado con muestras de suero humano dopadas a distintas concentraciones de HRP2 ante la imposibilidad de conseguir muestras reales infectadas. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.

Como se observa de los resultados mostrados en la Tabla 3, los valores de recuperación son buenos (70-117%) en el intervalo de trabajo del ensayo. Las muestras no infectadas en todos los casos se detectaron como negativas ( $< \text{LD}$ ) y las muestras dopadas con niveles de HRP2 elevados (hiperparasitemia) se detectan como positivas en todos los casos. A pesar de que el número de muestras analizadas no fue elevado, el biosensor desarrollado es útil para la detección de pacientes infectados con malaria, incluso a niveles de parasitemia bajos, obteniendo índices predictivos positivos y negativos excelentes. No obstante, hay que ser consciente de las limitaciones del presente estudio, puesto que la cantidad de muestras no es

significativa y no son muestras reales, sino dopadas. Se debe pues plantear como futuro trabajo de validación del biosensor el análisis de muestras reales positivas, tan pronto como el hospital disponga de las mismas.

**Tabla 3.** Resultados del análisis de muestras de suero fortificadas.

Muestra	HRP2 añadida ( $\mu\text{g/L}$ )	HRP2 detectada ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)
1	0	-	< LD
2	0	-	< LD
3	0	-	< LD
4	15	13	87
5	15	14	93
6	15	17	113
7	62,5	43	69
8	62,5	68	109
9	62,5	63	101
10	125	136	109
11	125	146	117
12	125	133	106
13	250	291	116
14	250	221	88
15	250	175	70
16	500	< 275	+
17	500	< 275	+
18	500	< 275	+
19	1000	< 275	+
20	1000	< 275	+
21	1000	< 275	+

## 5. CONCLUSIONES

El biosensor desarrollado basado en la tecnología de disco compacto es una herramienta útil como sistema de diagnóstico rápido para la detección de malaria en suero humano. Dada su buena sensibilidad y reproducibilidad, es posible detectar los estadios más tempranos de la enfermedad y determinar el grupo de parasitemia correspondiente.

Se han sentado las bases para el desarrollo de un test para la detección de HRP2 de *Plasmodium falciparum*, presentando un gran potencial para ser implementado en el diagnóstico rutinario, dada su robustez y portabilidad, obteniéndose resultados en tiempos cortos y consumiendo bajas cantidades de reactivos por muestra.

El marcaje del anticuerpo detector con oro coloidal ha permitido reducir el número de etapas de ensayo, manteniendo la sensibilidad.

Como perspectiva de futuro a medio plazo, el equipo de investigación SYM del Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia sigue trabajando en la integración de otros sistemas para la detección simultánea de malaria, VIH y Dengue.

## 6. REFERENCIAS

---

1. World malaria report **2013**
2. World Health Organization **2012**
3. World Health Organization **2011**
4. Campuzano-Zuluaga, C., Blair-Trujillo, S. *Medicina & Laboratorio*, 16, 7, **2010**
5. Faith H. A. *et al. Infect. Immun.* 76, 2240, 2008
6. Terrientes, Z. *Malar. J.* 9, 1, **2010**
7. Moody, A. *Clin Microbiol Rev.* 15, 66, **2002**
8. Han, E.T. *Expert Rev Mol Diagn* 13, 205, 2013
9. Hopkins *et al. J Infect Dis* 208, 645, **2013**
10. Mouatcho, J., Goldring, J.P.J. *Med. Microbiol.* 62, 1491, **2013**
11. Aydin-Schmidt, B., *et al. Malar J* 12, 349, **2013**
12. Maltha, J., Gillet, P., Jacobs J. *Clin. Microbiol Infect.* 19, 399, **2013**
13. Hendriksen, I., *et al. J Infect Dis.* 207, 351, **2013**
14. Cox-Singh, J. *Future Microbiology.* 5, 1157, **2010**
15. Sermwittayawong, N., *et al. Malar J* 8, 36, **2012**
16. Ellsworth, B., *et al. Cell Microbiol* 16, 351, **2014**
17. Tietje, K., *et al. Trends in Parasitology* 30, 5, **2014**
18. Rock, E.P *et al. Parasitol* 95, 209, **1987**
19. Lynn, A., Chandra, S., Malhotra, P., Chauhan VS. *FEBS letters* 459, 267, **1999**
20. Papalexis, V., *et al. Mol Biochem Parasitol* 115, 77, **2001**
21. Beadle, C., *et al The lancet* 343, 564, **1994**
22. Yallow, R., Berson, S. *J Clin Invest* 39, 1157, **1960**
23. Hennion, M.C., Barceló, D. *Anal Chi. Acta* 362, **1998**
24. Deng, A.P., *et al. Environ Sc. Technol* 37, 3422, **2003**
25. Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C. *J Agric Food Chem* 51, 691, **2003**
26. Nistor, C., Christensen, J., Ocio, N., Norgaard, L., Emmeus, J. *Anal Bioanal Chem* 380, 898, **2004**
27. Morais, S., Tortajada-Genaro, L.A., Maquieira, A. *Expert Rev Mol Diagn* 14, 773, **2014**
28. Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal Chem* 79, 7628, **2007**