



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA



**ESTUDIO DE UN INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL PARA LA DETECCIÓN
DE SARS-CoV-2 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO REPORTEROS
VISUALES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

FAZ HERNÁNDEZ CAROLINA

DIRECTORES:

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

DR. MARIANO DE JESÚS GARCÍA SOTO

SAN LUIS POTOSÍ, JULIO 2023

El programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 00896, en el Nivel Consolidado.

CVU de la beca otorgada por CONACYT: 1143592

El presente trabajo recibió apoyo financiero por parte del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), Proyecto UASLP-PTC-625 y por parte del CONACYT (Proyecto CF-2019-848290 de Ciencia de Frontera).



Estudio de un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de SARS-CoV-2 utilizando nanopartículas de oro como reporteros visuales by Carolina Faz Hernández is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Mis documentos página 1 de 1

Documentos Compartir Parámetros

<input type="checkbox"/>	Título	Informe	Autor	Procesados	Acciones
<input type="checkbox"/>	ESTUDIO DE UN INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO REPORTEROS VISUALES <small>1 part - 0 words</small>	21%	CAROLINA FAZ HERNÁNDEZ	7 jul 2023 14:28:25	 



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA



**ESTUDIO DE UN INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL PARA LA DETECCIÓN
DE SARS-CoV-2 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO
REPORTEROS VISUALES**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

FAZ HERNÁNDEZ CAROLINA

DIRECTORES:

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

DR. MARIANO DE JESÚS GARCÍA SOTO

SINODALES

Dr. Omar González Ortega

Dr. Mariano de Jesús García Soto

Dr. Raúl Ocampo Pérez

Dr. Nahum Andrés Medellín Castillo

SAN LUIS POTOSI, S.L.P. JULIO 2023

Comité Académico del Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química
Facultad de Ciencias Químicas

Presente:

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la estudiante de maestría Ing. Carolina Faz Hernández, titulada “ESTUDIO DE UN INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO REPORTEROS VISUALES”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 18 de Julio del 2023 a las 10:00 horas en la sala de exámenes profesionales de la facultad.

SINODALES

Dr. Omar González Ortega
Director de tesis
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Mariano de Jesús García Soto
Codirector de tesis
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Raúl Ocampo Pérez
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Nahum Andrés Medellín Castillo
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este proceso, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Les agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional, en cada momento, ya que con sus consejos me han brindado ese respaldo para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos permitiéndome culminar esta etapa de mi vida. Ellos son los que me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. Gracias por todas las oportunidades que me han brindado.

A mis hermanas Camila y Daniela por ser una fuente de inspiración y motivación en este logro académico. Por su apoyo incondicional desde principio hasta fin, pero sobre todo por darme tanto amor.

Agradecerles a todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, en especial a Saúl mi principal amigo y cómplice. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

Le agradezco enormemente al Dr. Omar González Ortega por su asesoría, dedicación y patrocinio dentro del proyecto. Porque siempre se dedicó a enseñarme y guiarme, con paciencia y dedicación. Fue una grata experiencia trabajar con usted. Gracias por permitirme explorar dentro del laboratorio. Sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr culminar este proyecto.

Le agradezco muy profundamente al Dr. Mariano García Soto por su tiempo y disposición. Gracias, por su orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis. Siempre se dedicó a resolver mis dudas, enseñarme y asesorarme en cada paso, para poder culminar este proyecto. Gracias por todos sus consejos, que me permitieron aprender mucho más, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

Gracias al Dr. Raúl Ocampo Pérez por su aportación en el análisis y discusión de resultados; por su asesoría, disposición y comentarios precisos, permitiendome tener una tesis más consisa. Gracias al Dr. Nahum Andrés Medellín Castillo por su comentarios que me permitieron aprender más y tener otra perspectiva sobre mi trabajo. Muchas gracias a mi comité.

RESUMEN

Este trabajo estableció una metodología para la evaluación y optimización de las condiciones de un inmunoensayo de flujo lateral (LFIA, *lateral flow immunoassay*) con nanopartículas de oro (AuNP) como agentes reporteros, usando sistemas modelos a fin de desarrollar un LFIA para la detección de partículas similares a la estructura del SARS-CoV-2.

Evaluamos la detección de partículas tipo virus (VLP, *virus-like particles*) y pseudovirus que presentan en su superficie proteínas multiméricas de SARS-CoV-2. Ambas son similares al virus nativo, pero carecen de genoma viral. Para esto utilizamos conjugados de AuNP con antisueros complejos conteniendo anticuerpos (anti-P6) afines a un epítipo de la región del dominio de unión del receptor (RBD, *receptor-binding domain*) de la proteína espícula y anticuerpos (anti-P50) que reconocen epítopos de la región conservada de la proteína espícula. La respuesta del inmunoensayo aumentó al emplear como agente de bloqueo 1 % de leche y dejando secar la membrana durante 24 h para disminuir respuestas no específicas en ensayos de flujo lateral. Como condiciones de operación fueron establecidas 15 μ L de conjugado concentrado 5 \times , conteniendo 0.05 % de polisorbato y dejando en contacto 15 min. La aparición de un punto rojo intenso fue indicativa de pruebas positivas. La membrana solo dio resultados positivos con los analitos de interés y no hay respuesta cruzada con otras muestras probadas.

Podría usarse como un método confiable en el monitoreo y control de COVID-19. Las pruebas existentes son adquiridas actualmente de otros países. Este proyecto contribuye al desarrollo de esta tecnología en el país y permitió establecer precedentes para continuar con el desarrollo de este tipo de pruebas de diagnóstico, que son necesarias en el mundo en desarrollo. Son una de las alternativas más prácticas para el diagnóstico de enfermedades.

Palabras Clave: Pseudovirus; LFIA; anticuerpo; AuNP; conjugados.

ABSTRACT

This work established a methodology for the evaluation and optimization of the conditions of a lateral flow immunoassay (LFIA) with gold nanoparticles as reporter agents, using model systems to develop an LFIA for the detection of SARS-CoV-2.

We evaluated the detection of virus-like particles (VLPs) and pseudoviruses that present SARS-CoV-2 multimeric proteins on their surface of. Both are similar to the native virus but lack the viral genome. For this, AuNPs conjugates were prepared with complex antiserum containing antibodies (anti-P6) related to an epitope of the receptor-binding domain (RBD) region of the spike protein and antibodies (anti-P50) that recognize epitopes from the conserved region of the spike protein. The immunoassay response is increased by using 1 % milk as a blocking agent and allowing the membrane to dry for 24 h to decrease non-specific responses in lateral flow assays. As operating conditions, 15 μ L of 5 \times concentrated conjugates were established, with 0.05% polysorbate and a contacting time of 15 min. The appearance of a deep red dot was indicative of positive tests. The membrane tested positive only with the analytes of interest and there was no cross-response with other samples tested.

The test developed above could be used as a reliable method in the monitoring and control of COVID-19. Existing tests are currently purchased from other countries. This project contributes to the development of this technology in the country and allows to establish precedents to continue with the development of this type of diagnostic tests, which are necessary in the developing world. They are one of the most practical alternatives for the diagnosis of diseases.

Keywords: Pseudovirus; LFIA; antibody; AuNP; conjugates.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES	4
2.1.	Coronavirus	4
2.2.	Estructura de SARS-CoV-2.....	4
2.3.	Patogénesis de SARS-CoV-2: Ingreso en la célula huésped.....	5
2.4.	Nanopartículas plasmónicas como biosensores.....	7
2.5.	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP).....	8
2.5.1.	El método de Turkevich	9
2.5.2.	El método de Frens	9
2.5.3.	AuNP en inmunoensayos	10
2.6.	Tipos de adsorción.....	11
2.7.	Adsorción física de proteínas en AuNP.....	12
2.8.	Factores relevantes en la estabilización de conjugados.....	14
2.9.	Inmunoensayo de flujo lateral	15
2.9.1.	Funcionamiento y componentes de LFIA	16
2.9.2.	Adsorción de antígenos y bloqueo de membranas de nitrocelulosa.....	17
2.9.3.	Nanopartículas de oro para inmunodetección de flujo lateral	18
2.9.4.	Pseudovirus.....	19
2.9.5.	Partículas similares a virus (VLP).....	20
2.9.6.	Detección de virus usando LFIA	21
3.	JUSTIFICACIÓN.....	22
4.	HÍPOTESIS	22
5.	OBJETIVOS.....	23
5.1.	Objetivo general	23

5.2.	Objetivos específicos	23
6.	METODOLOGÍA.....	24
6.1.	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP).....	24
6.2.	Conjugados AuNP-anticuerpo y estudio de adsorción.....	25
6.2.1.	Conjugados con inmunoglobulina G humana (IgGH).....	25
6.2.2.	Obtención de los datos experimentales de equilibrio de adsorción.....	25
6.2.3.	Cinética de adsorción.....	25
6.3.	Conjugados de AuNP-IgG para inmunoensayos.....	25
6.3.1.	Conjugados con inmunoglobulina G murina (IgGM)	26
6.3.2.	Conjugados con antisuero complejo.....	26
6.3.3.	Conjugados con ACE2 e IgGM.....	26
6.4.	Medición de absorbancia, diámetro hidrodinámico y potencial ζ	27
6.5.	Adsorción de antígenos en membranas de nitrocelulosa.....	27
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	29
7.1.1.	Caracterización de nanopartículas de oro de 30 y 48 nm.....	29
7.2.	Análisis de adsorción de anticuerpos en AuNP.....	31
7.2.1.	Isoterma de adsorción.....	31
7.2.2.	Cinética de adsorción.....	33
7.3.	Parámetros relevantes durante la conjugación.....	35
7.3.1.	Efecto del pH en la adsorción del anticuerpo sobre la AuNP	35
7.3.2.	Efecto de la concentración de IgGH en la adsorción sobre la AuNP.....	36
7.3.3.	Efecto de polisorbato 20 en la conjugación.....	38
7.3.4.	Efecto del tiempo y temperatura de incubación durante la conjugación.....	39
7.3.5.	Tamaño y potencial ζ de conjugados AuNP-IgGH	40
7.4.	Caso 1: LFIA con anticuerpos puros IgGM y anti-IgGM	45
7.4.1.	Efecto de la concentración de anticuerpo en la conjugación.....	45
7.4.2.	Agentes de bloqueo para estabilizar AuNP-IgGM.....	46

7.4.3.	Efecto del pH con anticuerpos puros y la adición de proteína de bloqueo.....	47
7.4.4.	Monitoreo de la agregación de los conjugados	48
7.4.5.	LFIA: IgGM contra IgG anti-murina	49
7.5.	Caso 2: AuNP-Suero ovino-péptido P6 vs. VLP	52
7.5.1.	Producción del Anticuerpo Anti-P6	53
7.5.2.	Caracterización del conjugado AuNP-anti-P6.....	54
7.5.3.	Efecto del agente de bloqueo y su concentración en la producción de membranas reactivas	56
7.6.	Caso 3. AuNP-anti-P50 vs. Pseudovirus	60
7.6.1.	Síntesis de conjugados con AuNP-anti-P50	60
7.6.2.	Inmunoensayo de flujo lateral: AuNP-anti-P50 vs. pseudovirus.....	60
7.7.	Caso 4. ACE2 + IgGM vs. Pseudovirus	63
7.7.1.	ACE2	63
7.7.2.	Ajuste de pH de conjugación.....	64
7.7.3.	Adición de proteína de bloqueo.....	64
7.7.4.	Resultados en LFIA anti-IgGM vs. conjugados IgGM+BSA	65
7.7.5.	Inmunoensayo de flujo lateral ACE2+IgG murina vs. pseudovirus/ anti-IgGM...67	
7.7.6.	Efecto de Vroman al utilizar dos proteínas	68
7.8.	Puntos por considerar	68
8.	CONCLUSIONES.....	70
9.	GLOSARIO.....	71
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial aún enfrenta la infección por el coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) (Huang, et al., 2020). Este surgió a finales de 2019 y los sistemas de salud fueron gravemente afectados a inicios de 2020 (Grant, et al., 2020). El diagnóstico rápido, confiable y selectivo de SARS-CoV-2 es extraordinariamente importante dada su velocidad de transmisión y la gravedad de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19, *coronavirus disease 2019*) que ocasiona en personas mayores o susceptibles (Guan, et al., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el brote de COVID-19 fue una pandemia con más de 676.6 millones de casos y casi 6.9 millones de muertes en todo el mundo reportados hasta el 10 de marzo de 2023 (JHU Coronavirus Resource Center, 2023). El diagnóstico actual más sensible, basado en ácidos nucleicos, requiere instrumentos especializados, además de ser lento y laborioso. Otro tipo de tecnologías convenientes y de bajo costo son necesarias con urgencia. La pandemia de COVID-19 demostró que el mundo aún no está adecuadamente preparado para estos escenarios y que existe una necesidad urgente para aumentar la investigación en este campo.

Las pruebas de COVID-19 disponibles en forma clínica y comercial actualmente están divididas en dos categorías principales. La primera incluye ensayos moleculares para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 utilizando técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real (Quan, et al., 2019). Esta prueba es muy sensible y precisa, pero considerablemente costosa y lenta, ya que su implementación requiere instrumentos y materiales especializados, además de personal capacitado profesionalmente (Moitra, et al., 2020). Estos métodos como tal no son adecuados para monitorear la propagación y la contención de los brotes de COVID-19 en tiempo real fuera de laboratorios.

La segunda categoría incluye ensayos serológicos e inmunológicos basados principalmente en la detección de anticuerpos producidos por individuos debido a la exposición al virus o en

la detección de proteínas antigénicas en individuos infectados (Hussein, et al., 2020). En la actualidad, hay una creciente atención hacia inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, *lateral flow immunoassay*) que tienen alta sensibilidad, están basados en procedimientos, con detección rápida y portátiles (Nuccetelli, et al., 2020). Estos son útiles para la detección cualitativa y cuantitativa de antígenos y anticuerpos específicos en una variedad de muestras biológicas (Hsieh, et al., 2021). Estas incluyen orina, saliva, sudor, suero, plasma, sangre y otros fluidos complejos, lo que hace a las pruebas LFIA útiles en el diagnóstico rápido de enfermedades (Grant, et al., 2020). Actualmente hay dos tipos de pruebas rápidas para la detección de COVID-19 (Quan, et al., 2019). El resultado puede obtenerse de 15 a 20 min después de tomar la muestra. 1) La prueba de antígenos, útil para detectar la enfermedad en una fase inicial, se realiza con una muestra de vías respiratorias y detecta la presencia de proteínas estructurales del virus (Kim, et al., 2021). De manera general, esta prueba es recomendable para personas que presentan síntomas para confirmar una infección por el virus. 2) La prueba rápida de anticuerpos, realizada con una gota de la sangre del individuo extraída del dedo, se utiliza para encontrar anticuerpos contra virus en el paciente (Benjamin, et al., 2020). Esta prueba no sirve para una fase inicial, ya que no detecta el virus, sino los anticuerpos producidos por el individuo.

En este proyecto empleamos citrato para reducir Au^{3+} a Au^0 , acorde al método de síntesis más reportado (Frens, 1972). Las nanopartículas metálicas, especialmente las nanopartículas de oro (AuNP), tienen una morfología diversa y propiedades fisicoquímicas de interés en aplicaciones biomédicas (Gupta, et al., 2020). Las AuNP se unen fácilmente a proteínas y, por lo tanto, forman conjugados estables (Dykman & Khlebtsov, 2012). Debido a todas estas propiedades, son útiles en muchas aplicaciones, incluyendo ensayos de diagnóstico como marcadores potenciales en el desarrollo de pruebas rápidas LFIA.

Los conjugados de proteína con AuNP son utilizados activamente en el área biomédica, en varios sistemas bioanalíticos y biosensores (Adekoya, et al., 2018). La amplia aplicación de conjugados de AuNP es debida a sus propiedades ópticas y estabilidad en esta escala (Zhang, et al., 2019). Otra ventaja de los conjugados es su sencilla preparación. El método más comúnmente empleado para conjugar proteínas en la superficie de AuNP es mediante su

inmovilización por adsorción física. Este método de conjugación produce una menor inestabilidad e inactivación de las proteínas inmovilizadas. Durante la preparación de conjugados AuNP-anticuerpo por fisisorción deben considerarse varios parámetros, incluyendo: a) la cantidad añadida de anticuerpos (Nadezhda, et al., 2017), b) su punto isoeléctrico (pI) (Hong, et al., 2010), c) el pH de la suspensión (Zherdev, 2020) y d) el tamaño de las nanopartículas de oro (Gupta, et al., 2020). Los factores anteriormente mencionados son clave e influyen en el límite de detección del analito en un inmunoensayo de flujo lateral. La consideración principal para su uso práctico consiste en determinar la concentración mínima de anticuerpos para la preparación de conjugados estables cuando estos deben tener una alta actividad de captura de antígenos (Mazouzi, et al., 2020).

En este trabajo hemos empleado un suero hiperinmune conteniendo anticuerpos contra un epítipo de la proteína S. Los estudios mostraron que los anticuerpos contra las proteínas S eran adecuados para el inmunoensayo rápido en cuanto a especificidad, precisión y estabilidad. Posteriormente, diseñamos una prueba rápida de flujo lateral basada en ella que puede ser utilizada en la detección de COVID-19. Esto potencialmente ahorrará tiempo para el control de brotes. Estas pruebas rápidas y sensibles son más adecuadas para algunas áreas remotas y con necesidades especiales, restringidas por una condición médica o para exámenes de detección rápidos y de gran número.

2. ANTECEDENTES

2.1. Coronavirus

Los coronavirus son virus infecciosos que constan de un segmento de ácido ribonucleico (ARN) rodeado por una cubierta proteica (Benjamin, et al., 2020). Estos pertenecen a la familia *Coronaviridae*, distribuida ampliamente entre humanos, otros mamíferos y aves. Estos causan enfermedades respiratorias, entéricas, hepáticas, renales y neurológicas (Dan, et al., 2021).

De acuerdo con el genoma y el análisis filogenético de los coronavirus, la familia *Coronaviridae* está dividida en cuatro géneros: α , β , γ y δ (Baker, et al., 2021). Los coronavirus (CoV) de los géneros α y β infectan generalmente a mamíferos y humanos, mientras que los coronavirus de los géneros γ y δ infectan principalmente a aves (Grant, et al., 2020). Ya ha habido dos brotes zoonóticos de β -CoV antes del brote de SARS-CoV-2 en las últimas dos décadas: el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002 (Hernández, et al., 2021) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012 (Zhong, et al., 2021).

2.2. Estructura de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un β coronavirus envuelto, con forma esférica y un diámetro aproximado de 125 nm (Benjamin, et al., 2020). Tiene el nombre de coronavirus, dado que de la envoltura lipoproteica emergen glicoproteínas espícula (S) que le dan apariencia de corona al visualizarlo en un microscopio electrónico (Liu, et al., 2021). Su genoma está constituido por ARN de cadena sencilla. Al igual que otras variantes de coronavirus, el SARS-CoV-2 está conformado de una envoltura lipoproteica en su exterior (Nuccetelli, et al., 2020). Su genoma consiste en una hebra monocatenaria no segmentada de ARN de polaridad positiva y de aproximadamente 30,000 pares de nucleótidos con 15 marcos de lectura abiertos, mismos que le permiten formar hasta 28 proteínas (Quan, et al., 2019); un número inusualmente elevado para un virus con genoma tan pequeño.

En la **Figura 1** se indican los cuatro tipos de proteínas estructurales principales: la glicoproteína espícula (S), la proteína de nucleocápside (N), la proteína de envoltura (E) y la proteína de membrana (M).

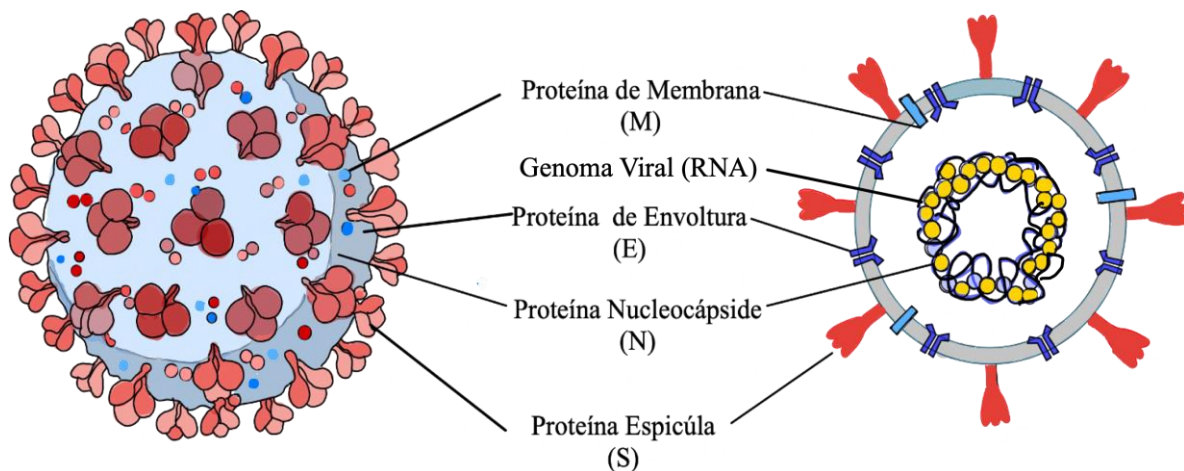


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. La envoltura exterior, formada por las proteínas M y E, con su distintiva proteína S y la proteína N protegiendo al material genético (RNA).

La glicoproteína S actúa como ligando para la adsorción del virus al epitelio respiratorio a través del dominio de unión al receptor celular (Xiaoyang, et al., 2023). Esta glicoproteína S es determinante, ya que facilita la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula huésped permitiendo la liberación del genoma viral al interior de la célula infectada (**Figura 2**). La proteína M es una glicoproteína transmembrana que da la forma al virus y permite la unión a la nucleocápside (N). La proteína E es clave en el ensamblaje y liberación del virus y la proteína N forma parte de la nucleocápside al unirse al material genético (Liu, et al., 2021). La glicoproteína S es el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes, por lo tanto, es clave en la inducción de inmunidad humoral y celular durante la infección con SARS-CoV-2.

2.3. Patogénesis de SARS-CoV-2: Ingreso en la célula huésped

Para ingresar a la célula huésped, el SARS-CoV-2 posee una alta afinidad para reconocer como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, *angiotensin-converting enzyme 2*), como puerta de entrada para establecer la infección (Hernández, et al., 2021). ACE2 está ampliamente expresada en membranas de casi todos los tejidos de pulmón, corazón, riñón, vía biliar, hígado e intestino (Wong, et al., 2017).

ACE2 es una proteína transmembrana y es responsable de la conversión de angiotensina I en angiotensina II; esta tiene un rol importante en la homeostasis y en la respuesta

proinflamatoria (Wu, et al., 2020). La **Figura 2** se representa el proceso de unión al receptor ACE2, la glicoproteína S de SARS-CoV-2 es la responsable de mediar dos procesos fundamentales en la infección a través de sus dos subunidades denominadas S1 y S2. La subunidad S1 se une al receptor ACE2 y la subunidad S2 determina la fusión permitiendo la entrada del virus por endocitosis (Guan, et al., 2020). Respecto a la respuesta serológica inducida por COVID-19, hay una elevación de IgM a partir del día 9 desde el inicio de los síntomas y desde el día 14 para IgG (Wang, et al., 2020). La magnitud de la respuesta de anticuerpos neutralizantes parece estar correlacionada con la severidad de la enfermedad, siendo menor en individuos asintomáticos, quienes además presentan una declinación más rápida. A la fecha los datos son limitados para determinar con certeza la duración y calidad de la respuesta inmune (Liu, et al., 2021).

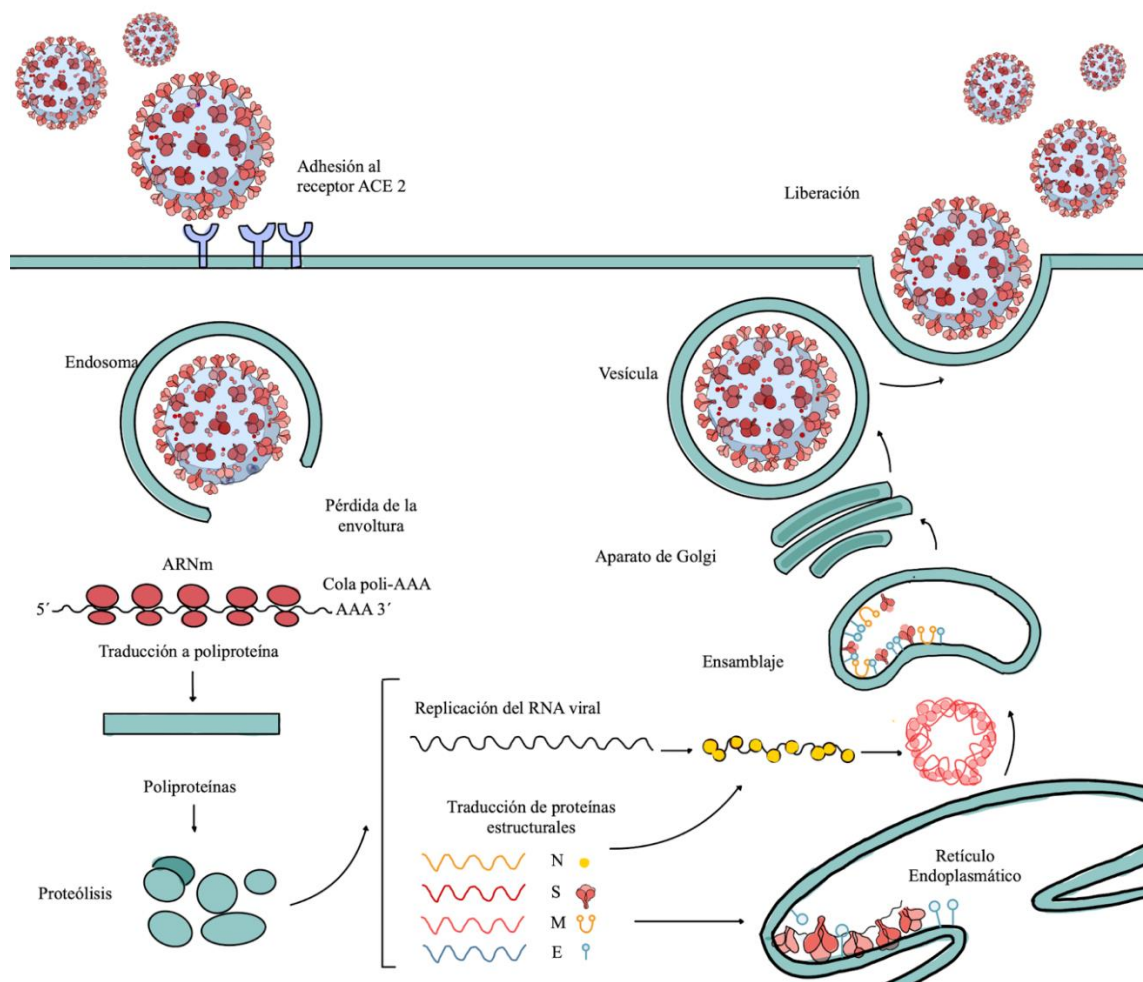


Figura 2. Ingreso de SARS-CoV-2 en una célula huésped, mostrando su ciclo de replicación.

2.4. Nanopartículas plasmónicas como biosensores

Las AuNP exhiben un fenómeno llamado resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR, *localized surface plasmon resonance*) que resulta de la oscilación de electrones libres en su superficie (Kah, et al., 2007). Esto hace que las AuNP generen una señal visible a simple vista (Adekoya, et al., 2018). Las AuNP han generado un gran interés como transductores en el desarrollo de biosensores ópticos debido son relativamente estables en una variedad de medios, su facilidad de síntesis, funcionalización, son biocompatibles con diversos fluidos fisiológicos (Maleki, et al., 2017) y tienen una alta relación superficie-volumen, lo que proporciona una química de superficie especial para la conjugación de biomoléculas (Loiseau, et al., 2019).

El fenómeno de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) representado en **Figura 3a** que ocurre cuando una onda de luz incidente queda atrapada dentro de nanopartículas conductoras más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente. Los electrones de la banda de conducción en las AuNP oscilan colectivamente a una frecuencia de resonancia inducida por la onda incidente (Faraday, 1857).

Como resultado, las AuNP absorben y/o dispersan la luz de forma muy intensa en determinadas longitudes de onda, traducándose en bandas características en su espectro de extinción (**Figura 3b**).

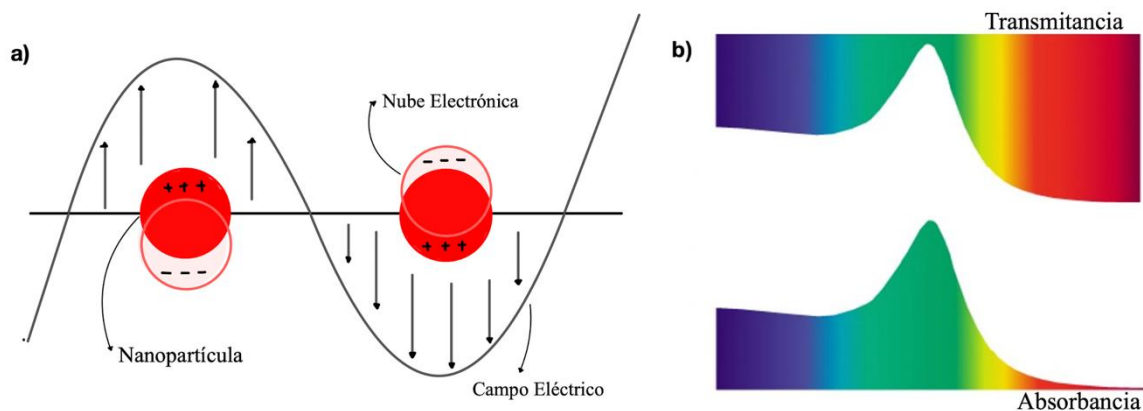


Figura 3. Propiedades ópticas de nanopartículas de oro. Un haz de luz causa la oscilación de electrones en superficie (a), causando principalmente la absorción y transmisión de esta (b).

Las AuNP muestran propiedades ópticas notables. Por ejemplo, las AuNP esféricas de 10 a 30 nm de diámetro muestran una banda de absorción en el rango visible ($\lambda_{\max} = 520$ nm), con

un coeficiente de extinción extremadamente alto (Jia, et al., 2022). Esta propiedad única impulsó el desarrollo de dispositivos de ensayo de flujo lateral (LFA, *lateral flow assays*) que utilizan AuNP como indicador. Estos dispositivos de un solo uso utilizan membranas reactivas inmunocromatográficas, lo que proporciona una detección simple, rápida, de bajo costo y fácil de usar con varios analitos (Moeremans, et al., 1984).

Otra propiedad extremadamente útil de las NP plasmónicas es la sensibilidad de la banda LSPR a cambios menores de la constante dieléctrica y el índice de refracción (IR) del entorno local. Esta propiedad permite la detección de eventos de unión mediante mediciones de espectroscopia de absorción estándar o incluso visualmente (Loiseau, et al., 2019). En 1998, Englebienne fue el primero en explotar el cambio de la señal de LSPR inducido por la unión de un antígeno a bioconjugados AuNP-Ab para determinar su constante de disociación. Además, las AuNP también pueden mejorar otras señales ópticas como la fluorescencia y la dispersión de la luz (Cho, et al., 2018).

2.5. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

Las propiedades físicas y químicas únicas de las AuNP las hacen eficientes para diferentes aplicaciones (Toubanaki, et al., 2020). Por lo tanto, al ser fáciles de conjugar y sensibles ante cambios mínimos, son empleadas como marcadores en inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) (Zhu, et al., 2016). El oro coloidal es una suspensión estable y uniforme de nanopartículas frecuentemente entre 2 y 150 nm (Daruich, et al., 2019). El estado monodisperso ocurre debido a un balance entre las fuerzas que actúan sobre estas nanopartículas (Dykman & Khlebtsov, 2012). Debido a su naturaleza hidrofóbica, las AuNP metálicas tienden a agregarse en complejos mayores mediante fuerzas de van der Waals (Ventura, et al., 2020). Esta es la razón por la que deben ser estabilizadas, por ejemplo, con moléculas de citrato sobre su superficie (Lin, et al., 2010), aportando cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las partículas.

Las AuNP pueden sintetizarse mediante la reducción de iones de oro, principalmente AuCl_4^- , utilizando agentes reductores fuertes o débiles (Englebienne, 1998). Los métodos principales emplean borohidruro y citrato, los iones más comunes para producir AuNP. El borohidruro al ser un reductor fuerte, permite realizar el proceso de reducción a temperatura ambiente,

produciendo AuNP más pequeñas (Dykman & Khlebtsov, 2012). El citrato es un reductor moderado y requiere llevar a cabo la reacción a temperatura elevada. En la producción de AuNP ocurre la reacción de reducción química del ácido cloroáurico por acción del citrato trisódico, que actúa como agente reductor y estabilizador (González, et al., 2015). Existen diferentes métodos para producir AuNP de distinto tamaño, entre los más usuales están el de Turkevich y el de Frens.

2.5.1. El método de Turkevich

El método Turkevich, aunque es el más antiguo, sigue siendo popular debido a su simplicidad (Turkevich, et al., 1951). Permite obtener AuNP de 14.5 nm de forma sencilla y reproducible. En este método, que tiene lugar en un medio acuoso, los iones citrato son mezclados con una solución de ácido cloroáurico. Al calentarse, ocurre el proceso de reducción, evidente por un cambio de coloración en la solución inicial (que se convierte en una suspensión). El cambio de coloración sigue el orden: amarillo, incoloro, púrpura y rojo. Los iones citrato son adicionados en exceso para acelerar la reacción de reducción y estos se adsorben en la superficie de las AuNP producidas y causan su estabilización. Por lo tanto, este método genera AuNP cargadas negativamente (González, et al., 2015).

2.5.2. El método de Frens

El método Turkevich fue modificado posteriormente por Frens para producir AuNP de diferentes tamaños (Frens, 1972). Sigue basándose en un sistema acuoso en el que la relación de volumen entre una solución de HAuCl_4 y soluciones con concentraciones decrecientes de citrato puede variarse para cambiar el diámetro de las AuNP en un rango de 16 a 147 nm. El aumento de esta proporción favorece la producción de AuNP de mayor tamaño. Podría esperarse que una proporción mayor produjera AuNP más grandes, ya que la reacción de reducción se alentaría. Posteriormente fue demostrado que una proporción menor estabiliza rápidamente las AuNP más pequeñas, mientras que la situación contraria promueve la agregación de las AuNP pequeñas en AuNP más grandes (Jingfang, et al., 2018).

Al igual que con el método Turkevich, el método Frens produce AuNP estabilizadas electrostáticamente debido a los iones citrato adsorbidos en la superficie y en consecuencia cargadas negativamente.

2.5.3. AuNP en inmunoensayos

Los principales marcadores utilizados en LFIA son nanopartículas de oro (Li, et al., 2021). La naturaleza de las AuNP determina en gran medida sus propiedades ópticas y cantidades mínimas que puedan detectarse en la membrana (Zhong, et al., 2021). La variación en el tamaño de las AuNP tiene un efecto profundo en la sensibilidad de LFIA y afecta las eficiencias de conjugación. Por lo tanto, controlar el tamaño y la forma de las AuNP sintetizadas es esencial para aumentar la eficiencia de la bioconjugación y aumentar la sensibilidad de detección del LFIA (Borse, et al., 2020).

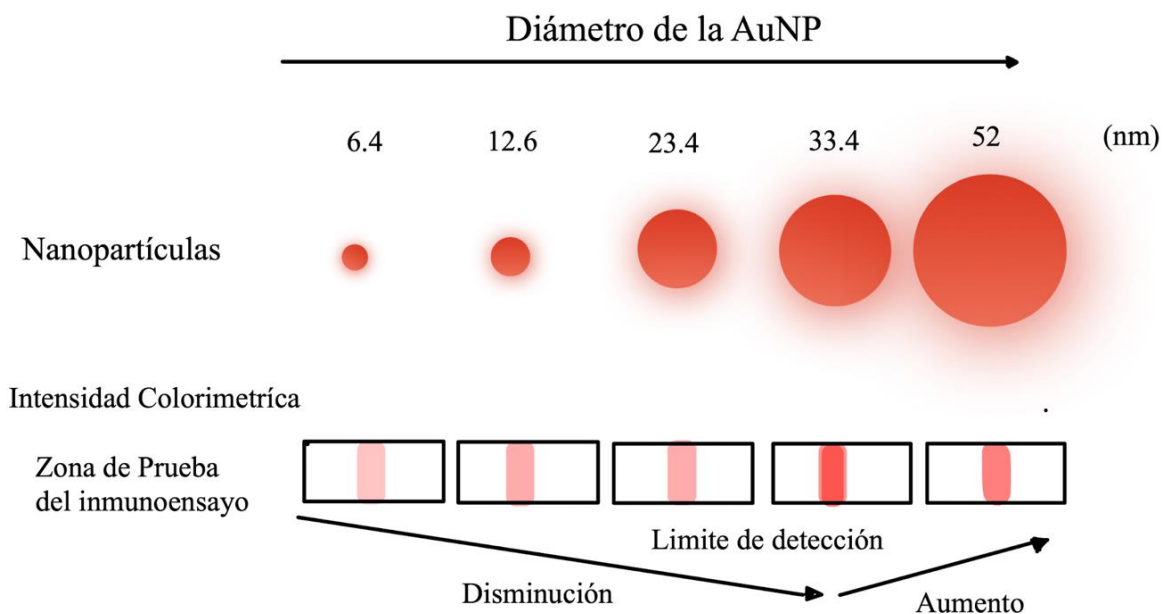


Figura 4. Influencia del tamaño de AuNP en la detección de analitos de interés en inmunoensayos (Safenkova, 2016).

Entre los reporteros colorimétricos, las AuNP tienen alta intensidad colorimétrica, lo que conduce a una mayor sensibilidad en un LFIA (Nag, et al., 2020). Además, otras características de las AuNP, como la no toxicidad, la rentabilidad, la facilidad de producción, y la estabilidad en suspensión, las convierten en candidatas ideales como indicadores de señal y adecuadas para aplicaciones médicas e industriales (Kim, et al., 2021). Las AuNP exhiben un color fuerte en la región visible debido a los efectos de la superficie del plasmón, y pueden conjugarse fácilmente con biomoléculas como anticuerpos para lograr el diseño de un biosensor deseado. Safenkova et al. (2012) investigaron si el tamaño de la nanopartícula tenía una influencia en la detección del analito. Los resultados mostraron que si las partículas

tienen un diámetro menor a 30 nm el límite de detección y la intensidad de la señal disminuyen, asimismo si el diámetro es mayor a los 50 nm la intensidad igualmente disminuye (**Figura 4**). Zhu et al. (2016) sintetizaron AuNP de diferentes tamaños por un método modificado de Frens para un ensayo de flujo lateral reportaron que el tamaño de la partícula con mejor intensidad en membrana era empleando AuNP de 25 nm para la detección del virus del mosaico de la soya. Zhang et al. (2019), cuantificaron la intensidad de la señal utilizando AuNP de tres diferentes diámetros 27, 37 y 57 nm, obteniendo la mejor respuesta en los estudios de LFIA con las AuNP de 27 nm.

La intensidad de la señal registrada de AuNP es determinante para la sensibilidad del ensayo. La sensibilidad limitada de los LFIA basados en AuNP es debido a la tasa de captura (Syedmoradi, et al., 2017). Además, los parámetros de las AuNP, como la forma y el tamaño, pueden afectar el límite de detección. Baker et al. (2021) utilizaron nanopartículas de oro conjugadas con ácido N-acetilneuramínico para capturar la proteína S1 del SARS-CoV-2. Evaluaron el impacto de diferentes diámetros de nanopartículas de oro (16, 35, 55 y 70 nm) en la unión. Las AuNP de 35 nm de diámetro proporcionaron una relación señal/ruido superior en comparación con las partículas de 16 nm, y las partículas más grandes no mejoraron más la intensidad de la señal (Baker, et al., 2021).

Con base en diversas publicaciones consultadas las AuNP pueden usarse como reporteros visuales para producir pruebas LFIA con un diámetro promedio entre 25 y 35 nm.

2.6. Tipos de adsorción

En la **Tabla 1** muestra una comparación entre adsorción física, también llamada fisisorción, y por adsorción química, también llamada quimisorción. Esto depende de las interacciones entre las moléculas y la superficie. En la adsorción física, las fuerzas débiles como las interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals están involucradas (Mazouzi, et al., 2020). Los enlaces químicos fuertes, como los enlaces covalentes, se forman entre la superficie y las moléculas adsorbidas en la adsorción química (Zherdev, 2020). La adsorción química es más lenta que la adsorción física y, por lo general, forma una capa mono molecular en la superficie del adsorbente, mientras que la adsorción física puede implicar la formación de una multicapa en la superficie (Maleki, et al., 2017).

Tabla 1. Comparación entre adsorción física y química (Zbigniew, 2019).

Adsorción Física	Adsorción Química
Involucra fuerzas electrostáticas y de van der Waals.	Formación de enlaces covalentes entre la superficie y la molécula adsorbida.
Rápida	Lenta
Reversible	Irreversible
No muy específica	Específica
Pueden formarse multicapas	Idealmente forma monocapas
Energía de activación no requerida	Energía de activación requerida

La fisisorción de nanobioconjugados ha ganado popularidad recientemente debido a que la nanotecnología es considerada una de las tecnologías más versátiles en diferentes áreas de aplicación, además la mayoría de las interacciones entre biomoléculas y nanomateriales/nanoestructuras pueden actualmente ser clasificadas como fisisorción (Qiquige, et al., 2016).

2.7. Adsorción física de proteínas en AuNP

La **Figura 5** representa las principales interacciones (interacciones electrostáticas, fuerzas atractivas de puente de hidrógeno, hidrofóbicas y de van der Waals) entre AuNP y proteínas (González, et al., 2015). Es el método de conjugación más sencillo e implica una interacción directa. Su facilidad está basada en que no es necesario modificar químicamente la superficie de las AuNP ni el anticuerpo a conjugar.

Durante la preparación de bioconjugados de AuNP-anticuerpo por fisisorción deben considerarse varios parámetros: a) el pH de la suspensión (Zherdev, 2020), b) el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo (Hong, et al., 2010) y c) la cantidad añadida de anticuerpos (Nadezhda, et al., 2017).

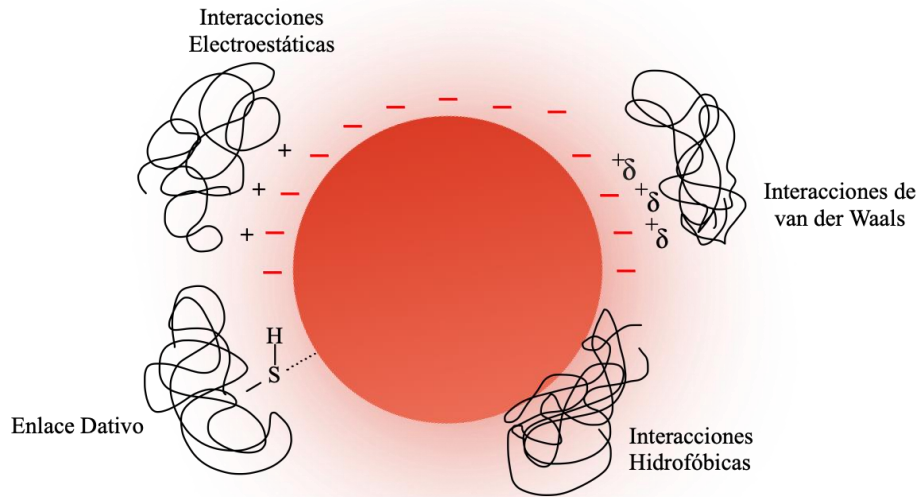


Figura 5. Interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals y por enlace dativo entre la superficie de AuNP y proteínas adicionadas durante su fisisorción (Pacheco, 2017).

La conjugación se produce simplemente mezclando los dos componentes (nanopartículas, anticuerpos) a un pH óptimo y una concentración dada de ambos. Este método proporciona una unión sin orientación específica, pero fuerte entre los anticuerpos adicionados con la superficie de nanopartículas de metales nobles. Esto es suficiente para obtener un conjugado funcional y efectivo para LFIA, que ha sido confirmado por protocolos ampliamente utilizados (Mazouzi, et al., 2020). Este método no permite orientar los anticuerpos en la superficie de las nanopartículas. La **Figura 6** muestra las orientaciones espaciales que posiblemente ocurren durante la fisisorción.

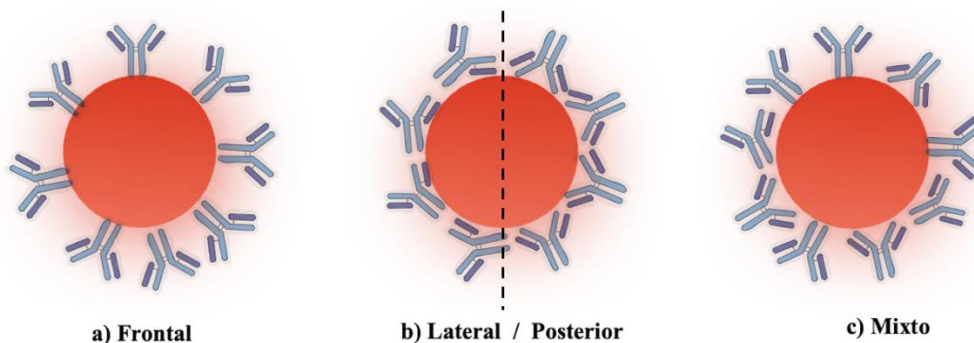


Figura 6. Posibles orientaciones espaciales de anticuerpos adheridos en la superficie de AuNP. a) Frontal: Sitio de unión al antígeno desbloqueado. b) Lateral: Sitio de unión al antígeno parcial o completamente bloqueado. c) Mixto: Sitios de unión parcialmente bloqueados y desbloqueados.

La **Figura 6a** muestra el caso ideal, donde todos los sitios de unión o reconocimiento del antígeno están libres. En el caso lateral (**Figura 6b**) el sitio de unión al antígeno está parcialmente bloqueado y en la orientación posterior el sitio de unión está completamente bloqueado. La **Figura 6c** muestra la configuración con mayor probabilidad de cómo es que ocurre la adsorción del anticuerpo en la superficie de la AuNP. Algunos anticuerpos tienen su sitio activo desbloqueado y otros están parcial o totalmente bloqueados. A pesar de su facilidad, la fisorción de anticuerpos sobre AuNP presenta dos inconvenientes principales: i) el anticuerpo se inmoviliza aleatoriamente en las AuNP (Moitra, et al., 2020) y ii) la interacción AuNP-anticuerpo es débil (Zherdev, 2020). Lo primero puede causar una pérdida parcial de la capacidad de unión al antígeno debido a la interacción directa entre las AuNP y los sitios de unión al antígeno o al impedimento estérico con las orientaciones espaciales “lateral” y “posterior” (**Figura 6b**).

No obstante, Ruiz et al. (2019) reportaron que al controlar cuidadosamente el pH de la solución de anticuerpos entre 7.5 y 8.5 es posible tener un control sobre la carga de la superficie del anticuerpo. Esto hace posible ajustar con regularidad la orientación del anticuerpo en la superficie del AuNP recubierto con citrato y, a su vez, modular la inmunoreactividad hacia su antígeno. Bajo el equilibrio de unión, el anticuerpo libre y el adsorbido en la AuNP coexisten en la muestra conjugada y puede ocurrir una adsorción multicapa de anticuerpos (Jans, et al., 2009). Las capas débilmente unidas, excepto la primera y la segunda, pueden desorberse, lo que hace que los conjugados sean menos estables con el tiempo (Jingfang, et al., 2018) .

2.8. Factores relevantes en la estabilización de conjugados

El valor de pH de acoplamiento óptimo para un anticuerpo o proteína debe determinarse a través de la medición del rango relativo de su pI (Yakota, 2019). Asimismo, Mazouzi et al. (2020) reportaron que es generalmente aceptable que la máxima adsorción de proteínas ocurre cuando el pH está cerca o ligeramente arriba de su pI. La principal razón es que en este intervalo ambos tendrán cargas opuestas, favoreciendo la interacción electrostática.

En práctica, la conjugación se prueba a diferentes valores de pH para encontrar el mejor. Sin embargo, muchos anticuerpos se adsorben mejor a un pH de 8 a 9 (Hong, et al., 2010). Muchos protocolos incluyen un paso posterior para estabilizar los conjugados con la adición de polietilenglicol (PEG, e.g., 1 %) (Zhang, et al., 2019) o albúmina de suero bovino (BSA, e.g., 0.25 %) (Pacheco, 2017). Estos agentes de bloqueo también cubren los sitios libres en las AuNP, evitando así una mayor unión no específica (Ruiz, et al., 2019). La mayoría de los protocolos de fisisorción de anticuerpos en AuNP siguen los pasos mencionados anteriormente.

Zhang et al. (2019) informó que la adición de un gran exceso de proteína a las AuNP produce conjugados con alta actividad específica. Sin embargo, hay evidencia de que el exceso de anticuerpo puede causar la pérdida progresiva de proteína débilmente unida (Nadezhda, et al., 2017). Borse et al. (2020), encontraron que la concentración de anticuerpos utilizada para la conjugación puede reducirse por debajo de la concentración estabilizadora sin perder actividad de captura de antígenos de los conjugados. Otro factor relevante es determinar la cantidad mínima de anticuerpo necesaria para mantener la estabilidad de AuNP frente a la agregación. La agregación puede monitorearse por el cambio de color de la suspensión coloidal, midiendo la absorbancia de la solución a su λ_{\max} (Busch, et al., 2019).

Con lo anterior, debe elegirse la concentración óptima de anticuerpos para cada caso individual considerando la estabilidad coloidal y la retención de actividad de anticuerpos (Mazouzi, et al., 2020). Además del factor de concentración de anticuerpos, (Zherdev, 2020) mostraron que la purificación adicional de AuNP sintetizadas antes de su conjugación con un anticuerpo policlonal a pH ácido mejora la reproducibilidad de la preparación del conjugado, este mostró excelentes rendimientos analíticos (Zherdev, 2020).

2.9. Inmunoensayo de flujo lateral

Es un dispositivo portátil de diagnóstico de fácil uso utilizado para confirmar la presencia o ausencia de un analito objetivo, como patógenos o biomarcadores en humanos o animales, o contaminantes en agua y alimentos (Türkcan, 2022). El tipo más conocido de membrana reactiva rápida de flujo lateral es la prueba de embarazo (Yüce & Kurt, 2017).

En la **Figura 7** se representa un LFIA, suelen contener una línea de control para confirmar que la prueba funciona correctamente, además de una o más líneas objetivo de prueba. Son cualitativos y de lectura visual (Sajid, et al., 2015). Debido a su naturaleza versátil las pruebas de flujo lateral son utilizadas en una serie de otros sectores industriales, incluidos los farmacéuticos, las pruebas ambientales, salud animal, pruebas de inocuidad de alimentos, plantas y cultivos (Wang, et al., 2018). Pueden ser realizados por profesionales, usuarios capacitados o un paciente, y en una variedad de entornos que incluyen el laboratorio, clínica o el hogar. Por lo general, están basadas en una membrana de nitrocelulosa con una almohadilla absorbente. Existen dos formatos más comunes de pruebas de flujo lateral: ensayos competitivos (Omidfar, et al., 2011) y tipo sándwich (Yüce & Kurt, 2017). En los ensayos competitivos una prueba positiva está representada por la ausencia de una línea de color en la posición de la línea de prueba, mientras que en los ensayos sándwich, una prueba positiva está representada por la presencia de una línea de color en la posición de la línea de prueba (Banerjee & Jaiswal, 2018).

2.9.1. Funcionamiento y componentes de LFIA

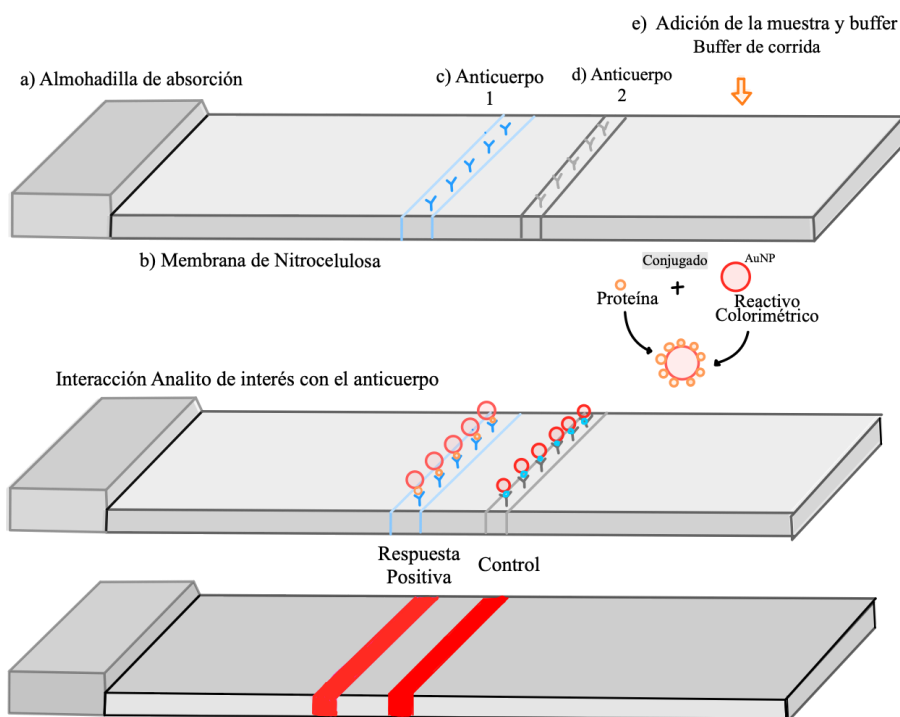


Figura 7. Componentes de un dispositivo de ensayo de flujo lateral (LFA), a) almohadilla de absorción, b) membrana de nitrocelulosa, c) anticuerpo de interés, d) anticuerpo control, e) muestra del conjugado (AuNP-analito de interés) mostrando líneas de prueba y control para la lectura del resultado.

En la mayoría de las aplicaciones de LFIA, se desarrolla una membrana reactiva como herramienta para la detección visual. En la **Figura 7** se muestran como los componentes de una membrana reactiva participan en la afinidad y el reconocimiento específico del objetivo de interés (anticuerpos o receptores alternativos) y en la generación de una señal visualmente detectable a partir de los complejos formados (AuNP como marcadores conjugadas con un antígeno de interés). El analito como parte de una muestra líquida es depositado en la membrana reactiva y en el curso de su movimiento forma un complejo en las zonas de unión con biomoléculas receptoras adsorbidas en la membrana y conjugadas con nanopartículas. Las zonas de unión se tiñen con los conjugados AuNP-proteína/antígeno como marcadores y, por lo tanto, se hacen visibles (Ventura, et al., 2020).

Debido a que todos los componentes son aplicados previamente a la membrana de prueba, el usuario final solo necesita sumergir la membrana en la solución por analizar (o dejar caer la muestra sobre la membrana) y evaluar visualmente el resultado después de 10-15 minutos.

2.9.2. Adsorción de antígenos y bloqueo de membranas de nitrocelulosa

Las membranas de nitrocelulosa son utilizadas como soporte en los ensayos de flujo lateral, sobre las cuales se forman y visualizan inmunocomplejos para indicar la presencia o ausencia de analitos en la muestra líquida. La nitrocelulosa adsorbe el analito de interés (proteína, anticuerpo, biomarcador) en una alta concentración. Las membranas de este material permiten que la muestra se transporte a lo largo de la membrana reactiva por fuerza capilar en un tiempo razonable (Huang, et al., 2020).

El bloqueo de la membrana es necesario para minimizar uniones no específicas del analito y la partícula detectora, y también para mejorar las propiedades de flujo a través de la membrana (Türkcan, 2022). Es importante que el agente de bloqueo utilizado no sea aplicado en exceso, ya que cualquiera de las moléculas no adsorbidas por la membrana puede secarse y formar complejos en los poros de las membranas, reduciendo o bloqueando el flujo de la muestra de interés. La **Figura 8** muestra las posibles orientaciones espaciales del analito de interés inmovilizado en la superficie de la membrana de nitrocelulosa.

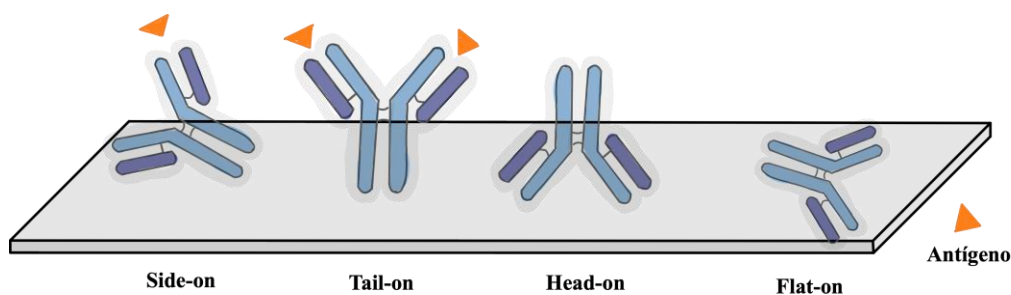


Figura 8. Posibles orientaciones espaciales del anticuerpo sobre la superficie de la membrana de nitrocelulosa.

2.9.3. Nanopartículas de oro para inmunodetección de flujo lateral

Las AuNP coloidales son la opción más común para LFIA. Está basado en reacciones inmunológicas en las que un antígeno es detectado mediante un anticuerpo específico unido a un marcador colorimétrico, por ejemplo, AuNP, perlas de látex, puntos de carbono y puntos cuánticos (Borse, et al., 2020). Según el tipo de detección, el LFIA puede clasificarse en métodos cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos (Borse & Srivastava, 2019). Se ha convertido en un método indispensable en el campo del diagnóstico, que presenta un bajo límite de detección, alta sensibilidad, alta especificidad, robustez, bajo costo, etc (Li, et al., 2021).

Las AuNP son sintetizadas como una suspensión coloidal que contiene nanopartículas dispersas y esféricas bien definidas. Se han realizado estudios en los que se utilizaron AuNP como suspensiones de oro coloidal para el desarrollo de dispositivos de flujo lateral o membranas inmunocromatográficas para detectar una variedad de compuestos y enzimas. Lin et al. (2010) reportaron la conjugación de AuNP con diferentes tipos de proteínas de detección (antígeno o anticuerpos) para detectar varios analitos como inmunoglobulina G (IgG) contra *Treponema pallidum*. Empleando LFIA han sido detectadas enzimas como la transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en muestras de alimentos congelados y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos (Fan, et al., 2016).

Omidfar et al. (2011) confirmaron la presencia de albúmina de suero humano en muestras de orina para el diagnóstico de microalbuminuria. Wang et al. (2020) detectaron bajas concentraciones (0.0022 mg/mL) de metabolitos de nitrofurano en muestras de pescado. La detección de los analitos la hicieron utilizando AuNP de diferentes tamaños. También han

sido empleados ensayos de flujo lateral para la detección del SARS-CoV-2 y estos pueden clasificarse en tres grupos: pruebas de ARN (Benjamin, et al., 2020), detección de la respuesta inmunitaria del huésped (Brümmer, et al., 2021) y detección de la superficie viral (Dörschug, et al., 2021).

2.9.4. Pseudovirus

Una de las principales desventajas es que los estudios realizados con virus altamente patógenos como el SARS-CoV-2 deben llevarse a cabo en laboratorios que cumplan con los estrictos requisitos del nivel de bioseguridad (Li, et al., 2018). Desafortunadamente, los requisitos de los laboratorios BSL-3 y BSL-4 a menudo implican que solo algunas instituciones específicas manejen estos agentes, lo que dificulta el desarrollo de investigación en esta área. El uso de pseudovirus es un enfoque alternativo útil que puede ser empleado para detectar y desarrollar eficazmente inmunoensayos contra virus patógenos fuera de un laboratorio de nivel de bioseguridad cuatro.

En comparación con un virus activo, los pseudovirus pueden producirse de forma artificial en un laboratorio con fines de investigación. Contienen fragmentos de ADN de la célula huésped sin contener ninguno de los componentes de ácido nucleico del virus infeccioso con el que están relacionados (Huang, et al., 2020). El material genético modificado de los pseudovirus evita que estas partículas produzcan proteínas virales de la superficie por sí solas, a menos que se ponga a disposición del pseudovirus un plásmido adicional o una línea celular estable que exprese dichas proteínas (Nie, et al., 2020). Además, los pseudovirus también carecen de los componentes virulentos del virus original, lo que prácticamente elimina la posibilidad de que estas partículas de virus puedan causar una infección activa a un individuo expuesto.

Las propiedades de los pseudovirus permiten manipularles de forma segura en los laboratorios. La estructura conformacional de las proteínas de la superficie de los pseudovirus es muy parecida a la del virus nativo (Kingston, et al., 2019). El sistema de pseudovirus es cuantificable y puede producirse rápidamente. Los numerosos beneficios asociados con la realización de estudios sobre pseudovirus han ayudado a los investigadores a la detección de anticuerpos, así como a proporcionar información sobre el reconocimiento de receptores, las

vías de inhibición del virus y los mecanismos de tropismo celular sin necesidad de emplear el virus nativo (Nie, et al., 2020).

2.9.5. Partículas similares a virus (VLP)

En los últimos años ha iniciado una nueva tecnología basada en partículas similares a virus (VLP, *virus-like particles*). Estas son partículas a nanoescala auto-ensambladas a partir de una o más proteínas estructurales. Forman complejos proteicos multiméricos virales, que se asemejan en la conformación espacial y estructura idéntica o muy similar con el virus nativo correspondiente (Xiaoyang, et al., 2023). El término VLP ha sido utilizado para describir una serie de objetos biológicos, como estructuras no caracterizadas con morfología viral encontradas en muestras biológicas, estructuras huecas de origen viral que no contienen ácidos nucleicos, por lo tanto, no pueden infectar o replicarse como los virus infecciosos (Nooraei, et al., 2021). Por esta razón constituyen un enfoque seguro y eficaz (Besora, et al., 2022).

El diámetro de las VLP oscila entre 22 y 200 nm, correspondiendo generalmente con el tamaño del propio virus, y además mantienen una morfología similar dependiendo del tipo de proteínas que incorporen (Carrondo, et al., 2022). La secuencia quimérica se genera y expresa en el hospedero apropiado y las VLP resultantes generalmente muestran el antígeno en la superficie (Huang, et al., 2020). Son generadas a partir de modificaciones estructurales y productos génicos auto-ensamblados, no infecciosos resultantes de la clonación y expresión de genes estructurales virales en sistemas biológicos como plantas, levaduras, bacteriófagos y células de mamífero (Liu, et al., 2018). De esta manera, las VLP quiméricas sirven como portadores de antígenos, lo que ofrece la posibilidad de producir VLP multivalentes al incluir varios antígenos o sus fragmentos (epítomos) en la proteína quimérica (Kingston, et al., 2019).

Dentro de las aplicaciones más novedosas, las VLP son utilizadas como plataformas para el desarrollo de vacunas. (Nooraei, et al., 2021) reportaron que también pueden emplearse como vehículos para transportar antígenos exógenos o entregar adyuvantes. Estas han demostrado ser un modelo promisorio, ya que resultan ser sistemas de entrega efectivos que combinan buenos perfiles de seguridad y constituyen una alternativa segura contra enfermedades infecciosas.

2.9.6. Detección de virus usando LFIA

El virus del mosaico de la soya (SMV, *soybean mosaic virus*) es el más común en esta planta y representa una grave amenaza para la producción de cultivos. En un estudio realizado por Zhu et al. (2016) produjeron VLP con la proteína de cubierta del SMV expresados en procariotas. Seleccionaron cuatro anticuerpos monoclonales anti-SMV. Observaron el resultado en LFIA después de 10 min. La membrana solo dio resultados positivos con SMV y no con otros virus probados. Además, podría usarse para detectar diluciones de 800 veces de muestras de hojas infectadas. El LFIA podría usarse para detectar SMV en tejido de hojas infectadas, así como en semillas de soya.

Thao et al. (2017) desarrollaron VLP, a través de la expresión transitoria de la proteína de la cápside de distintas cepas del virus de la influenza, para su uso con pruebas de LFIA como plataforma y detectar cepas particulares de interés. En la detección del virus de influenza demostraron que el LFIA puede discriminar una cepa de virus en particular frente a otras del mismo subtipo o enfermedades respiratorias. Usando PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), demostraron que el LFIA es muy efectivo para localizar el analito en la línea de prueba (consistentemente por encima de 90 %) y esto es crucial para la sensibilidad del dispositivo. Además, las intensidades de color de las líneas de prueba mostraron una buena correlación entre el LFIA y qRT-PCR.

El *citrus tristeza virus* (CTV) causa el picado del tallo que afecta a los cítricos independiente del portainjerto. Maheshwari et al. (2017) desarrollaron un inmunoensayo de flujo lateral para detectar CTV, pero optaron por producir VLP que simularan al virus. La prueba LFIA detectó CTV en 10 min y fue sensible hasta una dilución de 1:80 de extracto de savia de planta cruda.

En otro estudio diseñaron un prototipo de LFIA para la detección de partículas enteras de viriones de nodavirus (virus de la necrosis nerviosa de los peces). El nodavirus es una amenaza importante en la industria acuícola donde causa pérdidas económicas y problemas ambientales. El LFIA fue basado en anticuerpos policlonales conjugados con nanopartículas de oro. En la visualización de señales la formación de una línea de prueba roja era indicativa de la presencia de viriones de nodavirus, completando la detección visual de nodavirus en 30 min (Toubanaki, et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

El SARS-CoV-2 se ha extendido rápidamente a muchos países y regiones. En la actualidad representa un desafío para la salud pública, aunque ya no es considerado una emergencia. Aun cuando las vacunas han reducido el impacto de la pandemia, la rápida mutación de este virus y su prevalencia requerirán vacunas de refuerzo y la rápida contención de brotes; esto último mediante la rápida detección de infecciones utilizando ensayos sencillos y económicos, pero confiables.

Durante la pandemia las pruebas rápidas de inmunoensayo de flujo lateral fueron y continúan siendo un factor clave en el monitoreo y control de COVID-19. No obstante, las pruebas existentes son adquiridas actualmente de otros países. Este proyecto contribuye al desarrollo de esta tecnología en el país. El propósito es estudiar una metodología estandarizada de inmunoensayo de flujo lateral para definir condiciones y parámetros de preparación y operación, con la finalidad de mejorar la sensibilidad del análisis y establecer precedentes para continuar con el desarrollo de este tipo de pruebas de diagnóstico. Las pruebas en punto de atención son necesarias en el mundo en desarrollo. Son una de las alternativas más prácticas para el diagnóstico de enfermedades.

4. HIPÓTESIS

Este estudio basado en una metodología estandarizada de inmunoensayo de flujo lateral permitirá obtener respuestas de conjugados exploratorios AuNP-anticuerpo que reconozcan antígenos inmovilizados en membranas de prueba, con baja o nula interacción no específica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Establecer una metodología para la evaluación y optimización de las condiciones de un inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) con nanopartículas de oro como agentes reporteros, usando sistemas modelos a fin de desarrollar un LFIA para la detección de partículas tipo virus similares al SARS-CoV-2.

5.2. Objetivos específicos

1. Preparar y caracterizar nanopartículas de oro (AuNP) aproximadamente de 30 y 50 nm de diámetro.
2. Evaluar sobre AuNP condiciones de adsorción (pH, tiempo, concentración inicial) de un anticuerpo puro (IgG de suero humano) y de antiseros complejos (anti-P6 / anti-P50) conteniendo anticuerpos contra epítomos de la proteína de espiga de SARS-CoV-2.
3. Establecer condiciones de bloqueo de AuNP con proteína adsorbida y de membranas porosas (tipo de proteína, tiempo de bloqueo) para disminuir respuestas no específicas en ensayos de flujo lateral.
4. Establecer condiciones de operación (concentración de conjugados, surfactante) para el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral considerando los sistemas IgG y antisuero complejo contra péptido de la proteína de espiga de SARS-CoV-2.
5. Evaluar la detección de partículas tipo virus (VLP, *virus-like particles*) que presenten en su superficie proteínas de SARS-CoV-2 utilizando AuNP conjugadas con un antisuero correspondiente.

6. METODOLOGÍA

La parte experimental fue realizada en el Laboratorio de Bioseparaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los equipos principales para el análisis fueron un espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para medir cambios en absorbancia y un Zetasizer Advance Pro (Malvern Panalytical, Malvern, UK) para medir diámetro hidrodinámico y potencial ζ de AuNP y de conjugados AuNP-proteína.

6.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

La síntesis se representa en la **Figura 9**, fue en solución utilizando una variante del método descrito por Frens (1972). Empleando agua de un sistema Milli-Q, preparamos soluciones de 1 % $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y 1 % HAuCl_4 24 h previo a la síntesis. La mezcla de reacción de 1 mL de HAuCl_4 y 1 mL o 0.2 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, para partículas de 30 y 48 nm. Cada mezcla fue preparada con agitación continua, dejando reposar 5 min en un lugar oscuro. La síntesis fue efectuada adicionando la mezcla de precursores a 100 mL de agua en ebullición para una concentración final de 0.01 % de HAuCl_4 en ambos casos, dejando en reflujo 30 min adicionales. Las suspensiones de AuNP obtenidas fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

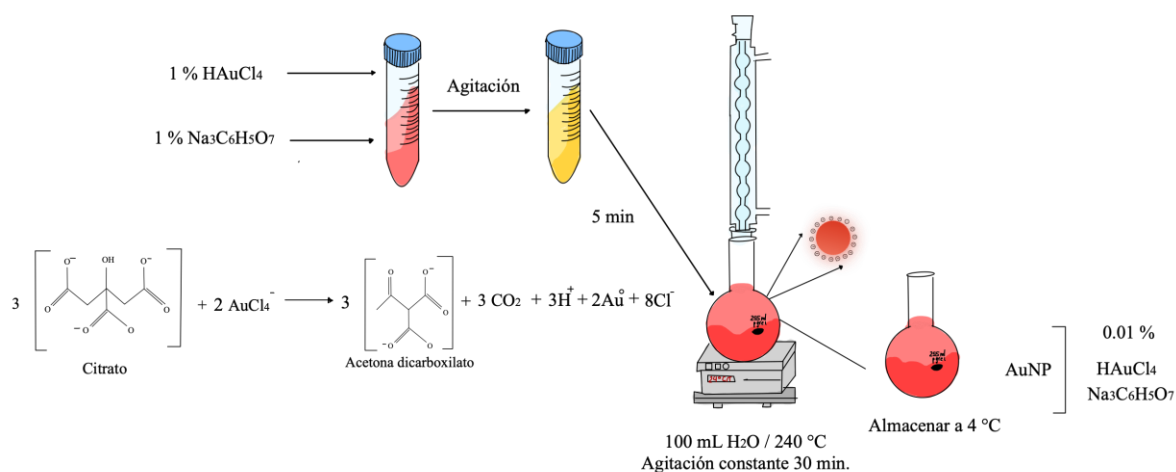


Figura 9. Síntesis de AuNP empleando un método modificado de Turkevich-Frens.

6.2. Conjugados AuNP-anticuerpo y estudio de adsorción

6.2.1. Conjugados con inmunoglobulina G humana (IgGH)

Para la preparación de 1 mL de conjugado de AuNP-IgG humana (IgGH), por cada 0.97 mL de suspensión de AuNP, adicionamos 10 μ L de polisorbato 20 (5 %) y 15 μ L de IgG (1 mg/mL), manteniendo en agitación durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente fue realizado un lavado con PBS 1 \times conteniendo 0.05 % de polisorbato 20, centrifugando 10 min a 14200 \times g y reemplazando el sobrenadante. La suspensión final fue en PBS 1 \times para su posterior uso.

6.2.2. Obtención de los datos experimentales de equilibrio de adsorción

Para la construcción de la isoterma fueron realizadas distintas pruebas de adsorción. Las distintas concentraciones del adsorbato fueron obtenidas de una solución patrón de 2 mg/mL de IgGH variando las concentraciones iniciales de la proteína por separado, desde 2 mg/mL hasta 0.25 mg/L, manteniendo constante el volumen de adsorbato (15 μ L) y del adsorbente (0.97 mL de AuNP), así como la concentración de AuNP. La adsorción fue realizada sin modificar el pH de las AuNP (pH 5) y con agitación continua durante 1 h. Después de la fisorción, los conjugados fueron centrifugados 10 min a 14200 \times g, tomando 500 μ L del sobrenadante. Las concentraciones finales de cada ensayo fueron determinadas utilizando una celda de cuarzo para medir la concentración de IgGH no adsorbida en la región UV (200-400 nm) con el espectrofotómetro Genesys 50.

6.2.3. Cinética de adsorción

A partir de una solución patrón de 1 mg/mL de IgGH fueron preparados 7 conjugados AuNP-IgGH con el protocolo descrito anteriormente, manteniéndolos a temperatura ambiente con agitación constante. El proceso de fisorción fue detenido a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min), centrifugando 10 min a 14200 \times g. Por último, partiendo de una alícuota de 500 μ L del sobrenadante fue determinada la concentración de IgGH remanente con el espectrofotómetro Genesys 50 a una longitud de onda de 214 nm. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

6.3. Conjugados de AuNP-IgG para inmunoensayos

6.3.1. Conjugados con inmunoglobulina G murina (IgGM)

Para la síntesis de 0.5 mL de conjugado AuNP-IgG murina (IgGM) una suspensión de AuNP fue lavada dos veces, centrifugando 5 min a 14200×g y resuspendiendo para reponer el volumen inicial con una solución amortiguadora de K₂CO₃ 10 mM (pH 9.4), conteniendo 0.05 % de polisorbato 20. Posteriormente fueron adicionados 3 μL de IgGM (1 mg/mL) manteniendo en agitación 60 min y en incubación toda la noche. Para producir AuNP con mejor estabilidad y tiempo de almacén, adicionamos 1.5 μL de BSA (1 mg/mL) durante 15 min. Posteriormente fueron completados 2 lavados con la solución amortiguadora de K₂CO₃ conteniendo 0.05 % de polisorbato 20, centrifugando por 5 min a 14200 ×g y retirando el sobrenadante. La suspensión final fue ajustada a una concentración final de 2× en solución amortiguadora de K₂CO₃ para su posterior uso en el inmunoensayo de flujo lateral.

6.3.2. Conjugados con antisuero complejo

Para la preparación de 0.10 mL de conjugado de AuNP-antisuero ovino, conteniendo anticuerpo que reconoce al péptido P6 (correspondiendo a un epítipo de RBD de la proteína S de SARS-CoV-2), por cada 0.25 mL de suspensión de AuNP, fueron adicionados 2.5 μL de antisuero y 15 μL de polisorbato 20 (5 %), manteniendo en agitación 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente este conjugado fue lavado centrifugando 5 min a 10400×g, reemplazando el sobrenadante con PBS 1× conteniendo 0.05 % de polisorbato 20, para su posterior uso en inmunoensayo de flujo lateral.

6.3.3. Conjugados con ACE2 e IgGM

Para la preparación de 0.10 mL de conjugado de AuNP con ACE2 e IgGM, por cada 0.2 mL de suspensión de AuNP, las AuNP fueron lavadas centrifugando 10 min a 12200×g y resuspendiendo al volumen inicial con una solución amortiguadora de K₂CO₃ 20 mM (pH 10) conteniendo polisorbato 20 (0.05 %). Fueron adicionados 1.5 μL de ACE2 (1.34 mg/mL), 3 μL de IgGM (1 mg/mL) y 10 μL de polisorbato 20 (5 %), manteniendo en agitación durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente fue realizado un lavado centrifugando 10 min a 10000×g y reemplazando el sobrenadante a una concentración final 2× con una solución amortiguadora de K₂CO₃ 0.02 M conteniendo 0.05 % de polisorbato 20, para su posterior uso en inmunoensayo de flujo lateral.

6.4. Medición de absorbancia, diámetro hidrodinámico y potencial ζ

La concentración de IgG inicial previo a conjugar o remanente después de la fisisorción fue medida con una celda de cuarzo de 1 cm de trayectoria, midiendo su absorbancia en un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm de la región UV. En esta región hay señales distintivas de aminoácidos aromáticos en 280 nm y de enlaces peptídicos en 214 nm que permiten corroborar la concentración de prácticamente cualquier proteína, empleando como blanco la solución amortiguadora correspondiente, e.g., PBS 1×. El análisis de AuNP y conjugados AuNP-IgG fue también con una celda de cuarzo de 1 cm de trayectoria, midiendo su absorbancia en un rango de longitud de onda de 400 a 700 nm de la región visible, donde a 520 nm se tiene el máximo de absorción característico de las AuNP de 30 nm y a 530 AuNP para las de 48 nm. Esta región permite observar los cambios en el plasmón de superficie localizado de las AuNP durante la adsorción de IgG a partir de la absorbancia medida, empleando como blanco agua. Los conjugados se colocaron directamente en una celda capilar plegada (DTS1070), empleando como blanco agua. El análisis en Zetasizer permitió determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial ζ de AuNP, IgG y del conjugado AuNP-IgG, para explorar su estabilidad, tamaño y carga.

6.5. Adsorción de antígenos en membranas de nitrocelulosa

Fueron depositados 0.5 μ L de antígeno (**Tabla 2**) en membranas de nitrocelulosa de 3 \times 18 mm, dejando secar 2 min y posteriormente fueron introducidas en una solución de bloqueo (leche sin grasa o BSA) en concentraciones correspondientes (1 o 5 %) durante 60 min. Después fueron lavadas con PBS 1× conteniendo 0.05 % de polisorbato 20, retirando el excedente y dejando secar 24 h en un desecador, para su posterior uso en inmunoensayo de flujo lateral.

Tabla 2. Casos de estudio: anticuerpo/proteína en AuNP y antígeno en membrana.

Caso	Conjugado	Antígeno
1	AuNP-IgG murina	anti-IgG murina
2	AuNP-suero ovino vs. péptido P6	VLP (C, 5, 6, 7)
3	AuNP-suero murino vs. multipéptido P50	Pseudovirus
4	AuNP-IgG murina/ACE2	Pseudovirus

En la **Figura 10** se representa una descripción general del proceso de la metodología anteriormente descrita.

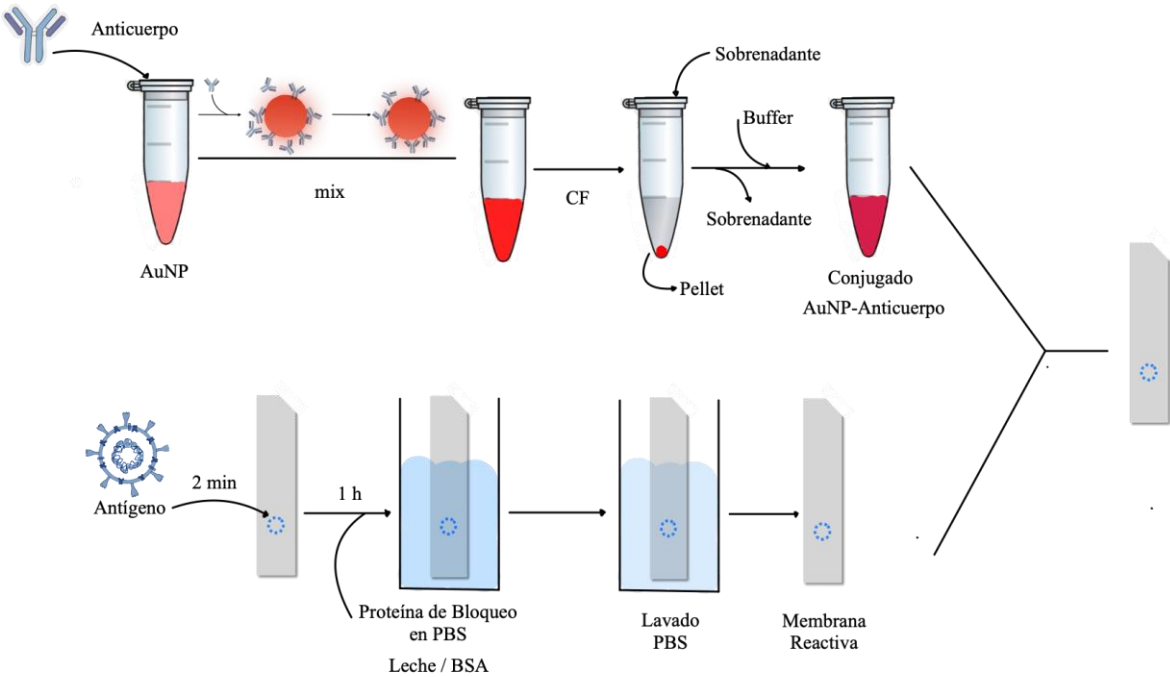


Figura 10. Descripción general del proceso de síntesis de conjugados y membranas reactivas.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1.1. Caracterización de nanopartículas de oro de 30 y 48 nm

Logramos sintetizar AuNP monodispersas de 30 y 48 nm para la preparación de conjugados (**Figura 11**). Estos diámetros fueron seleccionados ya que Safenkova, et al. (2012) reportaron que se obtiene una mejor intensidad de señal en membranas.

En la **Figura 11a** el espectro de absorción de cada lote de partículas sintetizadas de dos diámetros diferentes (30 y 48 nm) indica la cantidad de luz absorbida con diferentes valores de absorción máxima. La señal característica del plasmón de resonancia de AuNP monodispersas fue alrededor de 520 nm para AuNP de 30 nm y de 530 nm para AuNP de 48 nm, lo cual concuerda según lo reportado (Jingfang, et al., 2018). Esto es debido a que cuando la luz incide sobre las partículas de oro, estas absorben principalmente el color verde y transmiten el color rojo, característico de las partículas sintetizadas.

La variación de cada señal máxima depende del tamaño de las AuNP producidas. El plasmón de resonancia desplazado para AuNP de 48 nm, indica que hay un aumento en el tamaño. Los resultados obtenidos confirman que la síntesis fue reproducible y comparable con el protocolo de referencia.

La **Figura 11b** muestra el porcentaje de intensidad a diferentes valores de diámetro hidrodinámico. Los diámetros promedio fueron 33.7 y 45.8 nm, correspondientes a AuNP preparadas con condiciones para obtener 30 y 48 nm. Ambas con un índice de polidispersidad menor a 0.2, correspondiente a partículas monodispersas y homogéneas, confirmando la obtención de AuNP por síntesis coloidal con tamaños cercanos al diámetro deseado.

La **Figura 11c** muestra el potencial ζ de las AuNP. En ambos casos el potencial es negativo, indicando que las partículas son estables en suspensión de acuerdo con lo descrito anteriormente (Mazouzi, et al., 2020), favoreciendo la estabilización electrostática de las partículas y evitando la formación de agregados. Esto es debido al citrato presente en la superficie de las AuNP y los iones presentes en solución. Este mismo instrumento fue empleado para determinar el diámetro hidrodinámico promedio de las AuNP.

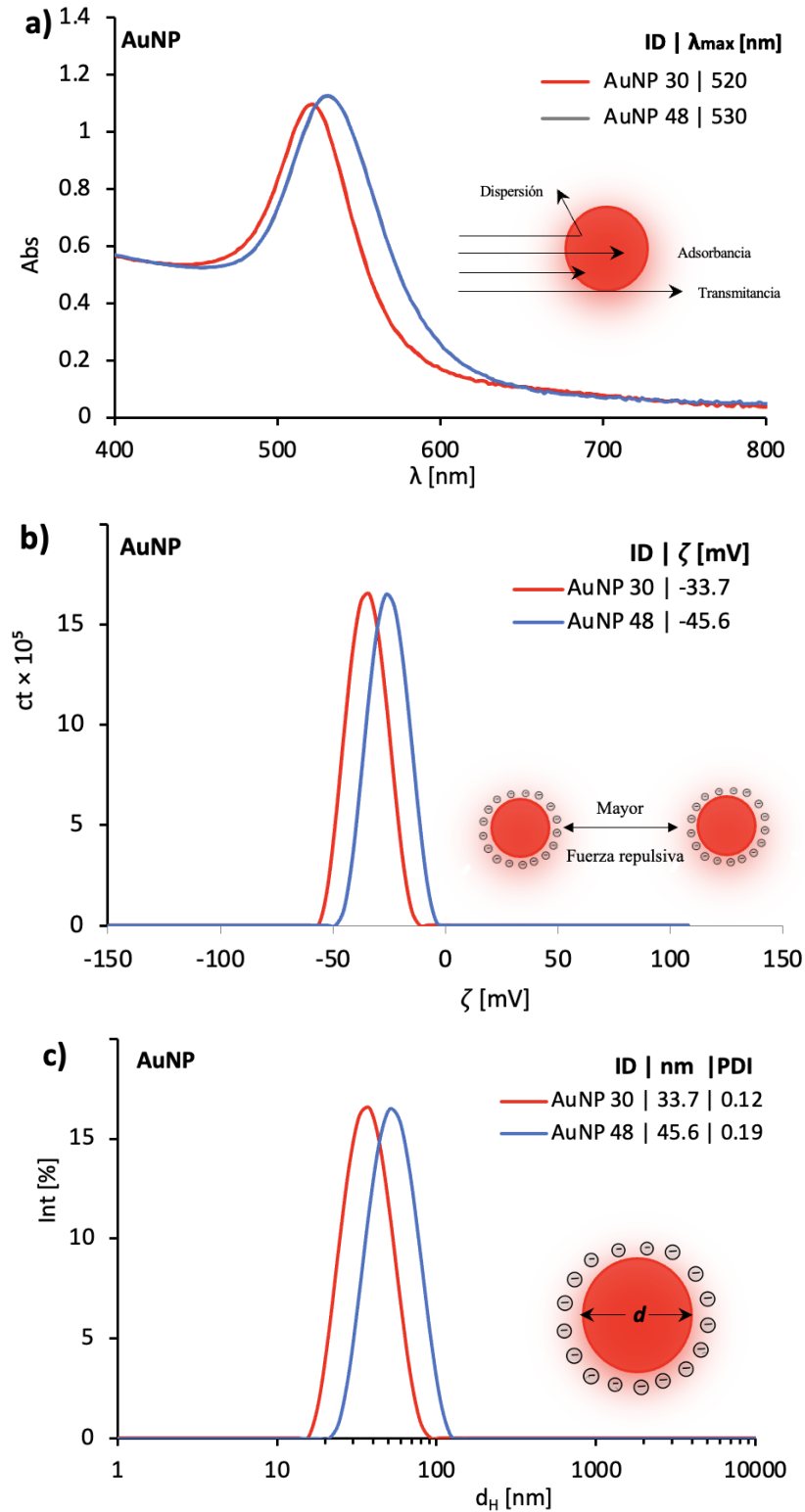


Figura 11. Caracterización de AuNP de 30 y 48 nm. a) Espectros UV-Vis de AuNP en suspensión indicando absorbancia máxima (λ_{max}). b) potencial ζ , c) diámetro hidrodinámico (d_H) e índice de polidispersidad (PDI).

Los resultados de un compendio de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) fueron complementarios. Estos permitieron confirmar la morfología aproximadamente esférica y AuNP con diámetros de 30 y 48 nm. La **Figura 12** muestra su correspondiente histograma de distribución de diámetros, obteniendo un promedio de 30.6 y 47.8 nm correspondientemente.

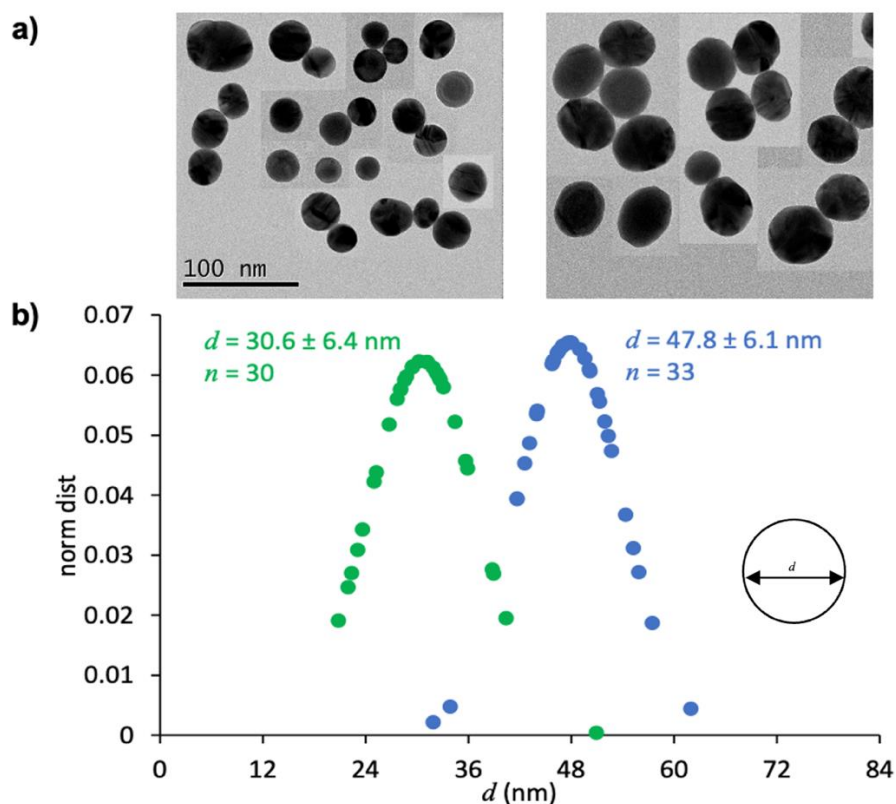


Figura 12. Caracterización de AuNP de 30 y 48 nm. a) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). b) Distribución de tamaño de AuNP de 30 y 48 nm.

7.2. Análisis de adsorción de anticuerpos en AuNP

7.2.1. Isotherma de adsorción

Tras la caracterización de las AuNP, confirmando propiedades esperadas después de su síntesis, preparamos conjugados con diferentes concentraciones de inmunoglobulina humana (IgGH) como proteína modelo. El objetivo fue estudiar la adsorción de anticuerpos en AuNP y generar conjugados AuNP-IgG estables, análogos a los requeridos en inmunoensayos de flujo lateral.

Obtuvimos isotermas de adsorción para IgGH, en un rango de concentración de 0.002 a 0.03 mg/mL, estimado para formar un equivalente de 1 a 15 monocapas en AuNP, considerando IgG eficientemente ordenadas en la superficie e inmovilizadas con sitios de unión a antígenos disponibles (frontalmente). La isotermas de adsorción obtenidas expresan la relación entre la concentración de proteína adsorbida q_e por unidad de masa de AuNP (concentración en fase sólida) y la concentración de proteína remanente y en equilibrio en la fase líquida C_e , a una temperatura dada (4 y 25 °C).

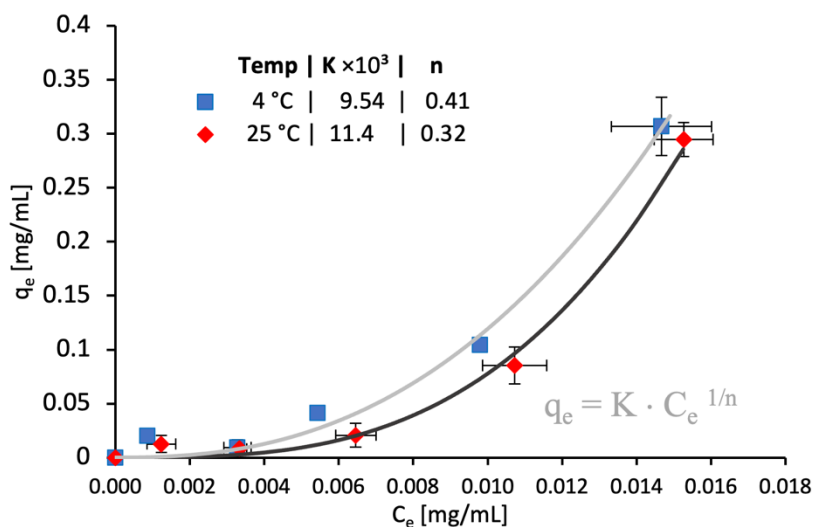


Figura 13. Isotermas de adsorción de IgG sobre AuNP de 30 nm a 4 y 25 °C. IgG en un rango de concentración inicial de 0.002 a 0.03 mg/mL, equivalente a 1 a 15 monocapas sobre AuNP. Modelo de Freundlich ajustado a los datos experimentales.

La **Figura 13** presenta los resultados experimentales de las isotermas de adsorción a 4 y 25 °C. Los datos a 4 °C están ligeramente por encima de los obtenidos a 25 °C. Por ejemplo, a una concentración baja de 0.006 mg/mL hay una diferencia de anticuerpo adsorbido, a 4 °C se adsorbió 0.020 mg/mg y a 25 °C solamente 0.013 mg/mg, equivalente a 1.5 veces más anticuerpo adsorbido a 4 °C en comparación con 25 °C. Por lo tanto, una temperatura menor favorece la adsorción. Esto es debido a que el proceso es exotérmico, ya que con la disminución de la temperatura incrementa la capacidad de adsorción. El valor del parámetro n representa la afinidad del anticuerpo por la superficie de la partícula. En este caso, a 4 °C es ligeramente mayor en comparación con el valor obtenido a 25 °C. Esa diferencia es

relevante ya que en la parte experimental a 4 °C observamos que los conjugados tienen una mejor estabilidad, por lo tanto, la adsorción es mejor a dicha temperatura.

En la **Figura 13** están indicados los valores obtenidos de la constante de proporcionalidad K y el parámetro n . La isoterma obtenida según la clasificación de la IUPAC es de tipo III: convexa respecto al eje horizontal y a lo largo de todo el eje vertical. Esta característica es indicativa de interacciones débiles entre el adsorbato y el adsorbente. Esto indica que las AuNP (adsorbente) tienen poca afinidad por el anticuerpo y que el número de sitios activos en la superficie de la AuNP es limitado, en consecuencia, a bajas concentraciones no se adsorbe una gran cantidad de anticuerpo.

El modelo de Freundlich se ajustó a los datos experimentales. Este modelo supone que la superficie del adsorbente es heterogénea y que las posiciones de adsorción tienen distintas afinidades, ocupando en primer lugar las posiciones de mayor afinidad y posteriormente el resto. La ecuación de la isoterma de Freundlich establece una relación de tipo potencial entre el soluto adsorbido y la concentración de equilibrio en la solución (Bell, et al., 2013):

$$q_e = K \cdot C_e^{1/n}$$

Donde q_e es la cantidad de soluto adsorbida por unidad de masa del adsorbente (mg/mg), C_e es la concentración de adsorbato en equilibrio en la fase líquida (mg/mL), K y n son coeficientes empíricos. K es la constante de equilibrio [(mg/mg)·(mL/mg)⁻ⁿ] y es un indicativo de la capacidad de adsorción. A partir de los valores obtenidos, el parámetro n fue menor a 1 en ambos casos, indicando que efectivamente mostró una intensidad de adsorción baja, lo cual fue corroborado con los datos experimentales (**Figura 14**).

7.2.2. Cinética de adsorción

La **Figura 14** muestra el proceso de fisisorción acorde a la cinética obtenida ocurre en minutos, el sistema AuNP-anticuerpo llega al equilibrio a los 12 min. La cinética de adsorción fue realizada a temperatura ambiente, empleando 1 mL de AuNP de 30 nm y adicionando 15 µL de una solución de IgGH (1 mg/mL), El ensayo incluyó diferentes tiempos de adsorción, desde su inicio hasta su término 2 h después, en intervalos de 20 min. La cinética fue rápida y este comportamiento indica que no hay efectos difusionales. Considerando que la difusión es instantánea, el proceso más lento es la adsorción del anticuerpo sobre el sitio activo y es el que controla la velocidad de adsorción.

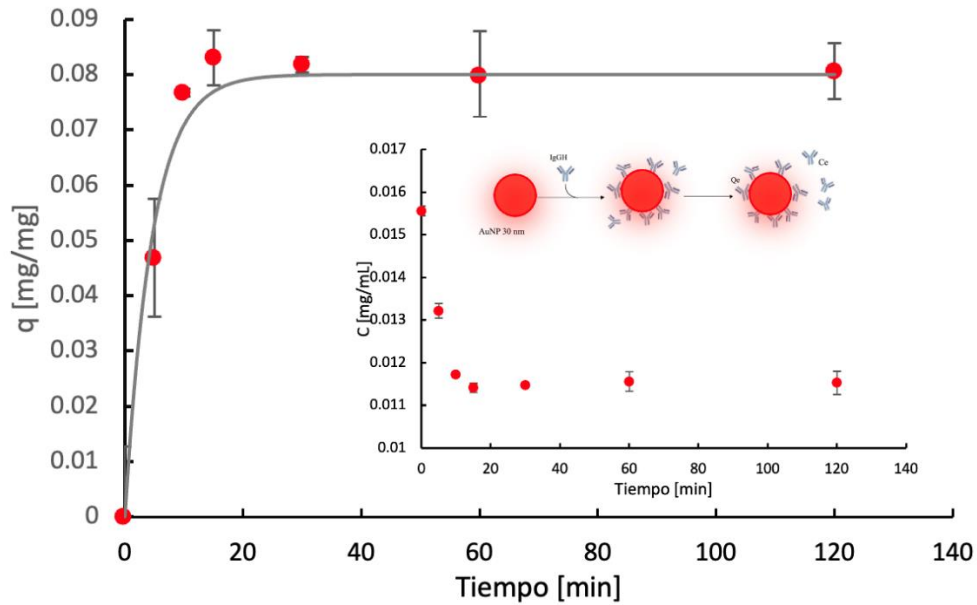


Figura 14. Cinética de adsorción de 0.015 mg/mL de IgGH sobre AuNP de 30 nm (inserto: evolución la proteína remanente en equilibrio). Los datos ajustados al modelo de Lagergren resultaron en los parámetros $q_e = 0.08$ mg/mg y $k = 0.21$ min⁻¹.

La **Figura 14** muestra los resultados del ajuste del modelo cinético de primer orden a los datos experimentales, también conocido como modelo Lagergren, que describe la adsorción de soluto en el adsorbente (Kajjumba, et al., 2018):

$$\frac{dq}{dt} = k (q_e - q), q(0) = 0$$

Resolviendo la ecuación:

$$q = q_e(1 - e^{-kt})$$

Donde q es el soluto adsorbido (IgGH) en el adsorbente (AuNP) en función del tiempo (mg/mg), q_e es la capacidad de adsorción alcanzada en el equilibrio (mg/mg) y k es la velocidad específica de adsorción. Después de resolver la ecuación diferencial y ajustar el modelo a los datos experimentales, encontramos $q_e = 0.08$ mg/mg y $k = 0.21$ min⁻¹, indicando que existen cambios importantes en la concentración q a los 4.8 min aproximadamente. Considerando la concentración inicial de 0.015 mg/mL (equivalente a 7.5 monocapas), el valor encontrado de q_e corresponde 0.004 mg/mL (eq. a 2 monocapas) de IgGH originalmente en suspensión ahora adsorbidos en AuNP.

7.3. Parámetros relevantes durante la conjugación

7.3.1. Efecto del pH en la adsorción del anticuerpo sobre la AuNP

La estabilidad del conjugado es afectada directamente por dos variables. La primera es la concentración de iones en el amortiguador empleado. No es recomendable emplear amortiguadores que contengan una concentración alta de sales/iones, ya que causan que los conjugados formen agregados y colapsen (**Figura 15**), perdiendo su estabilidad para su posterior uso en el inmunoensayo. Para muchas proteínas, especialmente las inmunoglobulinas derivadas de antisuero, el pI promedio abarca una amplia gama de valores de pH (Mazouzi, et al., 2020). Así, el valor de pH de acoplamiento óptimo para un anticuerpo dado debe determinarse mediante la medición de su rango de pI relativo. Por lo tanto, el pH óptimo debe elegirse para cada caso individual teniendo en cuenta la estabilidad coloidal y la retención de la actividad de los anticuerpos.

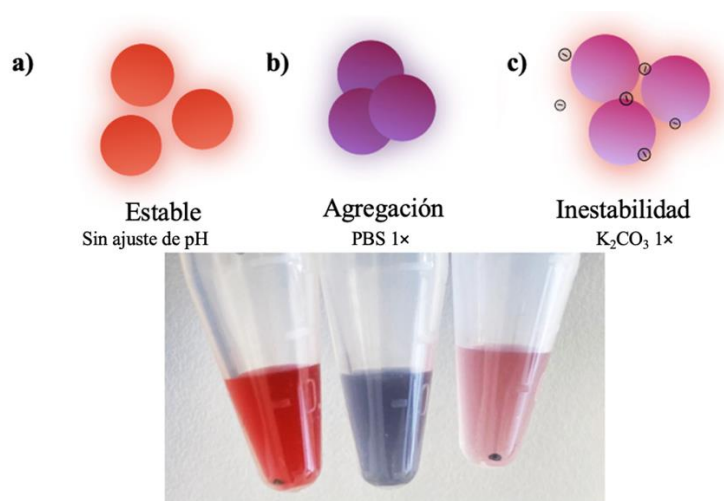


Figura 15. Efecto del pH en conjugados AuNP-IgG.

La **Figura 15** muestra un conjugado estable sin modificar el pH de la suspensión de AuNP (a), en la segunda fue empleando PBS 1× (pH 7.4) (b) y en la tercera K₂CO₃ 1× (pH 9.2) como soluciones amortiguadoras (c). Los conjugados en la **Figura 15** son posteriores al lavado, cuyo propósito es remover el exceso de proteína no adsorbida. Si el pH de conjugación no es el apropiado, esto causa inestabilidad al no favorecer la adsorción electrostática. Por otra parte, la concentración de sales o exceso de iones induce la agregación de los conjugados de manera irreversible. Así, tanto el pH y la fuerza iónica de la solución donde ocurre la conjugación impactan en la obtención de conjugados estables.

7.3.2. Efecto de la concentración de IgGH en la adsorción sobre la AuNP

En la **Figura 16** se observa el efecto de la concentración de proteína. En el caso de AuNP de 30 nm, el conjugado es estable con mayor concentración de proteína, equivalente a un mayor número de monocapas disponibles para ser adsorbidas. En general, la adición de una cantidad equivalente a una monocapa de proteína no es suficiente para estabilizar a las AuNP.

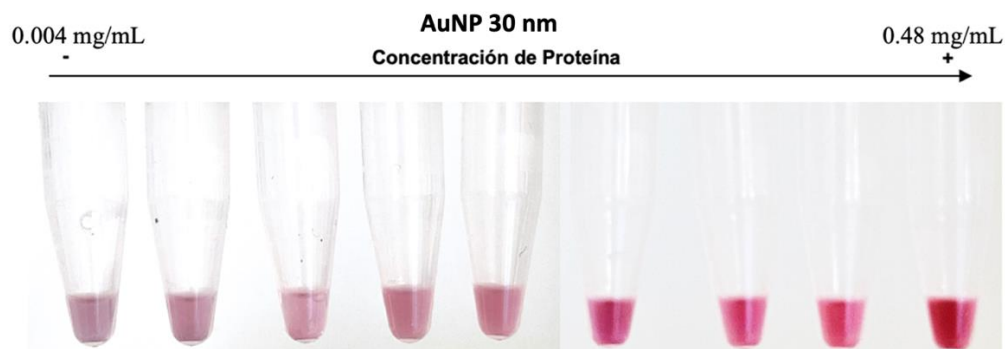


Figura 16. Efecto de IgGH de menor a mayor concentración en AuNP de 30 nm. Conjugados AuNP-IgGH obtenidos con concentraciones iniciales de 0.004 a 0.48 mg/mL (eq. de 2 a más de 200 monocapas) de proteína y resuspendidos en PBS 1×.

En contraste, la adición masiva de proteína estabiliza el sistema, pero podría provocar que no sea capaz de reconocer al analito de interés, ya que los sitios de unión se pudieran encontrar bloqueados (Maleki, et al., 2017). Una cantidad excesiva podría causar que los conjugados comiencen a agregarse y precipiten debido a que el área superficial es menor. Esto concuerda con lo reportado anteriormente, una menor concentración de anticuerpo es favorable en la superficie de la partícula (Driskell & Ruiz, 2019), dejando sin sobresaturar la superficie, favoreciendo la unión del analito de interés y evitando bloqueos innecesarios.

La **Figura 17b** muestra cómo la agregación puede monitorearse por el cambio de color de la suspensión coloidal. Adicionalmente puede medirse la absorbancia de la suspensión para determinar cambios en λ_{max} . Entre mayor es la inestabilidad del conjugado el LSPR se amplía y recorre hacia la derecha. En contraste, la **Figura 17a** con la adición de una cantidad suficiente de anticuerpo, el plasmón solo se desplaza ligeramente hacia la derecha. Esto indica que suficiente cantidad de anticuerpo fue adsorbido en la superficie de la AuNP obteniendo un conjugado estable. Por lo tanto, la concentración óptima de anticuerpos debe elegirse para cada caso individual teniendo en cuenta la estabilidad coloidal y la retención de la actividad de los anticuerpos.

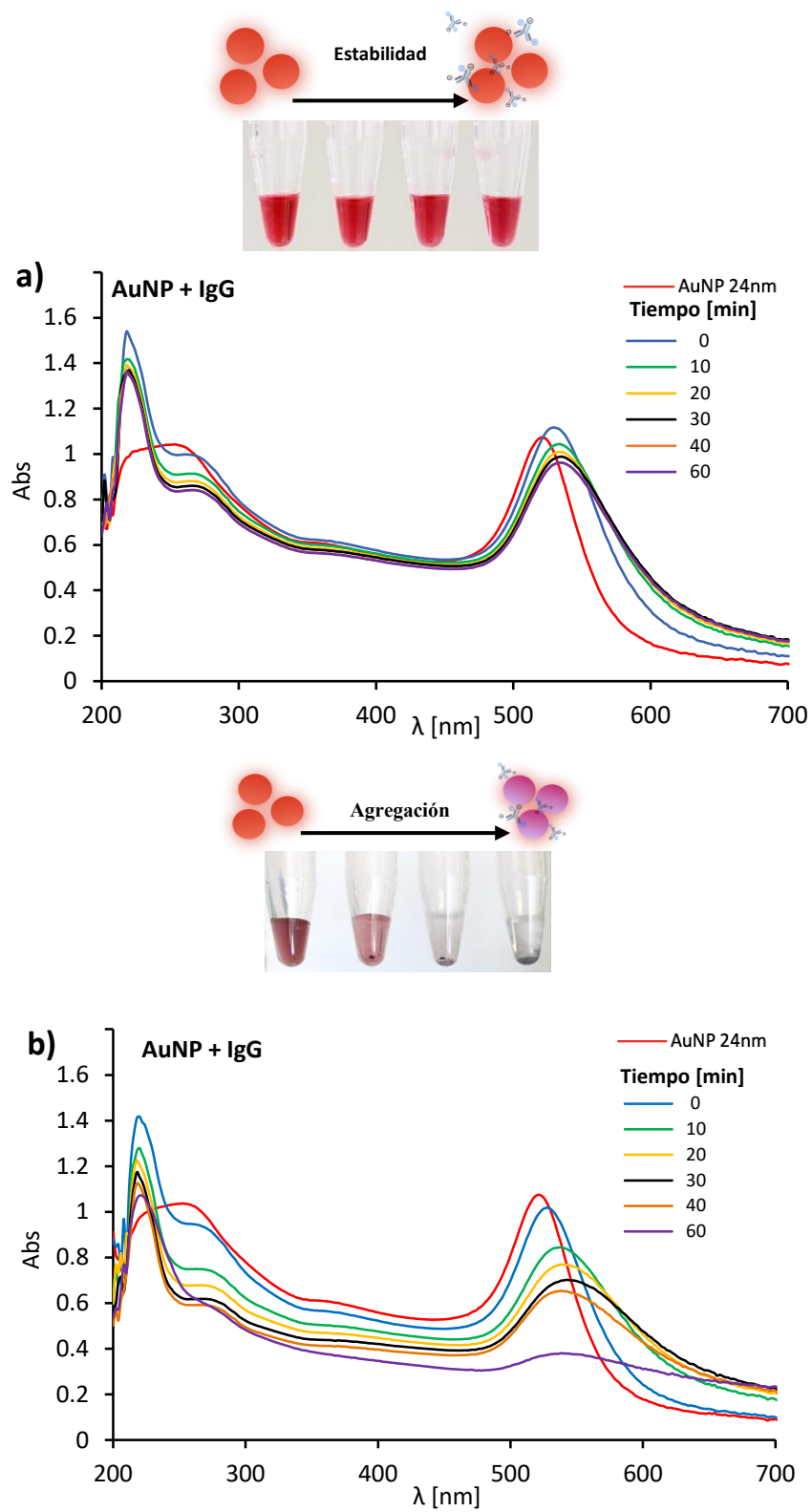


Figura 17. UV-Vis e imágenes de conjugados AuNP-IgG Humana. a) Conjugado estable b) Conjugado inestable.

7.3.3. Efecto de polisorbato 20 en la conjugación

La **Figura 18a** muestra 3 conjugados con ausencia de polisorbato 20 durante la conjugación. En el primer vial los conjugados son tan inestables que se adhieren a la pared del vial, esto debido los residuos hidrofóbicos de la proteína con afinidad por la pared hidrofóbica del vial causando este efecto e inestabilidad del conjugado. El segundo caso, muestra el mismo conjugado unos minutos después, pero sometido a sonicación. En ausencia de polisorbato 20 es evidente la presencia de agregados en suspensión, el conjugado tiene un color rosado-lila. En el último vial el mismo conjugado 20 min después, es de color morado y se formaron agregados de mayor tamaño, causando la pérdida de estabilidad.

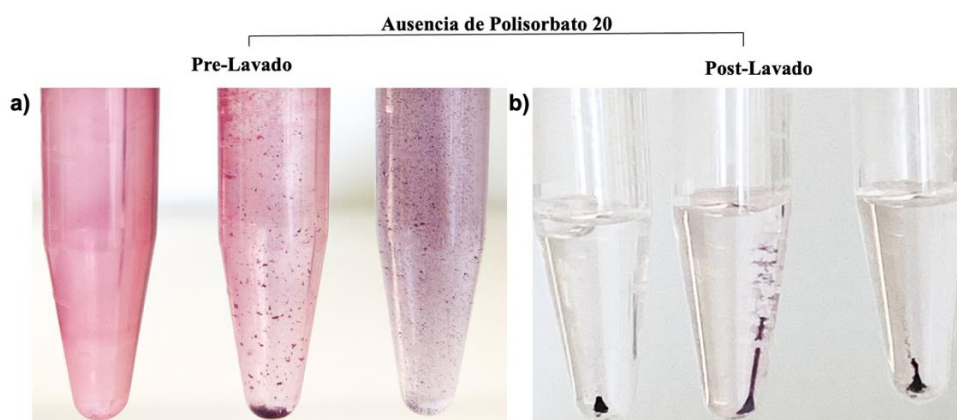


Figura 18. Efecto de la ausencia de polisorbato 20 en el proceso de conjugación. a) previo a centrifugación. a1) AuNP inestables y adheridas en la pared del vial, a2) conjugado 5 min después con presencia de agregados, a3) conjugado en estado de agregación e inestabilidad visible 20 min posterior a la conjugación. b) Mismos experimentos, pero sometidos a centrifugación.

Un paso posterior a la conjugación es el lavado, en el cual los conjugados son sometidos a centrifugación y la fuerza centrífuga causa la aglomeración de las partículas. Si el conjugado es estable, es sencillo resuspenderlo y mantenerlo disperso en solución. La **Figura 18b** muestra los conjugados anteriores sometidos a fuerza centrífuga (post-lavado). Como los conjugados eran inestables (previo al lavado), la fuerza centrífuga favoreció su agregación, provocando que las partículas formaran agregados de mayor tamaño y haciendo imposible la resuspensión de estos conjugados (**Figura 18b**).

Los conjugados que están agregados son inestables y no pueden ser empleados en el LFIA. En presencia de polisorbato 20, el conjugado es estable y no forma agregados. Así, su adición es imprescindible en la metodología de conjugación.

7.3.4. Efecto del tiempo y temperatura de incubación durante la conjugación

El tiempo de adsorción es clave cuando el sistema tiene una baja concentración de proteína, pues el conjugado colapsa en minutos. De haber proteína suficiente, el conjugado tiene un tiempo de adsorción de una hora. En este tiempo el sistema alcanza el equilibrio y es estable ya que soporta los lavados y no colapsa. La temperatura es un factor clave. Comparamos la adsorción a temperatura ambiente y a 4 °C, en ambos casos sin agitación ya que esta acelera el proceso de agregación causando la inestabilidad a los conjugados.

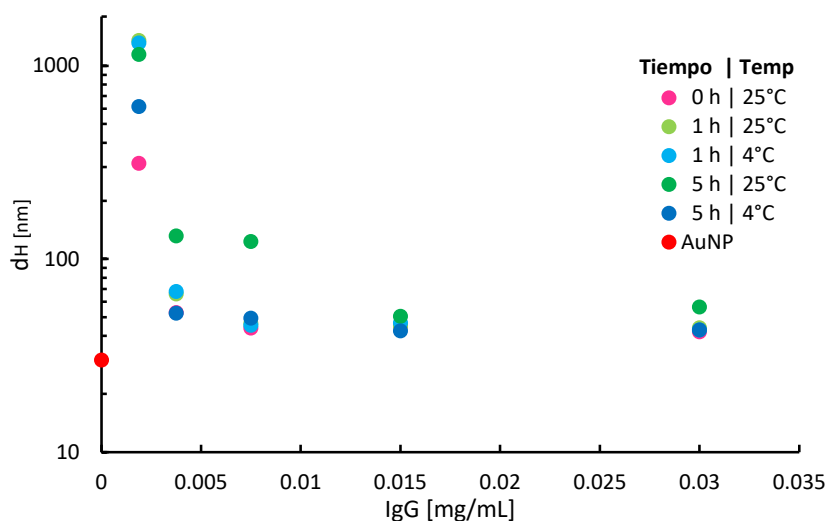


Figura 19. Variación del diámetro hidrodinámico de los conjugados AuNP-IgGH con diferentes concentraciones de IgGH, respecto a la temperatura y tiempo de conjugación.

La **Figura 19** muestra las distribuciones de tamaño en función de la concentración de proteína y temperatura. El diámetro hidrodinámico inicial de AuNP es de 30 nm. Posterior a la conjugación, este cambió a tamaños más grandes con el aumento de la concentración inicial de proteína en un rango de 0.03 a 0.002 mg/mL, terminando con un tamaño promedio de 50 nm hasta que la proteína saturó la superficie de las AuNP. Esto muestra una población altamente monodispersa de conjugados con pocos agregados detectables. Cuando la concentración inicial de IgGH es menor a 0.015 mg/mL, hay un aumento considerable en el diámetro hidrodinámico (en algunos casos mayor a 1000 nm).

Es decir, cuando la concentración IgGH es limitada (0.002 mg/mL) el conjugado es inestable y genera la presencia de agregados, traduciéndose en un mayor tamaño hidrodinámico. El aumento drástico del diámetro dinámico es indicativo de la inestabilidad del conjugado.

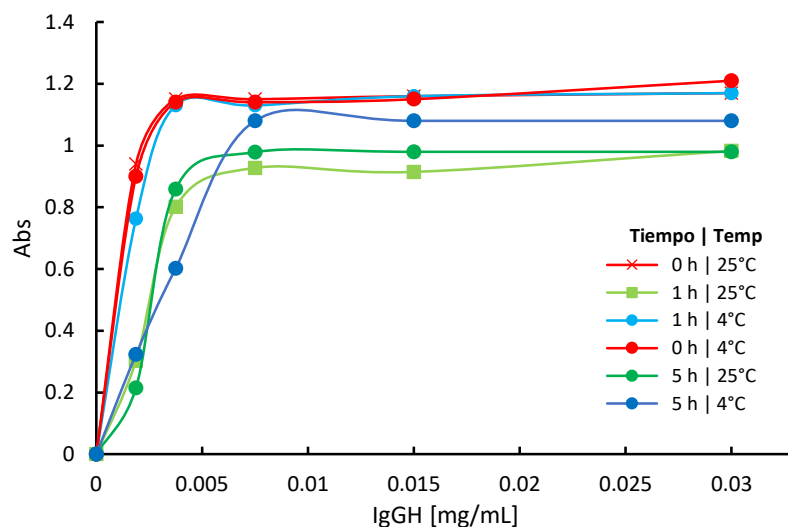


Figura 20. Variación de la absorbancia respecto a la concentración de proteína IgGH presente en el conjugado, temperatura y tiempo de incubación.

La **Figura 20** muestra que desde 0.0075 mg/mL el sistema alcanza un “equilibrio dinámico”. Este equilibrio indica que a partir de esa concentración el conjugado tiene la misma cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula. La temperatura, tiempo y agitación tienen una influencia directa en la adsorción. Después de 1 h de incubación hay una mayor concentración de proteína en el conjugado. A diferencia del conjugado de 5 h, donde hay un decremento en la absorbancia, esto se debe principalmente a factores como la temperatura (desnaturalizando potencialmente a la proteína), además es posible que sea más fuerte la interacción hidrofóbica de la proteína con la pared del vial. Es importante mencionar que a mayor tiempo de incubación mayor inestabilidad del conjugado. Mantener los conjugados a temperatura ambiente favorece la agregación a diferencia de los que están a 4 °C durante la incubación. Asimismo, la agitación acelera el proceso anteriormente descrito.

7.3.5. Tamaño y potencial ζ de conjugados AuNP-IgGH

Fueron preparadas dos series de conjugados con AuNP de 30 y 48 nm, cuantificando el potencial ζ y el tamaño de los conjugados de AuNP con IgG humana con diferentes concentraciones. La **Figura 21** muestra como el diámetro hidrodinámico promedio aumentó respecto al de las AuNP sin conjugar. Dicho aumento fue drástico, de 30 nm a 100 nm o mayor. Esto indica que se están formando multicapas o la inestabilidad del conjugado por la falta de proteína suficiente para evitar la formación de agregados. No obstante, los

conjugados tienen un aspecto homogéneo y color rojo, sin presencia de agregados visibles. La **Figura 21** muestra la distribución de tamaños indicando la presencia de agregados. En la concentración más baja de 0.04 mg/mL, la distribución de tamaño es más amplia, indicando la presencia de conjugados de diferentes tamaños cercanos a y por encima de 1000 nm.

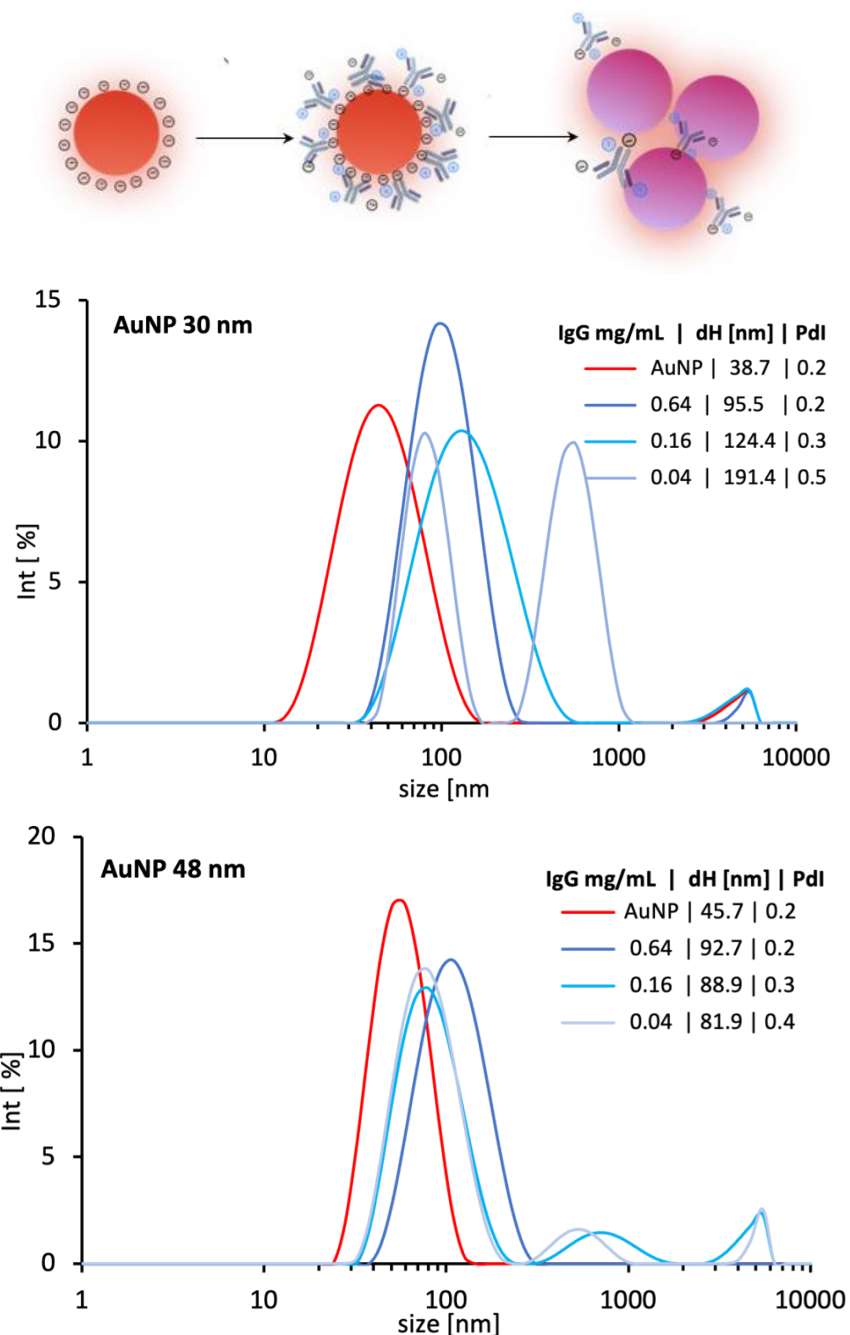


Figura 21. Tamaño hidrodinámico de conjugados con diferentes concentraciones de a) IgG humana y AuNP de 30 y b) 48 nm.

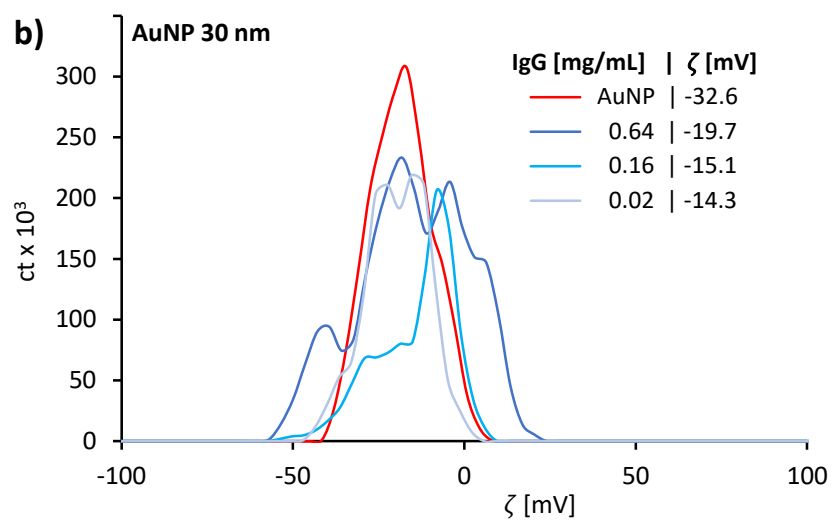
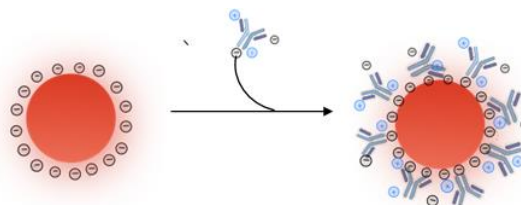
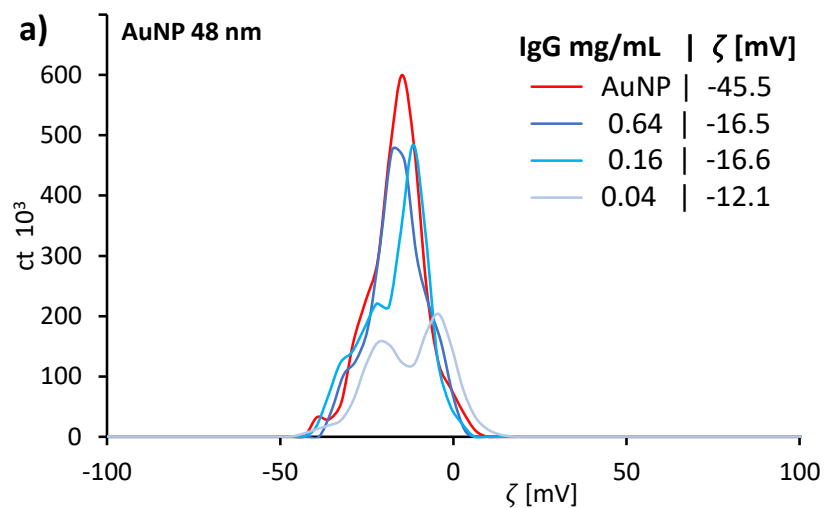
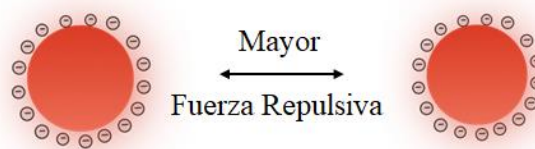


Figura 22. Potencial ζ de conjugados con diferentes concentraciones de a) IgG humana con AuNP de 48 nm b) IgG humana con AuNP de 30 nm.

En AuNP el potencial ζ es negativo debido al citrato presente en su superficie. El potencial ζ está relacionado con la carga superficial de la nanopartícula, aunque indirectamente, lo medido es el campo eléctrico en la interfaz entre la AuNP y el fluido. En la **Figura 22** el valor del potencial ζ de las AuNP es negativo. Después de la conjugación con la adsorción de la proteína de interés, el potencial ζ es menos negativo. Con la adición de la proteína (con carga positiva) se establece una interacción electroestática con los iones citrato en la superficie de la partícula, causando una disminución del potencial ζ . Al adicionar la proteína, esta afecta la estabilidad del conjugado por lo tanto la concentración de esta es uno de los parámetros de mayor relevancia.

Al estudiar las variables de conjugación como el pH y la presencia de polisorbato 20 con IgGH, fue posible tener una mayor comprensión sobre el proceso de conjugación por fisisorción. Una de las problemáticas principales es cuando este sistema sea empleado en muestras problema o sueros complejos donde la concentración y cantidad de proteína son limitadas. Experimentamos con conjugados a concentraciones más bajas donde el sistema fue probado al límite. Empleando el mismo protocolo descrito anteriormente con la finalidad de ver el comportamiento de estas, eliminamos la agitación ya que la cantidad de proteína es limitada y favorece la agregación.

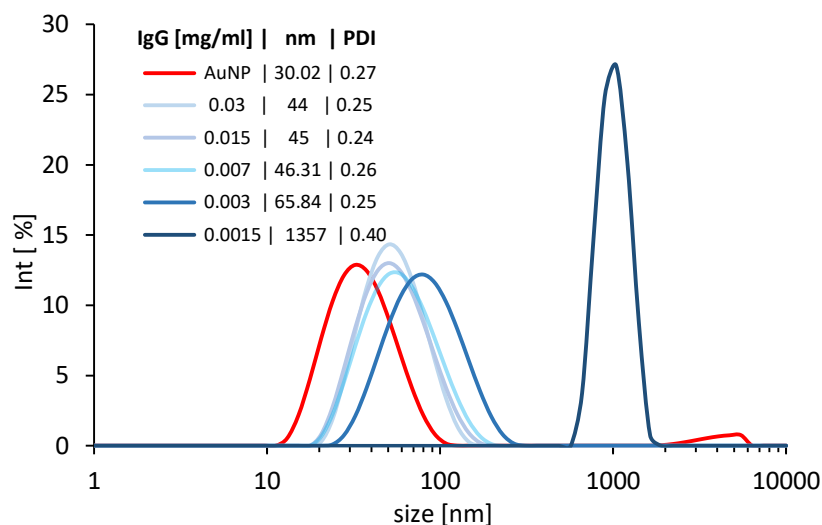


Figura 23. Tamaño hidrodinámico de conjugados con diferentes concentraciones de IgG humana con AuNP de 30 nm.

Al preparar conjugados con concentraciones iniciales bajas de proteína, el diámetro hidrodinámico aumentó respecto al de las AuNP sin conjugar, indicando que la adsorción de la proteína de interés ocurrió con éxito en la superficie de AuNP. En los resultados presentados en la **Figura 23**, donde la concentración de proteína es limitada, el diámetro hidrodinámico promedio no aumentó drásticamente, manteniéndose en un promedio de 45 nm. En comparación con los conjugados de la **Figura 21** donde la concentración de la proteína era más alta y el tamaño hidrodinámico promedio es de 100 nm.

El valor promedio del índice de polidispersidad es cercano a 0.2 lo que indica que los conjugados tienden a ser más monodispersos que polidispersos. Con la concentración inicial más baja de 0.002 mg/mL (eq. a 1 monocapa) el conjugado colapsó, encontrando que la cantidad mínima requerida para asegurar la estabilidad es 0.004 mg/mL (eq. a 2 monocapas), aunque produciendo conjugados de mayor diámetro.

Al preparar conjugados con concentraciones iniciales bajas de proteína, el potencial ζ , aunque con menor valor, continuó siendo negativo, indicando que existe repulsión entre las partículas que ya contienen proteína. Esto es favorable ya que esta fuerza repulsiva ayuda a que no se generen agregados en el conjugado, asegurando la estabilidad de este.

7.4. Caso 1: LFIA con anticuerpos puros IgGM y anti-IgGM

La inmunoglobulina G murina (IgGM) es un anticuerpo reconocido por anti-IgGM, un anticuerpo de origen caprino producido al emplear IgGM como inmunógeno. Ambos fueron comprados para probar inmunoensayos con anticuerpos modelo, altamente puros y con afinidad conocida. Como se representa en la **Figura 24**, generamos conjugados de ambos y ambos fueron también inmovilizados en membranas, respectivamente.

Datos Generales	IgGM	anti-IgGM
Tipo de anticuerpo	policlonal	policlonal
Punto Isoeléctrico	7.4	8
Producido en un modelo:	Murino	Caprino
Grado de pureza	> 95 %	> 90 %

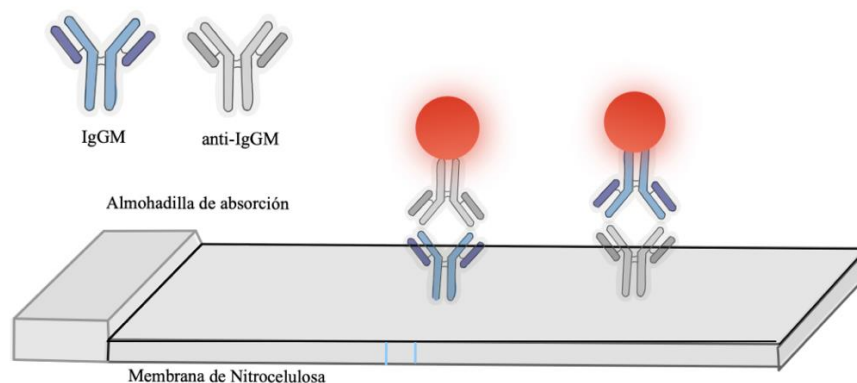


Figura 24. Datos generales de los anticuerpos murino y anti-murino utilizados.

De los anticuerpos mencionados, uno funcionó como analito y fue adsorbido en la superficie de las AuNP, el otro fue inmovilizado en la membrana reactiva de nitrocelulosa y viceversa. Este es un sistema modelo donde el antígeno es altamente afín al anticuerpo. Este sistema permitió tener una mejor comprensión de la interacción del sistema y la aplicación de los conjugados como reactivos colorimétricos en inmunoensayos de flujo lateral (LFIA).

7.4.1. Efecto de la concentración de anticuerpo en la conjugación

La **Figura 27b** se muestra el caso de conjugados AuNP-IgGM, a concentraciones limitadas de proteína causan el colapso del conjugados. Para obtener conjugados estables es necesario la adición de una concentración mayor de proteína para estabilizar el sistema.

La **Figura 25** muestra conjugados AuNP-IgGM producidos a partir de una solución concentrada de proteína (1 mg/mL), adicionando volúmenes en orden creciente de 5 a 30 μ L con la finalidad de aumentar el número de monocapas y concentración de la proteína para estabilizar el sistema. Adicionando un mayor volumen de proteína disuelta en solución amortiguadora (PBS 1 \times), resulta en un mayor número equivalente de monocapas, pero también de sales presentes. Los conjugados colapsan debido a la alta concentración de sales que desestabilizan al sistema. La **Figura 25** muestra conjugados AuNP-IgGH a partir de soluciones individuales de proteína IgGH con diferentes concentraciones en orden creciente para adicionar el mismo volumen y concentración de sales. A partir de 10 monocapas el conjugado tiende a ser estable. Una cantidad excesiva de monocapas no es deseable ya que se puede sobresaturar la superficie y bloquear la unión del analito de interés.

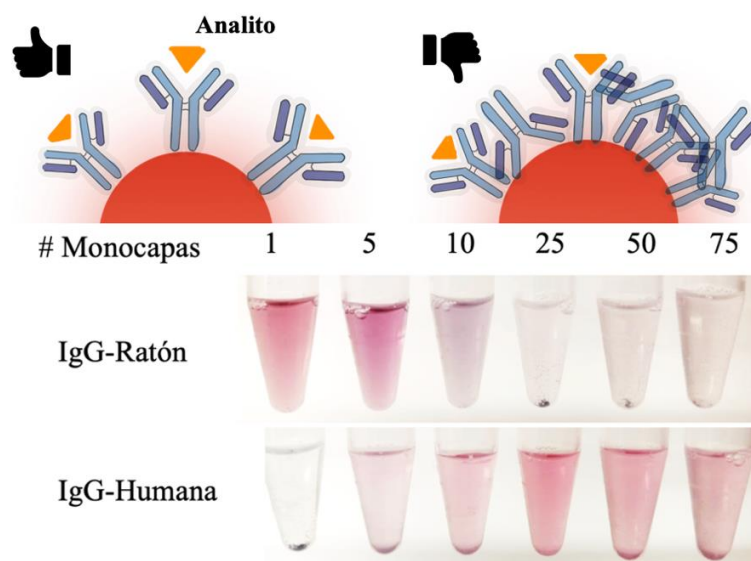


Figura 25. Variación de monocapas de conjugados con AuNP de 30 nm con IgG murina e IgG humana variando el número de monocapas (1 a 75 monocapas) para evaluar la cantidad de proteína necesaria para generar estabilidad.

7.4.2. Agentes de bloqueo para estabilizar AuNP-IgGM

La **Figura 26** muestra que con la adición de la proteína de bloqueo (BSA) los conjugados son estables, en cambio cuando no se añade esta los conjugados tienden a colapsar. La adición de la proteína de bloqueo es de gran utilidad cuando la concentración y cantidad del anticuerpo de interés es limitada, ya que con la adición de esta una menor cantidad de anticuerpo para estabilizar el conjugado es requerida. Estos agentes estabilizantes bloquean

los sitios libres donde el anticuerpo no fue adsorbido en las AuNP, evitando así uniones inespecíficas. Una de las principales desventajas de utilizar proteínas de bloqueo es que pueden causar una competencia con el anticuerpo que es requerido adsorber durante la conjugación, causando que una menor cantidad de anticuerpo se adsorba en la superficie de la partícula y, por tanto, afecte la eficacia de la conjugación (Zherdev, 2020). Así, el desarrollo de un protocolo donde no fuera necesario emplear proteínas de bloqueo es crucial.

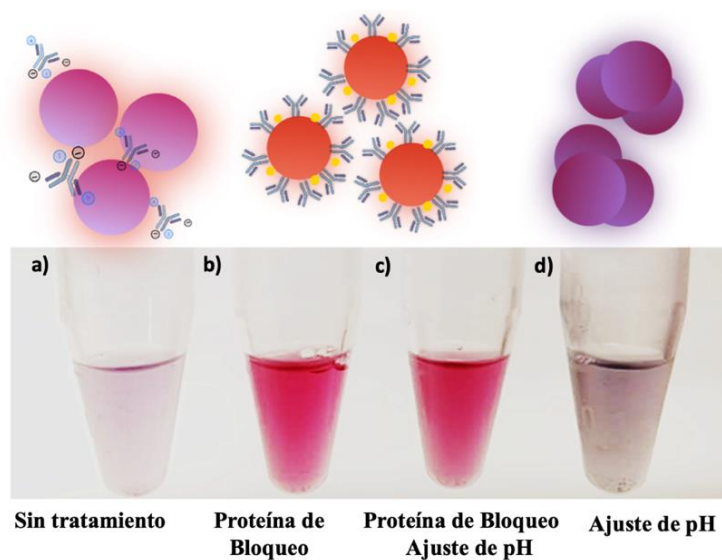


Figura 26. Conjugado AuNP 30 nm-IgGM. a) Sin tratamiento: sin proteína de bloqueo, ni ajuste de pH. b) Adicionando un agente de bloqueo. c) Adicionando el agente de bloqueo y ajuste de pH. d) Con ajuste de pH sin bloqueo.

7.4.3. Efecto del pH con anticuerpos puros y la adición de proteína de bloqueo

La concentración óptima de anticuerpos debe elegirse para cada caso individual teniendo en cuenta la estabilidad coloidal y la retención de la actividad de los anticuerpos. La **Figura 26** muestra que sin modificar el pH y adicionando el anticuerpo, el conjugado colapsa. Los resultados observados en la **Figura 26** ocurren cuando la concentración de proteína objetivo es limitada y de no hacer la adición de la proteína de bloqueo el sistema es inestable y tiende a formar agregados. El color cambia drásticamente a morado-gris y en este punto las partículas colapsan. Nuevamente, esto ocurre sin la adición de la proteína de bloqueo y empleando una cantidad limitada de anticuerpo IgGM. En el caso del conjugado AuNP-IgGM con ajuste de pH la conjugación es favorecida, evitando el colapso y agregación de los conjugados.

7.4.4. Monitoreo de la agregación de los conjugados

(Zhang, et al., 2019) documentaron cómo la agregación puede monitorearse por el cambio de color de la suspensión coloidal y midiendo la absorbancia de la solución en su λ_{\max} . La **Figura 27a** muestran que con la adición del anticuerpo el LSPR se desplaza ligeramente hacia la derecha. Esto indica que el anticuerpo fue adsorbido en suficiente cantidad sobre la superficie de la nanopartícula, si la cantidad de proteína es limitada, la adición proteína de bloqueo evita la generación de agregados.

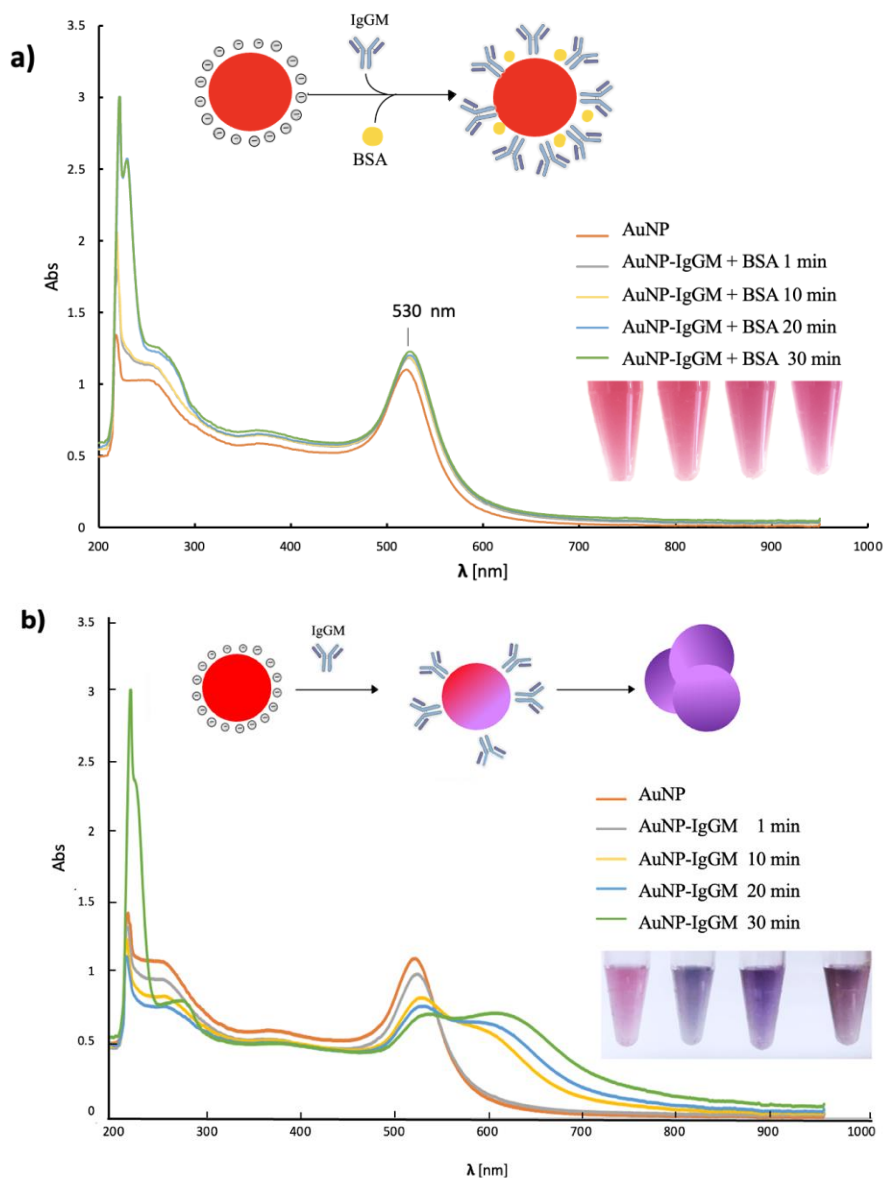


Figura 27. Monitoreo de la estabilidad e inestabilidad de conjugados con AuNP de 30 nm con 10 uL de IgG de ratón (1 mg/mL). a) Adicionando 5 uL de proteína de bloqueo (BSA a 1 mg/mL). b) Sin la adición de proteína de bloqueo.

Por lo tanto, al controlar bien los parámetros como el pH de conjugación, concentración de iones y la concentración de proteína pueden producirse conjugados con estabilidad idónea. En contraste, en ocasiones con la adición limitada del anticuerpo presente no es posible lograr la estabilidad del conjugado. Esto es debido al empleo de un pH no idóneo para la conjugación, la presencia de iones en exceso y la falta de la proteína de bloqueo, causando el colapso y agregación del conjugado. La **Figura 27b** se puede observar que entre mayor es la inestabilidad del conjugado el LSPR se ensancha más y se recorre hacia la derecha. La inestabilidad de un conjugado es irreversible y sucede de forma rápida. En solo unos segundos la suspensión cambia de roja a morada, enseguida a gris y finalmente queda incolora.

En el caso de los conjugados estables, estos permanecen sin cambios por hasta 5 semanas a 4 °C y la respuesta en membrana en un inmunoensayo de flujo lateral es similar que con un conjugado recién preparado.

7.4.5. LFIA: IgGM contra IgG anti-murina

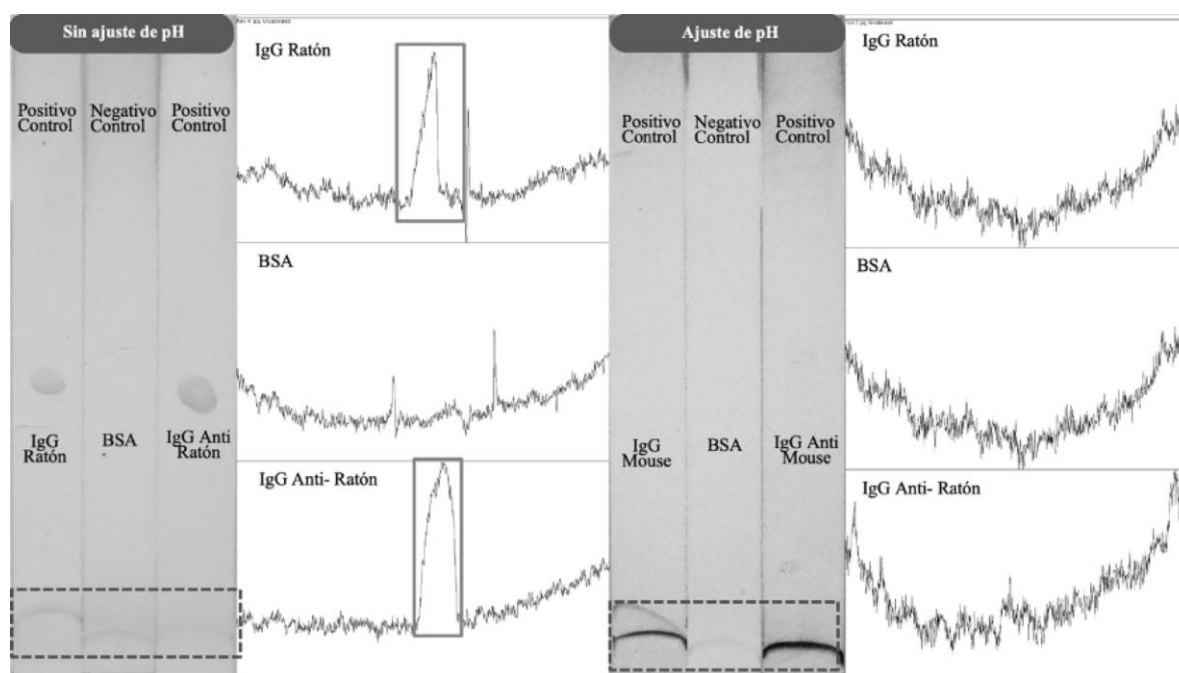


Figura 28. Membranas con anti-IgGM probados con 3 conjugados diferentes a) AuNP-IgGM b) AuNP-BSA c) AuNP-anti-IgGM. A la izquierda conjugados sin ajuste de pH. En la derecha conjugados con ajuste de pH con 100 mM de NaOH.

El conjugado AuNP-IgGM mostró una respuesta positiva con la membrana donde fue inmovilizado anti-IgGM y viceversa; esto es considerado el control positivo. El conjugado AuNP-BSA dio una respuesta negativa a la membrana donde fue inmovilizado IgGM. La **Figura 28** muestra las membranas con controles positivos y negativos acompañados de su análisis densitométrico. La metodología para la preparación de los respectivos conjugados usados y el bloqueo de las membranas está descrita en la sección 6.3.1. Los resultados obtenidos en membranas bloqueadas con 5 % de leche y el anticuerpo anti-IgGM inmovilizado en la membrana, inicialmente con una concentración de 1 mg/mL, fueron realizados tras una doble deposición (con la finalidad de mejorar la respuesta en membrana).

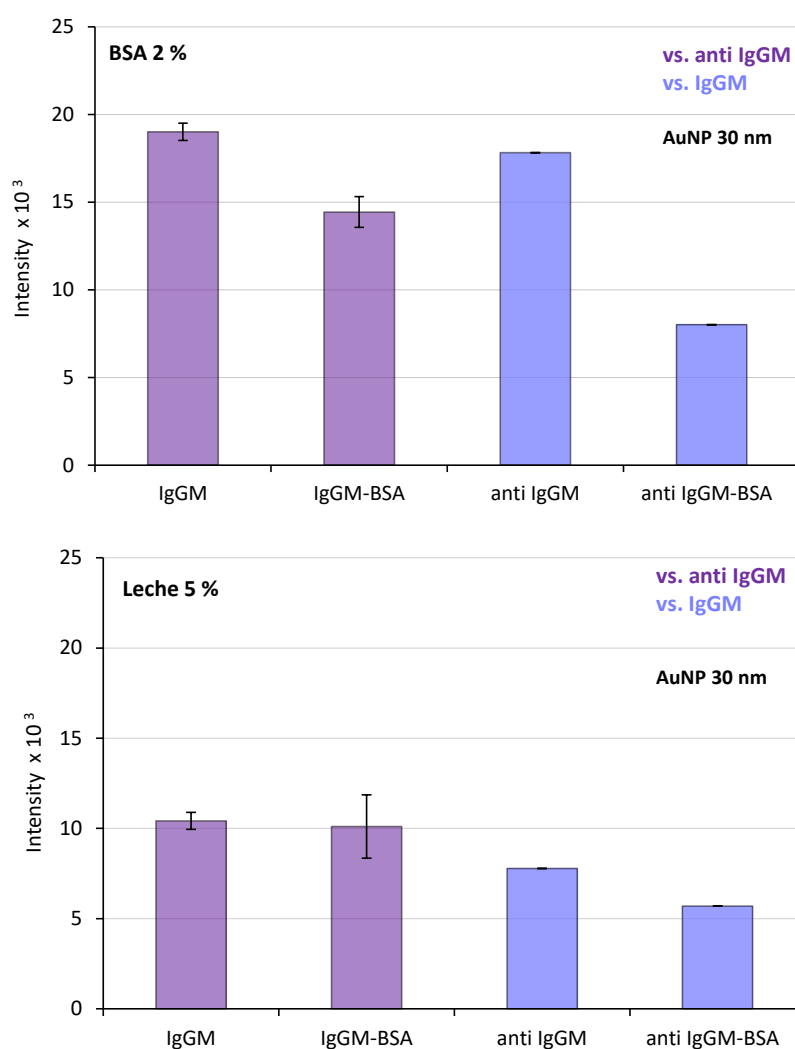


Figura 29. Análisis densimétrico de a) AuNP-IgGM vs. IgG anti-murina en membranas bloqueadas con BSA al 2 % y b) AuNP-IgGM vs. anti-IgGM en membranas bloqueadas con leche al 5 %.

En el sistema anterior no hay reacción inespecífica con BSA ni IgGH como controles negativos. La **Figura 29** muestra los gráficos de intensidad donde es evidente la presencia o ausencia de señal para la combinación probada. Los conjugados con mejor respuesta son los de AuNP-IgGM en membranas bloqueadas con 2 % de BSA, en comparación con membranas bloqueadas con 5 % de leche donde la señal esta disminuida. Esto ocurrió porque el anticuerpo inmovilizado en la membrana está a una concentración de 1 mg/mL (una concentración baja ya que el bloqueo fue en leche con mayor concentración que BSA). Esto pudo causar que la señal fuera menor en las membranas (**Figura 28**). Comparativamente, en la **Figura 29** se observa que, las membranas bloqueadas con BSA tienen una mejor intensidad de señal incluso a concentraciones bajas.

7.5. Caso 2: AuNP-Suero ovino-péptido P6 vs. VLP

Los sistemas empleados en los casos de estudio anteriormente realizados permitieron tener un mayor conocimiento sobre la interacción antígeno-analito y parámetros que afectan la sensibilidad y estabilidad del inmunoensayo. En este caso, desarrollamos un ensayo de flujo lateral (LFIA) práctico y rápido con aplicación potencial para la detección del SARS-CoV-2. Empleamos partículas similares a virus (VLP, *virus-like particles*) que son complejos de proteínas multiméricas que imitan la organización de los virus nativos, pero carecen del genoma viral. Estos contienen en su superficie a la proteína S o fracciones de esta para simular al virus (**Figura 30**).

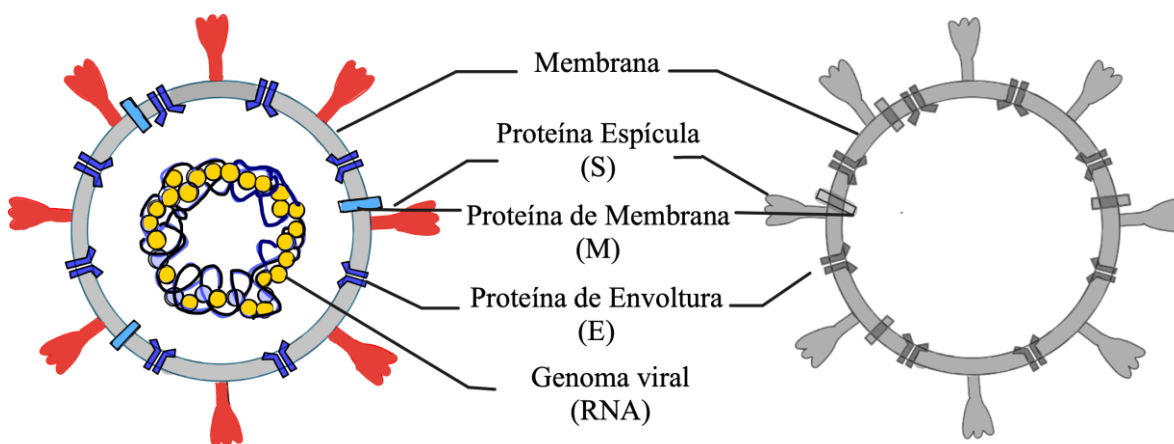


Figura 30. Comparación entre el virus del SARS-CoV-2 y una VLP.

El analito inmovilizado sobre la membrana de nitrocelulosa fueron las VLP y no un anticuerpo como en el caso anterior. En la **Figura 31** se muestran las 4 VLP de diferentes tipos, incluyendo una VLP control (C, que no expresa ninguna proteína del SARS CoV-2), una VLP con RBD en la superficie sin RNA (V5) o con RNA (V6), y una VLP con la proteína S en la superficie (V7) que se emplearon para el LFIA.

Como muestra la **Figura 30**, las VLP están compuestas de proteínas estructurales de la cápside del virus de interés. Pueden producirse imitando la repetitividad, la geometría, el tamaño e incluso la forma de la superficie del virus. Sirven como plataforma para la presentación de epítomos inmunogénicos.

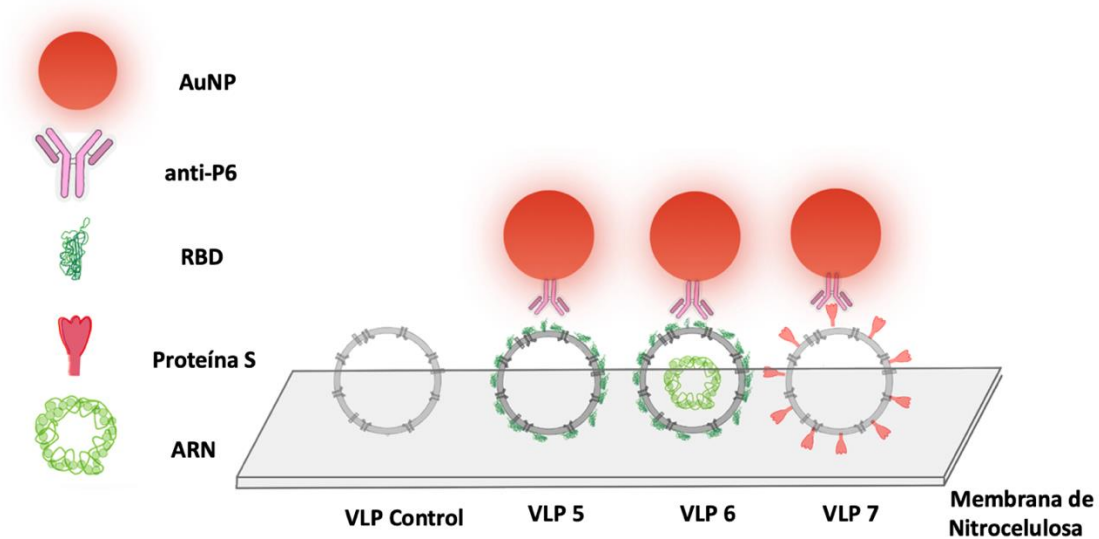


Figura 31. Representación de un inmunoensayo utilizando distintas VLP.

7.5.1. Producción del Anticuerpo Anti-P6

La proteína S de los diferentes coronavirus cuentan con un dominio de unión al receptor (RBD, *receptor binding domain*) mediante el cual la proteína se une a los receptores de su hospedero (Xiaoyang, et al., 2023). Este RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 es el sitio indispensable para que el virus pueda unirse a los receptores ACE2 de células humanas (Hernández, et al., 2021). Mientras que la proteína S está compuesta de 1250 aminoácidos, su RBD tiene 222 aminoácidos y es el sitio objetivo para anticuerpos neutralizantes (Grant, et al., 2020).

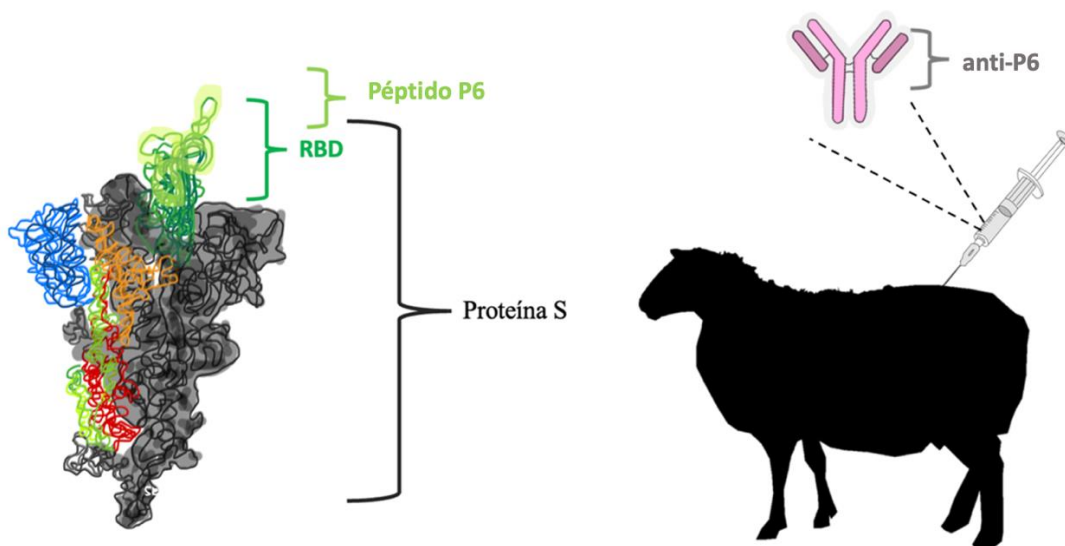


Figura 32. Estructura de la proteína S del SARS-CoV-2.

Mediante un análisis estructural de la proteína S fue posible identificar a los aminoácidos en el dominio RBD responsables de llevar a cabo la unión a los receptores para SARS-CoV-2. El péptido sintético P6, correspondiente a un epítipo de RBD, fue comprado e inyectado en un modelo ovino, del cual se obtuvo un suero hiperinmune conteniendo el anticuerpo anti-P6. En principio este tiene una alta afinidad por un epítipo de RBD de la proteína S (**Figura 32**). A continuación, empleando el protocolo de la sección 6.3.2 se produjeron conjugados AuNP-anti-P6. En este sistema el pH de conjugación no fue ajustado y la proteína de bloqueo no fue adicionada, ya que el suero contiene tanto a anti-P6 como a otras proteínas, incluyendo albúmina, que ayudan a estabilizar al sistema.

7.5.2. Caracterización del conjugado AuNP-anti-P6

La caracterización de las AuNP (sin y con anti-P6) mediante DLS y UV-Vis se muestra en la **Tabla 3** los parámetros más representativos de los conjugados de 30 y 48 nm de AuNP-anti-P6. Las AuNP sintetizadas, son dispersas y tienen una morfología cuasi-esférica. La caracterización por UV-Vis corroboró que poseen un LSPR característico en 520 nm, que resulta de la oscilación de electrones libres en su superficie, lo que hace que las AuNP generen una señal visible a simple vista. Además, el análisis DLS indicó que las AuNP tienen una carga superficial negativa. La **Figura 33** muestra que los conjugados aumentan su tamaño con la adición de anti-P6. En DLS la distribución de tamaño es más amplia, indicando la presencia de conjugados de diferentes tamaños.

Tabla 3. Caracterización de las AuNP y conjugados AuNP-anti-P₆ (30 y 48 nm).

ID	λ_{\max} (nm)	d_H (nm)	ζ (mV)	PDI
AuNP 30 nm	520	38.7	-33.7	0.326
AuNP 30-anti-P6	525	119.8	-15.6	0.234
AuNP 48 nm	530	45.70	-45.5	0.228
AuNP 48-anti-P6	537	90.4	-17.9	0.186

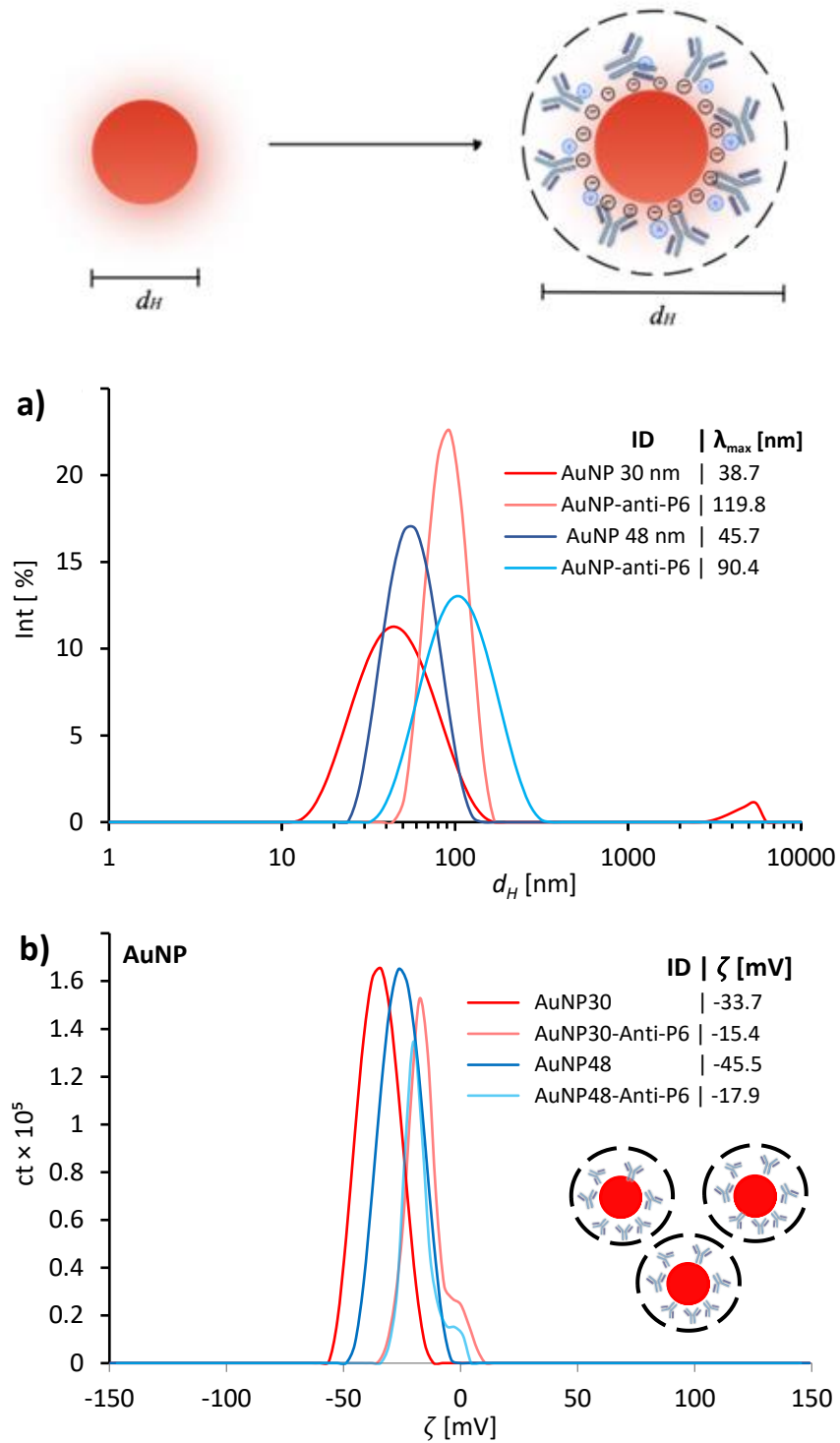


Figura 33. Caracterización de AuNP-anti-P6. Potencial ζ de conjugados b) anti-P6 con AuNP de 30 y 48 nm. Diámetro hidrodinámico de conjugados con diferentes concentraciones de anti-P6 con AuNP de 30 y 48 nm.

7.5.3. Efecto del agente de bloqueo y su concentración en la producción de membranas reactivas

Comparamos dos agentes de bloqueo en membranas con VLP inmovilizadas: BSA y leche sin grasa. La diferencia entre estos es que BSA es pura y la leche sin grasa contiene otros componentes que ayudan a bloquear los poros de la membrana de manera más eficiente. La elección entre BSA y leche sin grasa no solo depende de su disponibilidad y precio, sino también de criterios más específicos como el tipo de proteína por analizar o la fuerza de unión al anticuerpo.

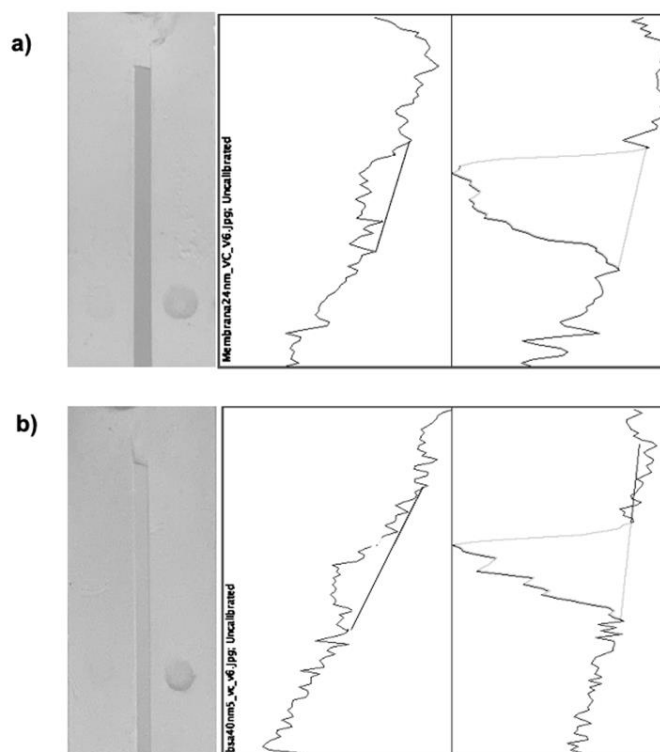


Figura 34. Comparación de respuesta en membrana y análisis densitométrico. Membrana bloqueada con BSA al 1 % usando a) AuNP-anti-P6 de 30 nm, b) AuNP-anti-P6 de 48 nm.

La ventaja de bloquear con leche, además de que es más accesible y de bajo costo, es que no presenta reacción inespecífica. Otra variable es el tiempo de flujo a través de la membrana, este es menor en comparación con las membranas bloqueadas con BSA al 1 %. El inconveniente de bloquear con leche es que en algunos casos la señal es muy tenue como ha sido descrito anteriormente (Ambytec, 2019). Esto hace necesario una mayor concentración de proteína o anticuerpo inmovilizado en membrana. Por el contrario, al bloquear con BSA,

una de las ventajas es que la intensidad de la señal incrementa, incluso cuando la proteína está en concentraciones bajas. La desventaja es que el flujo a través de la membrana es lento y existe una ligera respuesta no específica (como ocurrió con la VLP control en el caso de bloquear con 1 % de BSA) en comparación con leche. La **Figura 34a** muestra la comparación del análisis densitométrico de membranas usando un conjugado AuNP 30-anti-P6 y en la **Figura 34b** usando un conjugado AuNP 48-anti-P6.

La **Figura 35** muestra resultados representativos de los inmunoensayos junto con el análisis densitométrico de la respuesta de membranas representativas. Estudiamos el efecto del agente de bloqueo (dos concentraciones de BSA o una concentración de leche). Menor concentración de BSA mejora la respuesta de las muestras. Sin embargo, la señal del control (adsorción no específica) también incrementa. Las señales son reducidas al utilizar la concentración más alta de BSA. El bloqueo con 5 % de leche reduce significativamente la señal del control, mientras que las señales de las VLP siguen siendo visibles y cuantificables por densitometría (**Figura 35**).

Posterior al bloqueo, la membrana es situada en un desecador durante 24 h, con la finalidad de secarla y asegurar que este lista para ser utilizada. De no bloquear correctamente o no secar completamente la membrana, el flujo capilar es afectado, junto con la intensidad de la respuesta. El tiempo del inmunoensayo es de 15 min, más 20 min de lavado en una solución de PBS 1× con 0.05 % de polisorbato 20, para mejorar la intensidad de la señal en membrana.

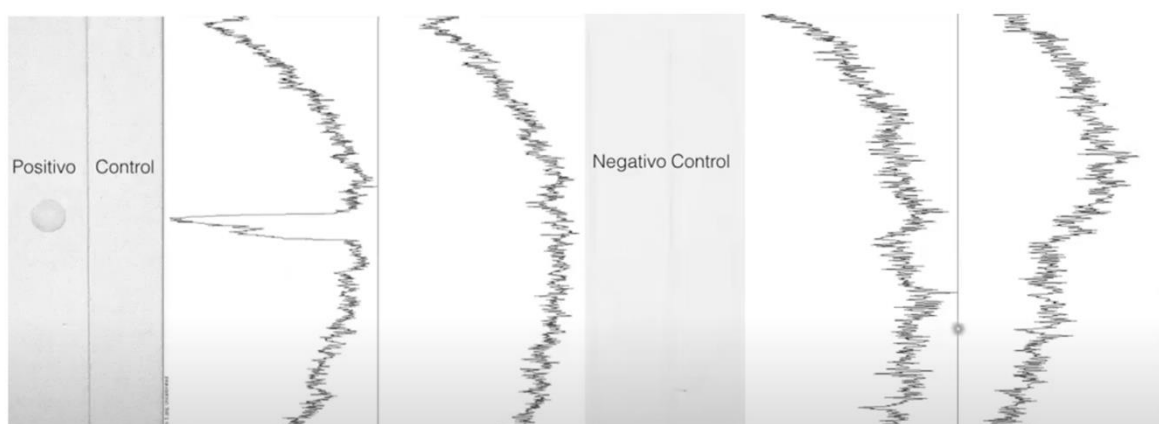


Figura 35. Membranas de NC después del inmunoensayo y su respectivo análisis densitométrico. La detección positiva aparece como un círculo de tonalidad roja por las AuNP. V6 (positivo), C (control) e IgG murina (negativo).

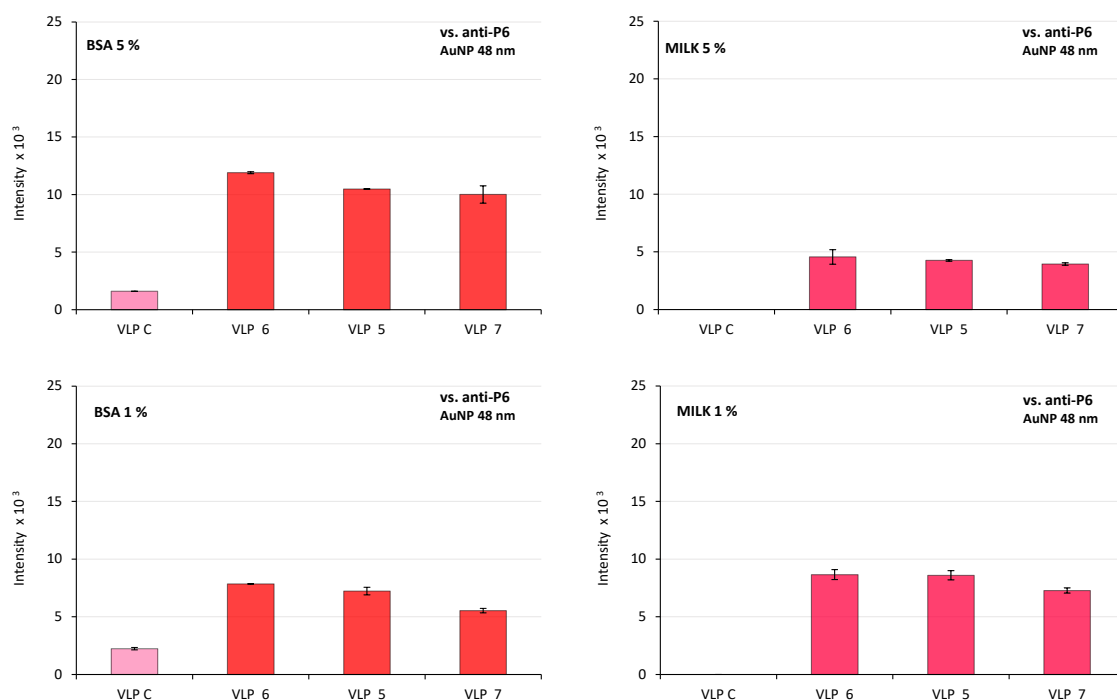


Figura 36. VLP (C, V5, V6 y V7) inmovilizadas en membranas bloqueadas con 5 % y 1 % de BSA y leche probada contra AuNP 30-anti-P6. VLP control (C), VLP con RBD en superficie sin RNA (V5) y con RNA (V6), VLP con proteína S en la superficie (V7).

Los resultados obtenidos han sido drásticamente diferentes. La mejor respuesta en membrana fue observada con conjugados de 30 nm (**Figura 36**). Asimismo, la respuesta es más intensa al emplear BSA como agente de bloqueo. El único inconveniente es que al usar 1 % de BSA el control muestra una ligera respuesta. Esto se soluciona aumentando la concentración a 5 % de BSA. En contraste, una de las ventajas de emplear leche como agente de bloqueo es que el flujo a través de la membrana es más rápido que con BSA, pero la respuesta en membrana disminuye (es tan eficiente el bloqueo que llega a enmascarar la respuesta en membrana). Como se observa en la **Figura 36** al utilizar 1 % de leche la respuesta mejora, ya que no se enmascara drásticamente la respuesta en membrana y la intensidad de la respuesta aumenta.

BSA funciona mejor como un agente de bloqueo que leche ya que no enmascara la respuesta y solo se observa la señal ligeramente en el control después de realizar un lavado a la

membrana, con solución amortiguadora de PBS 1× conteniendo 0.5 % de polisorbato 20. El flujo es ligeramente menor ya que BSA es un agente de bloqueo puro mientras que la leche empleada contiene diferentes proteínas presentes en la solución que funcionan como excelentes agentes para bloquear completamente los poros de la membrana y facilitar el flujo del conjugado a través de esta.

En principio la hipótesis consideraba que los conjugados con AuNP de 48 nm tendrían una mejor respuesta en membrana que los de 30 nm. No obstante, en los conjugados de 48 nm es más complicado ver la respuesta ya que en ocasiones tiñen completamente la membrana de rosa y no permiten ver directamente la señal esperada (**Figura 37**). En otras réplicas realizadas, los conjugados tienden a crear frentes en la membrana, disminuyendo la respuesta en la misma. Esto no ocurre con conjugados empleando AuNP de 30 nm, la respuesta es directamente visible durante el inmunoensayo de flujo lateral, el lavado es más rápido y no hay frentes de conjugados inmóviles en la base de la membrana.

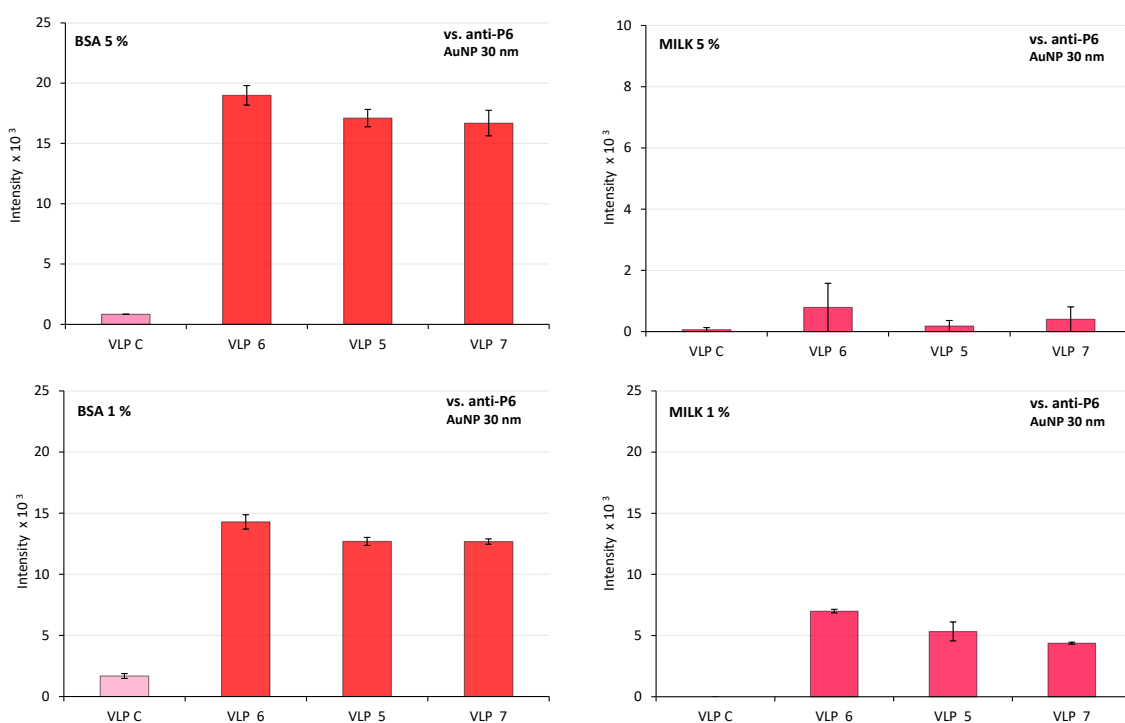


Figura 37. VLP (C, V5, V6 y V7) inmovilizadas en membranas bloqueadas con 5% y 1% de BSA y leche, probadas contra AuNP 48-anti-P6. VLP control (C), VLP con RBD en superficie sin RNA (V5) y con RNA (V6), VLP con proteína S en la superficie (V7).

7.6. Caso 3. AuNP-anti-P50 vs. Pseudovirus

7.6.1. Síntesis de conjugados con AuNP-anti-P50

Mediante un análisis estructural de la proteína S de SARS-CoV-2 fue posible identificar epítomos de una región más conservada con baja tasa de mutación. El multipéptido sintético P50 fue producido e inyectado en 2 modelos murinos como se muestra en la **Figura 38** (paciente 1 y paciente 2), obteniendo antisueros conteniendo el anticuerpo anti-P50. Dada la limitada cantidad de suero la concentración de anti-P50 presente no fue posible cuantificarle.

Este no es un antisuero hiperinmune como el obtenido en el caso 2 (antisuero hiperinmune con anti-P6) y esto implica que el anticuerpo de interés existe en una menor concentración en el suero obtenido. En principio este tiene una alta afinidad por varias regiones conservadas (epítomos) de la proteína S. A continuación, fueron preparados conjugados AuNP-anti-P50. La cantidad de suero murino es limitada. Esta es una de las desventajas y en consecuencia no es viable conocer la concentración de anticuerpo presente en dicho suero.

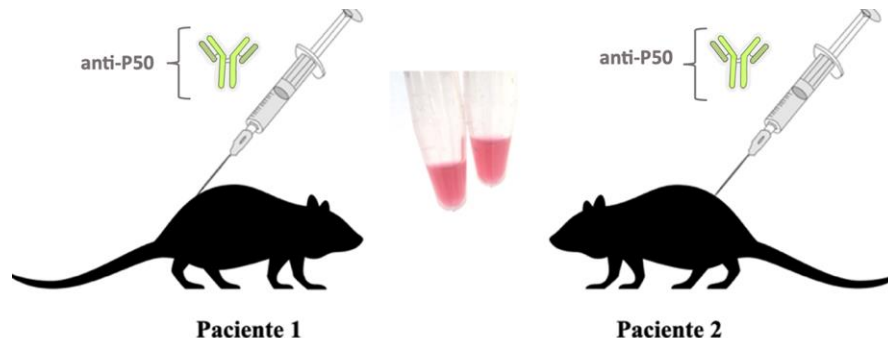


Figura 38. Conjugados de AuNP con anti-P6 presente en antisueros de dos modelos murinos.

7.6.2. Inmunoensayo de flujo lateral: AuNP-anti-P50 vs. pseudovirus

La mejor respuesta fue obtenida con el conjugado que contiene el suero del paciente 1. El conjugado que contiene el suero del paciente 2, tuvo una buena respuesta, pero disminuida. Esto puede indicar que existe una mayor concentración de anti-P50 en el paciente 1 con respecto al paciente 2. No fue posible caracterizar los conjugados ya que la cantidad era limitada y solo permitía realizar el LFIA. No obstante, los resultados fueron cercanos a los obtenidos con IgGH.

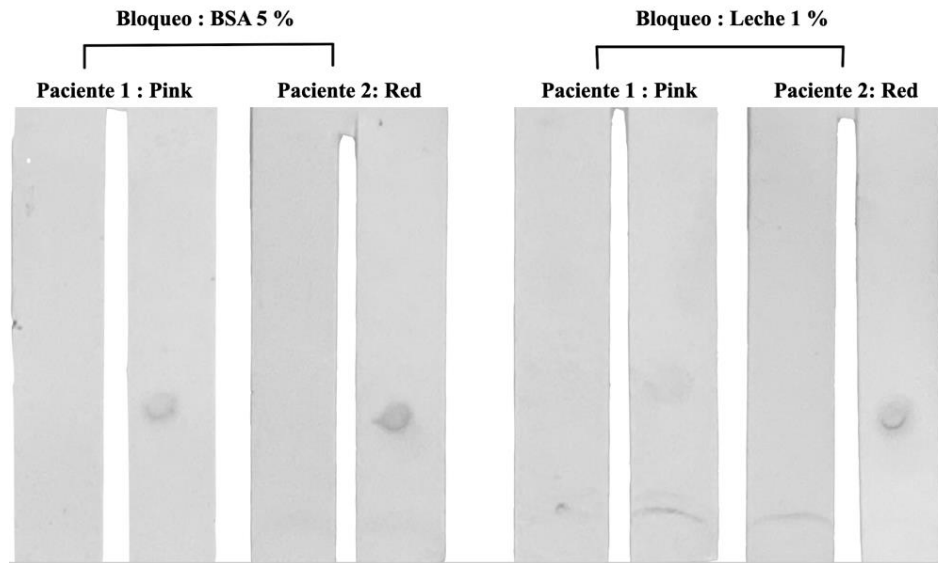


Figura 39. Resultados en membrana bloqueo con a) BSA al 5% y b) leche al 1% empleando conjugados concentrados 5 \times . AuNP de 30 nm con suero conteniendo anti-P50 de pacientes 1 y 2.

Para el inmunoensayo se requieren 20 μ L de conjugado concentrado 5 \times , además de 5 μ L de polisorbato 20. El tiempo del ensayo fue de 15 min y a los 3 min observamos la respuesta positiva en membrana. Las membranas fueron lavadas con PBS 1 \times conteniendo 0.05 % de polisorbato 20 para tener una mejor visión de la respuesta.

La **Figura 39** muestra las respuestas en las membranas y los valores obtenidos del análisis densitométrico en la **Figura 40**. No observamos respuesta positiva en el control. El control empleado en este inmunoensayo es una VLP análoga a la estructura proteica de un virus, pero sin expresar ninguna proteína relacionada con el virus del SARS-CoV 2 y carece de material genético viral.

La respuesta positiva indica que el pseudovirus que simula la estructura del SARS-CoV-2 es reconocido por el anticuerpo anti-P50 presente en el suero de ambos pacientes murinos. En contraste, en la VLP control no observamos alguna respuesta. Una conclusión preliminar es el que anti-P50 es altamente afín a reconocer a las proteínas en la superficie del SARS-CoV-2.

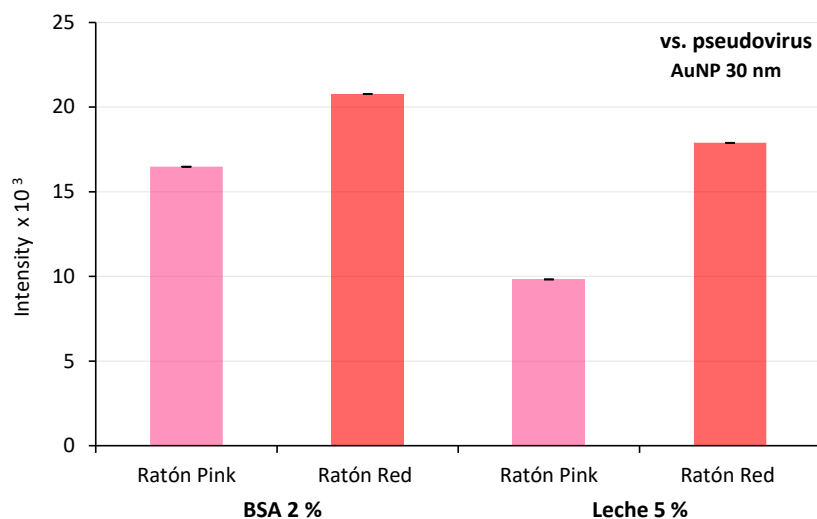


Figura 40. Pseudovirus inmovilizados en membranas bloqueadas con BSA al 5% y leche al 1% probadas contra AuNP conjugadas con antisueros anti-P50.

En este sistema lo ideal es ajustar el pH de la solución arriba del punto isoeléctrico del anticuerpo anti-P50. Esto debido a que, a la media hora de adsorción, el conjugado cambió de color de rojo a lila indicando que está colapsando. Asimismo, se puede optar por dejar a temperatura ambiente, pero sin agitación; ya que, si los parámetros de conjugación no son los ideales, esta última afecta directamente en la estabilidad. No es necesario adicionar proteína de bloqueo ya que en el suero están presentes otras proteínas como la albúmina que ayudan a estabilizar al sistema.

Esta “inestabilidad” puede observarse en las membranas de la **Figura 39** donde en la parte de inferior de la membrana se observa un frente. Dicho frente indica que el conjugado no es completamente estable. Aun así, hubo una buena respuesta en membrana. Este frente también puede presentarse si la membrana fue doblada durante el ensayo.

7.7. Caso 4. ACE2 + IgGM vs. Pseudovirus

7.7.1. ACE2

En la **Figura 41** se representa el mecanismo de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2) que es el receptor objetivo para el ingreso del SARS-CoV-2 a una célula huésped. Este receptor se expresa en células de tejidos humanos (Wu, et al., 2020). En este caso de estudio, el objetivo era desarrollar un inmunoensayo para demostrar que los anticuerpos producidos por los modelos animales produjeron anticuerpos neutralizantes posterior a su inmunización.

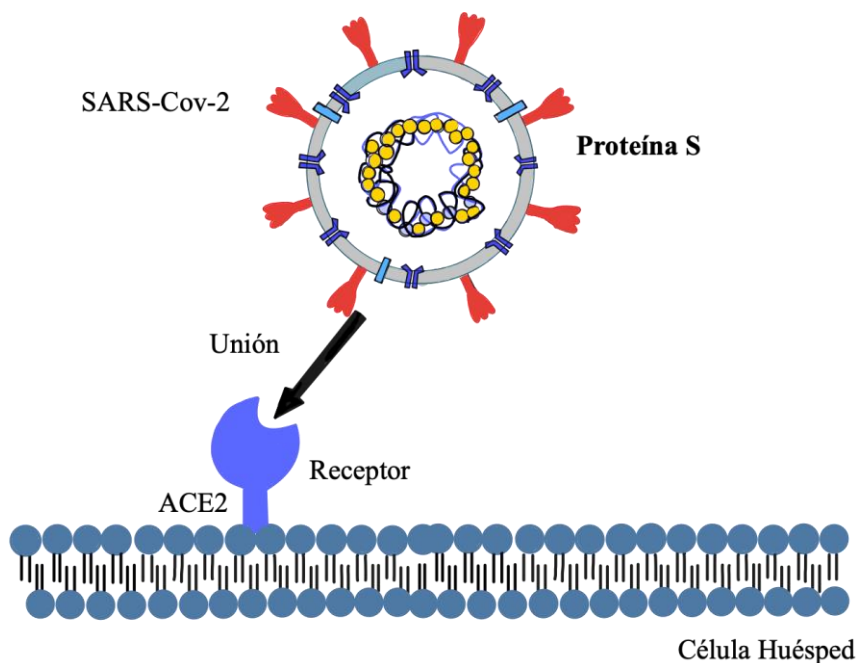


Figura 41. Reconocimiento de ACE2 y mecanismo de entrada de SARS-CoV-2. La proteína S reconoce y se une al receptor ACE2 por medio del dominio RBD.

Fue empleada una solución con 1.34 mg/mL de la proteína ACE2 humana, con un punto isoeléctrico de 4.1, similar al de BSA. En los casos anteriormente estudiados fueron producidos conjugados con BSA, pero dichos conjugados colapsaron; esto debido a que las AuNP tienen un pH de 5 y tanto BSA como ACE2 tienen un punto isoeléctrico muy cercano a 5. El pH de conjugación no favorece el proceso de fisisorción y causa el colapso e inestabilidad del conjugado. En este caso fueron explorados dos protocolos diferentes para ajustar el pH de conjugación y de esta forma asegurar la estabilidad del conjugado para el inmunoensayo. Es importante denotar que, debido a que la cantidad de proteína es limitada

(ACE2) se optó por hacer una mezcla con IgG murina para favorecer la estabilización del sistema. Es decir, en esta ocasión IgG murina fue empleada como proteína de bloqueo o estabilizante.

7.7.2. Ajuste de pH de conjugación

En este protocolo fueron empleadas dos soluciones amortiguadoras para ajustar el pH de conjugación y favorecer la adsorción de la ACE2 en la superficie de la AuNP. Una solución amortiguadora de carbonato de potasio (K_2CO_3) a un pH de 10 y otra solución amortiguadora de Tris Base a un pH de 8, ambas a una concentración de 10 mM.

7.7.3. Adición de proteína de bloqueo

BSA fue preparada en la misma concentración que la solución de ACE2 (1.34 mg/mL). BSA fue utilizada para simular a ACE2, ya que ambas proteínas son globulares y tienen un punto isoeléctrico similar. Esto fue necesario ya que la cantidad y concentración de proteína ACE2 es limitada. Por lo tanto, IgG murina fue la proteína estabilizante o de bloqueo como se mencionó anteriormente en los casos de estudio.

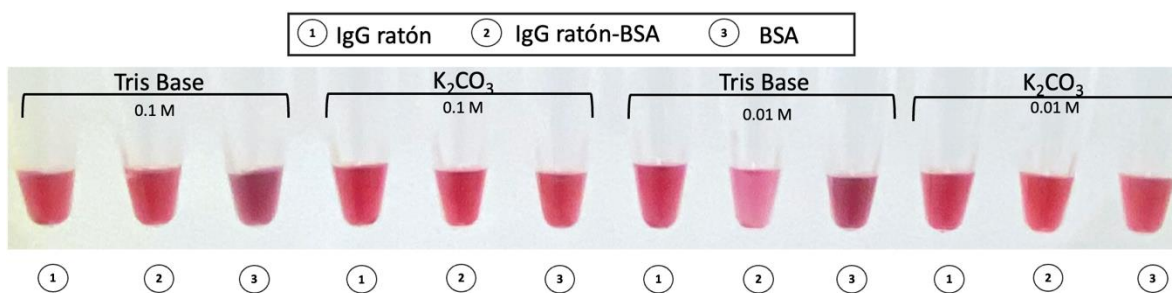


Figura 42. Resultados de los conjugados con el ajuste de pH con diferentes soluciones amortiguadoras.

Al adicionar como agente estabilizante IgGM, este no causa que la respuesta del conjugado en membrana disminuya y la ventaja es que no tiene reacción cruzada con el analito de interés, en este caso VLP (o pseudovirus) inmovilizadas en membranas. Sin la adición de la proteína de bloqueo el sistema es inestable y tiende a formar agregados, cambiando el color drásticamente de rojo a morado-gris e incluso incoloro. En este punto las partículas tienden a colapsar y establecen un estado de agregación irreversible. La **Figura 42** muestra los

resultados obtenidos, estos corroboran lo anterior, al adicionar IgGM como proteína de bloqueo los conjugados son estables, en cambio al no añadir esta los conjugados tienden a colapsar por la limitada cantidad de proteína.

La **Figura 42** muestra el efecto en el ajuste de pH con las soluciones amortiguadoras a dos concentraciones diferentes 0.1 M y 0.01 M. Los mejores resultados son obtenidos a una concentración de 0.01 M, ya que los conjugados preparados con una solución amortiguadora más concentrada tienen una mayor concentración de iones, causando el colapso de estos. Esto coincide con lo reportado por Mazouzi et al. (2021) quienes establecen que la presencia de iones en solución en elevada concentración causa el colapso de los conjugados.

La centrifugación previa o posterior a adicionar la solución amortiguadora a la suspensión coloidal parece no tener efecto sobre el conjugado. El conjugado de BSA sin el ajuste de pH colapsa, pero con el ajuste el conjugado es estable (**Figura 42**). Por lo tanto, este ensayo permitió asegurar la estabilidad del conjugado e incorporar IgGM para utilizar una menor cantidad de proteína ACE2.

7.7.4. Resultados en LFIA anti-IgGM vs. conjugados IgGM+BSA

La **Figura 43** muestra los resultados obtenidos del inmunoensayo. Las membranas tienen anti-IgGM inmovilizado y fueron bloqueadas con 1 % de leche. Fueron probadas contra conjugados de AuNP de 30 nm con: 1) IgGM, 2) IgGM-BSA y 3) BSA empleando dos soluciones amortiguadoras (K_2CO_3 , pH 10 y Tris Base, pH 8) a diferentes concentraciones (0.1 M y 0.01 M).

Si el conjugado es inestable, por la presencia de iones cuando se emplean soluciones amortiguadoras a 0.1 M, en la parte inferior de la membrana es desarrollado un frente que es indicativo de inestabilidad. Asimismo, es importante denotar que el frente observado en algunas membranas es debido a que durante el inmunoensayo la membrana fue doblada ligeramente, creando un frente en membrana. Se observan respuestas positivas de los conjugados que contienen IgGM ya que es altamente afín a anti-IgGM inmovilizado en membrana. Como control fue empleado el conjugado AuNP-BSA, el cual no tiene reacción cruzada ya que no desarrolló alguna respuesta en las membranas. Excepto en el conjugado

de BSA que tuvo un ajuste con Tris Base a una concentración de 0.1 M donde si hubo una respuesta disminuida en membrana.

Así, el ajuste con una solución amortiguadora de K_2CO_3 a pH 10 es más favorable para asegurar la estabilidad del conjugado. El conjugado que contiene IgGM + BSA parece no generar competencia o bloquear la interacción IgGM/anti-IgGM ya que en membrana sí hubo respuesta y el conjugado fue estable. Establecidos los parámetros de cantidad de proteína, pH de conjugación y después de confirmar la estabilidad del conjugado, estas condiciones fueron empleadas para llevar a cabo el inmunoensayo, pero cambiando BSA por ACE2.

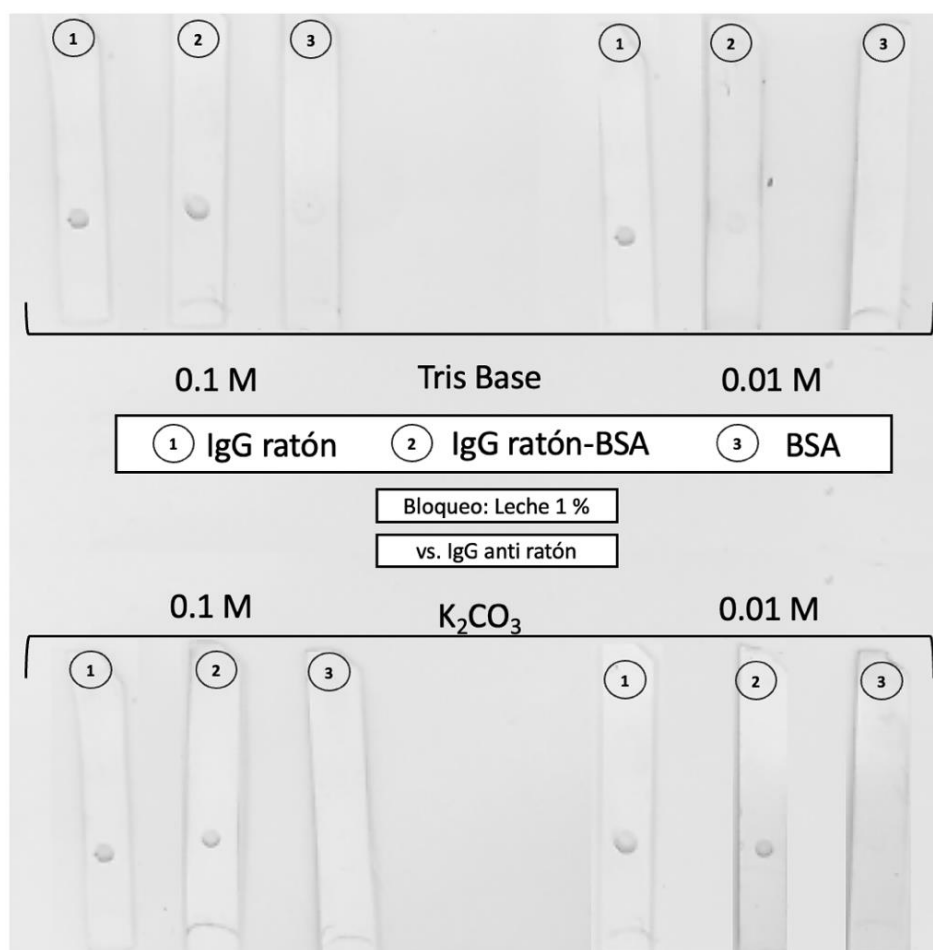


Figura 43. Anti-IgG murina inmovilizado en membranas bloqueadas con leche al 1% probadas contra conjugados de AuNP de 30 nm con: 1) IgGM, 2) IgGM-BSA y 3) BSA empleando dos soluciones amortiguadoras (K_2CO_3 , pH 10 y Tris Base, pH 8) a diferentes concentraciones (0.1 M y 0.01 M).

7.7.5. Inmunoensayo de flujo lateral ACE2+IgG murina vs. pseudovirus/ anti-IgGM

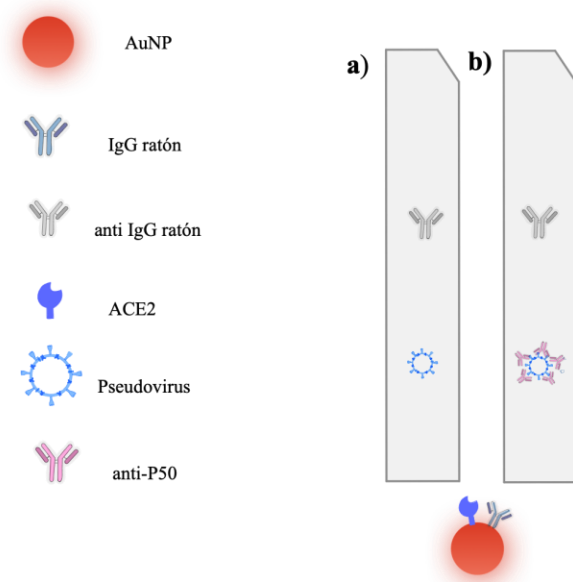


Figura 44. Inmunoensayo de Flujo Lateral. Conjugado AuNP 30nm ACE2 + IgGM. Membranas bloqueadas con 1% de leche, a) inmovilizando anti-IgGM (control positivo) y pseudovirus (control positivo), b) inmovilizando anti-IgGM (control positivo) y pseudovirus-anti-P50 (control negativo).

Un conjugado con AuNP de 30 nm fue preparado adicionando en una proporción 2:4 ACE2-IgGM y ajustando con una solución amortiguadora de K_2CO_3 (pH 10). Esto fue siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, pero sustituyendo BSA por la proteína ACE2, obteniendo un conjugado estable. En este último caso, fue planeado un inmunoensayo con doble deposición sobre la membrana para reconocer dos analitos de interés.

El resultado esperado del primer inmunoensayo era doble positivo. IgGM en la superficie de la partícula reconoce a anti-IgGM inmovilizado en membrana. ACE2 adsorbido en la superficie de la AuNP, es altamente afín a la proteína expresada en el pseudovirus inmovilizado en la membrana, esta combinación fue establecida como referente (**Figura 44a**). En la **Figura 44b** el resultado esperado del segundo inmunoensayo era (control positivo- control negativo) para confirmar que el anticuerpo anti-p50 es neutralizante. Ya que anti-P50 bloquea el sitio de unión del pseudovirus con ACE2. Anti-IgGM fue inmovilizado en la parte superior de la membrana (como control positivo), mientras que en la parte inferior fue inmovilizada una premezcla de pseudovirus con anti-P50 (como control negativo). Este inmunoensayo fue replicado, pero aumentando el tiempo de contacto de la mezcla de

pseudovirus con anti-P50 durante 1 h. Los resultados obtenidos fueron positivos, para el control anti-IgGM reconocido por AuNP-IgGM en ambos inmunoensayos. No obstante, no hubo respuesta en la prueba referente pseudovirus vs. ACE2 (primer inmunoensayo), ni en la prueba de interés pseudovirus-anti-P50 vs. ACE2 (segundo inmunoensayo). Al no tener respuesta en el referente la prueba fue invalidada. Por lo tanto, no fue posible concluir si anti-P50 es un anticuerpo neutralizante. El conjugado es estable y la respuesta en el primer control (anti-IgGM vs. AuNP-IgGM) fue positiva, además, no se presentaron frentes en la membrana que indiquen inestabilidad.

Como conclusión: hay parámetros que influyen directamente sobre la sensibilidad y respuesta del análisis. Es necesario repetir el inmunoensayo para confirmar si anti-P50 es neutralizante o no. También, repetir el conjugado con suero murino y pseudovirus inmovilizado en membrana (caso 3), ya que esto confirmaría la interacción anticuerpo-pseudovirus. Lo idóneo sería preparar un conjugado solamente con ACE2 ya que la presencia de otra proteína (como IgGM) puede estar generando competencia con ACE2 en la adsorción. También podría estar ocurriendo el efecto Vroman.

7.7.6. Efecto de Vroman al utilizar dos proteínas

Si bien hay inconsistencias en los estudios sobre la formación de una monocapa de proteínas alrededor de una nanopartícula, un fenómeno comúnmente observado es el efecto Vroman. En este efecto, pequeñas proteínas abundantes forman una monocapa inicial al introducir una nanopartícula en un fluido biológico. Sin embargo, estas proteínas pequeñas son posteriormente reemplazadas con el tiempo por las proteínas con mayor afinidad por la superficie de las AuNP, para alcanzar el equilibrio dinámico. Zbigniew et al. (2019) reportaron que cualquier proteína que muestre una mayor afinidad de unión a las AuNP que el anticuerpo podría potencialmente desplazar el anticuerpo de la superficie de las AuNP, siguiendo el efecto Vroman y, en última instancia, disminuir la función de estos conjugados en una aplicación, por ejemplo, en el inmunoensayo de flujo lateral. Debido a las limitaciones de la cantidad de suero y pseudovirus no fue posible llevar a cabo la caracterización de los conjugados ni en UV-Vis ni DLS, pero estos deberían ser similares a los resultados obtenidos previamente.

7.8. Puntos por considerar

Hay parámetros que influyen directamente sobre la sensibilidad y respuesta del análisis. La primera es el bloqueo de la membrana con leche, en varios casos anteriores observamos que este bloqueo disminuye la respuesta en membrana e incluso enmascara la respuesta. Una réplica en membranas bloqueadas con 5 % de BSA podría mejorar la sensibilidad e intensidad de la respuesta. Aumentar el tiempo de contacto del conjugado con suero conteniendo anti-P50, pero a temperatura ambiente, se ha reportado en este trabajo que la temperatura tiene un efecto en la fisisorción lo ideal sería conjugar a 4 °C y no a temperatura ambiente. Se debería repetir el control de conjugado con suero murino y pseudovirus inmovilizado en membrana (caso 3) ya que esto confirmaría la interacción anticuerpo-pseudovirus. El pH de conjugación no es favorable para la adsorción de la proteína ACE2 en la superficie de la AuNP. Se debería sintetizar un conjugado con ACE2 ya que la presencia de otra proteína (como IgGM) puede estar generando competencia con ACE2 en la adsorción. También podría estar ocurriendo el efecto Vroman. Este efecto ha sido reportado en algunos trabajos recientes que estudian la interacción entre dos proteínas-AuNP.

8. CONCLUSIONES

Sintetizamos AuNP de 30 y 48 nm, con diámetros hidrodinámicos de 33.7 y 45.6 nm medidos por dispersión dinámica de luz y cercanos a 30.6 y 47.8 nm, respectivamente, por microscopía electrónica de transmisión.

Para generar conjugados AuNP-anticuerpo, las condiciones de adsorción fueron evaluadas empleando IgGH. La concentración inicial mínima requerida para asegurar la estabilidad de estos conjugados fue de 0.004 mg/mL de IgGH (equivalente a 2 monocapas). La presencia de 0.1 % de polisorbato 20 es necesaria para la estabilidad y mayor tiempo de vida del conjugado. El tiempo estándar de conjugación es de 1 h. La isoterma de adsorción demostró que la fisorción es mejor a 4 °C.

Al emplear anticuerpos puros como analitos (IgGM, anti-IgGM), la adición de una proteína de bloqueo es necesaria para estabilizar al conjugado. En comparación, los antisueros al ser complejos no requieren la adición de una proteína de bloqueo ya que contienen otras proteínas que favorecen la estabilidad del sistema. Los antisueros empleados fueron contra un péptido de la proteína de espiga de SARS-CoV-2 (anti-P6) y contra una región conservada de la proteína espiga (anti-P50) sobre AuNP.

La respuesta del inmunoensayo aumenta al emplear como agente de bloqueo 1 % de leche y dejando secar la membrana durante 24 h para disminuir respuestas no específicas en ensayos de flujo lateral. Las condiciones de operación del LFIA incluyeron utilizar 15 µL de conjugados concentrados 5× con 0.05 % de polisorbato 20, dejando en contacto el conjugado con la membrana 15 min. Evaluamos la detección de partículas tipo virus (VLP, *virus-like particles*) y pseudovirus que presentan en su superficie proteínas de SARS-CoV-2 utilizando AuNP conjugadas con un antisuero correspondiente (anti-P50 y anti-P6). Obteniendo respuestas positivas en LFIA.

Así, establecimos una metodología para la evaluación y optimización de las condiciones de un inmunoensayo de flujo lateral con nanopartículas de oro como agentes reporteros, usando sistemas modelos para la detección de SARS-CoV-2.

9. GLOSARIO

SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> Coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> Enfermedad por coronavirus de 2019
RBD	<i>Receptor-binding domain</i> Dominio de unión al receptor
LFIA	<i>Lateral flow immunoassay</i> Inmunoensayo de flujo lateral
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonance</i> Resonancia de plasmón superficial localizado
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> Dispersión dinámica de luz
PdI	<i>Polydispersity index</i> Índice de polidispersidad
d_H	Diámetro hidrodinámico
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> Microscopía Electrónica de Transmisión
UV-vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible
K_2CO_3	Carbonato de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> Solución amortiguadora de fosfato salino
pI	Punto isoeléctrico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina de suero bovino
IgGH	Inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo
IgGM	Inmunoglobulina G murina de plasma sanguíneo
anti-IgGM	Inmunoglobulina G anti-murina producida en un modelo caprino usando IgGM como inmunógeno
anti-P6	Antisuero ovino hiperinmune generado contra el péptido P6
anti-P50	Antisuero murino generado contra el multipéptido LBT-P50
VLP	<i>Virus-like particle</i> Partícula tipo virus, producida en células de mamífero.
VLP C	VLP control, sin ninguna proteína relacionada con el SARS-CoV-2
VLP 5	VLP con RBD en superficie sin RNA
VLP 6	VLP con RBD en superficie con RNA
VLP 7	VLP con proteína S en la superficie
Pseudovirus	Similar a VLP con proteína S en la superficie, pero carente de material genético viral. Producida en células de mamífero

10. BIBLIOGRAFÍA

- Carrondo, M., Carvalho, S., Silva, J. & Sousa, M., 2022. Bioanalytics for Influenza Virus-Like Particle Characterization and Process Monitoring. *Bioengineering and Biotechnology*, 10(14), pp. 50-62.
- Li, G. et al., 2021. Development of a Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein. *Frontiers Immunology*, 12(7), pp. 62-78.
- Lin, L., Fu, Z., Dan, B. & Jing, G., 2010. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN47. *Diagnosis Microbiological Infectious Diseases*, 68(3), pp. 193–200.
- Li, Q., Liu, Q., Huang, W. & Xuguang, L., 2018. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in Medical Virology*, 28(1), pp. 188-197.
- Liu, D., Wu, F., Cen, Y. & Ye, L., 2021. Comparative research on nucleocapsid and spike glycoprotein as the rapid immunodetection targets of COVID-19 and establishment of immunoassay strips. *Molecular Immunology*, 13(131), pp. 6-12.
- Liu, J., Ren, Z., Wan, H. & Zhao, Y., 2018. Influenza virus-like particles composed of conserved influenza proteins and GPI-anchored CCL28/GM-CSF fusion proteins enhance protective immunity against homologous and heterologous viruses. *International Immunopharmacology*, 63(2), pp. 119-128.
- Cho, H., Agrawal, A., Zandi, O. & Ghosh, S., 2018. Localized Surface Plasmon Resonance in Semiconductor Nanocrystals. *Chemical Reviews*, 118(6), pp. 3121–3207.
- Loiseau, A., Asila, V., Lam, M. & Salamain, M., 2019. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Spectroscopy Biosensors*, 9(2), pp. 78-84.
- Adekoya, J., Ogunniran, K., Siyanbola, T. & Dare, E., 2018. Band structure, morphology, functionality, and size-dependent properties of metal nanoparticles. *Noble and Precious Metals - Properties, Nanoscale Effects and Applications*, 3(1), pp. 15–42.
- Baker, A., Richards, S., Congdon, T. & Zwetsloot, A., 2021. The SARS-CoV-2 spike protein binds sialic acids and enables rapid detection in a lateral flow point of care diagnostic device. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(2), pp. 379–380.

Banerjee, R. & Jaiswal, A., 2018. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst*, 143(9), pp. 1970–1996.

Bell, N., Minelli, C. & Shard, A., 2013. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement. *Analytical Methods*, 5(18), pp. 4523–4936.

Benjamin, D., Anderson, C., Williford, J. & Alonzo, L., 2020. SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Antigen-Detecting Half-Strip Lateral Flow Assay Toward the Development of Point of Care Tests Using Commercially Available Reagents. *Analytical Chemistry*, 92(18), pp. 11305–11309.

Besora, A. et al., 2022. Optimization, Production, Purification and Characterization of HIV-1 GAG-Based Virus-like Particles Functionalized with SARS-CoV-2. *Vaccines*, 10(2), pp. 2-18.

Borse, V., Konwar, A., Jayant, R. & Pravin, P., 2020. Perspectives of characterization and bioconjugation of gold nanoparticles and their application in lateral flow immunosensors. *Deliv Transl Res*, 10(4), pp. 878-902.

Borse, V. & Srivastava, R., 2019. Process parameter optimization for lateral flow immunosensing. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), pp. 434–441.

Brümmer, L., Katzenschlager, S., Gaeddert, M. & Erdmann, C., 2021. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *Pub Med*, 18(8), pp. 50-62.

Busch, R., Karim, F., Weis, J. & Sun, Y., 2019. Optimization and structural Stability of Gold Nanoparticle- Antibody Bioconjugates. *ACS Omega*, 4(12), pp. 15269–15279.

Dörschug, A., Schwanbeck, J., Hahn, A. & Hillebrecht, A., 2021. Comparison of Five Serological Assays for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. *Diagnostics*, 1(78).

Dan, L., Wu, F., Yu, C. & Ye, L., 2021. Comparative research on nucleocapsid and spike glycoprotein as the rapid immunodetection targets of COVID-19 and establishment of immunoassay strips. *Molecular Immunology*, 131(57), pp. 6-12.

Daruich, C., Nogueira, B. & Rostelato, M., 2019. Review of the methodologies used in the synthesis of gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 798(40), pp. 714-740.

- Dykman, L. & Khlebtsov, N., 2012. Gold Nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society*, 6(41), pp. 2256-2282.
- Englebienne, P., 1998. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Analyst*, 123(7), pp. 1599-603.
- Fan, D., Li, Y. & Gu, Z., 2016. Colloidal gold probe-based Immunochromatographic strip assay for the rapid detection of microbial transglutaminase in frozen Surimi. *Journal Chemistry*, 75(1), pp. 1-6.
- Faraday, M., 1857. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. 47(145), pp. 145-181.
- Frens, G., 1972. Controlled Nucleation for the regulation of the particle Size in monodisperse gold suspensions. *Natural Physical Science*, Volume 241, pp. 20-22.
- González, O., Rosales, S. & Salazar, J., 2015. Gold nanoparticles and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 14(9), pp. 1197–1211.
- Grant, B., Anderson, C., Williford, J. & Alonzo, L., 2020. SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid antigen-detecting half-strip lateral flow assay toward the development of point of care tests using commercially available reagents. *Anal Chem*, 92(16), pp. 11305–11309.
- Guan, Ni, Z. & Hu, Y., 2020. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *Emerg Med*, 58(4), pp. 711-712.
- Gupta, R., Sagar, P., Proyadarshi, N. & Kaul, S., 2020. Nanotechnology-based approaches for the detection of SARS-CoV-2. *Front Nanotechnology*, 18(2), pp. 120-134.
- Herizchi, R., Abbasi, E., Milani, M. & Akbarzadeh, A., 2016. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artificial Cells*, 2(44), pp. 596–602.
- Hernández, P., Reinoso, R. & Holguín, A., 2021. Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and Regional Approach by Epidemiological Week. *Viruses*, 13(2), pp. 243-256.
- Hong, W., Bai, H., Xu, Y. & Yao, Z., 2010. Preparation of Gold Nanoparticles/ Graphene composites with controlled weight contents and their application in Biosensors. *The Journal of Physical Chemistry*, 114(4), pp. 1822-1826.

Hsieh, W., Lin, C., Ching, T. & Tsai, C., 2021. Development and Efficacy of Lateral Flow Point-of-Care Testing Devices for Rapid and Mass COVID-19 Diagnosis by the Detections of SARS-CoV-2 Antigen and Anti-SARS-CoV-2 Antibodies. *Diagnosis (Basel)*, 11(10), pp. 1760-1768.

Huang, C., Wang, Y., Xingwang, L. & Ren, L., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(15), pp. 497–506.

Huang, C., Wen, T., Shi, F. & Zeng, X., 2020. Rapid detection of IgM antibodies against the SARS-CoV-2 virus via colloidal gold nanoparticle-based lateral-flow assay. *ACS Omega*, 5(21), pp. 12550–12556.

Huang, S., Tain, C., Hsu, Y. & Cheng, D., 2020. Assessing the application of a pseudovirus system for emerging SARS-CoV-2 and re-emerging avian influenza virus H5 subtypes in vaccine development. *Biomedical Journal*, 43(4), pp. 375-387.

Hussein, F., Chino, R. & Febbraio, H., 2020. Point-of-Care Diagnostics of COVID-19: From Current Work to Future Perspectives. *Sensors*, 20(15), pp. 110-119.

Jans, H., Liu, X., Austin, L. & Maes, G., 2009. Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies. *Analytical Chemical Society*, 81(22), pp. 9425–9432.

JHU Coronavirus Resource Center, 2023. *Johns Hopkins University & Medicine*. [Online] Available at: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

Jia, S., Tian, X., Li, G. & Zhang, F., 2022. Advanced plasmonic technologies for multi-scale biomedical imaging. *Chemical Society Reviews*, 51(6), pp. 9445-9468.

Jingfang, Z., Ralston, J., Sedev, R. & Beattie, D., 2018. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), pp. 251-262.

Kah, J. et al., 2007. Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *International Journal Nanomedicine*, 2(4), pp. 785-798.

Kajjumba, G., Serkan, E., Ongen, A. & Ozcan, K., 2018. Modelling of Adsorption Kinetic Processes—Errors, Theory and Application. In: *Advanced Sorption Process Applications*. Istanbul: s.n., pp. 50-62.

Kim, H., Lee, J., Jeong, M. & Park, C., 2021. Development of a SARS-CoV-2-specific biosensor for antigen detection using scFv-Fc fusion proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 175(46), pp. 112-118.

Kingston, N., Kurtovic, L., Walsh, R. & Joe, C., 2019. Hepatitis B virus-like particles expressing Plasmodium falciparum epitopes induce complement-fixing antibodies against the circumsporozoite. *Vaccine*, 37(12), pp. 1674-1684.

Maleki, M., Moradi, O. & Tahmasebi, S., 2017. Adsorption of albumin by gold nanoparticles: Equilibrium and thermodynamics studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), pp. 491-502.

Maheshwari, Y., Selvaraj, V., Hajeri, S. & Ramadugu, C., 2017. On-site detection of Citrus tristeza virus (CTV) by lateral flow immunoassay using polyclonal antisera derived from virions produced by a recombinant CTV. *Springer*, 45(3), pp. 1-8.

Mazouzi, Y., Zhang, L., Salamain, M. & Lidberg, B., 2020. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 165(44), pp. 112370-112379.

Moeremans, M., Dannels, G., Dijck, A. & Langanger, G., 1984. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. *J Immunol Methods*, 30(74), pp. 353-60.

Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K. & Frieman, B., 2020. Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 Mediated by N gene targeted antisense oligonucleotide-capped plasmonic nanoparticles. *ACS Nano*, 14(6), pp. 7617–7627.

Nadezhda, B., Sanfenkova, I., Slutskaya, E. & Dzantiev, B., 2017. Less is more: A comparison of Antibody - Gold Nanoparticle Conjugates of different ratios. *Bioconjugate Chemistry*, 28(11), pp. 2737-2746.

Nag, P., Sadani, K. & Mukherji, S., 2020. Optical fiber sensors for rapid screening of COVID-19. *Trans Indian Natl Acad Eng*, 5(2), pp. 233–236.

Nie, J., Li, Q. & Wu, J. ., Z. C., 2020. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emergent Microbes Infection*, 9(1), pp. 680-686.

Nooraei, S., Bahrulolum, H. & Hoseini, Z., 2021. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal Nanobiotechnology*, 19(59), pp. 17-24.

- Nuccetelli, M., Pieri, M., Gisone, F. & Bernardini, S., 2020. Combined anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG, and IgM detection as a better strategy to prevent second infection spreading waves. *Immunol Invest*, 13(4), pp. 1–13.
- Omidfar, K., Kia, S. & Larijani, B., 2011. Development of a colloidal gold- based immunochromatographic test strip for screening of microalbuminuria. *Hybridoma*, 30(2), pp. 117–124.
- Pacheco, B., 2017. Method: Conjugation of Proteins to Gold Nanoparticles. In: *Nanomaterial Bioconjugation Techniques*. Canada: MERK Sigma Aldrich, pp. 22-27.
- Qiquige, D. et al., 2016. Study on physisorption between G-Actin and amphiphilic polymer - coated gold nanoparticles. *Luminescence*, 32(4), pp. 618-624.
- Quan, L., Bento, A., Yang, K. & Zhang, H., 2019. The COVID-19 outbreak in Sichuan, China: Epidemiology and impact of interventions. *Plos Computational Biology*, 16(12), pp. 50-62.
- Ruiz, G., Driskell, J., Okyem, S. & Tripathi, K., 2019. pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 30(8), pp. 1182-1191.
- Ruiz, G., Ryan, N., Rutschke, K. & Awotunde, O., 2019. Antibodies Irreversibly Adsorb to Gold Nanoparticles and Resist Displacement by Common Blood Proteins. *Langmuir*, 32(35), pp. 10601–10609.
- Safenkova, I., Zherdev, A. & Dzantiev, B., 2012. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X. *Springer*, 403(60), pp. 1595-1605.
- Sajid, M., Kawde, A. & Daud, M., 2015. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), pp. 689–705.
- Syedmoradi, L. et al., 2017. Point of care testing: The impact of nanotechnology. *Biosens & Bioelectronics*, 87(19), p. 373–387.
- Türkcan, C., 2022. Development of A New Method For The Synthesis of Macroporous Polymeric Surfaces For Lateral Flow Assay. *European Polymer Journal*, 170(22), pp. 1162-1171.

- Thao, T., Chang, P., Benton, D. & Iqbal, M., 2017. Dual Recognition Element Lateral Flow Assay Toward Multiplex Strain Specific Influenza Virus Detection. *ACS Publications*, 89(12), pp. 6781-6786.
- Toubanaki, K., Margaron, M., Athanasios, P. & Evdokia, K., 2020. Development of a Nanoparticle-based Lateral Flow Strip Biosensor for Visual Detection of Whole Nervous Necrosis Virus Particles. *Nature Research*, 10(16), pp. 6529-6534.
- Turkevich, J., Stevenson, P. & Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, Discussions of the Faraday Society, *The Faraday Society*, 11(7), pp. 55-75.
- Ventura, B., Cennamo, M., Minopoli, A. & Campanile, R., 2020. Colorimetric Test for Fast Detection of SARS-CoV-2 in Nasal and Throat Swabs. *ACS Sensors*, 5(10), pp. 3043–3048.
- Wang, Q. et al., 2018. A multiplex immunochromatographic test using gold nanoparticles for the rapid and simultaneous detection of four nitrofurantoin metabolites in fish samples. *Anal Bioanal Chem*, 410(1), pp. 223–238.
- Wang, R., Zhang, X., Irwin, D. & Shen, Y., 2020. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *Journal of Infection*, 80(3), pp. 350-371.
- Wong, A., Tomlinson, C., Zhou, D. & Satkunarajah, M., 2017. Receptor-binding loops in alphacoronavirus adaptation and evolution. *Nat Commun*, 8(15), pp. 1735-1743.
- Wu, F., Zhao, S. & Yu, B., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 29(579), pp. 265-269.
- Xiaoyang, G., Yeting, X., Xiaofang, L. & Pengyang, L., 2023. A perspective on SARS-CoV-2 virus-like particles vaccines. *International Immunopharmacology*, 115(3), pp. 40-52.
- Yüce, M. & Kurt, H., 2017. How to make nanobiosensors: Surface Modification and Characterization of Nanomaterials for biosensing Applications. *RSC Advances*, 7(4), pp. 49386-49403.
- Yakota, S., 2019. Preparation of colloidal Gold Particles and conjugation to protein A, IgG, F(ab') and Streptavidin. *Methods Mol Biology*, 34(657), pp. 109-119.
- Zbigniew, A., 2019. Protein adsorption: A quest for a universal mechanism. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41(6), pp. 50-65.
- Zhang, L. et al., 2019. Direct quantification of surface coverage of antibody in IgG-Gold nanoparticles conjugates. *Biosensors*, 7(204), pp. 875-894.

Zherdev, G., 2020. Protocol Conjugation of proteins to Gold Nanoparticles Nanomaterial Bioconjugation Techniques. *MERK*, pp. 27-31.

Zhong, J., Rösch, E., Viereck, T. & Schilling, M., 2021. Toward rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 with functionalized magnetic nanoparticles. *ACS Sensors*, 6(3), pp. 976–984.

Zhu, M., Zhang, W., Tian, J. & Zhao, W., 2016. Development of a Lateral-Flow Assay (LFA) for Rapid Detection of Soybean Mosaic Virus. *Journal of Virological Methods*, 235(7), pp. 51-57.