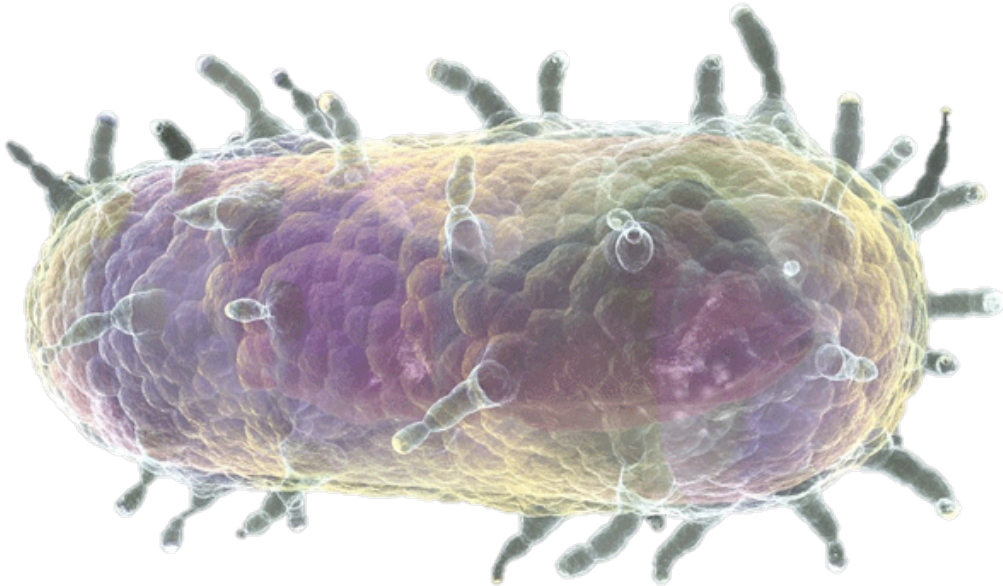


La Prova de Flux Lateral aplicada al diagnòstic de *Yersinia pestis*



Tania Mackie Sanz
Curs 2016-2017
Jordi Martí Piqué
Institut d'Altafulla

“Las plagas en efecto, son una cosa común pero es difícil creer en las plagas cuando las ve uno caer sobre su cabeza. Ha habido en el mundo tantas pestes como guerras y, sin embargo, pestes y guerras cogen a las gentes siempre desprevenidas (...) Nuestros conciudadanos, a este respecto eran como el mundo, pensaban en ellos mismo; dicho de otro modo, eran humanidad: no creían en las plagas. La plaga no está hecha a la medida del hombre, por lo tanto el hombre dice que la plaga es irreal, es un mal sueño que tiene que pasar y no siempre pasa, y de mal sueño en mal sueño son los hombres los que pasan y los humanistas en primer lugar porque no han tomado precauciones”

Albert Camus

RESUM

La pesta és una malaltia contagiosa i letal que acaba amb la vida de moltes persones, sobretot del Tercer Món. Aquesta gent necessita un diagnòstic ràpid i senzill que sigui capaç de detectar en una mostra el bacteri causant d'aquesta malaltia. Els avenços científics han permès trobar diferents solucions a aquest problema, entre les quals es troben les proves de flux lateral. El propòsit d'aquesta investigació és estudiar la viabilitat de les proves de flux lateral, capaces de detectar i identificar la presència o l'absència d'una seqüència específica d'ADN del bacteri *Yersinia pestis*, agent etiològic de la pesta, en una mostra. El resultat final de les pràctiques dutes a terme va ser positiu, les proves de flux lateral tenen la destresa de detectar en una mostra la presència del bacteri de la pesta. Mitjançant el diagnòstic que se'n pot derivar d'aquestes proves, econòmiques i assequibles per qualsevol persona, la gent malalta dels països subdesenvolupats són capaces de saber si el seu malestar es degut al bacteri *Yersinia pestis* i, d'aquesta forma, poder rebre quan abans possible el tractament adequat.

ABSTRACT

The plague is a contagious and lethal disease that is fatal for many people, especially in the Third World. These people need a rapid and simple diagnostic that is able to detect in a sample the bacteria that causes this disease. Scientific advances have given rise to different possible solutions to this problem, and among these can be found the Lateral Flow Assay (LFA). The purpose of this research is to study the viability of LFA, able to detect and identify the presence or absence of a specific DNA sequence of the bacteria *Yersinia pestis*, pathogenic agent of the plague, in a sample. The final result of the experiments was positive, the LFA is able to detect in an assay the presence of the plague bacteria. By way of a diagnostic that can be derived from these tests, economic and easily available for anyone, infected people from underdeveloped countries are able to know if the illness is due to the *Yersinia pestis* bacteria and, in this way, receive adequate treatment as soon as possible.

Índex

Introducció	4
1. La pesta com a malaltia rellevant en el Tercer Món	7
1.1 Breu història de la pesta.....	7
1.1.1 Pesta de Justinià.....	8
1.1.2 Pesta Negra.....	9
1.1.3 Pesta Moderna.....	10
1.1.4 Epidemiologia.....	10
1.2 Etiologia de la pesta.....	13
1.3 Patologia general.....	14
1.4 Tipus.....	15
1.5 Transmissió.....	17
1.6 Diagnòstic.....	19
1.7 Tractament.....	20
1.8 Prevenció.....	21
2. Proves de flux lateral o <i>Lateral Flow Assay</i>	22
2.1 Breu història de la prova de flux lateral.....	22
2.2 Estructura d'una prova de flux lateral.....	23
2.3 Funcionament de la prova de flux lateral.....	26
2.3.1 Proves de flux lateral directes.....	27
2.3.2 Proves de flux lateral competitives.....	28
2.4 Utilitat i avantatges de la prova de flux lateral.....	28
2.5 Aplicacions de la prova de flux lateral.....	29
2.5.1 Prova de flux lateral en el diagnòstic clínic.....	30
2.5.2 Prova de flux lateral en medicina veterinària.....	30
2.5.3 Prova de flux lateral en la indústria alimentària i de begudes.....	30
2.5.4 Prova de flux lateral en la indústria farmacèutica.....	30
2.5.5 Prova de flux lateral per a l'anàlisi d'aigua i la descontaminació ambiental.....	31
2.6 El negoci de les proves de flux lateral per segments de mercat.....	31
3. Realització al laboratori d'un <i>Lateral Flow Assay</i> per a <i>Yersinia pestis</i>	32
3.1 Reacció en cadena de la polimerasa.....	33
3.1.1 PCR en temps real.....	35

3.2	Elaboració d'ADN sintètic.....	35
3.3	Elaboració d'un gel d'agarosa.....	36
3.4	Electroforesi.....	38
3.4.1	Electroforesi en gel.....	38
3.5	Espectrofotometria.....	42
3.5.1	Tipus d'espectrofotometries.....	43
3.5.2	Espectrofotòmetre.....	44
3.6	Assaig pràctic de <i>Lateral Flow Assay</i> per a <i>Yersinia pestis</i> al laboratori del grup <i>Interfibio Group</i>	45
3.6.1	PCR utilitzant encebadors sense "cues".....	47
3.6.2	PCR utilitzant encebadors amb "cues".....	51
3.6.3	Elaboració gel d'agarosa.....	54
3.6.4	Conjugació de les nanopartícules d'or amb ADN.....	55
3.6.5	Comprovació de la conjugació de les nanopartícules d'or amb l'ADN.....	56
3.6.6	Elaboració de les tires de la prova de flux lateral o <i>Lateral Flow Assay</i>	58
3.6.7	Resultats.....	67
4.	Conclusions	68
5.	Fonts documentals	71

ANNEXOS

Agraïments

A Jordi Martí Piqué, tutor del treball de recerca, per tots els seus bons consells, per tota la seva dedicació i per totes les seves orientacions, que m'han guiat durant aquest treball.

A la Doctora Miriam Jauset Rubio, pertanyent al grup de nanotecnologia i bioanàlisi de la Universitat Rovira i Virgili, per tutoritzar-me i dirigir el treball experimental d'aquest projecte.

A la Doctora Ciara O'Sullivan, investigadora del centre ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats), per proposar-me la idea d'aquest treball, per facilitar-me dur a terme la investigació al seu grup de laboratori i per iniciar-me en el món de la biomedicina.

A tots els membres del Interfibio Group, per acollir-me i acompanyar-me durant els mesos de juny i juliol en les seves instal·lacions.

A la Universitat Rovira i Virgili (URV), per obrir-me les portes dels seus laboratoris i donar-me l'oportunitat d'investigar i aprendre en les seves instal·lacions. En especial, al Doctor Allan Mackie, al Doctor Josep Bonet i a la Doctora Ciara O'Sullivan per tots els tràmits realitzats per a que el conveni entre la Universitat i l'Institut fos possible.

A l'Institut d'Altafulla i al seu professorat per tot suport que he rebut durant tots aquests anys. En especial a Jordi Martí i Araceli Muñoz per buscar i trobar la manera de fer possible la meva estància a la Universitat.

Introducció

La medicina és el conjunt de sabers, mètodes, tècniques i activitats relacionats amb la salut i la seva preservació i recuperació, així com amb la malaltia i el seu guariment i prevenció. Per a l'assoliment dels seus objectius, la medicina es basa en una sèrie de procediments: el diagnòstic, que consisteix en la identificació dels problemes que afligeixen al pacient, el tractament, que consisteix en el conjunt de mitjans destinats a corregir, alleujar i guarir els símptomes causats per una malaltia, i finalment, la prevenció, que consisteix en les mesures preses per evitar qualsevol mal possible.

El concepte de salut ha anat evolucionant al llarg del temps i ha passat d'una definició, que només tenia en compte l'absència de malaltia, a la consideració global de l'individu des del punt de vista físic, mental i, fins i tot, social.

Ja fa uns quants anys que l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va proposar una definició general del terme salut: "La salut és un estat de complet benestar físic, mental i social, i no solament l'absència de malaltia."

Jordi Gol i Gurina (cap del servei de medicina interna de l'Hospital de la Creu Roja de Barcelona, del 1970 al 1975, i membre de la Societat Catalana de Biologia i de l'Acadèmia de Ciències Mèdiques), en el X Congrés de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana, celebrat a Perpinyà el 1976, va definir la salut com "aquella manera de viure que és autònoma, solidària i joiosa".

Actualment, les diferències de salut entre el Primer Món, també anomenat món desenvolupat, i el Tercer Món són ben evidents i paleses en la mortalitat infantil o en l'esperança de vida. A Catalunya, una regió pertanyent al món desenvolupat, a inicis del segle XIX morien abans de complir l'any uns 300 nadons de cada 1.000 que en naixien; en començar el segle XX la xifra de mortalitat es va reduir aproximadament a la meitat i per cada 1.000 infants que naixien, morien 150,8 (dades oficials del Registre Civil); finalment, l'any 2.000 van morir només 3,4 nadons per 1.000 que naixien; dada molt positiva i que difícilment es podrà millorar. En canvi, aquesta dada de mortalitat infantil es diferent per països menys desenvolupats, com per exemple la Xina on la mortalitat infantil és de 33 morts per cada 1.000 nadons nascuts. Aquesta xifra empitjora en els països més pobres del món, on la mortalitat infantil pot arribar a les 60 o 80 morts per cada mil nascuts. L'esperança de vida a

Catalunya va passar d'una mitjana de 36,7 anys a principis del segle XX a gairebé de 80 anys en l'actualitat. Al Tercer Món l'esperança mitjana de vida amb prou feines són els 45 anys. En el Primer Món, la prevenció i el tractament de les malalties transmissibles, causades per paràsits, bacteris o virus, la vigilància de l'aigua potable, el tractament de les aigües residuals, l'increment de la higiene personal, la introducció de les vacunes i el descobriment de quimioteràpics i antibiòtics, entre altres mesures, han estat la clau per fer desaparèixer moltes infeccions, com ara la verola, el xarampió i la poliomielitis. No es pot dir el mateix dels països subdesenvolupats, on aquestes infeccions acaben amb la vida de moltes persones diàriament. Els principals factors d'aquestes diferències en la mortalitat i l'esperança de vida de les poblacions de diferents parts del món són el grau d'escolarització, les condicions de vida de les persones i el grau de desenvolupament d'aquella societat.

En el segle XXI, el món desenvolupat ha assolit fites espectaculars i ha aconseguit eradicar pràcticament les infeccions històricament amb més incidència a la població, gràcies, en gran part, a la ciència. Es pot afirmar que l'ésser humà ha tingut un avenç significatiu en la recerca de millors condicions de salut, alimentació, habitatge, comunicacions i benestar degut als avenços científics. Malauradament no s'ha trobat l'equilibri perquè aquests beneficis siguin distribuïts equitativament entre tots els habitants del planeta Terra. D'aquesta forma, els habitants dels països desenvolupats disposen d'unes bones condicions de vida que cobreixen totes les seves necessitats, mentre que els habitants dels països del Tercer Món lluiten diàriament contra infeccions i malalties, per l'obtenció d'aliments i aigua i pel manteniment d'habitatge que els permeti seguir vivint.

Per tots aquest motius que s'han anat esmentat en els anteriors paràgrafs, es considera que la ciència és la solució per poder acabar, o almenys reduir, les morts causades per malalties transmissibles en els països subdesenvolupats. Per poder tractar de forma correcta aquestes malalties és molt important un diagnòstic previ. Aquestes proves diagnòstiques han de ser senzilles, específiques, ràpides, econòmiques i fàcils d'usar, donades les condicions socioeconòmiques dels països on es volen aplicar. Afortunadament, la ciència del segle XXI ha arribat a aportar solucions com les de les proves de flux lateral o Lateral Flow Assay (LFA).

En aquest treball de recerca es redacta de forma detallada el funcionament i els objectius de la LFA i del diagnòstic que se'n pot derivar. Durant els mesos de juny i juliol vaig dur a terme les pràctiques del meu treball de recerca sota la supervisió de

la doctora Ciara O'Sullivan, investigadora ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats), al laboratori 223, pertanyent al grup anomenat Interfibio Group, en el Departament d'Enginyeria Química (DEQ) de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química (ETSEQ) pertanyent a la Universitat Rovira i Virgili (URV). Aquesta pràctica va ser realitzada juntament amb la doctora Miriam Jauset Rubio, pertanyent al grup de Nanotecnologia i Bioanàlisi de la Universitat Rovira i Virgili (URV), qui em va tutoritzar durant aquests dos mesos. L'experiència realitzada en la universitat ha consistit en l'elaboració d'una prova de flux lateral per a la identificació del *Yersinia pestis*, el bacteri patògen de la pesta. Aquest és un dels principals agents infecciosos que provoca més morts actualment als països subdesenvolupats.

1 La pesta com a malaltia rellevant en el Tercer Món

La pesta és una malaltia molt greu, contagiosa i letal que ha generat diferents epidèmies i pandèmies al llarg de la història, acabant amb moltes vides humanes. Aquesta malaltia segueix present en molts països subdesenvolupats. L'agent patògen d'aquesta malaltia és el bacteri *Yersinia pestis*.

1.1 Breu història de la pesta

La pesta ha tingut enormes efectes en el desenvolupament de la civilització moderna i molta importància al llarg de la història. Es considera com una terrible malaltia que ha afectat amb el pas del temps a nombroses persones de tot el planeta Terra. Durant molts segles la pesta ha suposat una amenaça a nivell mundial, sobretot a Àfrica, Àsia i Europa. Antigament no es coneixien les causes de l'aparició de la malaltia i per aquest motiu produïa un pànic massiu a les regions on apareixia. La pesta va donar lloc a diverses epidèmies i pandèmies, narrats en llibres històrics com a èpoques de moltes pèrdues humanes diàries i de molt de patiment. Segons el Diccionari de la Llengua Catalana de l'Institut d'Estudis Catalans (IEC), una epidèmia és una malaltia infecciosa accidental i transitòria que ataca un gran nombre de persones d'una regió i una pandèmia és una malaltia epidèmica estesa a molts països i que afecta molts individus del mateix país a la vegada.

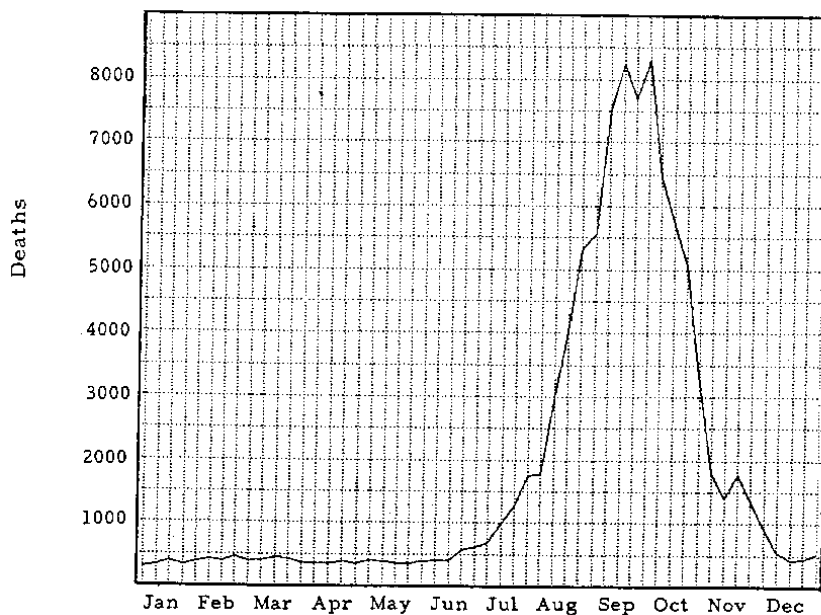


Figura 1. Mortalitat total, Londres 1665 (basat en xifres de mortalitat).

Referència: University of London Institute of Historical Research
(<http://www.history.ac.uk/cmh/arpt88.html>).

Actualment s'ha aconseguit reduir la taxa de persones infectades per la pesta arreu del món i s'ha conegut la causa de la malaltia gràcies a les investigacions científiques. Tot i això la malaltia encara suposa una gran amenaça en alguns països del planeta Terra, sobretot als països subdesenvolupats. El bacteri *Yersinia pestis* és l'agent patogen responsable de la pesta, una malaltia infecciosa bacteriana molt contagiosa. La denominació de la paraula pesta procedeix del terme llatí *pestis*, que significa epidèmia, perdició. Com s'ha esmentat abans, la pesta és una malaltia que ha originat diverses pandèmies i que ha tingut un pes terrible sobre la humanitat al llarg de la història. Els científics consideren que hi han hagut tres pandèmies importants de pesta fins ara.

1.1.1 Pesta de Justinià

La Pesta de Justinià va ser una pandèmia que va afectar l'Imperi bizantí, especialment la seva capital Constantinoble, l'Imperi sassànida, i les ciutats portuàries al voltant de tot el mar Mediterrani. La Pesta de Justinià va començar l'any 541 dC i van seguir reapareixent brots de pesta durant els pròxims dos-cents anys, fins l'any 750 dC. Es considera com una de les majors plagues de la història de la humanitat, i va provocar la mort de 25 milions de persones. Segons Procopi, un historiador important del segle VI, la pandèmia va tindre un impacte a nivell mundial, atacant Àsia, Àfrica i Europa. Els estudis genètics actuals assenyalen la Xina com la principal font de contagi. Porta aquest nom en referència a l'emperador Justinià I el Gran, regidor de l'Imperi bizantí durant la pandèmia.



Figura 2. Representació de la Mort Negra en la Bíblia de Toggenburg.

Referència: Clinical Infectious Diseases. Oxford Journals
(<http://cid.oxfordjournals.org/content/53/3.cover-expansion>)

1.1.2 Pesta Negra

La pesta negra o mort negra es refereix a la pandèmia de pesta més devastadora que hi ha hagut en la història de la humanitat. Va ser originada a la Xina l'any 1334 i es va estendre al llarg de les rutes comercials cap a Constantinoble. Va afectar a Europa al segle XIV i va aconseguir un punt màxim entre els anys 1346 i 1351, matant a un terç de la població europea. Va tindre un impacte a nivell mundial i va afectar Europa, Índia, Xina, Orient Mitjà i Nord d'Àfrica. No va arribar a afectar l'Àfrica subsahariana ni al continent americà. Tot i la gran devastació causada per aquesta pandèmia, l'escassetat de mà d'obra massiva causada per les altes taxes de mortalitat van accelerar el desenvolupament de moltes modernitzacions econòmiques, socials i tècniques. Fins i tot la pesta negra s'ha considerat com un factor en l'aparició del Renaixement al final del segle IV.

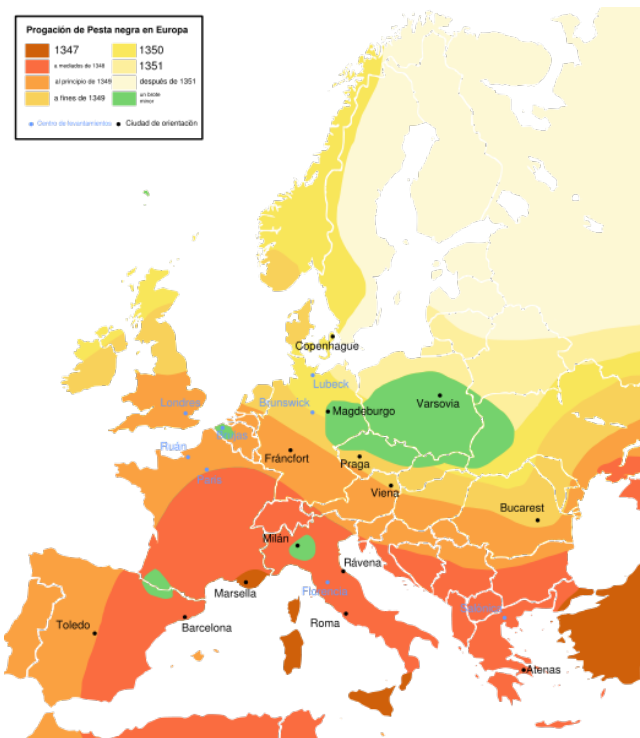


Figura 3. Mapa de propagació de la Pesta Negra a Europa. Les diferents tonalitats de vermell mostren les àrees d'incidència més primerenca, mentre que en color verd apareixen aquelles zones on amb prou feines la pesta va tindre efecte.

Referència: WikimediaCommons

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bubonic_plague_map.PNG).



Figura 4. Pesta Negra a Itàlia l'any 1348, segons la il·lustració de Benedetto Marcello.

Referència: Tèmpora (<http://www.temporamagazine.com/la-peste-negra-en-la-edad-media/>).

1.1.3 Pesta Moderna

La tercera pandèmia, la pesta moderna, va començar a la Xina en la dècada de 1860 i va aparèixer a Hong Kong l'any 1894. Durant els propers 20 anys, es va anar estenent per les ciutats portuàries de tot el món a causa les rates dels vaixells de vapor. La pandèmia va causar aproximadament 10 milions de morts. Durant aquesta última pandèmia, els científics van identificar l'agent patògen de la pesta, i van determinar que era un bacteri, al que van anomenar *Yersinia pestis*. També es va descobrir els mètodes de transmissió de la malaltia i aviat van posar sota control les plagues de rates en la majoria de zones. Però la infecció es va propagar a les poblacions locals dels esquiroles i d'altres petits mamífers, que han permès que la pesta es converteixi en endèmica en moltes zones rurals, incloent l'oest dels EUA. No obstant això, com una malaltia bacteriana, la pesta pot ser tractada amb antibiòtics, i es pot prevenir la propagació de la malaltia mitjançant la identificació i el tractament de casos humans.

1.1.4 Epidemiologia

La pesta actualment es pot trobar en tots els continents del món amb l'excepció d'Àustràlia, tot i que és particularment endèmica als països del tercer món com l'Índia, el Brasil, el Perú, Madagascar, Zaire (actual República Democràtica del Congo), Vietnam, Malawi, Moçambic i la Xina. Als Estats Units, les zones de la

infecció es troben a Nou Mèxic, Arizona, Colorado, Califòrnia, Oregon i Nevada. Hi ha aproximadament 10-15 casos per any als EUA rural i 1-3,000 a tot el món.

La distribució de la pesta coincideix amb la distribució geogràfica dels rosegadors infectats, que es troben en tots els continents excepte Austràlia, en una àmplia distribució que abasta climes tropicals, subtropicals i temperats.

Des de mitjans del segle XX, gràcies als antibiòtics i a les millores en les condicions higièniques, les epidèmies devastadores de pesta semblen cosa del passat, però tot i això, la malaltia està lluny d'estar eradicada. A tot el món ocorren encara uns 1000-3000 casos anuals de pesta humana, normalment notificats com a casos esporàdics o com petits brots localitzats. Entre l'any 2010 i el 2015 es van notificar a l'OMS 3.248 casos de pesta amb 584 morts associades, una tendència ascendent que no es mostrava abans.

La pesta es presenta com endèmica en molts països d'Àfrica, Àsia i Sud-Amèrica, reportant més del 90% dels casos humans a l'Àfrica. Encara que característicament els focus de pesta són dinàmics i canvien en resposta als canvis en altres factors com el clima, el paisatge i la migració de població de rosegadors, la majoria dels casos es donen en zones rurals, on el contacte amb rosegadors salvatges infectats és més comú.

A continuació, es detalla geogràficament l'epidemiologia de la pesta.

- No hi ha casos de pesta a Austràlia ni a l'Europa occidental.
- A l'Àsia i a la zona sud-est d'Europa hi ha focus localitzats i els casos ocorren generalment només en caçadors i ramaders, ja que el reservori en aquesta zona són fonamentalment jerbus i marmotes. Els brots epidèmies de pesta més recents s'han reportat a l'Índia durant la primera meitat del segle XX i a Vietnam durant la guerra dels anys 1960 i 1970. A la Xina i la Mongòlia segueixen existint focus distribuïts per diverses províncies. L'últim brot notificat a la Xina va ser a l'estiu del 2009, amb 12 casos confirmats de pesta pneumònica en una població remota de la província de Quinhai.
- En Amèrica, destaca Perú, que notifica casos regularment en 4 regions del nord-oest, en les que va emergir un focus en 2013. Actualment es consideren 5 països endèmics per la pesta (Bolívia, Brasil, Equador, Estats Units i Perú). A l'Amèrica Llatina, els casos humans que encara persisteixen estan molt localitzats, i en general ocorren en poblacions rurals que viuen en situació de

pobresa extrema i en àrees de focus en aquests països. En els últims 12 anys prop dels 120 casos humans de pesta reportats en aquesta regió, el 87% d'ells es van localitzar a Perú. Als Estats Units la pesta es dona a les zones rurals i principalment deshabitades. Del 1994 al 1999, van ser reportats 49 a Arizona, Califòrnia, Colorado, Nou Mèxic i Utah, donant com a resultat tres morts. El 2006 es van reportar 13 casos de pesta i dues morts a Califòrnia, Colorado, Nou Mèxic i Texas.

- A L'Àfrica els focus es distribueixen en diferents països. Els països africans més afectats que notifiquen casos regularment són la República Democràtica del Congo (RDC), Madagascar, Moçambic, Uganda i Tanzània. La RDC i Madagascar són els països més endèmics del món, que representen més del 90% dels casos reportats. Madagascar és el país més afectat en l'actualitat.

Finalment, es pot afirmar que s'ha produït un clar canvi en la distribució geogràfica de la pesta al llarg dels últims 50 anys. En els anys 50 era un problema fonamentalment a Àsia i ocasionalment a Amèrica. En els 60, es va incrementar a Amèrica i va començar a l'Àfrica. Ja en els 70, va ocórrer una gran epidèmia a Vietnam i la malaltia va seguir el seu avanç en el continent africà. En aquests últims 30 anys l'increment ha continuat sent clarament africà, tendència que continua.

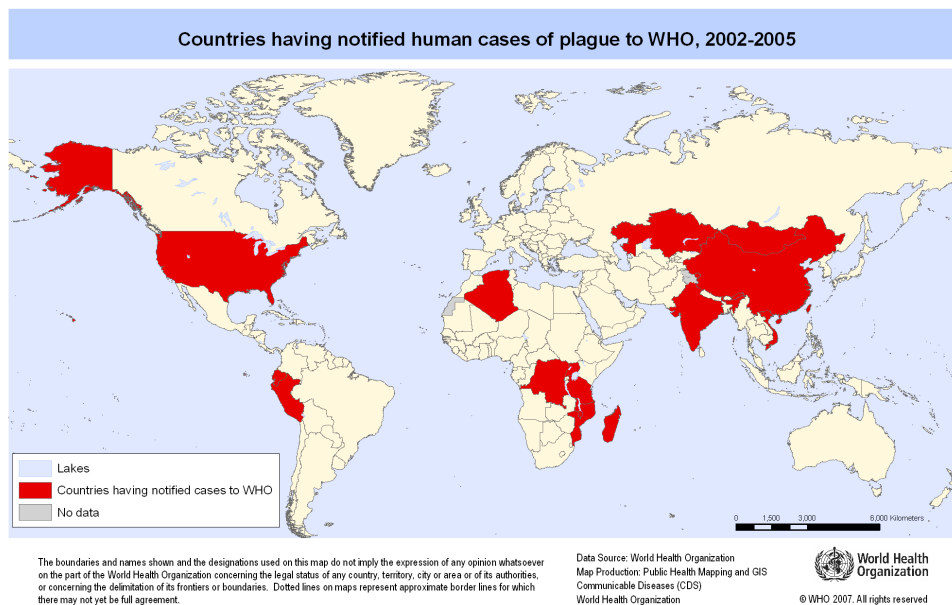


Figura 5. Països notificats amb casos humans de pesta durant els anys 2002 – 2005 per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (o en anglès, World Health Organization (WHO)). **Referència:** Organització mundial de la salut (<http://www.who.int/en/>).

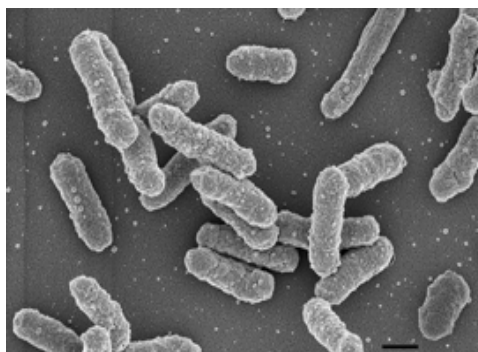
1.2 Etiologia de la pesta

El bacteri *Yersinia pestis* (antigament anomenat *Pasteurella pestis*) és un eubacteri gramnegatiu en forma de bacil (forma de bastó) pertanyent a la família de les enterobacteriàcies (*Enterobacteriaceae*) que pot infectar humans i altres animals. Les enterobacteriàcies són una família d'eubacteris gramnegatius que conté més de 30 gèneres i més d'un centenar d'espècies que poden tenir morfologia de bacils o

Classificació científica	
Regne	Eubacteria
Fílum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacterial
Família	Enterobacteriaceae
Gènere	<i>Yersinia</i>
Espècie	<i>Yersinia pestis</i>

Figura 6. Taula amb la classificació científica del bacteri *Yersinia pestis*.

Si no està present l'oxigen (O₂), el bacteri és capaç de canviar cap a la fermentació, procés de catabolisme anaeròbic en el qual un compost orgànic actua com a donador i acceptor d'electrons i l'ATP resultant s'obté per la fosforilació (addició d'un grup fosfat (PO₄³⁻)) a nivell de substrat.



cocs. Són anaeròbics facultatius i oxidasa negatius.

Un organisme anaerobi facultatiu és aquell que sintetitza ATP (trifosfat d'adenosina) per respiració aeròbica, metabolisme energètic mitjançant el qual els éssers vius extreuen energia de molècules orgàniques, com ara la glucosa, per un procés complex en el qual el carboni és oxidat i l'oxigen procedent de l'aire és l'oxidant emprat.

Figura 7. Microscòpia electrònica de rastreig amb escala= 500nm d'una colònia de *Yersinia pestis*.

Referència: Robert Koch Institut

(http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/infAZ/Pest/EM_Tab_Pest.html)

El nom del gènere *Yersinia* ve donat pel seu descobridor, l'any 1894, Alexandre Emile Jean Yersin (1863–1943), bacteriòleg francès suís de l'Institut Pasteur. Originalment, aquest microorganisme va ser denominat *Pasteurella pestis* pel químic i microbiòleg francès Louis Pasteur (1822-1895), però l'any 1967 es va anomenar *Yersinia Pestis* en honor al seu descobridor.



Figura 8. Alexandre Yersin davant la seva barraca de palla, on va descobrir el bacteri causant de la pesta.

Referència: Heredote.net

(https://www.herodote.net/20_juin_1894evenement18940620.php).

El *Yersinia pestis* és l'agent etiològic de la pesta. La pesta és una zoonosis, és a dir, una malaltia infecciosa que es produeix primàriament en diversos animals i que es pot transmetre secundàriament a l'espècie humana pel contacte amb aquests animals. Generalment la pesta es transmet als éssers humans a través de les puces que s'alimenten de rosegadors infectats. Es coneixen com a reservoris aquells llocs on els microorganismes patògens poden sobreviure fora dels hostes i des d'on poden iniciar la infecció. En la pesta els reservoris són rosegadors salvatges i rates domèstiques.

1.3 Patologia general

La pesta es desenvolupa després de la picada d'una puça infectada i també per l'elaboració o consum d'aliments contaminats d'animals infectats. La pesta es pot presentar com una infecció bacteriana mortal depenent de la seva ubicació, és a dir, on es produeix i el seu desenvolupament dels símptomes. En general, els símptomes es desenvolupen de dos a vuit dies. Els primers símptomes apareixen uns dies després d'un atac biològic i, poc després dels primers símptomes de la plaga, generalment es produeix la mort de les persones o animals infectats.



Figura 9. Bacteri *Yersinia pestis*, a través del microscopi electrònic.

Referència: CBSNEWS

(<http://www.cbsnews.com/news/scientists-crack-genetic-code-of-black-death-germ-yersinia-pestis/>).

1.4 Tipus

Hi ha tres tipus de pesta, depenent de la via d'infecció:

- **Pesta bubònica** (afecta als ganglis limfàtics). És la forma més comuna de pesta. La infecció es produeix després de la picada d'una puça paràsita d'una rata infectada per *Yersinia pestis*. La seva taxa de mortalitat, sense tractament, es situa entre el 30% i 75% de les persones infectades per la malaltia. El símptoma característic d'aquesta variant de la malaltia és l'aparició de bubons (inflamacions dels ganglis limfàtics similars en aparença a butllofes enormes) a l'engonal, el coll i les aixelles pels quals supura pus i sang. Les persones infectades també tenen hemorràgies sota la pell, raó per la qual presenten nombroses taques fosques per tot el cos. L'aparició d'aquestes tumoracions va acompanyada de febre alta (entre 38 i 41 °C), vòmits i confusió o deliri.

Símptomes de la pesta bubònica

- Febre.
- Calfreds.
- Debilitat.
- Mal de cap.
- Inflamació dels ganglis limfàtics.
- L'àrea dels ganglis limfàtics de la pell afectada per la malaltia pot estar rígida i vermellosa.
- Protuberàncies o llagues a la picada de puces.
- Ansietat.
- Falta d'energia.
- Convulsions possibles.
- Confusió.
- Nàusea, vòmits i diarrea.



Figura 10. Bubó al coll causat per la pesta bubònica (Madagascar).

Referència: Enfermedad y Salud (<http://enfermedadysalud.es/sintomas-de-la-pestebubonica/>).

- **La pesta pneumònica** (afecta al pulmó). Aquest tipus de pesta es produeix quan el bacteri *Yersinia pestis* infecta els pulmons de la persona malalta. La pesta pneumònica o pulmonar es propaga per la inhalació del bacteri *Yersinia pestis* suspès en les gotes minúscules que es formen en les vies respiratòries d'una persona (o animal) que pateix de pesta pulmonar. Perquè una persona s'infecti d'aquesta forma es requereix que aquesta estigui en contacte directe i proper a una persona o animal malalt. La pesta pneumònica també es pot presentar quan el bacteri *Yersinia pestis* arriba als pulmons d'una persona malalta a causa d'una progressió dels diferents tipus de pesta. La forma més general de propagació es a través de l'aire.

Síntomes de la pesta pneumònica

- Febre.
- Calfreds.
- Debilitat.
- Mal de cap.
- Tos, amb secrecions sanguinolentes o aquoses.
- Dificultat per respirar.
- Mal de pit.
- Nàusea, vòmits i diarrea.

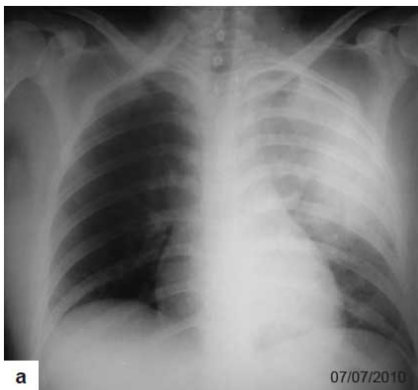


Figura 11. Radiografia d'un cas de pesta pneumònica.

Referència: Articles about medicine (<http://book-med.info/plague/58542>).

- **Pesta septicèmica** (afecta a la sang). És causada pel desenvolupament i la propagació del bacteri *Yersinia pestis* a la sang. És la menys freqüent respecte a les altres pestes, però alhora la més mortífera, ja que la infecció envaeix ràpidament tota la sang de la persona infectada. Aquest tipus de pesta causa la mort a gairebé el 100% dels malalts. Pot presentar-se a partir de la pesta pneumònica o bubònica o bé desenvolupar-se per si mateixa.

Quan apareix per si mateixa, presenta els mateixos símptomes que la pesta bubònica. Els símptomes més característics de la pesta septicèmica són la febre alta i l'aparició de taques de color morat per tot el cos.

Símptomes de la pesta septicèmica

- Sagnat sota la pell.
- Dits dels peus, de les mans o el nas negres.
- Coagulació anormal de la sang.
- Dificultat per respirar.
- Xoc.
- Insuficiència orgànica.

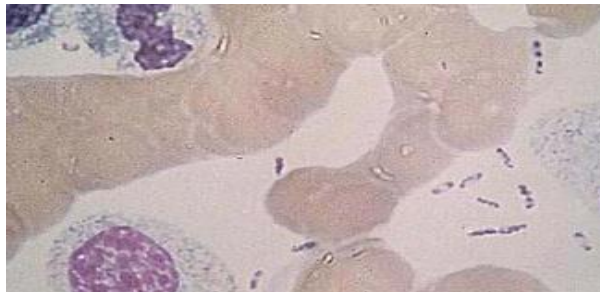


Figura 12. Bacteri *Yersinia pestis* en un pacient amb pesta septicèmica.

Referència: National Science Foundation
(<https://www.nsf.gov/od/lpa/news/press/99/pr9970.htm>).

1.5 Transmissió

La pesta és una malaltia pròpia dels rosegadors; per tant, les rates són el principal reservori del bacteri *Yersinia pestis*. Els principals portadors del bacteri patògen de la pesta són els rosegadors infectats i la puça de la rata oriental (*Xenopsylla cheopis*).



Figura 13. Puça de la rata oriental (*Xenopsylla cheopis*).

Referència: Natural History Museum, London (<http://www.nhm.ac.uk>).

La majoria de les rates infectades pel bacteri moren en un període curt de temps, però un petit percentatge sobreviu contenint el bacteri de la malaltia. Quan la puça de la rata oriental xucla la sang d'un rosegador infectat, ingereix el bacteri *Yersinia pestis* i esdevé portadora de la infecció. Posteriorment els bacteris ingerits per la puça es multipliquen en l'intestí d'aquesta i es transmeten a una altra rata mitjançant la picada de la puça infectada. El bacteri de la pesta s'anirà estenent de forma progressiva a través de les picades de les puces i per tant creixerà la taxa de mortalitat de les rates. Com a conseqüència d'aquest fet, la puça portadora del bacteri buscarà nous hostes, entre les quals troba a l'home. En general els éssers humans es contagien de la pesta a partir de la picada d'una puça infectada.

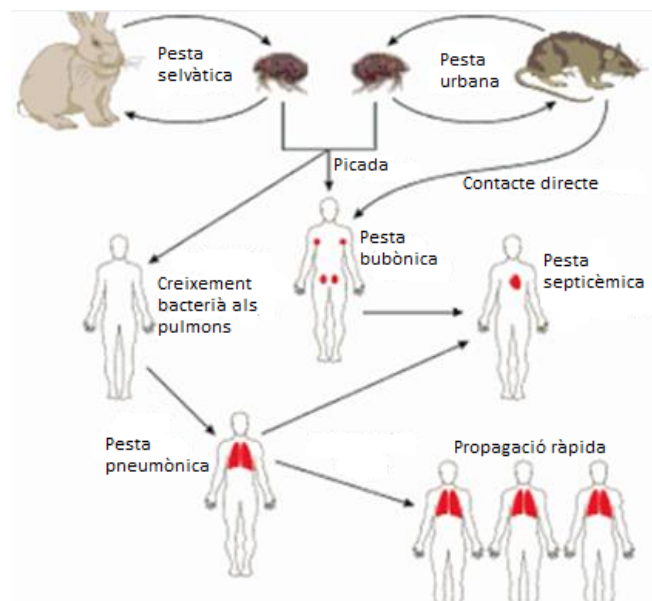


Figura 14. Esquema del cicle de transmissió de la pesta.

El bacteri de la pesta es pot transmetre als humans de les formes següents:

- ❖ **PICADES DE PUCES.** El bacteri de la pesta es transmet amb més freqüència per mitjà de la picada d'una puça infectada. Durant l'epizootia de pesta molts rosegadors moren, provocant que les puces infectades busquin altres éssers vius per poder alimentar-se de la seva sang. Les persones i els animals que visiten llocs on han mort rosegadors a causa del bacteri *Yersinia pestis* corren el risc de ser infectats per mitjà de les picades de les puces. Aquestes picades provoquen la pesta bubònica o la pesta septicèmica en els éssers humans.
- ❖ **CONTACTE AMB FLUIDS O TEIXITS CONTAMINATS.** Els éssers humans poden infectar-se en manipular teixits o fluids corporals d'un animal infectat de

pesta. Per exemple, quan un caçador escorxa un animal infectat sense la utilització de mesures preventives adequades podria infectar-se amb bacteris de la pesta. Aquesta forma de contagi és més comuna en la pesta bubònica o en la pesta septicèmica.

- ❖ **GOTETES INFECCIOSES.** Una persona contagiada de pesta pneumònica pot tossir gotetes que contenen el bacteri *Yersinia pestis*. Aquestes gotetes poden causar pesta pneumònica a qui les hagi inhalat a través de l'aire. Aquest tipus de transmissió requereix un contacte directe i proper amb la persona malalta. La transmissió d'aquestes gotetes és l'única forma per la qual el bacteri *Yersinia pestis* pot propagar-se entre les persones. Aquest tipus de transmissió es produeix sobretot amb certa freqüència als països subdesenvolupats.

Diagnosticar i tractar la malaltia com més aviat millor pot reduir un 5% la taxa de mortalitat de la pesta.

1.6 Diagnòstic

La pesta és una malaltia comuna en regions on hi ha un gran nombre de rosegadors infectats. Si una persona comença a presentar símptomes propis de la pesta hauria d'anar a un centre mèdic per assegurar, mitjançant un diagnòstic, si el malestar de la persona es causat per un dels tipus de pesta. El signe més comú de la pesta bubònica és el desenvolupament d'un gangli limfàtic inflammat i dolorós anomenat bubó, per tant si el pacient presenta un bubó el més possible és que presenti pesta bubònica. La presència d'una picada de puça o d'un bubó al cos del pacient ajuden al metge a considerar la pesta com la causa del malestar de la persona infectada. El metge inspeccionarà els diferents símptomes que presenti el pacient i li farà un examen físic per a determinar si el seu malestar es degut o no a la pesta.

Per poder diagnosticar correctament si el pacient està infectat pel bacteri *Yersinia pestis* i el tipus de pesta que pot presentar són necessàries unes proves diagnòstiques. Quantes més proves es duguin a terme, més fàcil serà fer un diagnòstic diferencial amb altres malalties que presentin símptomes semblants a la pesta. Les proves diagnòstiques que generalment s'utilitzen amb més freqüència, depenent dels recursos disponibles al centre mèdic on s'atén al pacient, són les següents:

- Radiografia del tòrax.
- Anàlisi de sang, per buscar signes d'infecció.
- Anàlisi de sang per detectar anticossos a infestar els bacteris.
- Estudi dels fluids corporals utilitzant equips especials.
- Els fluids de cultiu, per detectar bacteris.

1.7 Tractament

La pesta és una malaltia molt greu, però pot ser tractada amb antibiòtics. Com més aviat una persona infectada busqui atenció mèdica i rebi el tractament adequat, millors i majors seran les possibilitats d'una recuperació completa d'aquesta persona.

El metge sospitarà que es tracta de pesta si el pacient manifesta els símptomes corresponents a la malaltia i ha estat en contacte amb rosegadors salvatges o amb animals morts. Per assegurar-se, el metge haurà de buscar indicis del bacteri *Yersinia pestis* en la sang de la persona, en la flegma que escup en tossir o en mostres de teixit dels ganglis limfàtics. Segons els tipus de pesta que presenti el pacient el metge receptarà diferents antibiòtics.

El tractament és diferent per a una persona que ha tingut contacte amb la pesta, però que encara no manifesta símptomes.

- **Prevenició de la malaltia després del contacte:** Les persones que hagin tingut contacte directe o proper a la pesta hauran de prendre durant set dies seguits antibiòtics per evitar que s'acabin infectant.
- **Tractament de la malaltia:** Una persona que comença a presentar símptomes de pesta ha de rebre atenció mèdica d'immediata. Per reduir la probabilitat de mortalitat, la persona infectada haurà de prendre antibiòtics dins de les 24 hores d'aparició dels primers símptomes. A més a més, els pacients hauran de prendre antibiòtics durant deu dies seguits.

Les persones malaltes de pesta han d'estar aïllades. L'ús d'una màscara quirúrgica ben ajustada sobre el nas i la boca ajuda a prevenir el contagi de la infecció.

Per al tractament de la pesta, s'utilitzen antibiòtics. Un antibiòtic és una substància química capaç, a baixes concentracions, d'inhibir el creixement d'altres microorganismes o d'eliminar-los. Generalment, els antibiòtics actuen sobre els eubacteris, com per exemple el bacteri de la pesta. Els més utilitzats per tractar la

pesta són els citats en la llista següent:

- Estreptomicina (es pot assignar juntament amb tetraciclina).
- Gentamicina.
- Tetraciclina o doxiciclina.
- Cloranfenicol.
- Ciprofloxacina.

A més a més se'ls subministra oxigen (O₂), suport respiratori i se'ls aplica una teràpia intravenosa, és a dir, la infusió de substàncies líquides directament en una vena.

1.8 Prevenció

Els antibiòtics poden prevenir la infecció després del contacte amb persones infectades de pesta. Els medicaments s'han de prendre diàriament mentre s'està en contacte amb el pacient, i també s'han de prendre set dies després de l'últim contacte.

Actualment no existeix cap vacuna disponible contra la pesta, però diversos mitjans eficaços disminueixen la possibilitat de transmissió de la malaltia. S'han d'eliminar els rosegadors que habiten prop dels habitatges i aplicar als animals domèstics insecticides per al control de puces. L'aplicació de repel·lent d'insectes per a les persones en àrees a l'aire lliure és una mesura eficaç per a protegir-se contra les picades de puces. Qualsevol contacte amb animals infectats ha de ser limitada immediatament.

També es poden aplicar als hospitals mitjans de protecció, on la possibilitat de contagiar-se és elevat. El personal de l'hospital i els pacients han d'utilitzar màscares i protegir tots els orificis del cos que puguin entrar en contacte amb el bacteri *Yersinia pestis*. Els pacients afectats per la malaltia s'aïllen en sales de l'hospital fins que la infecció deixa d'existir per evitar la propagació de la pesta a altres persones.

Mesures per prevenir la pesta natural:

- No tocar els rosegadors morts o gats malalts;
- Utilitzar insecticides en les cases afectades, per desfer-se de rosegadors;
- Eliminar les rates que habitin prop de la casa;
- No deixar accedir als gossos i gats a les zones on la plaga és comuna.

2 Proves de flux lateral o *Lateral Flow Assay*

Les proves de flux lateral, generalment conegudes per la seva denominació anglesa *Lateral Flow Assay* (LFA), són proves diagnòstiques senzilles, específiques, ràpides, econòmiques i fàcils d'utilitzar, que permeten que qualsevol persona, sense alts nivells de coneixement científic, les pugui utilitzar. Són proves que tenen com a objectiu detectar la presència o l'absència d'un determinat anàlit en una mostra.

Des del seu ús inicial en la dècada del 1980, la prova de flux lateral s'ha anat desenvolupant i ha guanyant una àmplia acceptació. La principal raó del seu èxit és, entre altres motius, la simplicitat del disseny del protocol que segueix. Es tracta d'una prova compacta, fàcil de transportar i emmagatzemar. La fabricació de la prova de flux lateral és relativament fàcil i econòmica. Les indicacions a seguir per la seva utilització són senzilles i no requereixen un personal altament especialitzat ni laboratoris científics. Els resultats s'obtenen de forma ràpida, en un temps breu, i són fàcils d'interpretar a ull nu.

La tecnologia utilitzada per aquesta prova és de gran abast i ha resultat ser molt eficaç. Actualment es desenvolupen i comercialitzen proves de flux lateral capaces de detectar múltiples anàlits en un sol dispositiu. L'avanç en la tecnologia, la millora dels components materials i la major atenció a la qualitat de fabricació contribueix a augmentar en la fiabilitat, la precisió i les aplicacions de la prova de flux lateral. No obstant això, la contínua demanda d'obtenir un resultat quantitatiu afegit al valor qualitatiu que ja donava la prova ha presentat un gran repte per als desenvolupadors d'aquesta prova.

2.1 Breu història de la prova de flux lateral

El desenvolupament de la prova de flux lateral és el resultat de la convergència de diverses fites de la dècada del 1950. No obstant això, el concepte de proves de diagnòstic ràpid basat en els fluids corporals existeix des de fa molt de temps. Hi ha evidències documentades que fa milers d'anys s'empraven procediments de diagnosi que utilitzaven saliva i orina. Els antics xinesos van ser els primers usuaris documentats d'utilitzar un diagnòstic ràpid utilitzant la saliva. Un dels primers registres escrits d'una prova diagnòstica basada en l'orina durant l'embaràs data de l'època de l'antic Egipte. Aquests primers diagnòstics eren poc exactes tant en el diagnòstic com en el pronòstic. Malgrat els esforços a través dels diferents segles no va ser fins a mitjans del segle XX que la majoria dels mètodes de diagnòstic ràpid van guanyar valors predictius reals.

La base tècnica de la prova de flux lateral va derivar de l'assaig d'aglutinació de làtex, el primer dels quals va ser desenvolupat l'any 1956 pels científics Singer J. M i Plotz C. M. Durant el mateix període s'estaven desenvolupant els immunoassaigs basats en placa. El primer ràdio-immunoassaig (RIA) va ser inventat per Berson i Yalow en la dècada de 1950. El immunoassaig enzimàtic (EIA) va ser introduït en la dècada de 1960, amb més avantatges que el RIA com per exemple la substitució de radioisòtops per enzims, temps de reacció més ràpid i una vida útil més llarga. A partir de la dècada del 1980, la gran varietat de tecnologies, processos i metodologies van permetre que les proves de flux lateral es desenvolupessin de forma considerable. La principal aplicació dels primers desenvolupaments de la tecnologia utilitzada en els assaigs va ser la prova d'embaràs humà, que va provocar un gran salt en les proves diagnòstiques mèdiques. Aquesta prova va ser el resultat de les millores en les tecnologies de generació d'anticossos, guanys significatius en la comprensió de la biologia i la detecció de la gonadotropina crònica humana (hCG), hormona segregada a l'embrió i a la placenta de les dones embarassades.

Per desenvolupar plenament la prova de flux lateral era necessària una varietat d'altres tecnologies de suport com la fabricació de la membrana de nitrocel·lulosa, la generació d'anticossos, la distribució de fluid per la prova, l'equip de processament i l'evolució de coneixements en metodologies de desenvolupament i fabricació. Moltes d'aquestes tecnologies es van desenvolupar durant la dècada de 1990, permetent l'elaboració complexa d'una prova de flux lateral, capaç de proporcionar de forma adequada pronòstics ajustats en una varietat aplicacions. Els primers productes de flux lateral es van introduir al mercat a finals de 1980. Des de llavors, la tecnologia, les seves aplicacions, i la indústria han seguit evolucionant i l'aplicació de la tecnologia s'ha expandit més enllà dels diagnòstics clínics a àrees tan diverses com la veterinària, l'agricultura, l'alimentació, la salut ambiental i la seguretat en proves industrials.

2.2 Estructura d'una prova de flux lateral

La **figura 15** mostra la configuració típica d'una prova de flux lateral. Les proves estan compostes per una varietat de parts o àrees, cadascuna de les quals té una funció determinada per al bon funcionament de la prova. Les parts es sobreposen unes sobre les altres damunt d'una tira adhesiva que s'utilitza com a suport.

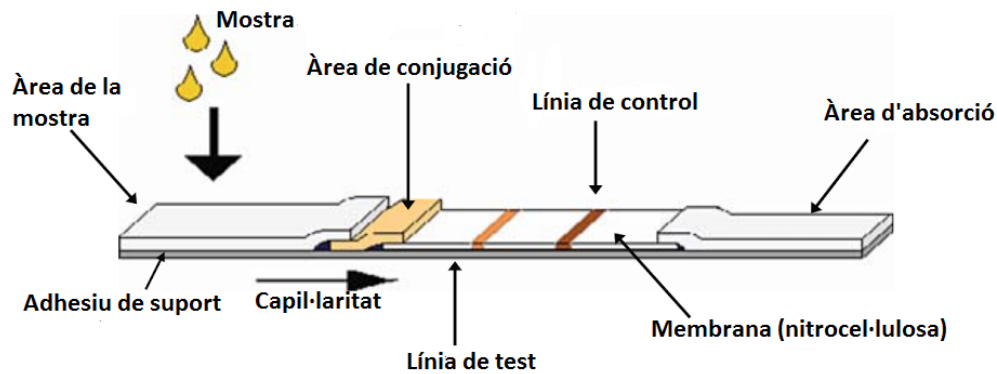


Figura 15. Estructura d'una prova de flux lateral on s'hi representen les diferents àrees que la formen.

Referència: WONG i TSE (http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book%5B1%5D.pdf).

A continuació es detallen les diferents parts d'una prova de flux lateral amb la funció corresponent:

- I. **Membrana o regió analítica:** L'objectiu de la membrana d'una prova de flux lateral consisteix en unir i fixar unes determinades proteïnes (depenent de la finalitat de la prova) a les línies de test i de control, i mantenir les proteïnes estables durant el temps d'utilització de la prova de flux lateral. Quan la prova es utilitza, la membrana ha d'acceptar que la mostra que es vol analitzar (anàlit) i la conjugació procedent de l'àrea de conjugació (explicada posteriorment) puguin fluir per capil·laritat fins al final de la prova, ha de permetre que succeeixi les reaccions adequades entre les proteïnes de les línies de test i de control i les substàncies de la mostra i la conjugació, i finalment, també ha de permetre que les restes de la mostra i de la conjugació arribin fins al final de la tira, on seran retingudes per l'àrea d'absorció. Generalment s'utilitza nitrocel·lulosa a les membranes de les proves de flux lateral per les característiques següents: alta capacitat d'unió amb les proteïnes i capacitat de permetre el flux d'un fluid per capil·laritat.
- II. **Àrea de conjugació:** La funció principal de l'àrea del conjugat en una prova de flux lateral és acceptar el conjugat, mantenir-lo estable abans de la utilització de la prova i alliberar-lo quan s'utilitzi l'assaig. La sensibilitat de l'assaig es pot veure afectada per la mala elaboració del conjugat i pel mal alliberament del conjugat per part de l'àrea de conjugació. Dependent de la

conjugació utilitzada, algunes àrees de conjugació alliberen de forma ràpida el conjugat i d'altres ho fan de forma més lenta. L'addició del conjugat a l'àrea de conjugació es pot fer de diferents formes. La forma més utilitzada consisteix en la immersió de l'àrea del conjugat en la suspensió (*Dispersió estable d'una fase sòlida composta per partícules visibles al microscopi repartides en un líquid o en un gas d'una manera pràcticament uniforme*¹) del conjugat. Els materials més utilitzats per a fer l'àrea de conjugació són fibres de vidre, polièsters o raions (fibra tèxtil de polímer natural).

- III. **Àrea de la mostra:** La funció de l'àrea de la mostra és assimilar la mostra que es vol analitzar i tractar-la de tal manera que sigui compatible amb l'assaig. Els tractaments donats per aquesta àrea inclouen la filtració de partícules o glòbuls vermells i el canvi de pH de la mostra. L'àrea de la mostra ha de ser capaç d'assimilar tot el volum de la mostra aplicada d'una forma controlada, ajudant a la mostra a fluir a través de la tira de la prova. També ha d'evitar l'excés de mostra en la prova. Els materials utilitzats per elaborar l'àrea de la mostra depenen dels requisits de l'aplicació. En general s'utilitza cel·lulosa, fibra de vidre, raïó i altres materials de filtració.
- IV. **Àrea d'absorció:** L'àrea d'absorció està col·locada al final de la tira de la prova, i té com a funció principal absorbir tot el fluid de la mostra sobrant, és a dir, que ha arribat fins el final de la tira. Un cop arriba la mostra a l'àrea d'absorció, es queda retinguda en aquesta àrea fins que finalitzi el temps de la prova. El material més utilitzat és cel·lulosa d'alta densitat.
- V. **Adhesiu de suport:** Tots els diferents components de la prova de flux lateral es col·loquen unes sobre les altres i es laminen, és a dir, es redueixen a una làmina el material de suport, normalment adhesiu, per a proporcionar rigidesa i un maneig més fàcil de la prova. Els materials de suport més utilitzats són el poliestirè o altres materials de plàstic recoberts amb una superfície adhesiva.
- VI. **Línies de control i de test (reactius per a la detecció):** Els reactius per a la detecció de partícules més utilitzats en la prova de flux lateral són nanopartícules d'or col·loïdal i partícules de làtex uniformes. Aquestes partícules, juntament amb una varietat de reactius de detecció com ara tints de color, colorants fluorescents i components magnètics estan disponibles

¹ *Diccionari de la llengua catalana*. Barcelona: Institut d'estudis catalans

comercialment. Els reactius per a la detecció es situen a les línies de test i de control de la prova de flux lateral. La línia de test identifica la presència o l'absència d'un determinat anàlit contingut en la mostra que es vol analitzar. La línia de control confirma que el funcionament de la prova de flux lateral és correcte.

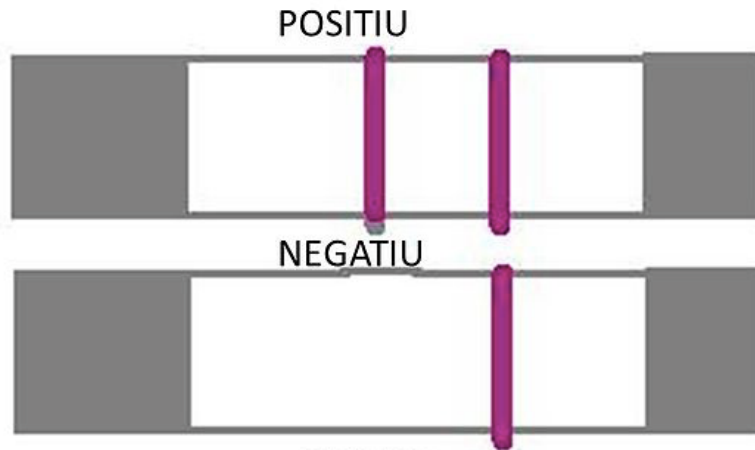


Figura 16. Esquema on s'hi representa una tira de prova de flux lateral amb un resultat positiu (a la part superior), on s'hi pot observar la línia de test i de control de color morat, i una tira amb un resultat negatiu (a la part inferior), on únicament s'hi pot observar la línia de control.

Referència: WikimediaCommons

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Immunocromatografia.jpg>).

2.3 Funcionament de la prova de flux lateral

Quan s'executa una prova de flux lateral, s'afegeix la mostra que es vol analitzar a l'extrem proximal de la tira, és a dir, a l'àrea de la mostra, que té com a funció tractar la mostra per a que sigui compatible amb la resta de la prova. La mostra tractada migra per capil·laritat a l'àrea de conjugació, on s'hi ha immobilitzat un conjugat de partícules. Les partícules normalment són d'or col·loïdal o de làtex, que s'han conjugat (unit) a un dels components específics de l'assaig, ja sigui antígens o anticossos depenent del format de l'assaig. L'anàlit de la mostra analitzada interactua amb el conjugat de l'àrea de conjugació i seguidament migra cap a la matriu de reacció o membrana. Es tracta d'una matriu porosa on s'hi ha immobilitzat l'altre component biològic específic. Aquests components solen ser proteïnes, ja sigui anticossos o antígens, que han estat establertes en àrees específiques de la membrana i que tenen com a funció capturar l'anàlit de la mostra i el conjugat que

migren cap a la línia de control. L'excés de reactius són retinguts a l'àrea d'absorció, al final de la tira. Un cop que s'asseca la tira es poden comprovar els resultats. Els resultats s'interpreten en la matriu de reacció o membrana com la presència o l'absència de la línia de test de conjugat capturat a simple vista. La línia de control sempre hi ha d'aparèixer, ja que confirma que la prova funciona de forma correcta. Les proves de flux lateral poden ser de dos tipus, directes (figura 17) o competitives (figura 18).

2.3.1 Proves de flux lateral directes

Les proves de flux lateral directes s'utilitzen quan les proves de l'anàlit són més grans i amb múltiples llocs antigènics, com ara gonadotropina crònica humana (hCG), virus de la immunodeficiència humana (VIH) i hormona luteïnitzant (LH). En aquest cas, un resultat positiu s'indica per la presència de la línia de test en la membrana. Quan hi ha un excés d'anàlit en la mostra analitzada algunes de les partícules del conjugat no són capturades en la línia de test (o de captura) i continuen fluint fins arribar a la segona línia d'anticossos immobilitzats, anomenada línia de control. Aquesta línia de control comprèn típicament un anticòs d'anti-immunoglobulines específiques de l'espècie, específic per a l'anticòs en el conjugat de partícules.

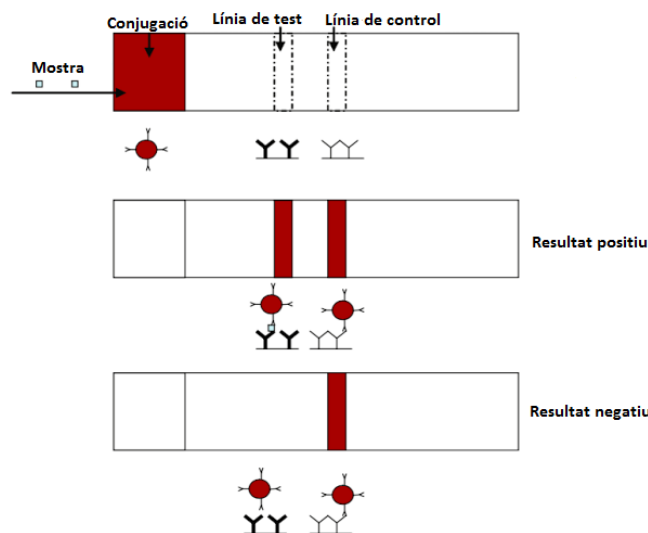


Figura 17. Esquema on s'hi representa una prova de flux lateral directa. En la primera tira s'introdueix a l'àrea de la mostra la mostra que es vol analitzar. La segona tira representa un resultat positiu de la prova amb la visualització de dues línies sobre la membrana i finalment, la tercera tira representa un resultat negatiu amb la visualització d'una única línia sobre la membrana.

Referència: WONG i TSE (http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book%5B1%5D.pdf).

2.3.2 Proves de flux lateral competitives

Les proves de flux lateral competitives s'utilitzen quan les proves són petites molècules amb determinats antigens individuals que no es poden unir a dos anticossos simultàniament. En aquest format, un resultat positiu s'indica per l'absència de la línia de test en la membrana. També s'hi forma la línia de control, independentment del resultat de la línia de test.

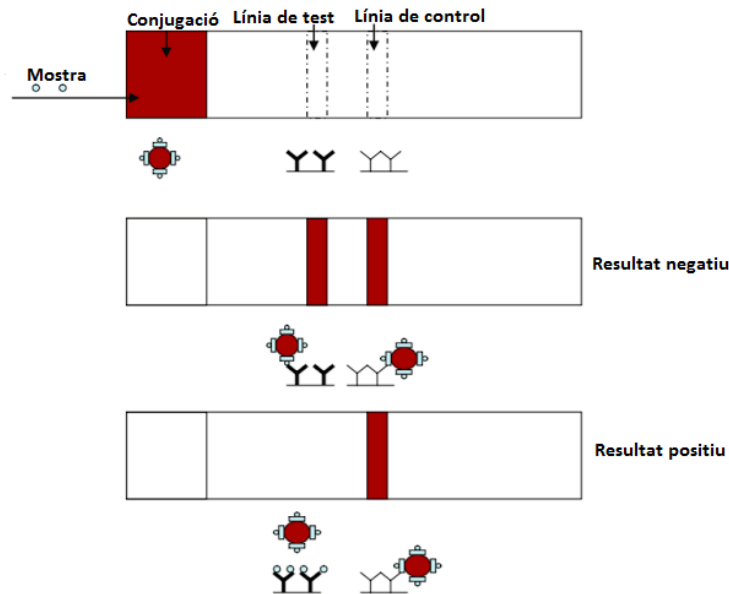


Figura 18. Esquema on s'hi representa una prova de flux lateral competitiva. En la primera tira s'introdueix a l'àrea de la mostra la mostra que es vol analitzar. La segona tira representa un resultat negatiu de la prova amb la visualització de dues línies sobre la membrana i finalment, la tercera tira representa un resultat positiu amb la visualització d'una única línia sobre la membrana.

Referència: WONG i TSE (http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book%5B1%5D.pdf).

2.4 Utilitat i avantatges de la prova de flux lateral

La prova de flux lateral és un assaig tan simple i alhora tan útil que s'aplica a gairebé qualsevol situació en que es requereix un assaig ràpid i efectiu. Als hospitals, a les clíniques, als consultoris mèdics i als laboratoris clínics s'utilitza la prova de flux lateral per a la detecció qualitativa i quantitativa d'una àmplia varietat d'antígens i anticossos i, a més a més, per a la detecció de productes d'amplificació de gens. La prova pot ser utilitzada per analitzar gairebé qualsevol mostra biològica, com per exemple les llàgrimes, la orina, la suor, la saliva, el sèrum, la sang i la biòpsia de

teixits i fluids. La prova de flux lateral també s'utilitza en la medicina veterinària, en proves ambientals, per comprovar la seguretat de l'aigua, per assegurar la qualitat i la seguretat del producte en la producció d'aliments i en la fabricació de productes farmacèutics i biològics. En aquests casos, la prova es fa servir per a la detecció de patògens i toxines en les matèries primeres, l'entorn de fabricació i el producte acabat.

Una altra raó per les nombroses aplicacions de la prova de flux lateral és el baix cost de la fabricació i del desenvolupament. Si els antígens i els anticossos necessaris per dur a terme la prova estan disponibles, els costos del desenvolupament de la prova pot ser tan baix com \$30.000 (dòlars) o no superior a \$100.000. Un cop desenvolupada i fabricada es pot vendre a \$0,10 - \$3,00 la prova. Si es compara aquest preu amb el preu d'altres elaboracions utilitzades per a la detecció de determinats anàlits és molt més econòmic i assequible la prova de flux lateral.

2.5 Aplicacions de la prova de flux lateral

La prova de flux lateral ha assolit ser utilitzada en una àmplia varietat de mercats a nivell mundial. En la llista següent s'enumeren els segments del mercat dels quals s'utilitza la prova de flux lateral o estan en desenvolupament per utilitzar-la.

- Ciència forense
- Diagnòstic mèdic
- Industrial
- Seguretat dels aliments
- Militar/Bio defensa
- Diagnòstic del consumidor
- Sanitat dels animals
- Bancs de sang
- Agricultura
- Aqüicultura
- Medi ambiental
- Monitorització terapèutica

Com que l'aplicació de la prova es va estenent a diferents segments de mercat, augmenten les demandes del desenvolupament de la tecnologia, amb millores de la sensibilitat, la reproductibilitat i la capacitat de fabricació.

Seguidament es detalla la funció principal de la prova de flux lateral en els segments de mercat més destacats.

2.5.1 Prova de flux lateral en el diagnòstic clínic

La prova de flux lateral en el diagnòstic clínic s'utilitza principalment per reemplaçar els immunoassaigs utilitzats en laboratoris per proves descentralitzades i utilitzades en diverses localitzacions, generalment conegudes com a punt d'atenció o *Point-of-care* (POC). Aquesta prova inclou tots els immunoassaigs del tipus POC-LFA per a autodiagnòstic, que es venen sense recepta mèdica i els immunoassaigs realitzats per professionals de la salut en els laboratoris d'hospitals, sales d'hospitals, clíniques, centres de salut comunitaris i consultoris mèdics.

2.5.2 Prova de flux lateral en medicina veterinària

La prova de flux lateral s'utilitza en medicina veterinària per a fer proves en animals de granja (com per exemple vaques, porcs, aus de corral, ovelles, etc.) i també en animals domèstics (com per exemple gats, gossos, etc.) per a una varietat de condicions mèdiques que inclouen: infeccions bacterianes i víriques, al·lèrgies, problemes de fertilitat i diabetis.

2.5.3 Prova de flux lateral en la indústria alimentària i de begudes

Els problemes de seguretat alimentària i les preocupacions per la salut pública han donat lloc a una legislació més estricta en els requisits de seguretat alimentària. La legislació ha produït una major demanda de proves de patògens i toxines en tots els diferents segments de la indústria de producció d'aliments (aliments processats, carns, aus de corral, begudes i productes làctics). La prova de flux lateral es fa servir principalment per a les proves de les matèries primeres, productes intermedis en el procés de fabricació i el producte finals de bacteris com la *Listèria*, el *Escherichia coli* o la *Salmonel·la*, entre d'altres.

2.5.4 Prova de flux lateral en la indústria farmacèutica

La indústria farmacèutica en general ha estat reticent a la introducció de sistemes innovadors en el sector de fabricació i de proves, i com a conseqüència la prova de

flux lateral només ha aconseguit captar el 7% del mercat dels immunoassaigs en aquest sector.

2.5.5 Prova de flux lateral per a l'anàlisi d'aigua i la descontaminació ambiental

Els països pertanyents a la Organització de Cooperació i Desenvolupament Econòmic (OCDE) han promulgat lleis d'aigua potable. Els reglaments es difereixen d'un país a un altre però en general s'espera reduir al mínim la contaminació de l'aigua per les indústries mitjançant el control de les fonts puntuals que aboquen contaminants en llacs i rius. A causa del gran impacte que la contaminació pot tenir sobre la salut pública, la majoria de proves es porten a terme en laboratoris certificats per mètodes aprovats. La prova de flux lateral s'utilitza per a controls de la qualitat de l'aigua potable i, a més a més s'utilitza a les llars per verificar la neteja de l'aigua del pou.

2.6 El negoci de les proves de flux lateral per segments de mercat

La prova de flux lateral es comercialitza i genera un mercat. Els diners que es venen relacionats a l'oferta i la demanda del LFA es resumeixen a continuació i s'especialitzen en un quadre. Hi ha una gran demanda d'aquest tipus de proves a nivell mundial. Segons les xifres de l'any 2007, el mercat dels Estats Units d'Amèrica (EUA) va subministrar \$1.005 milions, representant el 44% del total del mercat mundial, el mercat de la Unió Europea (UE) va subministrar \$799 milions, representat el 35% del total i, finalment, la resta del món (RDM) va subministrar \$466 milions, representant el 21% del percentatge total.

La Unió Europea (UE) no és un mercat únic sinó que es tracta d'una confederació de països, que inclou els 13 països originals de la UE: Àustria, Bèlgica, Finlàndia, França, Alemanya, Grècia, Irlanda, Itàlia, Luxemburg, Països Baixos, Portugal, Espanya i el Regne Unit. El major mercat per a la prova de flux lateral és el dels Estats Units d'Amèrica. Les pressions dels costos i la gestió de la qualitat en l'assistència sanitària, la seguretat alimentària i la fabricació de productes biològics impulsen la necessitat i el desenvolupament de la prova de flux lateral.

	Vendes 2007	EUA	UE	RDM
Clínica	2.010	865	705	440
Veterinària	205	105	80	20
Alimentació i begudes	30	23	6	1
Productes farmacèutics i biològics	15	8	4	3
Ambient	5	2	2	1
Servei d'aigua	5	2	2	1
TOTAL	2.270	1.005	799	466

Figura 19. Ingressos a nivell mundial de la prova de flux lateral (LFA) per regions (en milions de \$).

Referència: Kalorama Information (<https://www.kaloramainformation.com>).

3 Realització al laboratori d'un *Lateral Flow Assay* per a *Yersinia pestis*

Aquesta pràctica consisteix en la realització d'una prova de flux lateral directa, o no-competitiva, per a la identificació del bacteri *Yersinia pestis*. Aquest bacteri ha causat un gran impacte mundial al llarg de la història de la humanitat i segueix causant moltes morts diàries arreu del món sobretot al continent africà, com s'ha comentat anteriorment a l'apartat d'epidemiologia. Mitjançant el diagnòstic que se'n deriva d'aquesta prova es pot obtenir de forma ràpida, específica i sense la necessitat d'un equipament especialitzat, essent assequible per tot tipus d'usuari, la detecció d'aquest patògen. Els preus assequibles i la seva senzilla utilització permet que persones malaltes del Tercer Món puguin tenir un diagnòstic ràpid del bacteri i rebre quan més aviat el tractament adequat per a la pesta.

S'ha de tenir en compte que en aquesta pràctica no es va poder afegir l'àrea de conjugació de les nanopartícules d'or a la tira de flux lateral com en els assajos comercials degut a que l'afegiment d'aquesta àrea no ha sigut provada encara en aquest laboratori.

LFA: Proves sensibles, específiques, ràpides, econòmiques i fàcils d'usar.

Per poder seguir amb l'explicació d'aquesta pràctica és important l'enteniment dels següents processos utilitzats al laboratori que s'explicaran detalladament a continuació.

3.1 Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa, coneguda com a PCR per les sigles angleses de *polymerase chain reaction*, és una tècnica de biologia molecular l'objectiu de la qual és obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'àcid desoxiribonucleic (ADN) específic a partir d'una quantitat mínima. Avui en dia, la tecnologia és capaç de fer la PCR a partir d'una sola còpia. El procés va ser descobert el 1983 per Kary Banks Mullis, guardonat amb el Premi Nobel de Química. Aquesta tècnica serveix per amplificar un fragment d'ADN, és a dir, fer diverses còpies de la mostra inicial. Normalment, la PCR s'utilitza per a la identificació de virus o organismes que causen malalties amb una gran precisió i d'una forma més senzilla.

La PCR s'inicia disposant en un medi l'ADN que conté la seqüència diana (seqüència de nucleòtids d'interès per amplificar), una polimerasa resistent a la calor, els quatre tipus de desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTPs), diversos segments d'ADN monocatenari complementaris dels extrems de la seqüència diana que actuen com a encebadors, ions de magnesi (Mg^{+2}) d'una solució de clorur de magnesi ($MgCl_2$) que actuen com a cofactors de la polimerasa, un amortidor de reacció que manté el pH adequat pel funcionament de l'ADN polimerasa, i Mili-Q (aigua desionitzada) que té com a funció ajustar la dissolució al volum desitjat.

A continuació s'escalfa tot a uns $90^{\circ}C$ per aconseguir la separació de les dues cadenes de l'ADN inicial. Aleshores, a cadascuna de les cadenes s'hi associa un dels dos petits segments encebadors perquè la polimerasa pugui utilitzar el conjunt com a motlle per sintetitzar la cadena complementària i fer un nou ADN de doble hèlix per acabar obtenint-ne un parell. Sense aquests segments encebadors, el DNA-polimerasa no podria exercir la seva funció. Tot aquest procés engloba el primer cicle. A continuació, es duu a terme el segon cicle en el qual s'obtenen quatre cadenes d'ADN de doble hèlix. En el tercer cicle se n'obtenen vuit, i aquest procés es va repetint contínuament. Al final, totes les cadenes porten la seqüència diana, però cada vegada la proporció de cadenes curtes on només hi ha la seqüència d'interès és més elevada, ja que els encebadors sempre es col·loquen a l'inici de la sèrie de nucleòtids la qual es vol amplificar per ser treballada.

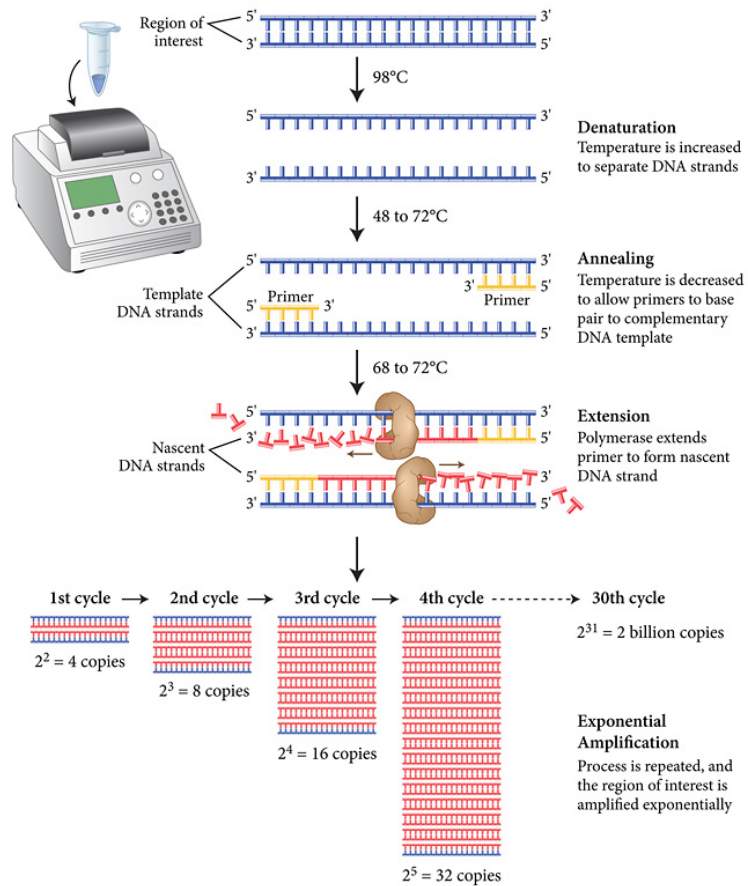


Figura 20. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

Referència: New England BioLabs[®] Inc (<https://www.neb.com>).

Al cap de 20 cicles s'obtenen un milió de còpies i, en poques hores, milers de milions de còpies. Aquest procés es fa automàticament en un termociclador. El termociclador és una màquina usada en biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els diferents cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació d'ADN.



Figura 21. Termociclador.

3.1.1 PCR en temps real

La PCR en temps real, també anomenada PCR quantitativa o qPCR, és una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que es fa servir per amplificar i quantificar, en termes absoluts, el producte de l'amplificació, l'àcid desoxiribonucleic (ADN). Igual que en la PCR convencional, s'empra un motlle d'ADN, un parell d'encebadors específics, dNTP, un amortidor de reacció adequat i una polimerasa d'ADN estable a diferents temperatures. A més a més, s'afegeix a aquesta barreja una substància marcada amb un fluorocrom, normalment Taqman® o SYBR® Green, que en un termociclador dotat de sensors per mesurar la fluorescència permet mesurar la taxa de generació de la seqüència de nucleòtids que es vol amplificar, després de ser excitat a la longitud d'ona apropiada. Aquest mesurament es fa després de cada cicle d'amplificació, motiu pel qual també se la denomina PCR en temps real.

3.2 Elaboració d'ADN sintètic

L'ADN i l'ARN eren conegudes com les úniques molècules amb la capacitat de contenir i transferir informació biològica fins l'any 2012, quan una investigació duta a terme a la Universitat British Columbia a Canadà, amb la col·laboració de la Universitat de Cambridge liderada per Philipp Holliger i Vitor Pinheiro, biòlegs del *Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology* a Cambridge, Anglaterra, van anunciar la creació d'AXN, o que és el mateix, ADN sintètic.

L'AXN és capaç d'emmagatzemar i copiar la informació genètica com si es tractés d'una molècula d'ADN o ARN i, a més a més, podria ajudar a respondre les preguntes bàsiques de la biologia i implicar-se en la biotecnologia i en la medicina.

Per a dur a terme l'elaboració de l'ADN sintètic, els investigadors van aconseguir sintetitzar sis molècules, polímers que fossin capaços de complir amb les lleis de l'herència.

Per a fer-ho, en primer lloc els científics van substituir el component natural de sucre de l'ADN, la desoxiribosa, per una de sis polímers diferents.

A continuació, l'equip liderat per Philipp Holliger i Vitor Pinheiro va dissenyar enzims denominats polimerases que podien sintetitzar AXN a partir d'ADN i altres que podien transformar AXN de nou en ADN.

Finalment, gràcies a la capacitat de copiar i traduir va permetre que les seqüències genètiques fossin copiades i transmeses contínuament, creant així una herència genètica artificial.

Entre els sis diferents tipus d'AXN provats, els investigadors van determinar que una de les versions, anomenada AHN, podia respondre a estímuls específics en un tub d'assaig i evolucionar de diferents formes d'acord a la manera en que els científics ho incentivaven. Els investigadors han estat guiant l'evolució de l'ADN natural de la mateixa forma. Aquest fet fa pensar als científics que l'AXN sintètic podria funcionar de la mateixa manera en un organisme viu. Per tant, es pot afirmar que l'AXN es capaç de comportar-se de la mateixa forma que l'ADN en condicions canviants.

Aquesta investigació ha donat a entendre que no existeix cap imperatiu perquè la vida s'hagi de basar en l'ADN i l'ARN. A causa d'aquesta deducció, molts científics s'han fet preguntes molt bàsiques de la biologia, com per exemple que la vida no va començar amb l'ADN i les proteïnes que coneixem, sinó que va començar amb quelcom molt més simple. Altres científics com Holliger, una de les persones encarregades de la investigació, explica que els resultats impliquen que pot haver altres mètodes d'emmagatzemar informació genètica diferents als que coneixem tant en el nostre planeta com en l'univers. A més a més, Holliger raona que el descobriment obre les portes a l'era de la genètica sintètica.

3.3 Elaboració d'un gel d'agarosa

L'agarosa és un polisacàrid format per galactosa alfa i beta que s'extreu de les algues dels gèneres *Gellidium* i *Gracillaria*.

L'agarosa és un producte natural que forma una matriu inerta i no tòxica que suposa una eina indispensable en gran quantitat de tècniques de biologia molecular, bioquímica i biologia cel·lular. La seva funció principal és la construcció de gels que permetin separar molècules d'ADN mitjançant electroforesi. D'aquesta forma, les mostres introduïdes al gel migraran d'un costat a un altre gràcies a l'aplicació d'un camp elèctric. Com a conseqüència d'aquesta migració, les molècules que siguin de polaritat negativa, com l'àcid desoxiribonucleic, es dirigiran cap a l'ànode. A més s'utilitza per a fixar molècules a la seva estructura com anticossos, antigens i enzims.

Per a la preparació d'un gel d'agarosa es necessari:

- Agarosa en pols.
- Una dissolució tampó o buffer, en la qual es dissol l'agarosa en pols. Serveix per embeure el gel i transmetre el camp elèctric.
- Microones o una font de calor, per barrejar i dissoldre l'agarosa en pols en el tampó.
- Cubeta i motlle per solidificar el gel.
- Pintes específiques per a l'elaboració de gels.

Primerament, es mesura la quantitat d'agarosa en pols depenent de la concentració a la qual es vulgui obtenir el gel. Quanta més concentració tingui el gel, més resolució obtindrem. Per exemple, per obtenir un gel al 2% es necessitaria 2 grams (g) d'agarosa en pols dissolts en 100 mil·lilitres (mL) de dissolució tampó. La concentració del gel s'obté mitjançant la relació pes de l'agarosa en pols/volum de la dissolució tampó. A continuació, s'aboca en un matràs el volum necessari de tampó per obtenir el gel amb la concentració desitjada. Seguidament, s'introdueix aquesta barreja en un microones durant un parell de minuts per poder dissoldre l'agarosa en pols en la dissolució tampó. Un cop dissolt l'agarosa s'aboca la dissolució en un recipient especialitzat per a l'elaboració de gels i s'hi afegeixen unes pintes específiques al recipient. Aquestes pintes tenen com a funció formar els pous del gel, que serà per on s'introduirà la mostra al gel. Finalment, es deixa el gel refredar en el motlle fins que es solidifiqui, després es treu del motlle i finalment s'introdueix en una nevera fins la seva utilització.

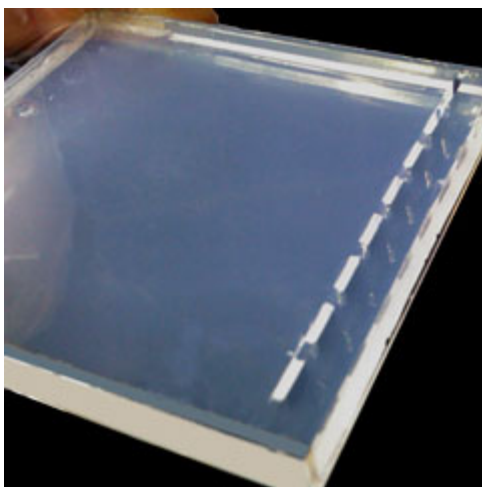


Figura 22. Gel d'agarosa.

Referència: E&S Bio Electronics Company (http://www.agarose.co.kr/html/?doc=bbs/content.php&co_id=product2).

3.4 Electroforesi

L'electroforesi és un procés en el qual es duu a terme la separació de molècules, depenent de la mobilitat que cadascuna d'elles tingui dins d'un camp elèctric.

La gran majoria de macromolècules estan carregades elèctricament i, igual que els electròlits, es poden classificar en forts i febles depenent de la constant d'ionització dels grups àcids i bàsics. Per exemple, els àcids nucleics són poliàcids forts. En general, per caracteritzar la molècula es determina la velocitat a la qual es mou en un camp elèctric. La velocitat s'utilitza per determinar, en el cas de proteïnes, la massa molecular o per detectar canvis d'aminoàcids i separar quantitativament diferents espècies moleculars; en el cas d'àcids nucleics es determina la seva mida, mesurat en parells de bases.

Aquesta separació de les molècules es pot fer en una superfície hidratada amb una base sòlida, en una matriu de tipus porós o també en dissolució. Segons el tipus de tècnica que s'utilitzi, la separació de les molècules serà en diferent proporció depenent de la càrrega elèctrica i la massa que tingui cada molècula.

Aquest fenomen electrocinètic es va observar per primera vegada l'any 1807 per Reuss, que es va adonar que l'aplicació d'un camp elèctric constant causava que partícules d'argila disperses en aigua migressin.

Més endavant a l'any 1937, Tiselius va desenvolupar una tècnica que aplicava aquest principi per a la separació de proteïnes i que el va fer mereixedor del Premi Nobel de Química. Aquesta tècnica, i les seves variants han esdevingut unes eines fonamentals en els laboratoris bioquímics gràcies a les enormes aplicacions en la indústria de la salut i mèdica, incloent els antibiòtics, l'anàlisi de la vacuna i, sobretot, l'anàlisi de proteïnes.

A més a més, l'electroforesi és un procediment molt utilitzat i important alhora d'analitzar ADN. Mitjançant aquesta tècnica, les seqüències específiques d'ADN poden ser analitzades, aïllades i clonades.

3.4.1 Electroforesi en gel

L'electroforesi en gel és una tècnica utilitzada al laboratori clínic i té, habitualment, un propòsit analític. Permet separar moltes molècules importants (aminoàcids, pèptids, proteïnes, nucleòtids, àcids nucleics) al llarg d'un camp elèctric en funció de

les seves propietats biofísiques com la seva càrrega elèctrica, el seu pes molecular i la seva velocitat de moviment, a través d'un gel sotmès a un camp elèctric.

En molts casos el gel és un polímer entrellaçat amb una densitat de porus que pot ser controlada en la creació del gel. En separar proteïnes o petites seqüències d'àcids nucleics (ADN o ARN) el gel sol estar format per diferents concentracions d'acrilamida (C_3H_5NO). En canvi, per separar llargues seqüències d'àcids nucleics (més d'un centenar de bases), s'utilitzen gels amb diferents concentracions d'agarosa. En ambdós casos, el gel formarà un sòlid de base porosa amb un aspecte semblant a la gelatina, que permetrà el pas dels components. L'electroforesi fa referència a la força electromotriu (FEM) que és emprada per empènyer o estirar les molècules a través de la matriu de gel. Col·locant les molècules en els pous dels gels i aplicant-hi un corrent elèctric les molècules es mouran a través de la matriu del gel a diferents velocitats depenent de les seves propietats biofísiques. Les molècules es dirigiran cap a l'ànode si està carregada negativament o cap al càtode si està carregada positivament. El gel d'electroforesi opera com a una cel·la electrolítica, per tant l'ànode és positiu i el càtode negatiu.

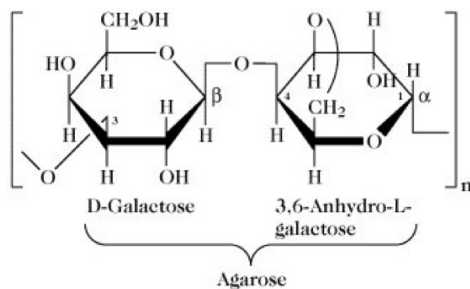


Figura 23. Estructura d'un polímer d'agarosa.

Referència: Sigma-Aldrich

(<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/agarose.html>).

Els àcids nucleics, ADN i ARN, tenen per naturalesa càrrega negativa a causa dels grups fosfats (PO_4^{3-}) que presenten a l'exterior de la molècula. Si posem fragments d'ADN extrets d'una mostra biològica sobre un suport porós (gel) i apliquem un camp elèctric, es produirà la migració diferencial dels fragments a través dels porus de la matriu. Com a conseqüència de les càrregues negatives que presenten, l'ADN i l'ARN es mouen cap a l'elèctrode positiu (ànode). A mesura que es mouen a través del gel, aquest ofereix més resistència al pas dels fragments més llargs que dels curts, amb la qual cosa els fragments queden separats d'acord amb la seva longitud. La distància recorreguda per cada fragment d'ADN és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular.

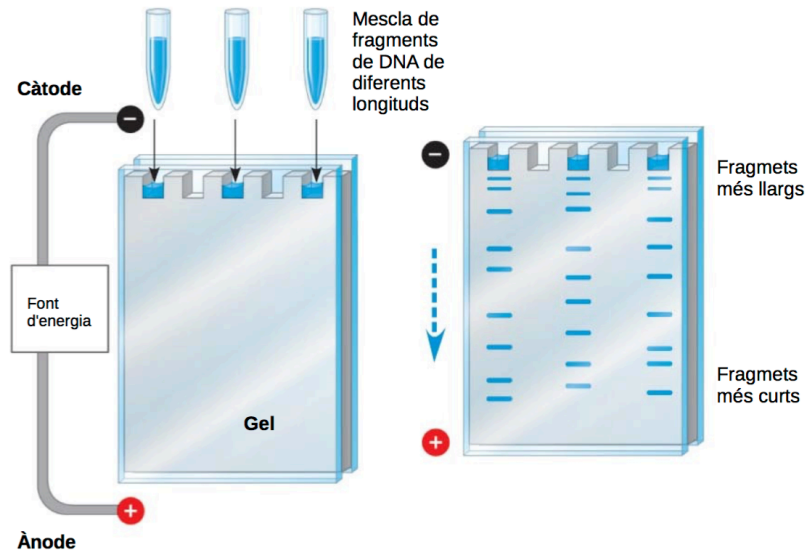


Figura 24. Es sotmet el gel a un corrent elèctric. Els fragments de DNA es mouen cap a l'elèctrode positiu. Els fragments es separen segons la seva mida, ja que els més grans migren més lentament que els més petits. D'aquesta manera s'obté un gel amb una sèrie de franges (anomenades bandes), cadascuna composta per fragments de DNA de la mateixa longitud. **Referència:** *Biologia. Campbell. Ed. Panamericana.*

En el cas dels gels d'agarosa, s'afegeix bromur d'etidi ($C_{21}H_{20}BrN_3$). Aquesta substància fluorescent s'intercala entre les bases del DNA i en exposar-se a llum ultraviolada, emet una llum vermella-taronja que s'intensifica unes 20 vegades després d'haver-se unit a una cadena d'ADN. Després de la electroforesi, es visualitza el gel amb llum ultraviolada (UV) per veure les bandes corresponents al desplaçament dels diferents fragments d'ADN sotmesos al camp elèctric.

Es pot conèixer la mida i el pes molecular dels fragments d'ADN comparant-los amb el patró de bandes que ve indicat per marcadors comercials de pes molecular conegut.

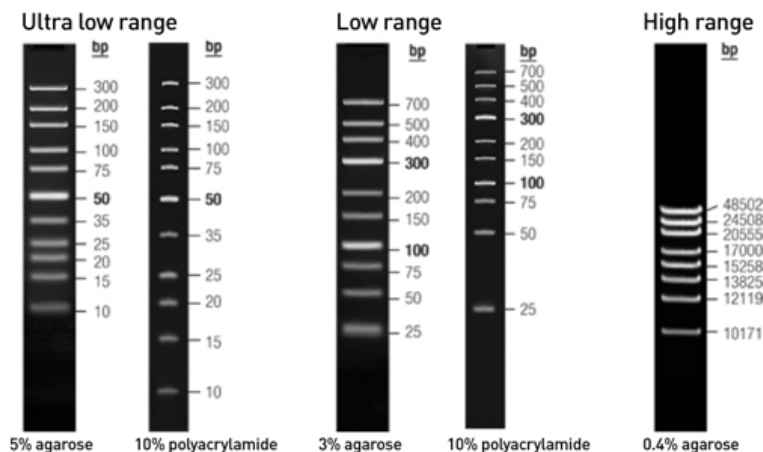


Figura 25. Diferents marcadors comercials amb les seves bandes corresponents. Indiquen els parells de bases que contenen els diferents fragments d'ADN que han estat sotmesos al camp elèctric. D'aquesta forma, si un fragment d'ADN s'esitua a la mateixa altura que una determinada banda del marcador, es podrà conèixer amb exactitud el nombre de parells de bases nitrogenades que conté. Els marcadors estan ordenats d'esquerra a dreta segons la resolució dels fragments que es vol veure, com més baix és el rang, es podran observar aquelles seqüències d'ADN petites i que disten en pocs parells de bases entre elles, mentre que en un alt rang es podran veure les seqüències més grans. Dintre de cada tipus de marcador hi ha dos models diferents, depenent de si s'ha utilitzat gel d'agarosa o gel d'acrilamida.

Referència: ThermoFisherScientific

(<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html>).

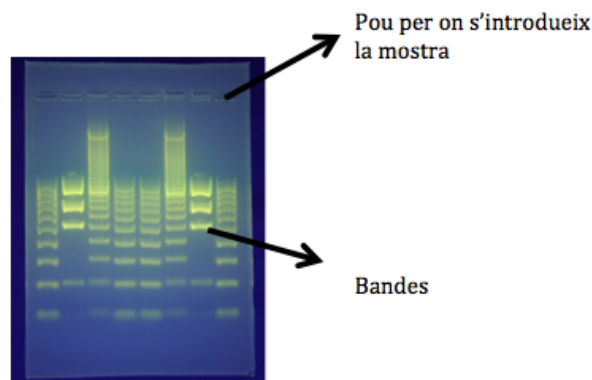


Figura 26. Les bandes es fan visibles en afegir un colorant d'unió a l'ADN. En aquest cas, el colorant mostrat adopta un color groc fluorescent quan es il·luminat amb llum ultraviolada (UV).

Referència: BiotechSpain

(https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1109tecnica_electroforesis).

L'electroforesi d'ADN és útil per comparar patrons de bandes de diferents mostres biològiques. Per exemple, es pot fer servir per comparar mostres d'individus sans davant individus malalts, per la identificació d'àcids nucleics d'agents infecciosos o per l'obtenció d'un fragment determinat d'ADN que, un cop localitzat al gel, pot ser extret per a anàlisis posteriors.

3.5 Espectrofotometria

Espectrofotometria significa “mesura de l'espectre de la llum” i es refereix a la mesura del tipus i quantitat de llum que s'obté d'una solució.

Es tracta del mesurament de la quantitat d'energia radiant que absorbeix o transmet un sistema químic en funció de la longitud d'ona. A més a més, és el mètode d'anàlisi òptic més utilitzat en les investigacions químiques i bioquímiques.

Aquesta tècnica es fonamenta en l'absorció de radiació electromagnètica per part de la matèria en diferents regions de l'espectre electromagnètic, provocant transicions entre els diferents nivells energètics de les molècules. Cada molècula tindrà un perfil espectral definit pel seus nivells energètics característics, és a dir, que cada molècula absorbirà o transmetrà un determinat tipus de radiació electromagnètica:

- **Microones:** Ones electromagnètiques la freqüència de les quals està compresa entre 300 MHz (megahertz) i 300 GHz (gigahertz), i la corresponent longitud d'ona és d'1 m a 1 mm (mil·límetre). La radiació d'aquest tipus d'ones provoca canvis en la rotació de les molècules.
- **Infraroig (IR):** Ones electromagnètiques la freqüència de les quals està compresa entre 0,3 THz (terahertz) i 385 THz, i la corresponent longitud d'ona és de 0,78 µm (micròmetres) a 1000 µm. La radiació d'aquest tipus d'ona provoca canvis vibracionals en els enllaços entre les molècules.
- **Ultraviolada (UV):** Ones electromagnètiques la freqüència de les quals està compresa entre 750THz i 3000 THz, i la corresponent longitud d'ona és de 100 nm (nanòmetres) a 400 nm. La radiació d'aquests tipus d'ona provoca canvis en l'estat electrònic de les molècules, és a dir, que la molècula varii d'orbital.

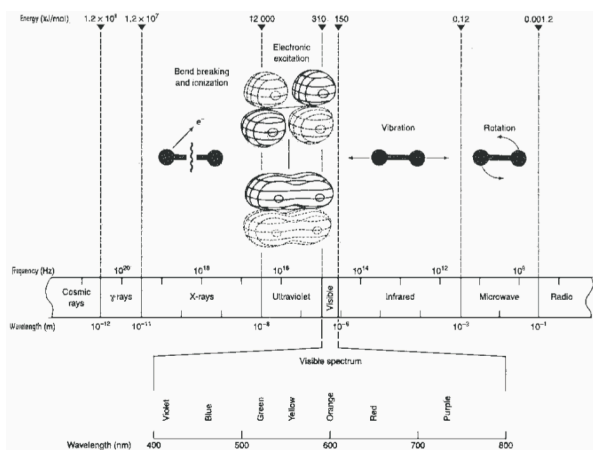


Figura 27. Espectre de radiacions electromagnètiques, juntament amb els canvis provocats per les ones electromagnètiques a determinades molècules.

Referència: *Apunts de espectrofotometria* per Florencio de la Torre, Universitat Girona.

3.5.1 Tipus d'espectrofotometries

A l'esquema següent es mostra una classificació dels diferents tipus d'espectrofotometries agrupats segons el tipus d'interacció llum-molècula (absorció o emissió) i segons la zona de l'espectre en la qual es treballa.

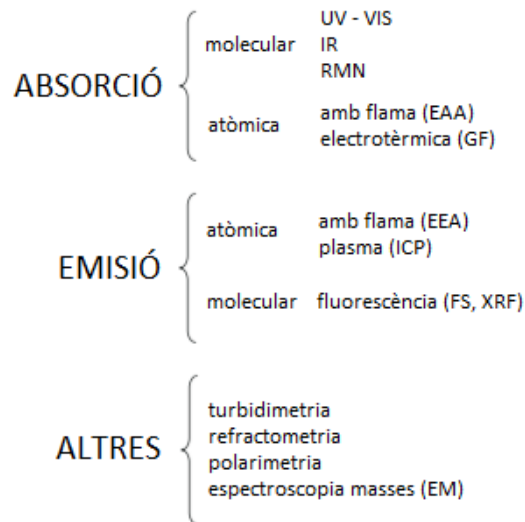


Figura 28. Classificació dels tipus d'espectrofotometria.

Espectrofotometria d'absorció molecular VIS-UV

Durant aquesta pràctica es va utilitzar l'espectrofotometria d'absorció molecular VIS-UV, per aquest motiu, a continuació es donarà una explicació detallada d'aquest tipus d'espectrofotometria.

En aquest tipus d'espectrofotometria hi ha un procés d'absorció de radiació per part de les molècules passant a un estat excitat i, en un temps molt breu, es produeix la relaxació amb emissió de l'energia en forma de calor. L'augment d'energia interna de les molècules comporta transicions electròniques. Aquestes transicions són d'electrons compartits que formen enllaços o d'electrons d'orbitals atòmics externs (no compartits).

Els principals tipus de molècules que experimenten aquest fenomen són:

- Compostos orgànics amb grups no saturats (dobles i triples enllaços) on hi ha electrons d'enllaç que poden saltar a altres orbitals d'enllaç. Aquests grups funcionals que absorbeixen en VIS o UV es diuen cromòfors.
- Compostos de coordinació de metalls de transició.
- Ions de metalls de transició, de lantànids i d'actínids.

Generalment l'absorció d'aquests compostos es produeix en diverses longituds d'ona o àmplies bandes d'absorció, per la qual cosa no hi ha pics ben definits. Això confereix poca selectivitat a la tècnica per a la identificació d'espècies químiques, sent més útil en anàlisi quantitativa.

L'instrument utilitzat és l'espectrofotòmetre visible-ultraviolada, que permet treballar amb una gran quantitat de longituds d'ona. Aquests aparells consten d'un selector de longituds d'ona i una cubeta transparent d'1 cm de costat i 3 cm d'altura on es col·loca la solució per mesurar. Normalment hi ha dos forats per a dues cubetes, un per a la mostra i un altre per a una dissolució de referència o blanc.

3.5.2 Espectrofotòmetre

L'espectrofotòmetre és el nom genèric donat a tots els aparells basats en l'espectrofotometria. A aquest terme se li afegeixen els adjectius corresponents a la subtècnica utilitzada, com ara "espectrofotòmetre d'absorció atòmica".

Es tracta d'un instrument que permet comparar la radiació absorbida o transmesa per una solució que conté una quantitat desconeguda de solut i una que conté una quantitat coneguda de la mateixa substància. Aquest instrument té la capacitat de projectar un feix de llum monocromàtica, formada per components d'un sol color, a través d'una mostra i mesurar la quantitat de llum que és absorbida per aquesta mostra. Això li permet a l'operador realitzar dues funcions:

- 1- Donar informació sobre la naturalesa de la substància en la mostra.
- 2- Indicar indirectament quina quantitat de la substància que ens interessa és present en la mostra.

Els espectrofotòmetres mesuren la potència radiant obtinguda i tenen un generador de radiació lumínica i un separador per obtenir la radiació adequada. Els components fonamentals que tenen tots els espectròmetres són:

FONT: dispositiu emissor de radiació electromagnètica. Generalment emet una banda molt àmplia de radiacions contínues al voltant de la longitud d'ona desitjada.

MONOCROMADOR (selector de longitud d'ona): tenen com a objectiu controlar la puresa de la radiació emesa aconseguint el menor ample de banda de longitud d'ona possible. Consta d'un conjunt de lents, miralls i escletxes per dispersar i separar, enfocar i restringir la radiació no desitjada.

CEL·LES PER A LA MOSTRA: recipients on es col·loca la mostra la qual es vol analitzar. Varien molt segons la tècnica utilitzada, però com a característica comuna han de ser transparents en la regió on la longitud d'ona es mesura.

DETECTOR: produeix un senyal elèctric quan rep un fotó. Aquest senyal elèctric després és convertit en unitats de potència radiant transmesa o absorbida.

REGISTRADOR: aparell on es mostren els senyals. En els instruments més antics el senyal es mostrava en un mesurador d'agulla que tenia una escala a unitats de transmitància i d'absorbància. Els instruments més moderns tenen un display digital on apareix el valor numèric d'absorbància o el valor de concentració. En el cas d'obtenir l'espectre d'absorció (en un interval de longitud d'ona concret) d'una substància, el registrador mostra una gràfica amb el valor de longitud d'ona (λ) en l'eix de les abscisses i l'absorbància en l'eix de les ordenades.

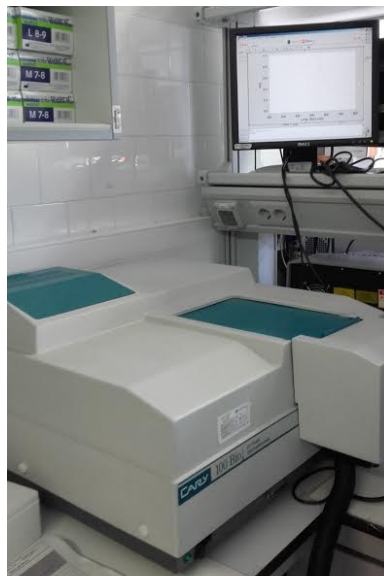


Figura 29. Espectrofotòmetre.

3.6 Assaig pràctic de *Lateral Flow Assay* per a *Yersinia pestis* al laboratori del grup Interfibio Group

L'assaig es va realitzar amb la utilització d'una seqüència d'ADN sintètic (inclosa en la figura 30) que correspon a una zona concreta del genoma del bacteri *Yersinia pestis*. Aquesta seqüència és específica d'aquest bacteri i no es troba en el genoma d'altres éssers vius, per tant, si una molècula d'ADN conté aquesta seqüència

únicament pot pertànyer al material genètic del bacteri de la pesta. Per obtenir un diagnòstic positiu es necessita la presència de la seqüència específica d'ADN d'aquest bacteri.

NOM	SEQÜÈNCIA
<i>Yersinia pestis</i>	5'-gtaataggttataaccagcgctttctatgccatattggactgcaggccagatcgcattaatgatttgagtaaatacattattaaattcagcgactgggttcgggcacat-3'
ADN (línia de test)	5'-gtcgtgactgggaaaactttttttttttt-Biotina-3'
ADN (línia de control)	5'-tgtaaacgacggccagttttttttttttt-Biotina-3'
<i>Forward Primer Yersinia pestis</i>	5'-gtaataggttataaccagcgctt-3'
<i>Reverse Primer Yersinia pestis</i>	5'-atcattatcatgtgcccgaac-3'
<i>Forward Primer Yersinia pestis amb cues</i>	5'-gttttcccagtcacgac-C3-gtaataggttataaccagcgctt-3'
<i>Reverse Primer Yersinia pestis amb cues</i>	5'-tgtaaacgacggccagt-C3-atcattatcatgtgcccgaac-3'
ADN conjugat amb les nanopartícules d'or	5'-actggccgctgtttacattttttttttt-Tiol-3'

Figura 30. Seqüències utilitzades en aquesta pràctica

Aquesta seqüència específica es troba en molt baixes concentracions i és un problema ja que per identificar la seqüència correctament al diagnòstic, és necessària una prèvia amplificació, és a dir, obtenir moltes còpies de la mateixa seqüència d'ADN. Es va dur a terme aquesta amplificació mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), més concretament, es va utilitzar la seva variant anomenada PCR en temps real que ens permet quantificar en termes absoluts l'àcid desoxiribonucleic (ADN) amplificat.

Per a fer correctament la detecció en la prova de flux lateral del bacteri *Yersinia pestis* es necessària la utilització d'encebadors amb "cues" específiques (fragments d'ADN) a la PCR. Hi ha dos tipus de "cues" segons l'encebador, el **Forward Primer de *Yersinia pestis*** (DNA encebador davanter) i el **Reverse Primer de *Yersinia pestis*** (DNA encebador darrer). Les "cues" dels encebadors es necessiten per poder

unir, per una banda, l'ADN del *Yersinia pestis* amplificat mitjançant la PCR amb l'ADN immobilitzat a la línia de test situada a la membrana del lateral flow assay (LFA) i, per l'altra banda, l'ADN del bacteri amb l'ADN immobilitzat a les nanopartícules d'or, com es mostra en la **figura 31**.

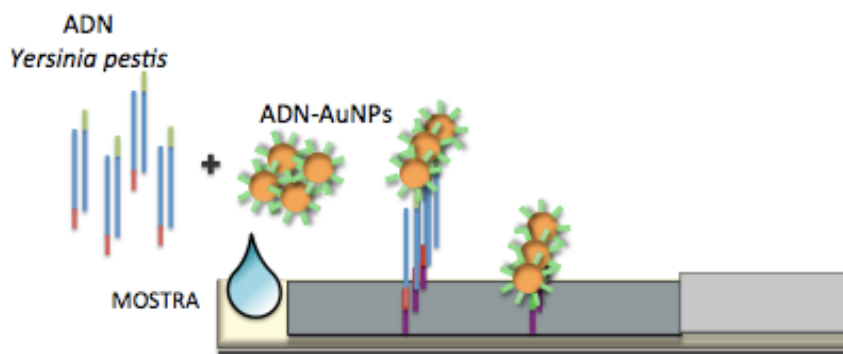


Figura 31. Esquema on s'hi representa una tira d'una prova de flux lateral. Els fragments en verd i vermell als extrems de l'ADN *Yersinia pestis* representen les "cues" dels encebadors. A continuació, s'observa com la "cua" vermella s'uneix a l'ADN immobilitzat a la línia de test de la membrana i la "cua" verda s'uneix a l'ADN immobilitzat a les nanopartícules d'or (ADN-AuNPs).

3.6.1 PCR utilitzant encebadors sense "cues"

Prèviament a la realització de la PCR emprant encebadors amb "cues", es va fer una PCR utilitzant encebadors estàndards i sense "cues" amb la finalitat de comprovar si totes les seqüències estaven dissenyades correctament per tal de poder amplificar l'ADN del *Yersinia pestis*. Es van preparar 50µl de Master Mix (MM), nom donat a la solució formada amb tots els elements necessaris per a realitzar correctament la PCR. Els elements utilitzats, conjuntament amb les seves concentracions, les quantitats i les seves funcions corresponents són citats en la taula següent:

	50 µ L Master Mix (MM)
Buffer PCR (solució tampó) amb una concentració 5x <u>Fórmula utilitzada:</u>	10 µl
$\frac{\text{Concentració final} \times \text{Volum final}}{\text{Concentració inicial}} = \text{Volum inicial}$	

$\frac{1x \times 50\mu l}{5x} = 10\mu l$ <p><u>Funció:</u> Dóna les propietats idònies pel bon funcionament de la PCR.</p>	
<p>Clorur de magnesi (MgCl₂) amb una concentració de 50 mil·limolar (mM)</p> <p><u>Funció:</u> Permet el funcionament de la <i>Tfi polymerase</i>.</p>	5 µl
<p>Nucleòtids trifosfats (dNTPs) amb una concentració de 2mM</p> <p><u>Funció:</u> Són les unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics, és a dir, que els àcids nucleics estan formats per l'encadenament de nucleòtids i són necessaris perquè la polimerasa pugui sintetitzar, a partir de la cadena motlle, la cadena d'ADN complementària.</p>	5 µl
<p>Forward Primer de <i>Yersinia pestis</i> (ADN encebador davanter) amb una concentració de 10 µM (seqüència inclosa en la figura 30)</p> <p><u>Funció:</u> És una cadena d'àcids nucleics que serveix com a punt d'inici per a la replicació de l'ADN. És necessari a causa del fet que els enzims que catalitzen la replicació, les ADN polimerases, només poden afegir nucleòtids nous a una cadena ja existent d'ADN. La polimerasa inicia la replicació a l'extrem 3' de l'encebador, i fa una còpia de la cadena motlle. Es tracta d'un encebador específic que es col·loca al davant de la cadena motlle.</p>	1 µl
<p>Reverse Primer de <i>Yersinia pestis</i> (DNA encebador darrer) amb una concentració de 10 µM (seqüència inclosa en la figura 30)</p> <p><u>Funció:</u> Té la mateixa funció que el Forward Primer. La diferència respecte el Forward Primer és que, en aquest cas, l'encebador es col·loca en la part de darrere per sintetitzar la doble cadena d'ADN.</p>	1 µl
<p>BSA (albúmina de sèrum boví) amb una concentració de 50 mg/ml</p> <p><u>Funció:</u> Proteïnes que eviten que l'ADN s'uneixi al plàstic del tub d'assaig.</p>	0,5 µl

<p>Tfi DNA polymerase (polimerasa)</p> <p><u>Funció:</u> La Tfi polimerasa es una polimerasa específica termoestable, és a dir, capaç d'actuar a les altes temperatures de la PCR. És l'enzim principal per al procés de replicació d'ADN. A partir d'un filament d'ADN anomenat filament patró, el Tfi DNA-polimerasa és capaç de sintetitzar un nou filament d'ADN complementari al filament patró.</p>	<p>0,5 μl</p>
<p>Milli-Q (Aigua desionitzada)</p> <p><u>Funció:</u> Omple la dissolució fins ajustar al volum de MM desitjat</p>	<p>27 μl</p>

Figura 32. Taula amb els elements, concentracions, quantitats utilitzats durant la PCR emprant encebadors sense "cues"

Un cop preparada la solució Master Mix (MM), es van separar els 50 μ l en dos tubs. En el primer tub, anomenat positiu (+), s'hi van introduir 22,5 μ l de MM i 2,5 μ l de l'ADN que es vol amplificar amb una concentració de 10nM. En el segon tub, anomenat negatiu (-), s'hi van introduir 22,5 μ l de MM i 2,5 μ l de Milli-Q. El tub negatiu serveix per comprovar que els reactius utilitzats no estan contaminats i la amplificació del tub positiu es donada per l'ADN incorporat i no per algun reactiu contaminat.

La PCR es va dur a terme en un termociclador del laboratori i es van introduir els dos tubs prèviament preparats dins del termociclador. El procés de la PCR en temps real consisteix en una sèrie de canvis de temperatura repetits anomenats cicles. Prèviament consisteix en una etapa de dos minuts en la qual la temperatura és de 95°C i serveix per desnaturalitzar tot l'ADN. Després va seguida d'una segona etapa caracteritzada per 3 subetapes que es repetiran depenent els cicles que es necessitin per amplificar l'ADN. En aquesta pràctica es van realitzar 15 cicles. Durant la primera subetapa, també anomenada etapa de desnaturalització, es va mantenir una temperatura al voltant dels 95°C. Després, en la segona etapa, anomenada alineament o unió del encebador, es basa en la temperatura idònia per a que el encebador s'uneixi a la cadena d'ADN, essent en aquest cas de 58°C. Finalment es du a terme la tercera etapa, anomenada extensió o elongació de la cadena, que es dona a 72°C. Un cop acabats els 15 cicles es va deixar durant 5 minuts més a 72°C per tal d'aconseguir que totes les cadenes d'ADN s'acabessin de formar correctament.

El nombre de repeticions, la temperatura i el temps de cada etapa estan recollits en la següent taula.

REPETICIONS	TEMPERATURA (°C)	TEMPS
1x	95 °C	2 min
15x	95 °C	30 segons
	58 °C	30 segons
	72 °C	30 segons
1x	72°C	5 min

Figura 33. Temps, temperatura i repeticions de les etapes de la PCR

A continuació es va dur a terme una electroforesi de l'ADN del *Yersinia pestis* amplificat per comprovar si l'amplificació de la mostra s'havia realitzat correctament. Per mitjà d'una pipeta es va barrejar 8µl del producte del tub positiu amb 4µl de *Loading buffer* (colorant format per glicerol (C₃H₈O₃) i utilitzat amb la finalitat de poder veure per on corre l'ADN en el gel, així com per mantenir l'ADN dins el pou del gel) i es va introduir dins del segon pou de l'esquerra del gel d'agarosa, prèviament elaborat. També per mitjà d'una pipeta es va barrejar 8µl del producte del tub negatiu amb 4µl de *Loading buffer* i es va introduir dins del tercer pou del gel d'agarosa. En el primer pou començant per l'esquerra del gel d'agarosa s'hi va introduir per mitjà d'una pipeta l'ADN *ladder* (marcador comercial utilitzat de referència per saber si el producte amplificat es l'adequat basant-se en la mida que s'espera d'ell). El gel d'agarosa es va introduir a la cubeta d'electroforesi durant 15 minuts. Seguidament es va dipositar el gel dins d'un lector de gels de raigs ultraviolats pel qual es va poder observar les bandes corresponents al desplaçament dels fragments d'ADN sotmesos al camp elèctric (**figura 33**).

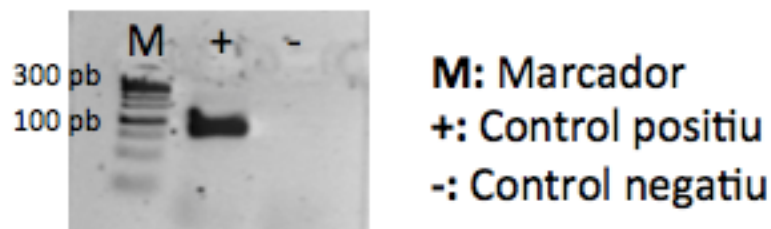


Figura 34. Com es veu en la figura, el marcador (ADN ladder) correspon a la primera columna, amb les diferents bandes de fragments de DNA indicant les concentracions de parells de base (pb) dels fragments d'ADN dependent de l'atura que es situïn. En la segona línia es pot observar el control positiu corresponent al ADN del *Yersinia pestis* amplificat. L'electroforesi en gel d'agarosa demostra i confirma que els fragments d'ADN amplificat

tenen una concentració de 100 parells de base (pb). En el control negatiu s'observa que no hi ha cap banda, la qual cosa confirma que no hi ha hagut cap contaminació amb altres molècules d'ADN durant tot aquest procés i que la PCR realitzada és correcta.

3.6.2 PCR utilitzant encebadors amb “cues”

Un cop realitzada aquesta primera part, es va realitzar una segona PCR utilitzant encebadors amb “cues” d'ADN específics. Com s'ha mencionat anteriorment, aquestes “cues” dels encebadors són necessàries per poder detectar l'ADN del bacteri *Yersinia pestis* amplificat en la prova de flux lateral. D'aquesta forma, una “cua” dels encebadors és complementària a l'ADN immobilitzat en la línia de test i l'altra “cua” és complementària a l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. Per aquesta PCR es van voler preparar 300µl de Master Mix (MM). Els elements i les quantitats utilitzades estan citats en la llista següent:

	300 µl Master Mix (MM)
Buffer PCR (dissolució tampó) amb una concentració 5x	60 µl
Clorur de magnesi (MgCl ₂) amb una concentració de 50mM	30 µl
Nucleòtids trifosfats (dNTPs) amb una concentració de 2mM	30 µl
Forward Primer de <i>Yersinia pestis</i> (ADN encebador davanter) amb una concentració de 10 µM i amb una “cua” específica	6 µl
Reverse Primer de <i>Yersinia pestis</i> (ADN encebador darrer) amb una concentració de 10 µM i amb una “cua” específica	6 µl
BSA (albúmina de sèrum boví) amb una concentració de 50 mg/ml	3 µl
<i>Tfi DNA polymerase</i> (polimerasa)	3 µl
Milli-Q (Aigua desionitzada)	162 µl

Figura 35. Taula amb els elements, concentracions i quantitats utilitzats durant la PCR emprant encebadors amb “cues”

Molts d'aquests elements estan congelats per a poder conservar-los durant més temps en bon estat. Per aquest motiu, abans d'utilitzar-los es voltegen amb el vòrtex (figura 36) per descongelar-los.

Els 300 μ l de la Master Mix (MM) es van dividir en quatre tubs. Els tres primers tubs



Figura 36: Vòrtex

es van anomenar positius i en cada tub s'hi van barrejar 95 μ l de la MM amb 5 μ l de la mostra d'ADN. L'últim tub es va anomenar negatiu i té com a funció comprovar mitjançant l'electroforesi si durant la PCR la mostra d'ADN amplificat ha sofert algun tipus de contaminació. D'aquesta forma, si a l'hora d'efectuar l'electroforesi s'observa una banda en la tira del gel corresponent al contingut del tub negatiu, es podrà afirmar que hi ha hagut una contaminació. El tub negatiu serveix per confirmar que l'amplificació no ha sofert cap contaminació d'ADN diferent

al d'interès. En el tub negatiu s'hi barregen 30 μ l de la MM amb 65 μ l de Milli-Q.

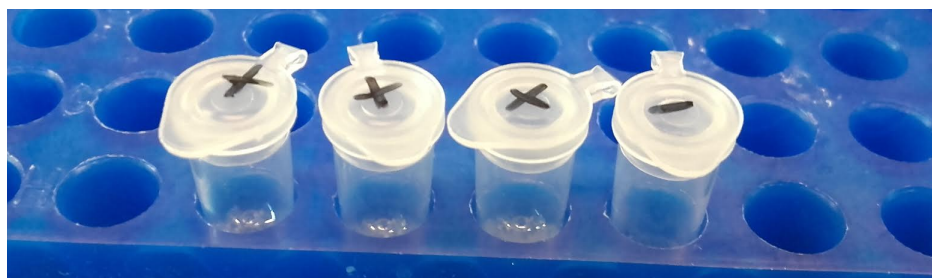


Figura 37. 300 μ l de la Master Mix (MM) dividits en quatre tubs

A continuació, es van col·locar els quatre tubs al termociclador per poder amplificar les mostres contingudes en cada tub. El nombre de repeticions, les diferents temperatures i el temps de cada etapa corresponen amb els mateixos valors utilitzats en la primera PCR, i estan recollits en la figura 33.

Un cop amplificades les mostres, es va comprovar si ha estat correcta la PCR en temps real i si no hi ha hagut cap tipus de contaminació mitjançant l'electroforesi. Mitjançant una pipeta es va introduir en el primer pou de l'esquerra del gel d'agarosa 5 μ l de DNA ladder barrejat amb 4 μ l de Loading buffer. En els tres pous del gel següents s'hi van introduir 5 μ l de la mostra amplificada barrejats amb 4 μ l de loading buffer de cadascun dels tubs positius. Finalment, en l'últim pou del gel s'hi va introduir mitjançant una pipeta graduada 5 μ l de la mostra del tub negatiu barrejat

amb 4 μ l de Loading buffer. El gel d'agarosa es va introduir a la cubeta d'electroforesi durant 10 minuts amb un voltatge de 100 volts (V). Seguidament es va dipositar el gel dins d'un lector de gels de raigs ultraviolats pel qual es va poder observar les bandes corresponents al desplaçament dels fragments d'ADN sotmesos al camp elèctric.

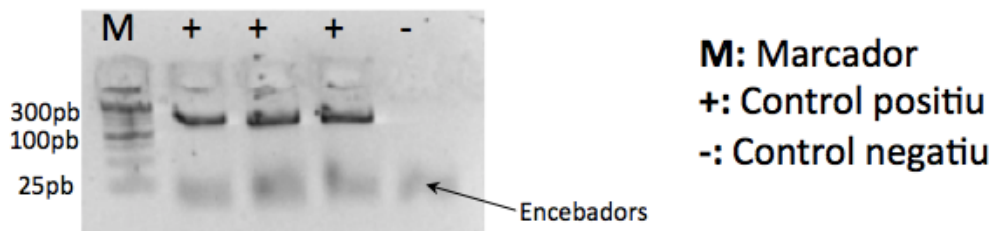


Figura 38. Imatge duta a terme mitjançant un lector de gels de raigs ultraviolats. En el primer pou s'hi situa el DNA ladder o marcador, en els tres pous següents s'hi situen les mostres dels tubs positius i en l'últim pou del gel s'hi situa el contingut del tub negatiu. Les bandes més fosques corresponen als fragments d'ADN del bacteri *Yersinia pestis* amplificats amb una mida de 200 parells de base (pb) aproximadament. A l'ànode (+) es situen els encebadors utilitzats durant la PCR. Es tracta de petits fragments d'ADN amb una concentració de pb i un pes molecular molt baix, per aquest motiu es desplacen amb més facilitat cap al pol positiu del camp elèctric degut a la carrega negativa que posseeixen en general.

Un cop comprovat que els productes s'havien amplificat de forma correcta, es van ajuntar les mostres dels tres tubs positius en un sol tub. A continuació es van seguir les indicacions del kit de purificació d'ADN per poder purificar i concentrar el producte amplificat. Dit en altres paraules, per poder treure les restes d'encebadors i reactius utilitzats durant la PCR i obtenir únicament les seqüències de l'ADN amplificades per tal de poder detectar-les en les proves de flux lateral. Les indicacions del kit, anomenat Clean & Concentrator™, van ser les següents:

1. Barrejar el volum total de la mostra amb DNA *binding buffer*, amb un volum cinc vegades més gran que el volum de la mostra.
2. Transferir aquesta barreja a una columna del kit, anomenat Zymo-Spin™.
3. Centrifugar la barreja durant 30 segons a 14.000 rpm (revolucions per minut) en un centrifugador, i descartar el líquid restant en el tub.

4. Afegir 200 μ l de *Washing buffer*, i centrifugar durant 30 segons més. Descartar el líquid que ha quedat en el tub i repetir aquest pas una segona vegada.
5. Afegir 10 μ l d'aigua filtrada i desionitzada (Milli-Q), deixar la barreja en repòs durant 1 minut a temperatura ambient i centrifugar 30 segons.
6. El líquid que ha quedat en el tub és l'ADN amplificat purificat i concentrat.

3.6.3 Elaboració gel d'agarosa

Un cop finalitzada la PCR es va elaborar un gel d'agarosa amb una concentració del 3%. En el punt 3.3 es dóna una explicació detallada sobre la realització d'aquest producte. Mitjançant una balança es van pesar 1,3 grams d'agarosa en pols, i es va diluir en un recipient de 50 mil·lilitres (mL) de solució tampó de 1x Tris-Borat-EDTA, també anomenat 1x TBE. Un cop feta la dilució, el líquid va ser escalfat al microones fins que es tornès viscos. Seguidament es va afegir al recipient 3 μ l de Gel Red, colorant que se intercala entre les bases de l'ADN i que permet visualitzar mitjançant el trans-il·luminador (aparell que aplica raigs ultraviolats) el desplaçament efectuat per l'ADN en el gel. Seguidament es va afegir la solució al recipient d'elaboració de gels prèviament preparat amb les pintes i es va deixar reposar durant 10 minuts a temperatura ambient fins que es va solidificar. Finalment es va posar el gel solidificat a la nevera fins la seva utilització per mantenir-lo en bones condicions.



Figura 39. Recipient d'elaboració de gels amb les corresponents pintes.

3.6.4 Conjugació de les nanopartícules d'or amb ADN

En les proves de flux lateral s'utilitzen nanopartícules d'or per poder immobilitzar l'ADN complementari a l'ADN immobilitzat a la línia de control i a l'ADN de la "cua" de l'ADN del bacteri *Yersinia pestis*. Aquestes nanopartícules d'or amb ADN tenen com a funció confirmar que la prova de flux lateral funciona de forma correcta. La prova de flux lateral es tracta d'un assaig colorimètric, és a dir, que la detecció del bacteri *Yersinia pestis* es realitzarà mitjançant la visualització de colors.

Per poder conjuguar l'ADN a nanopartícules d'or és necessari que aquest ADN estigui modificat amb un grup tiol (grup funcional format per un àtom de sofre i un àtom d'hidrogen [-SH]). Aquest grup funcional s'unirà de forma covalent, és a dir, compartint electrons, a l'or localitzat a la superfície de les nanopartícules. Es va seguir rigorosament els següents passos perquè aquesta unió entre el grup tiol de l'ADN i l'or de les nanopartícules es dugués a terme. Primerament, es va tractar l'ADN modificant amb un grup tiol amb TCEP un agent reductor, és a dir, element capaç de transferir electrons a un altre element anomenat oxidant, en aquest cas el



Figura 40. *Dynal Sample Mixer*

grup tiol, que permet que el grup tiol de l'ADN s'uneixi millor a les nanopartícules d'or. D'aquesta forma es van barrejar 2 μ l de TCEP (10 mM) amb 98 μ l d'ADN amb una concentració de 15 micromolar (μ M), i es va deixar aquesta dissolució donant voltes en una màquina anomenada *Dynal Sample Mixer* (figura 40) durant una hora.

Un cop transcorregut aquest temps, es va afegir 1 mL de nanopartícules a la solució i es va deixar durant 24 hores en repòs. Passat aquest temps, es va anar afegint sal (clorur de sodi [NaCl]) cada 20 minuts fins arribar a una concentració final de 0,7 molar (M), amb l'objectiu d'estabilitzar les nanopartícules i evitar que s'agreguessin entre elles. La sal es va anar introduint lentament, per a fer possible l'estabilització. També es va comprovar que les nanopartícules no s'havien unit entre elles, observant el color de la solució. En el cas que les nanopartícules s'haguessin agregat entre elles, la solució hauria canviat de vermell, el seu color original, a violeta. Un cop es va arribar a una concentració de 0,7M, es va deixar la solució en

repòs durant 24 hores més. A continuació, es va centrifugar el conjugat, durant 30 minuts a 15.000rpm en la centrifugadora. Seguidament es va rentar amb 500 μ l de Milli-Q, es va centrifugar una segona vegada i es va repetir el mateix procés una tercera vegada. Després de tres rentades de Milli-Q, les nanopartícules d'or van ser dissoltes en aigua i guardades en la nevera fins la seva utilització.

3.6.5 Comprovació de la conjugació de les nanopartícules d'or amb l'ADN

Es van realitzar diferents mètodes per poder comprovar si la conjugació de les nanopartícules d'or amb l'ADN s'havia realitzat correctament. Per poder fer aquesta comprovació també es van utilitzar nanopartícules d'or sense ADN com a control.

En primer lloc, es va fer una electroforesi amb les nanopartícules d'or amb ADN (ADN-AuNPs) i amb les nanopartícules d'or soles (AuNPs) utilitzant el gel d'agarosa del 3% de concentració prèviament elaborat i guardat a la nevera. Es van utilitzar tres carrils en aquesta electroforesi, en el carril M, mitjançant una pipeta es va introduir el DNA ladder o marcador de pes molecular, indicador de les concentracions de parells de base (pb) dels fragments d'ADN, per poder confirmar que la banda obtinguda per l'ADN amb les nanopartícules d'or del carril 1 és l'esperada. En el carril 1, es va introduir mitjançant una pipeta graduada una barreja de 10 μ l de la mostra d'ADN-AuNPs i 4 μ l de blau bromofenol (loading buffer), colorant utilitzat per indicar en el gel el desplaçament de l'ADN amb les nanopartícules d'or. Finalment, en el carril 2, es va introduir mitjançant una pipeta una barreja de 10 μ l de la mostra amb nanopartícules d'or soles i 4 μ l de blau bromofenol. Les nanopartícules d'or sense ADN no es desplacen en una electroforesi, per tant, si es queden en el mateix lloc que l'inicial es pot confirmar que

no hi ha cap fragment d'ADN contaminant en la mostra. L'electroforesi va durar 30 minuts a 10V (volts). Un cop finalitzada l'electroforesi, es va introduir en la màquina lector de gels d'electroforesi, que mitjançant els raigs ultraviolats es va poder veure que únicament el conjugat era visible, degut a que tenia l'ADN unit covalentment a les partícules d'or. (figura 42)



Figura 41. Màquina lector de gels (a la dreta) i eines per a la realització de l'electroforesi (a l'esquerra).

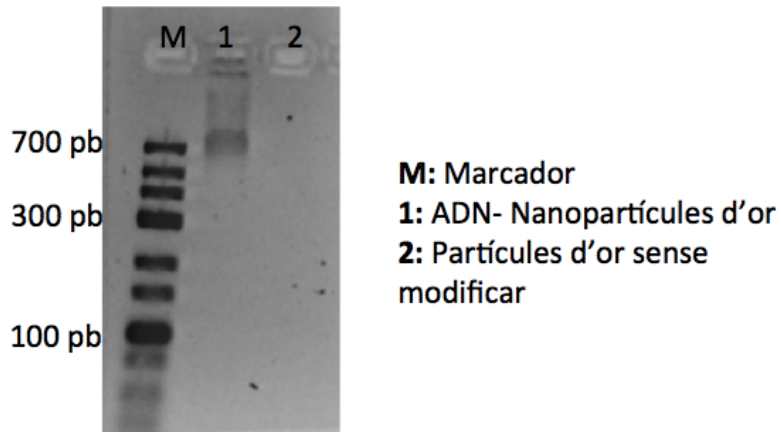


Figura 42. Imatge duta a terme mitjançant un lector de gels de raigs ultraviolats. En el carril M es situa el DNA ladder o marcador de pes molecular, en el carril 1 es situa el ADN-AuNPs i en el carril 2 es situa AuNPs. Únicament es desplacen les nanopartícules amb ADN, per la qual es demostra que la conjugació ha estat correcta. Que no hi hagi hagut cap desplaçament al carril 2, també ens demostra que únicament en aquell carril hi ha nanopartícules d'or soles. Si hi hagués hagut algun fragment d'ADN contaminant, en el carril 2 s'hi mostraria una banda. L'ADN de les nanopartícules d'or té una concentració de 700 pb (parells de base), dada que demostrada pel marcador de pes molecular. En aquest cas l'ADN es situa molt més amunt del gel perquè està unit amb les partícules d'or, essent tot el conjunt molt més gran i per tant, corre molt més a poc a poc pel gel.

També es va dur a terme una segona fotografia utilitzant la càmera mòbil per veure el desplaçament de l'ADN amb les nanopartícules d'or a ull nu (**figura 43**).

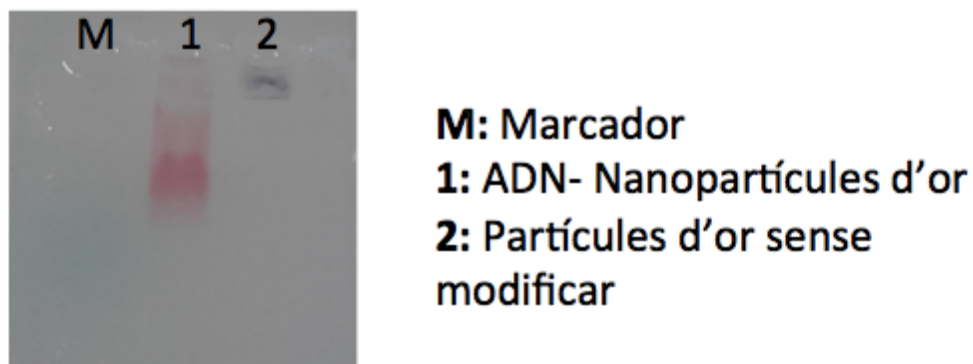


Figura 43. Fotografia realitzada mitjançant la càmera d'un mòbil. S'observa a ull nu que en el carril 1 hi ha hagut desplaçament de l'ADN-AuNPs i que en el carril 2 les Au-NPs s'han mantingut en la seva posició inicial.

Una altra metodologia per comprovar si el conjugat elaborat és correcte és la utilització de l'espectrofotòmetre. Es va utilitzar l'espectrofotòmetre Agilent Cary 100/300 Series UV-VIS, que empra l'espectrofotometria d'absorció molecular VIS-UV (explicació detallada en el **punt 3.5**). Prèviament a la seva utilització, ja es sabia que la longitud d'ona de les partícules d'or es detecta a 520 nanòmetres (nm) i que la longitud d'ona de les molècules d'ADN es detecta a 260nm. Per tant, la gràfica de les AuNPs només tindria un pic a 520nm, mentre que les ADN-AuNPs tindria dos pics, un a 520nm corresponent a les nanopartícules d'or i un altre pic a 260nm corresponent a les molècules d'ADN. Un cop introduïdes les dues mostres a l'espectrofotòmetre es va comprovar que els pics de les gràfiques (**figura 44**) eren correctes i com a conseqüència que la conjugació també ho era.

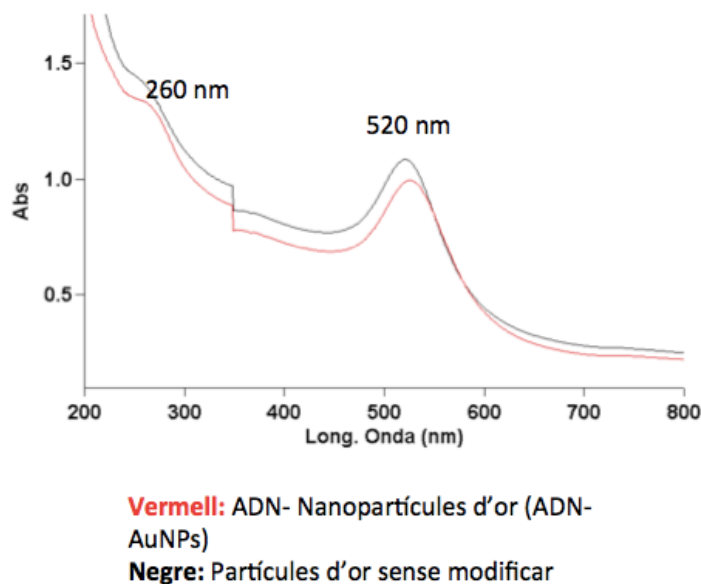


Figura 44. Gràfiques dutes a terme mitjançant l'espectrofotòmetre Agilent Cary 100/300 Series UV-VIS de la Universitat Rovira i Virgili. La gràfica vermella correspon a la mostra amb ADN-AuNPs i s'observa que té dos pics, un a 520nm corresponent a les nanopartícules d'or i un altre pic a 260nm corresponent a les molècules d'ADN. La gràfica negra correspon a les AuNPs soles i només té un pic a 520nm corresponent a les nanopartícules d'or.

3.6.6 Elaboració de les tires de la prova de flux lateral o *Lateral Flow Assay*

Les tires de la prova de flux lateral es basen en la immobilització de molècules d'ADN biotinitades, és a dir, unides de forma covalent a una proteïna de biotina. Les línies de test i de control estan formades per ADN amb aquesta modificació. En la

línia de test, l'ADN immobilitzat és complementari a la "cua" en la regió 5' de l'ADN amplificat en la PCR, mentre que a la línia de control, l'ADN immobilitzat és complementari a l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or (AuNPs), amb l'objectiu de comprovar si la prova està funcionant de forma correcta. L'ADN conjugat a les nanopartícules d'or també és complementari a l'altra "cua" en la regió 3' de l'ADN amplificat. Per tant, l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or s'unirà a l'ADN amplificat formant una hibridació (*Tècnica consistent a separar dos brins d'àcid desoxiribonucleic i associar-los posteriorment amb brins d'àcid desoxiribonucleic o d'àcid ribonucleic d'altres espècies d'individus, o bé del mateix*²) en forma de sandvitx en la línia de test, i també s'unirà a l'ADN immobilitzat a la línia de control, generant en ambdós casos una línia vermella visible a ull nu.

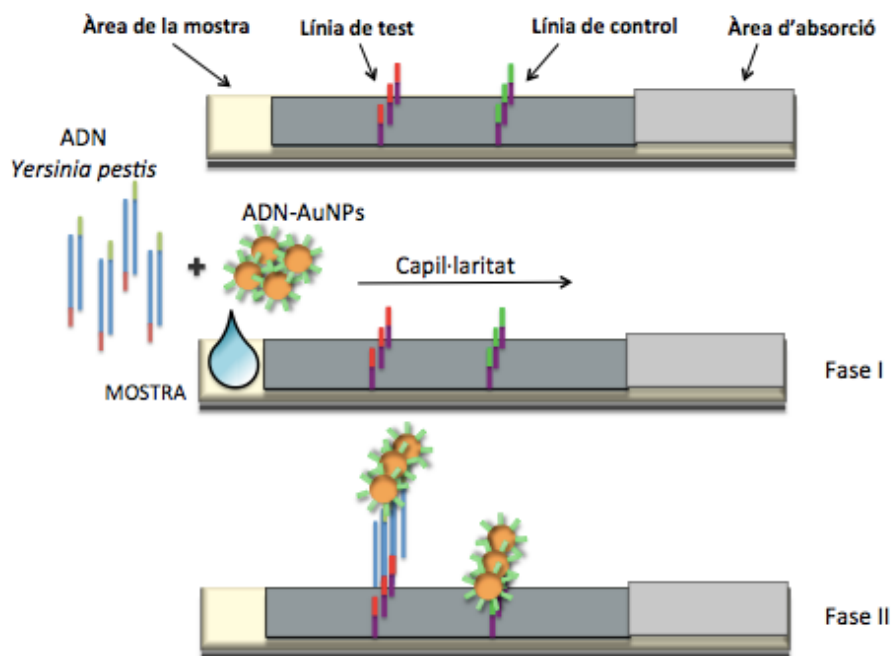


Figura 45. Esquema on s'hi representen tres tires de la prova de flux lateral. En la primera tira s'hi representen les diferents àrees de les quals està formada la tira, i en la segona i tercera tira s'hi representa una mateixa tira en diferents fases. Les figures situades a les línies de test i de control representa l'ADN immobilitzat. En la primera fase de s'hi situa una mostra, formada per l'ADN *Yersinia pestis* amplificat i ADN conjugat a les nanopartícules d'or, en l'àrea de la mostra. Aquesta mostra es desplaça per capil·laritat al llarg de la tira. En la línia de test hi ha un sandvitx format per la unió de l'ADN immobilitzat amb l'ADN amplificat, i aquest últim amb l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. L'ADN immobilitzat en la línia de control s'uneix únicament a l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or.

² *Diccionari de la llengua catalana*. Barcelona: Institut d'estudis catalans

Per fer la prova es necessiten dues tires, la primera positiva i la segona negativa. En la tira positiva la mostra utilitzada estarà formada per l'ADN *Yersinia pestis* amplificat i l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. Quan la mostra es desplaça per capil·laritat per sobre de la tira, a la línia de test es formarà el sandvitx compost per l'ADN immobilitzat a l'ADN amplificat, i aquest últim unit a l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. A la línia de control, únicament s'unirà a l'ADN immobilitzat l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. Aquesta línia serveix per comprovar que la tira funciona de forma correcta. Un cop la mostra hagi arribat al final de la tira i s'hagi assecat, es podrà veure a ull nu dues línies de color vermell sobre la tira, un corresponent a la línia de test i l'altre a la línia de control. En el cas que només aparegués una línia vermella en el control voldria dir que la mostra conté l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or i que la tira funciona correctament, però que l'ADN amplificat no correspon amb l'ADN *Yersinia pestis*, i que per aquest motiu no s'uneix a l'ADN immobilitzat a la línia de test. Si no apareix cap línia a la tira significa que l'assaig és invàlid ja que no funciona adequadament.

En la tira negativa la mostra utilitzada estarà formada únicament per l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or. En aquesta tira només apareixerà una única línia vermella sobre la línia de control, que té com a objectiu confirmar que la mostra no està contaminada i que la unió entre l'ADN immobilitzat a la línia de control i l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or es compleix. Per tant, té la funció de confirmar que l'assaig funciona correctament.

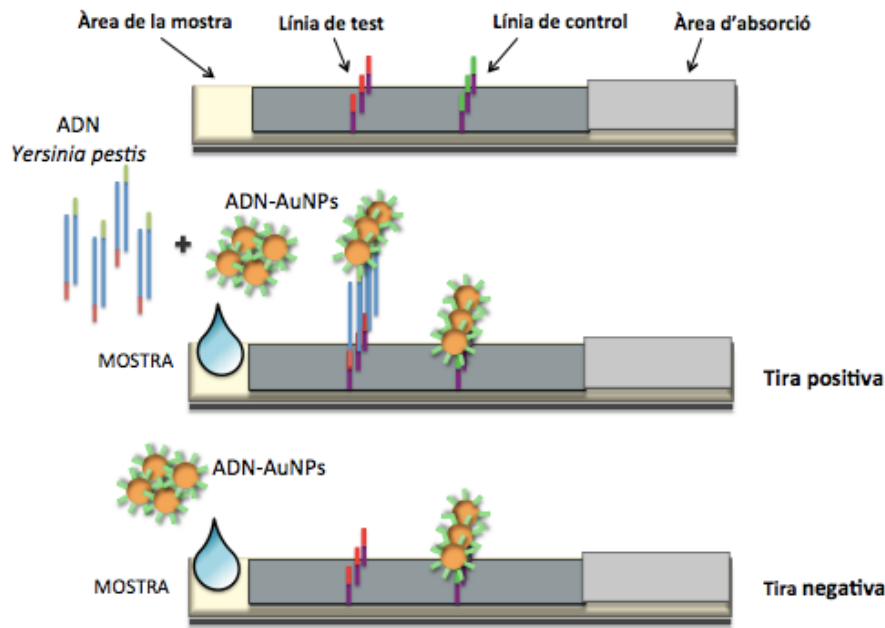


Figura 46. Esquema on s'hi representen tres tires de la prova de flux lateral. En la primera tira s'indiquen les diferents àrees que formen una tira de la prova de flux lateral. La segona tira correspon amb una tira positiva, on s'hi forma el sandvitx prèviament explicat en la **figura 45** sobre l'ADN immobilitzat en la línia de test i sobre l'ADN de la línia de control s'hi uneix l'ADN conjugat amb les nanopartícules d'or.

Com s'ha vist en els esquemes anteriors, la tira de la prova de flux lateral està formada per diferents parts, les funcions dels quals estan descrites en el **punt 2.2**: àrea de la mostra (on es diposita inicialment la mostra que es vol analitzar), adhesiu de suport, membrana (generalment de nitrocel·lulosa), línia de test, línia de control i finalment, àrea d'absorció (on s'absorbeix les restes de la mostra que han arribat fins al final de la tira per capil·laritat).

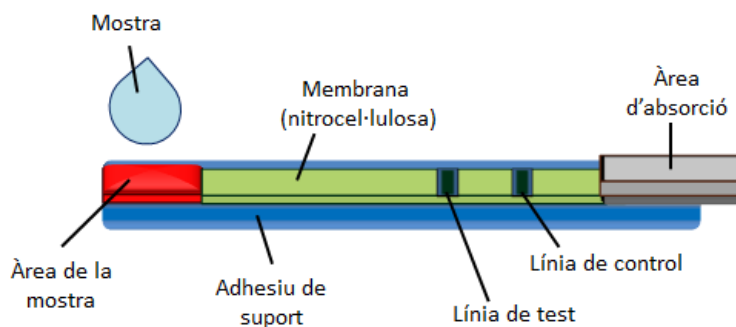


Figura 47. Representació gràfica d'una tira de flux lateral en la que s'han diferenciat per colors les diferents àrees de les quals està composta.

Per a obtenir la tira de la prova de flux lateral final es va anar elaborant les diferents parts i es van anar unint sobre l'adhesiu de suport. La metodologia que es va seguir per elaborar les diferents parts es redacta a continuació.

En primer lloc es va preparar la membrana, que consisteix en una superfície on s'hi situen les línies de test i de control, que com s'ha explicat anteriorment, serveixen per comprovar el resultat que dona la prova de flux lateral, és a dir, el diagnòstic que se'n pot derivar de la prova. El material utilitzat com a membrana per a les tires va ser paper de nitrocel·lulosa FF170HP (Whatman, Alemanya). En les línies de test i de control s'immobilitzen molècules d'ADN. Per a fer-ho, és necessari que aquestes molècules siguin modificades prèviament. Cada molècula d'ADN s'uneix a una biotina, que és una vitamina termostable i soluble en aigua, amb una mida considerablement petita. La molècula de biotina s'uneix a l'estreptavidina, que és una proteïna de grans mesures i amb una elevada afinitat per la biotina, és a dir, que la biotina i l'estreptavidina formen un fort enllaç, ja que per si sola la molècula de biotina, a causa de la seva mida, no es capaç d'unir-se a la membrana. Per tant s'obté una molècula d'ADN unida a una biotina, que alhora aquesta està unida a una estreptavidina, i finalment, l'estreptavidina s'uneix a la superfície de la membrana. Per a preparar el contingut de la línia de test es va dipositar en un tub $10\mu\text{l}$ d'ADN (línia de test) amb una concentració de $100\mu\text{M}$ (micromolar), la seqüència de les quals està inclosa en la **figura 32** i que incorpora una molècula de biotina, i $4,5\mu\text{l}$ d'estreptavidina amb una concentració de 5 mg/mL. Seguidament es va repetir el mateix procés per a preparar el contingut de la línia de control, amb al·l diferència que es va utilitzar $10\mu\text{l}$ d'ADN (línia de control). Els dos tubs es van deixar durant una hora en la *Dynal Sample Mixer* (**figura 40**), una màquina giratòria que permet el volteig dels contingut dels tubs. Durant aquest temps les molècules de biotina s'anaven unint a les molècules d'estreptavidina. Un cop acabat aquest temps es va seguir elaborant la membrana. Es va tallar una tira del paper de nitrocel·lulosa amb un gruix de 3cm i una llargada de 20,5cm. Mitjançant una pipeta graduada es va agafar $20\mu\text{l}$ de la dissolució continguda en el tub corresponent a la línia de test. Amb la mateixa punta de la pipeta (amb un volum de $200\mu\text{l}$) que incloïa en el seu interior la solució, es va traçar una línia recta sobre la membrana, deixant un marge de 1 cm amb la part superior. D'aquesta forma es va formar la línia de test amb la seva respectiva solució sobre la membrana de nitrocel·lulosa (**figura 48**). Es va fer el mateix procés amb la línia de control, tenint en compte que es va deixar un marge de 2 cm amb la part superior de la membrana i que es va utilitzar la solució continguda en el tub corresponent a la línia de control (**figura 49**). Un cop fetes les

dues línies, es va deixar assecar la membrana durant una hora a temperatura ambient.



Figura 48. Es va traçar sobre la membrana de nitrocel·lulosa la línia de test mitjançant la punta de la pipeta que contenia la solució corresponent.

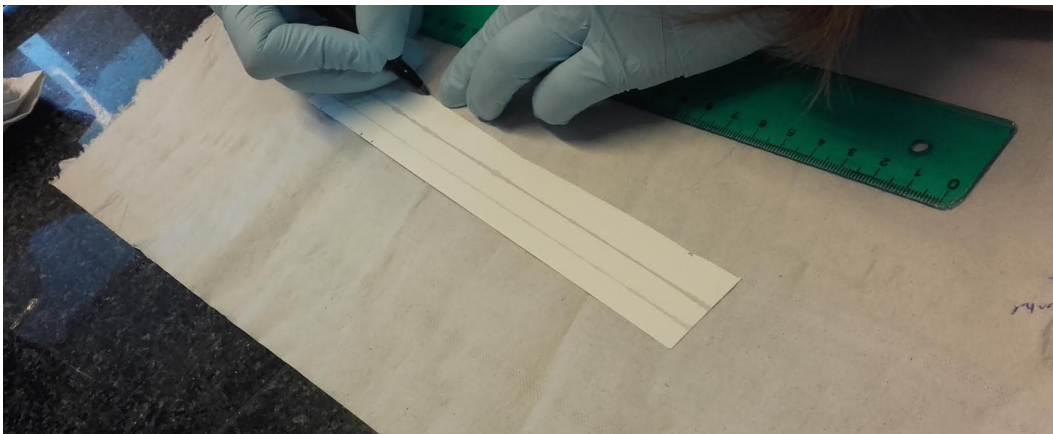


Figura 49. Es va traçar sobre la membrana de nitrocel·lulosa la línia de control, deixant un marge de 2cm amb la part superior de la membrana. mitjançant la punta de la pipeta que contenia la solució corresponent.

Un cop transcorregut aquest temps es va fer un bloqueig de la membrana. Aquest procés consisteix en l'addició d'agents de bloqueig per evitar interaccions entre la mostra d'ADN que es vol analitzar i la superfície de la membrana. D'aquesta forma, l'ADN amplificat i l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or només s'uniran amb l'ADN immobilitzat a les línies de test i de control. Per a fer una solució de 50mL que permetés fer el bloqueig de la membrana es va necessitar una tub de 50mL. En aquest tub s'hi van barrejar els elements citats en la taula següent:

Components	Massa o Volum
<p>Buffer de carbonat, amb una concentració de 10mM i un pH de 9,6</p> <p>Fórmula utilitzada:</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> $\frac{\text{Concentració final} \times \text{Volum final}}{\text{Concentració inicial}} = \text{Volum inicial}$ </div> $\frac{10\text{mM} \times 50\text{mL}(\text{volem})}{50\text{mM}} = 10\text{mL}$	10mL
<p>Skimmed milk (llet en pols) amb una concentració de 1%</p> $\frac{1 \times 50 (\text{volem})}{100} = 0,5\text{g} (\text{grams})$	0,5g
<p>Empigen detergent (EMPIGEN®BB) amb una concentració de 0,1%</p> $\frac{0,1 \times 50\text{mL}(\text{volem})}{100} = 0,05\text{mL} = 50\mu\text{L}$	50μL
<p>Milli-Q</p>	S'afegeix aigua desionitzada fins arribar als 50mL de dissolució

Figura 50. Elements i quantitats necessàries per a elaborar una solució de 500mL que permeti el bloqueig de la membrana.

A continuació, es va abocar la solució de 50mL i la membrana a l'interior d'un recipient de 2L de volum. Es va deixar el recipient durant 15 minuts sacsejant-se en un aparell anomenat *Sunflower mini-shaker*. Un cop finalitzat aquest quart d'hora es va deixar la membrana assecar-se durant dues hores a temperatura ambient, i un cop seca es va introduir a la nevera fins a ser utilitzada a 4-8°C.

La membrana va ser tallada per les zones on la línia de test o de control haguessin quedat més gruixudes que en la resta de la tira, perquè sinó s'unirien masses partícules de la mostra a les línies. Seguidament es va col·locar i enganxar la membrana a sobre de l'adhesiu de suport, i per la part superior de l'adhesiu de suport també s'hi va enganxar l'àrea d'absorció, una mica sobreposat a la membrana. Aquesta àrea té com a funció absorbir les restes de la mostra que arriben fins al final de la tira de la prova de flux lateral per capil·laritat. Per la part de davant de l'adhesiu de suport es va deixar un petit fragment que actuaria com a àrea de la mostra, on la mostra que es vol analitzar s'hi diposita inicialment i després es desplaça per la tira.

S'hi van tallar dues tires fines aproximadament d'uns 4 mil·límetres (mm) a partir de la gran, una tira correspondria amb la tira positiva, per mitjà de la qual es poden



Figura 51. Es va elaborar en gran tota l'estructura i a partir d'aquesta es van tallar dues tires, una positiva i l'altra negativa.

comprovar els resultats finals i la segona tira tallada correspondria amb la tira negativa, que té com a funció comprovar i confirmar que l'assaig funciona correctament. Per elaborar la solució que es va abocar a l'àrea de la mostra de la tira positiva, mitjançant una pipeta, es va agafar 10 μ l de la dissolució d'ADN conjugat a les nanopartícules d'or, 2 μ l de l'ADN *Yersinia pestis* prèviament amplificat amb els encebadors de cua i 8 μ l de la solució tampó prèviament elaborat. Aquesta solució tampó està formada per un 10x

de SSC (citrat de sodi de solució salina, el qual afavoreix la unió ADN-ADN) un 0,25% de SDS (dodecilsulfat sòdic [NaC₁₂H₂₅SO₄]), un 12,5% de formamida (generalment coneguda com a metanamida [CH₃NO]) i un 3,5% de Triton X-100 (detergent). Tant el SDS, la formamida i el Triton són en aquest cas detergents i additius afegits en la solució tampó per tal de millorar el desplaçament de la mostra en la tira de flux lateral. La solució composta per l'ADN amplificat i el conjugat amb les partícules d'or es va deixar incubar durant 3 minuts a temperatura ambient abans de ser afegit en la tira. Per elaborar la solució que es va abocar a la tira negativa es va seguir un procés similar a l'anterior. Mitjançant una pipeta es va agafar 10 μ l de la solució d'ADN conjugat a les nanopartícules d'or, 2 μ l de Milli-Q (per obtenir el mateix volum que l'anterior solució) i 8 μ l de la mateixa solució tampó prèviament elaborada. Aquest

buffer es utilitzat per permetre que les partícules de les dissolucions preparades per a les tires positives i negatives s'uneixin correctament a les molècules d'ADN immobilitzades a les línies de test i de control. També s'utilitza per permetre que les dissolucions es puguin desplaçar bé per sobre de la membrana de la tira.



Figura 52. Tires fines d'aproximadament uns 4mm tallades a partir de la gran (part inferior) amb les corresponents solucions elaborades, solució positiva per una tira i solució negativa per a l'altra (part superior).

A continuació s'hi va afegir la solució per a la tira positiva sobre l'àrea de la mostra de la respectiva tira, i per capil·laritat la dissolució va anar avançant per sobre de la tira fins arribar al final, és a dir, a l'àrea d'absorció. Es va fer el mateix procediment amb la solució per a la tira negativa i es van deixar les dues tires reaccionar durant 10 minuts a temperatura ambient abans de comprovar els resultats.



Figura 53. Mitjançant una pipeta graduada en una tira s'aboca la solució positiva i en l'altra tira s'aboca la solució negativa. Les solucions avancen fins el final de la tira per capil·laritat.

3.6.7 Resultats

La tira positiva té com a funció confirmar si hi ha absència o presència de la seqüència d'ADN del bacteri *Yersinia pestis*. En aquesta pràctica es van poder observar dues línies amb un color més intens que la resta de a tira positiva. Aquestes línies corresponen amb les línies de test i de control, verificant que en sobre la línia de test s'ha format el sandvitx compost per la unió de l'ADN immobilitzat amb l'ADN amplificat, i aquest últim amb l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or, i que en la línia de control l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or s'ha unit a l'ADN immobilitzat en aquesta línia, confirmant que la prova funciona de forma correcta i que les nanopartícules d'or s'han conjugat bé amb l'ADN. En el cas que hi hagués absència de la seqüència específica d'ADN del bacteri *Yersinia pestis*, només apareixeria una línia en la línia de control, perquè l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or no es pot unir directament a l'ADN immobilitzat a la línia de test. En el primer cas, obtindríem un resultat positiu, i en el segon cas obtindríem un resultat negatiu.

En la tira negativa, que té com a funció comprovar si és correcte el funcionament de la prova, s'observa una única línia amb un color més intens que correspon amb la línia de control. La dissolució per a la tira negativa només conté la conjugació de l'ADN amb les nanopartícules d'or, per la qual cosa aquest ADN únicament s'unirà a l'ADN immobilitat a la línia de control. D'aquesta forma, només apareix una línia en la tira negativa a sobre de la línia de control i es confirma que la prova funciona de forma correcta.

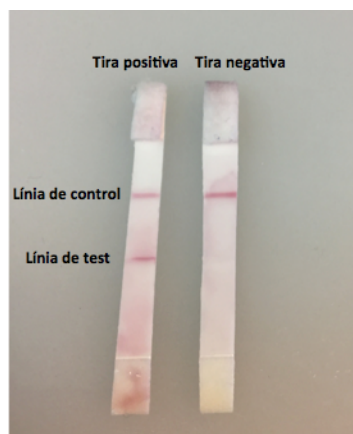


Figura 54 Fotografia realitzada mitjançant la càmera d'un telèfon mòbil on s'hi representen els resultats finals obtinguts. En la tira positiva s'hi poden observar dues línies, una corresponent a la línia de test indicant la presència de la seqüència del bacteri *Yersinia pestis*, i una altra línia a la línia de control indicant que la tira funciona correctament. En la tira negativa s'hi observa una única línia en la línia de control, indicant que l'experiència realitzada és correcta.

4 Conclusions

Per estudiar la viabilitat de les proves de flux lateral capaces de detectar la presència d'una seqüència específica d'ADN (àcid desoxiribonucleic) del bacteri *Yersinia pestis*, agent patògen de la pesta, es va dur a terme durant els mesos de juny i juliol un projecte d'investigació al laboratori pertanyent al grup anomenat Interfibio Group, en el Departament d'Enginyeria Química (DEQ) de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química (ETSEQ) de Tarragona.

Prèviament es va haver de cercar informació en pàgines webs, articles i publicacions científiques sobre el funcionament i la consistència de la prova de flux lateral, majoritàriament coneguda com a Lateral Flow Assay (LFA), que és una tècnica de diagnòstic que engloba diferents procediments de laboratori. Es va fer una àmplia recerca i es van estudiar rigorosament diferents esquemes de publicacions científiques que representaven detalladament el funcionament d'aquesta prova. Un cop finalitzat aquest estudi també es va fer una recerca de la pesta i del seu agent etiològic, el bacteri *Yersinia pestis*. Era necessari conèixer de forma detallada el gran pes que ha tingut aquesta malaltia sobre la humanitat al llarg de la història, així com els diferents tipus de pesta i els símptomes causats per cadascun, les formes de transmissió de la malaltia, els diferents tipus de diagnòstic i el posterior tractament per intentar salvar el pacient de la mort i, finalment, les possibles mesures de prevenció per evitar la pesta.

Mitjançant gràfiques i mapes es va entendre de forma clara i precisa que la pesta és una malaltia encara present en molts països del planeta Terra, sobretot en els més subdesenvolupats, i que a causa dels factors socioeconòmics presents en aquests països, la pesta acaba amb la vida de moltes persones. En general, els habitants del Tercer Món no tenen suficients recursos econòmics per permetre's un diagnòstic adequat capaç d'identificar la malaltia que provoca el malestar de la persona ni un posterior tractament i rehabilitació.

El gran avenç i desenvolupament que ha tingut la ciència durant els últims segles ha permès trobar diferents solucions per aquest problema, entre les quals es troba la LFA. Aquesta és econòmica, fàcil d'interpretar ja que no requereix laboratoris especialitzats ni un personal amb alts graus de coneixement i, a més a més, amb ella s'obté un resultat ràpid (qüestió de minuts). La LFA posa de manifest que la ciència avança de forma progressiva i dona solucions a les necessitats de la societat, sigui quina sigui la seva condició social.

La realització del treball també ha inclòs un procés de documentació o recerca d'informació sobre el bacteri *Yersinia pestis* i les seves característiques com a microorganisme. Les proves de flux lateral, la patologia de la pesta i el seu agent etiològic constitueix el gruix de la base teòrica d'aquest treball de recerca.

Com s'ha esmentat a l'inici d'aquest punt, es va dur a terme la investigació a un laboratori bioquímic de la Universitat Rovira i Virgili. Com a conseqüència, va ser necessari aprendre i complir les diferents normes de seguretat que s'han de tenir presents quan es treballa en un laboratori, seguir les indicacions donades per a la utilització dels diferents aparells científics i protegir-se amb el material adequat, com per exemple amb una bata de laboratori i uns guants de làtex a l'hora de manipular diferents productes. Abans d'entrar en el respectiu laboratori i començar amb la investigació, la doctora Ciara O'Sullivan em va fer algunes classes teòriques per poder ampliar els meus coneixements científics, en concret, sobre la biomedicina. Segons el Diccionari de la Llengua Catalana de l'Institut d'Estudis Catalans (IEC), la biomedicina és l'estudi i la pràctica de la medicina basats en l'aplicació dels principis de les ciències biològiques. La doctora Ciara O'Sullivan també em va explicar, ensenyar i mostrar les investigacions que duïen a terme les diferents persones del laboratori. Una vegada assolida aquesta noció sobre la biomedicina, es van iniciar les pràctiques. Tot aquest aprenentatge ha resultat bàsic per entendre el funcionament dels equips i locals especialitzats, i poder dur a terme amb garanties la part pràctica del treball de recerca.

Aquestes pràctiques van consistir en la realització de diferents PCR per amplificar la seqüència específica d'ADN del bacteri *Yersinia pestis*, en primer lloc utilitzant encebadors estàndards, i en segon lloc es van utilitzar encebadors amb unes "cues" específiques complementàries a l'ADN conjugat a les nanopartícules d'or per una banda, i unes "cues" específiques complementàries a l'ADN immobilitzat a la línia de test per l'altra banda. Seguidament es va comprovar si s'havien realitzat les PCR de forma correcta mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa. A continuació es van seguir les indicacions d'un protocol amb la finalitat de poder purificar i concentrar el producte amplificat. Després es va fer la conjugació de l'ADN a les nanopartícules d'or, que s'uneixen per complementaritat a l'ADN immobilitzat a la línia de control i també, com s'ha explicat anteriorment, a un extrem de l'ADN amplificat del bacteri *Yersinia pestis*. L'ADN conjugat a les nanopartícules d'or és necessari per comprovar i confirmar si la prova s'ha realitzat correctament. Per comprovar si la conjugació era correcta es va utilitzar primerament l'electroforesi en gel d'agarosa i

després, una anàlisi mitjançant l'espectrofotòmetre. Finalment es va dur a terme la construcció de les diferents parts de la proves de flux lateral i la posterior unió de totes. Per a dur a terme aquest últim pas, es van tallar dues tires, una va ser anomenada positiva i l'altra negativa. Per a cada tira es va preparar una solució diferent. La solució de la tira positiva estava formada per l'ADN amplificat, la conjugació de l'ADN a les nanopartícules d'or i el buffer prèviament elaborat; mentre que la solució de la tira negativa estava formada per la conjugació de l'ADN a les nanopartícules d'or, Milli-Q (aigua desionitzada) i el buffer.

La tira positiva té la funció de donar el resultat sobre la presència o absència de la seqüència específica d'ADN del bacteri patògen de la pesta, i la tira negativa té la funció de comprovar si tota la prova funciona correctament. Un cop abocades les solucions corresponents a cada tira, les dues tires es van deixar assecar a temperatura ambient. Després d'assecar-se es van observar i analitzar els resultats obtinguts. Es va contemplar i comprovar que la tira negativa només tenia una línia marcada sobre la línia de control, indicant que el funcionament és correcte, i que a la tira positiva s'hi distingien dues línies, una sobre la línia de control, també per indicar que s'havia realitzat tot el procés correctament, i l'altra línia sobre la línia de test, indicant que l'ADN amplificat a l'inici de la pràctica corresponia a la seqüència específica del bacteri *Yersinia pestis*, tal com suposàvem.

Aquesta investigació confirma que les proves de flux lateral són capaces de detectar la presència de l'ADN del bacteri *Yersinia pestis* en una mostra i obtenir un diagnòstic correcte derivat de la prova. Mitjançant tots els materials utilitzats durant la investigació al laboratori, es va calcular que cada tira fabricada podria tenir un preu de 1,15€, un preu bastant econòmic i assequible per qualsevol persona, incloent la gent dels països del Tercer Món. Aleshores, mitjançant el diagnòstic derivat d'una prova de flux lateral, moltes persones dels països subdesenvolupats podrien comprovar si el seu malestar és degut o no a la presència de l'agent patògen de la pesta i rebre quant abans el tractament adequat.

La ciència sempre intenta entendre la causa dels problemes dels éssers humans en totes les seves àrees i trobar utilitzant el mètode científic la solució més adequada en cada moment de la història a aquests problemes. Aquesta prova és una forma senzilla d'ajudar i salvar moltes vides, perquè al cap i a la fi tots som humans i tots tenim els mateixos drets, sobretot, el dret a viure, a viure bé amb un complet benestar físic, mental i social.

5 Fonts documentals

- [1] AMSE. "Peste. Epidemiología y situación mundial". (23 març 2016) http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=150:peste-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50
- [2] BANGS LABORATORIES, INC. "Lateral Flow Tests" TechNote 303 (20 març 2013)
- [3] BLOG DE LABORATORIO. "Preparación de gel de agarosa para electroforesis". (26 febrer 2010). <http://blogdelaboratorio.com/preparacion-de-gel-de-agarosa-para-electroforesis/>
- [4] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. "Plague". (10 setembre 2015) <http://www.cdc.gov/plague/index.html>
- [5] DE LA TORRE, Florencio. "Apuntes de espectrofotometria" Universitat Girona
- [6] *Diccionari de la llengua catalana. Segona edició*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans. <http://dlc.iec.cat>
- [7] GLOBEDIA. El diario colaborativo. <http://es.globedia.com/axn-adn-sintetico-cambia-conceptos-basicos-herencia-evolucion-origenes>
- [8] IOWA STATE UNIVERSITY. The Center for Food Security & Public Health. "Peste". (Octubre 2009). <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/peste.pdf>
- [9] JAUSET-RUBIO, Miriam [et al.]. "Ultrasensitive, ràpid an inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay" (en premsa)
- [10] JORGE, Miguel. "Científicos anuncian AXN, la creación de ADN sintético". <https://hipertextual.com/2012/04/cientificos-anuncian-axn-la-creacion-de-adn-sintetico>
- [11] MEDICINA MOLECULAR. FIBAO. "Electroforesis en gel". (11 novembre 2017) <http://medmol.es/tecnicas/68/>
- [12] NATIONAL GEOGRAPHIC. "Crean un ADN sintético capaz de evolucionar". <http://www.nationalgeographic.es/noticias/ciencia/adn-sintetico>
- [13] ONMEDA. "Peste" (19 març 2012) <http://www.onmeda.es/enfermedades/peste.html>
- [14] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. "Peste". (Setembre 2016) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/es/>
- [15] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. "Plague". (11 juny 2014) http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8933%3A2013-informacion-general-peste&catid=5604%3Aplague-home&Itemid=40032&lang=es

- [16] PADILLA PEÑA, Carmen Alicia [et al.] “Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico”. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
- [17] PALL CORPORATION. “Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Tests Development Ideas” <http://www.pall.com/main/oem-materials-and-devices/literature-library-details.page?id=4154>
- [18] POSTHUMA-TRUMPIE, Geertruida A. “Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey”. A: Analytical and Bioanalytical Chemistry, Gener 2009, Volum 393, pgs. 569–582 <http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-008-2287-2>
- [19] STURM, Cony. “Crean ADN sintético que evoluciona y se replica”. (20 abril 2012). <https://www.fayerwayer.com/2012/04/axn-el-adn-sintetico-que-evolucion-a-y-se-replica-por-si-mismo/>
- [20] WONG, Raphael C. ; TSE, Harley Y. *Lateral Flow Immunoassay*. Nova York, Estats Units, 2009. http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book%5B1%5D.pdf

ANNEX. Glossari

ANTICÒS: Els **anticossos**, també coneguts com a immunoglobulines, són glicoproteïnes produïdes pel sistema immunitari del cos quan detecta substàncies nocives, anomenades antígens. Exemples d'antígens són microorganismes (com ara bacteris, fongs, paràsits i virus) i substàncies químiques. Els anticossos es poden produir quan el sistema immunitari considera erròniament el teixit sa com una substància nociva.

ANTÍGEN: Qualsevol substància que indueix al sistema immunitari a la formació d'anticossos contra si mateix, ja que aquest últim no reconeix la substància i tracta de combatre-la. Alguns exemples de molècules que actuen com a antígens són les proteïnes, els polisacàrids i els àcids nucleics.

BIOTINA: La **biotina**, **vitamina H**, **vitamina B₇** o **vitamina B₈** és una vitamina termostable, soluble en l'aigua, i també en alcohol i susceptible a l'oxidació, intervé en el metabolisme dels glúcids, lípids, aminoàcids purines. La biotina és important com un cofactor en la catàlisi de reaccions metabòliques essencials per sintetitzar àcids grassos, en la gluconeogènesi i en el metabolisme de la leucina.

BLAU BROMOFENOL: Compost orgànic utilitzat en anàlisis de laboratori com a indicador de pH. També conegut com a blau de **tetrabromofenol**.

BUFFER: Un **tampó**, **buffer** o **solució amortidora** és la barreja, en concentracions relativament elevades, d'un àcid feble i la seva base conjugada, és a dir, sals hidrolíticament actives. Tenen la propietat de mantenir estable el pH d'una dissolució enfront de l'addició de quantitats relativament petites d'àcids o bases fortes.

CAPIL·LARITAT: Cadascun dels fenòmens consistents a deixar d'ésser horitzontal la superfície lliure d'un líquid en contacte amb una paret sòlida, i en la formació de meniscs i l'ascens o el descens d'un líquid en un tub capil·lar.

CEL·LULOSA: Polisacàrid lineal macromolecular format per unitats de glucosa, principal constituent de les parets cel·lulars dels vegetals superiors.

EMPIGEN DETERGENT: Els **detergents** són les substàncies que tenen la propietat química de dissoldre la brutícia o les impureses d'un objecte sense corroi-lo. És a dir, substàncies o productes que renten o serveixen per a fer neteja. Aquest detergent és específic per netejar la membrana de la tira del Lateral flow assay (LFA).

ENDÈMIA: Una **endèmia** és un terme utilitzat per fer referència a un procés patològic que es manté de forma estacionària en una població o zona geogràfica determinada durant períodes de temps prolongats.

EPIZOÒTIA: Malaltia contagiosa que afecta un gran nombre d'animals d'una o més espècies en un extens territori i es transmet amb gran rapidesa.

ESTREPTAVIDINA: Proteïna tetramèrica sintetitzada pel bacteri *Streptomyces avidinii*. Es caracteritza per la seva elevada afinitat per la biotina. La constant de dissociació del complex biotina-estreptavidina és una de les interaccions no covalents més fortes que es coneixen. Aquesta capacitat d'unió es manté en condicions extremes de pH i de temperatura. Gràcies a aquesta propietat la proteïna s'utilitza molt en biologia molecular i biotecnologia.

EUBACTERIS: Els **eubacteris**, anomenats de manera general bacteris, són un gran grup de microorganismes unicel·lulars. Tot i que són organismes molt simples, amb escasses estructures internes i tan sols quatre formes externes (bacil, coc, espiril i vibrió), presenten una gran variabilitat de metabolismes, des de l'heteròtrof fins a l'autòtrof (bacteris fotosintètics i quimiosintètics) i des de l'aerobi fins a l'anaerobi. Tenen una mida que pot oscil·lar entre els 1,5µm d'*Escherichia coli*, el bacteri intestinal humà, els 7 µm del cianobacteri (bacteri fotoautòtrof) *Oscillatoria* o els 600 µm d'*Epulopiscium fishelsoni*, un bacteri que viu a l'intestí del peix cirurgià dels oceans Índic i Pacífic.

GELRED: Colorant d'intercalació d'àcids nucleics utilitzat en biologia molecular per a la electroforesi en gel d'agarosa.

GRAMNEGATIU: Els **bacteris gramnegatius** són aquells que no retenen el cristall violeta en la tinció de Gram i que per tant apareixen de color vermell al microscopi òptic. La paret dels bacteris gramnegatiu és biestratificada, ja que té una capa basal fina (20-30Å) de peptidoglicans sobre la qual hi ha una membrana externa (60-180Å de gruix). Aquesta membrana està constituïda per una doble capa lipídica que conté un gran nombre de proteïnes, la majoria amb activitat enzimàtica, i lipopolisacàrids, que es projecten a l'exterior de la membrana externa.

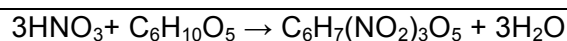
GRAMPOSITIU: Els **bacteris grampositius** es defineixen com tots aquells bacteris que retenen el cristall violeta durant el procés de tinció Gram, de manera que s'observen de color blau o violeta al microscopi òptic. Aquesta classificació entre bacteris grampositius i gramnegatius es basa principalment en les diferències

estructurals de la paret bacteriana. La paret dels bacteris grampositiu és monoestratificada i està formada per una capa gruixuda (200-800 Å) de peptidoglicans (mureïna) a la qual s'associen àcids teïcoics.

MILLI-Q: Aigua purificada i desionitzada en un alt grau per un sistema de purificació d'aigua fabricat per Millipore Corporation. És una marca registrada de 3Millipore. Milli-Q es serveix de filtres de resina i desionització per a purificar l'aigua. El sistema controla la concentració d'ions, mesurant la resistència elèctrica de l'aigua. Quanta més resistència, menys càrrega d'ions. La majoria dels sistemes Milli-Q dispensen l'aigua a través d'un filtre de membrana de 0,22 micres. És capaç de produir aigua prou pura per aconseguir reproductibilitat i una precisió de poques partícules per milió quan s'utilitzen espectròmetres de masses d'ions en l'anàlisi geoquímica, microbiologia i ciències de l'atmosfera.

NITROCEL·LULOSA: El **nitrat de cel·lulosa, nitrocel·lulosa o cotó pólvora** és un compost explosiu sintetitzat per primera vegada l'any 1845 per Christian Friedrich Schönbein. És un sòlid semblant al cotó, o un líquid gelatinós lleugerament groc o incolor amb olor d'èter. S'empra en l'elaboració d'explosius, propulsors per a coets, cel·luloide (base transparent per a les emulsions de les pel·lícules fotogràfiques) i com matèria primera en l'elaboració de pintura, laca, vernissos, tinta i altres productes similars.

Reaccions químiques amb les quals l'àcid nítric converteix la cel·lulosa en nitrocel·lulosa i aigua (l'àcid sulfúric hi actua com a catalitzador):



OXIDASA: L'**oxidasa** és un enzim que catalitza una reacció d'oxidació/reducció emprant oxigen molecular (O₂) com acceptor d'electrons. En aquestes reaccions l'oxigen es redueix a aigua (H₂O) o peròxid d'hidrogen (H₂O₂).

PANDÈMIA: Una **pandèmia** (del grec πᾶν (*pan*), "tot", i δῆμος (*demos*), "poble") és una epidèmia o afectació per una malaltia a persones o animals al llarg d'una àrea geogràficament extensa sigui un continent o fins i tot el món sencer. És una malaltia epidèmica estesa a molts països i que afecta molts individus del mateix país a la vegada.

POLIÀCID: Dit de les bases i dels alcohols una molècula dels quals, contenint dos o més grups hidroxils, és capaç de combinar-se amb dues o més molècules d'un àcid monobàsic per a formar una sal o un èster.

PUNT ISOLÈCTRIC: El **punt isoelèctric** (pI) és el pH en el qual una molècula té càrrega elèctrica neutra.

TBE: El **TBE**, també anomenat **Tris-Borat-EDTA** és una solució tampó que conté una mescla de base Tris, àcid bòric i EDTA. Tris és una abreviació del compost orgànic denominat tris (hidroximetil) aminometà, amb la fórmula $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$. És àmpliament utilitzat en bioquímica i biologia molecular com un component de les solucions tampons, especialment per a les solucions d'àcids nucleics. L'àcid bòric és un àcid utilitzat com a antisèptic, insecticida i controlador de la fissió nuclear de l'urani en centrals nuclears. Es troba en forma de cristalls incoloros soluble en aigua i té la fórmula química $\text{B}(\text{OH})_3$. L'EDTA o àcid etilendiamintetraacètic serveix per dissoldre la carrall, subproducte no metàl·lic, de consistència vidriosa, que l'home obté en la reducció dels minerals per a l'obtenció de metalls o en el tractament de purificació del metall fos.

TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina): És un agent reductor utilitzat amb freqüència en aplicacions de bioquímica i biologia molecular. Generalment es fa servir com una sal de clorhidrat (TCEP-HCl) amb un pes molecular de 286,65 g/mol. És soluble en aigua i s'immobilitza sobre un suport d'agarosa per facilitar l'eliminació de l'agent reductor.