



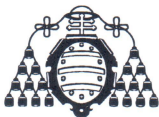
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**“Desarrollo de un genosensor electroquímico para la detección del gen
16S rRNA de *Legionella pneumophila*”**

Emilio José Santiago Rodríguez

Julio 2014, Oviedo



María Jesús Lobo Castañón, Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Desarrollo de un genosensor electroquímico para la detección del gen 16S rRNA de *Legionella pneumophila*”

ha sido realizado por el licenciado Emilio José Santiago Rodríguez, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 25 de Junio de 2014

Fdo: María Jesús Lobo Castañón

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La <i>Legionella</i> como problema de salud pública	2
1.2. Métodos de detección de <i>Legionella</i>	4
1.3. Monocapas autoensambladas	6
1.4. El 4-aminotiofenol como bloqueante alternativo	7
1.5. Gen 16S rRNA	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS	13
3.1. Reactivos	14
3.2. Instrumentación	16
3.3. Procedimientos experimentales	17
3.3.1. Preparación de electrodos	17
3.3.2. Construcción del sensor	19
3.3.3. Protocolo de operación	19
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	22
4.1. Diseño de las secuencias de nucleótidos	23
4.2. Optimización de la superficie del transductor electroquímico	26
4.3. Características analíticas del genosensor	37
4.4. Estabilidad del sensor	38
4.5. Determinación de las ufc de <i>Legionella pneumophila</i>	41
4.6. Sugerencias para trabajos futuros	46
5. CONCLUSIONES	48
6. REFERENCIAS	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La *Legionella* como problema de salud pública

La *legionellosis* es una enfermedad relativamente nueva cuyo conocimiento se produjo en el año 1976, tras un brote de neumonía en un hotel de Filadelfia que afectó a miembros de la legión americana que celebraban su convención anual. Se produjeron un total de 182 casos con 34 fallecidos. La enfermedad se denominó legionelosis y fue descrita por investigadores del Center for Disease Control (CDC) de Atlanta; el agente patógeno causante de la misma se denominó *Legionella pneumophila*. No obstante investigaciones posteriores identificaron brotes anteriores, ya desde el año 1957.

Legionella es un género de bacterias Gram negativas, de las que *Legionella pneumophila* es la especie que más habitualmente produce la enfermedad, con 15 serogrupos distintos [1]. Las infecciones causadas por este patógeno se presentan principalmente de dos maneras, siendo la infección pulmonar o *Enfermedad del Legionario* la más severa. Esta manifestación produce una neumonía con fiebre alta, la cual es la causante de la mayor parte de las muertes debido a la enfermedad, siendo el segundo cuadro sintomático conocido como *Fiebre de Pontiac* un proceso febril leve [2].

Se puede considerar el patógeno más importante transmitido por el agua en términos de mortalidad [3] y se encuentra en la mayoría de aguas naturales sobre todo en estancamientos y aguas residuales, pudiendo sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes con alto grado de salinidad [4].

Una de las características de este patógeno es que produce brotes severos e impredecibles [5], hecho que se relaciona con unos porcentajes de muerte entre el 10% y el 40% subiendo hasta un 50% cuando dichos brotes se producen en hospitales con personas con un sistema inmunitario más debilitado [6]. Las zonas más comunes de contagio son las torres de refrigeración, sistemas de agua caliente sanitaria, sistemas de agua climatizada y con recirculación como piscinas, spas y centrales humidificadoras industriales, sistemas que favorecen la proliferación de la bacteria llegando a alcanzar concentraciones que pueden resultar peligrosas para el hombre [7].

La forma más común de contagio es la inhalación de partículas de agua suspendidas en el aire siendo poco probable la contaminación de aguas de consumo [3], por lo que el análisis en aguas en instalaciones de riesgo como las anteriormente

comentadas es uno de los campos más estudiados y legislados en la prevención de la *legionellosis*. En la legislación española se recoge la periodicidad y medidas preventivas a aplicar en estas instalaciones dependiendo del número de unidades formadoras de colonias detectadas (**Tabla 1**) [8]. Las unidades formadoras de colonias son las células viables del patógeno, siendo necesario un cultivo y un recuento para determinarlas. El método está definido en la legislación española así como los protocolos que se deben seguir para la toma de muestra [9].

Tabla 1. Niveles de referencia en ufc L⁻¹ y medidas correctoras correspondientes.

Ufc L ⁻¹	Medida correspondiente
100-1000	Revisión del programa de mantenimiento y realización de las correcciones oportunas. Remuestreo después de 15 días
1000-10000	Limpieza y desinfección. Remuestreo después de 15 días.
>10000	Paro del funcionamiento de la instalación. Limpieza y tratamiento de choque. Remuestreo después de 15 días

✚ 1.2. Métodos de detección de *Legionella*

Se han desarrollado multitud de métodos con el fin de detectar *Legionella*, cada uno de ellos con sus características particulares, sin embargo el cultivo sigue siendo el método estándar, certificado para la determinación de este patógeno. El aislamiento de la bacteria mediante cultivo y posterior identificación y recuento tiene en cambio una serie de problemas asociados a la dificultad de crecimiento de la *Legionella*, que puede estar inhibido por la presencia de otros microorganismos, lo que se traduce en un error por defecto en el recuento de ufc [5, 10]. El cultivo para la detección de *Legionella* tiene por tanto un problema de sensibilidad, a lo que se suma el elevado tiempo de análisis (aproximadamente 10 días), sin embargo debido a su alta especificidad sigue siendo el método de referencia.

Con el fin de aumentar la sensibilidad y disminuir el tiempo de análisis se han propuesto diferentes métodos inmunoquímicos para la detección del patógeno. Los más utilizados emplean marcadores fluorescentes y enzimáticos. Inicialmente se utilizaron anticuerpos policlonales dirigidos contra antígenos de superficie de la bacteria, sin embargo estos ensayos mostraron problemas de selectividad asociados a la reactividad cruzada con otras especies no patógenas [4, 5]. Así uno de los métodos más utilizados, la inmunofluorescencia directa (DFA), no puede discriminar entre las especies más cercanas de *Legionella* como *Legionella cincinnatiensis*, *Legionella sainthelensi* y *Legionella santicrusis* [11].

Una alternativa para los métodos inmunoquímicos es el uso de anticuerpos monoclonales. Los resultados obtenidos mejoraron mucho respecto a los anteriores métodos basados en la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo, encontrándose reactividad cruzada únicamente entre los distintos serogrupos de *Legionella pneumophila* [12]. El problema de esta metodología es el coste adicional de los reactivos, ya que estos anticuerpos tienen un precio elevado.

Teniendo en cuenta los problemas de sensibilidad y especificidad, una alternativa adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que a la especificidad aportada por el reconocimiento de secuencias específicas de ADN se le suma la amplificación en sucesivos ciclos de las hebras de ADN de la *Legionella*.

La qRT-PCR (*quantitative real time polimerase chain reaction*) es hasta el momento el método más adecuado para el análisis, aunque presenta exigencias de instrumentación cara y personal altamente cualificado. Estas exigencias no son la mayor limitación de la técnica ya que su mayor problema está relacionado con la amplificación de ADN proveniente de células muertas o no viables dando lugar a una estimación por exceso, pudiéndose detectar *Legionella* en muestras recogidas 6 semanas antes [4]. También se ha observado inhibición de la amplificación en muestras debido a la presencia de materia orgánica y metales pesados [13].

Las limitaciones de la PCR son, en comparación con el método estándar de cultivo, aceptables debido a que una sobreestimación puede dar lugar a falsos positivos y a un gasto innecesario de recursos, en cambio una infravaloración de las ufc de *Legionella* puede traducirse en un problema de salud pública.

Con el fin de suprimir la amplificación del ADN de las células no viables se puede acoplar un tratamiento previo con monoazida de etidio (EMA). Este compuesto traspa las membranas comprometidas y se une al ADN evitando la posterior amplificación por la ADN polimerasa. Se ha comprobado que el método funciona comparándolo con el cultivo y la PCR tradicional, por contra el pretratamiento deja de ser tan efectivo cuando el número de ufc es elevado [14].

Desarrollar un método más adecuado que la qRT-PCR dada su alta sensibilidad es complicado, aunque en los últimos años la investigación en biosensores unido al desarrollo de nanomateriales constituye una alternativa atractiva desde el punto de vista económico y de la sencillez [15].

Los biosensores y más concretamente los genosensores aportan además de la especificidad inherente a la detección del ADN, una plataforma sencilla y barata. El corto tiempo de análisis y la fácil interpretación de los datos son otras cualidades que aumenta el interés en el desarrollo de estos métodos.

La detección directa del ADN de la *Legionella* mediante un genosensor es posible aunque debido al gran enrollamiento del DNA genómico dentro de la célula, es difícil que sin un pretratamiento adecuado de la muestra se puedan lograr los extremos límites de detección que el problema que se plantea demanda. Como alternativa a la detección de ADN se han desarrollado en los últimos años métodos para la detección

del ARN ribosómico, debido al elevado número de copias que existen por célula y a su menor tamaño.

Más recientemente el gen 16S se ha convertido en una elección muy adecuada para la determinación del patógeno, además la detección de esta secuencia proporciona la ventaja de que su existencia está íntimamente relacionada con la actividad microbiana de la *Legionella* [5]. Centrándose en la detección de este gen se han desarrollado métodos con detección electroquímica [16-18] y fluorescente [19-21]. También se han desarrollado otros métodos como impedancia [22] y resonancia de plasmón superficial [5, 23, 24] ya que estas técnicas son más sensibles cuanto mayor es el tamaño del analito, y no exigen el empleo de reactivos marcados.

1.3. Monocapas autoensambladas

En la construcción de biosensores hay una amplia variedad de reactivos utilizados para la modificación del transductor con el objetivo de inmovilizar el receptor y así generar la fase sensora, siendo la preparación de monocapas autoensambladas o SAM's (*self-assembled monolayers*) una de las alternativas más comunes. Hay muchos compuestos capaces de autoensamblarse, siendo la unión entre el azufre y los metales nobles uno de los procedimientos más ampliamente utilizados [25]. Entre los diferentes receptores inmovilizados mediante esta estrategia, se puede destacar la generación de superficies de ADN inmovilizando la sonda de reconocimiento sobre transductores de oro, para posteriormente utilizar la reacción de hibridación entre secuencias de ADN complementarias como reacción de reconocimiento molecular.

En los primeros estudios se inmovilizaba un reactivo tiolado para posteriormente utilizando la reacción de la carbodiimida unir covalentemente las hebras de ADN utilizadas como sonda [26]. Con el objetivo de generar monocapas más densas se optó por autoensamblar la hebra tiolada directamente, en cambio esta práctica no proporcionó buenos resultados en sus inicios debido a la afinidad que poseen las bases nitrogenadas del ADN por el oro [27].

La solución a estas interacciones inespecíficas fue aportada por Tarlov y sus colaboradores [28] proponiendo la adición de otro tiol inerte controlando de esta manera las propiedades de la monocapa. Se observó que esta estrategia no solo controlaba la

densidad de empaquetamiento de las hebras, espaciándolas y favoreciendo la hibridación, sino que disminuía las uniones de otros reactivos, incluidas las bases nitrogenadas del ADN, a la superficie del transductor. Tarlov utilizó el 6-mercaptop-1-hexanol como bloqueante debido a que este alcanotiol tiene las propiedades adecuadas para bloquear las uniones inespecíficas.

Se han publicado muchos trabajos describiendo las aplicaciones de las SAM's [29, 30] haciendo énfasis en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Aprovechando todos estos estudios se ha abordado la detección de una amplia variedad de analitos, poniendo de manifiesto las ventajas que aporta este sistema.

1.4. El 4-aminotiofenol como bloqueante alternativo

El uso de bloqueantes con el fin de eliminar las uniones inespecíficas a la superficie electródica es muy común en el diseño de genosensores. Esta práctica ha sido ampliamente descrita en muchos trabajos.

El 6-mercaptohexanol y el 11-undecanol como bloqueantes han sido las primeras opciones en los trabajos en los que se selecciona como superficie del transductor oro [31], mostrando una disminución importante de la señal de los blancos. Estos alcanotioles contribuyen además a desplazar las hebras de ADN adsorbidas a través de las bases nitrogenadas al oro y orientan la sonda de captura de manera que la reacción de hibridación en superficie sea favorable.

Las monocapas autoensambladas de 4-aminotiofenol (4-ATP) y de otros compuestos aromáticos similares han sido estudiadas desde los años 90, en cambio no hay apenas trabajos que describan el 4-ATP como bloqueante en un genoensayo completo.

Se han hecho estudios de polimerización con anilina en disolución aprovechando la capacidad del 4-ATP de formar electroquímicamente un radical que inicie la polimerización preservando el enlace con el sustrato [32, 33].

Las monocapas de 4-ATP también han resultado muy eficaces para la inmovilización de sondas de ADN en superficie por medio de su grupo amino [34], sin embargo el hecho de poseer este grupo funcional orientado hacia la disolución hace

muy sensible la monocapa a los cambios de pH, pudiéndose observar adsorciones de compuestos cargados negativamente a pH ácido [35].

La principal diferencia del 4-ATP con los bloqueantes más utilizados es su grupo aromático. Al inmovilizar este compuesto sobre la superficie se espera que la interacción y la deslocalización electrónica hagan posible un buen bloqueo de la superficie electródica y una buena transferencia de corriente a través de la monocapa. Se ha comprobado la capacidad bloqueante con monocapas autoensambladas de compuestos muy similares como el tiofenol, observando un elevado bloqueo de la superficie a la transferencia electrónica de los pares redox ferro/ferricianuro y hexamin rutenio respecto al observado para el 4-ATP [36]. En este trabajo se concluye que esta diferencia de bloqueo proviene de la repulsión entre los dipolos momentáneos que forma el 4-ATP debido a la deslocalización electrónica con el grupo amino, formándose así monocapas menos compactas y por lo tanto más conductoras.

Hay otros estudios que afirman conseguir una alta densidad de empaquetamiento, y por lo tanto una alta capacidad de bloqueo al autensamblar monocapas de 4-ATP en concentraciones de 10 mM (muy altas) durante 46 horas [37], sin embargo estos tiempos no son asumibles en una etapa de un genoensayo electroquímico.

La utilización del 4-ATP como bloqueante de la superficie es una buena alternativa a los bloqueantes comúnmente más utilizados como el 6-mercaptohexanol. A su capacidad de evitar las uniones inespecíficas se le une la alta conductividad a través de la deslocalización electrónica de sus anillos aromáticos. Otra gran ventaja de este compuesto es la interacción Π (*stacking Π*) entre los anillos que le confiere una mayor estabilidad una vez ensamblado.

1.5. Gen 16S rRNA

El ARN ribosómico 16S (**Figura 1**) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía de bacterias. Este hecho se debe a que está presente en todas las bacterias actuales, su estructura y función ha permanecido constante durante un largo periodo de tiempo, es relativamente largo (1500 pares de bases) y ha conservado su estructura secundaria [38].

A todas estas características se suma la gran cantidad de estudios que permiten conocer su estructura, lo que convierte a esta secuencia en una diana adecuada para la determinación de *Legionella*. En cambio, la estructura secundaria y la inestabilidad inherente del ARN complican el análisis desde un punto de vista operacional siendo este hecho compensado por el gran número de copias presente en cada célula que actúa como un sistema de amplificación [5]. El número de copias por ribosoma es de 6800 y permite posteriormente al análisis el cálculo de la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) en la muestra [39].

El ARN ribosómico 16S se considera una huella dactilar de la *Legionella* y ha sido el objeto de análisis de diferentes métodos, convirtiéndose en una opción alternativa que aporta grandes ventajas, sobre todo desde el punto de vista de la sensibilidad.

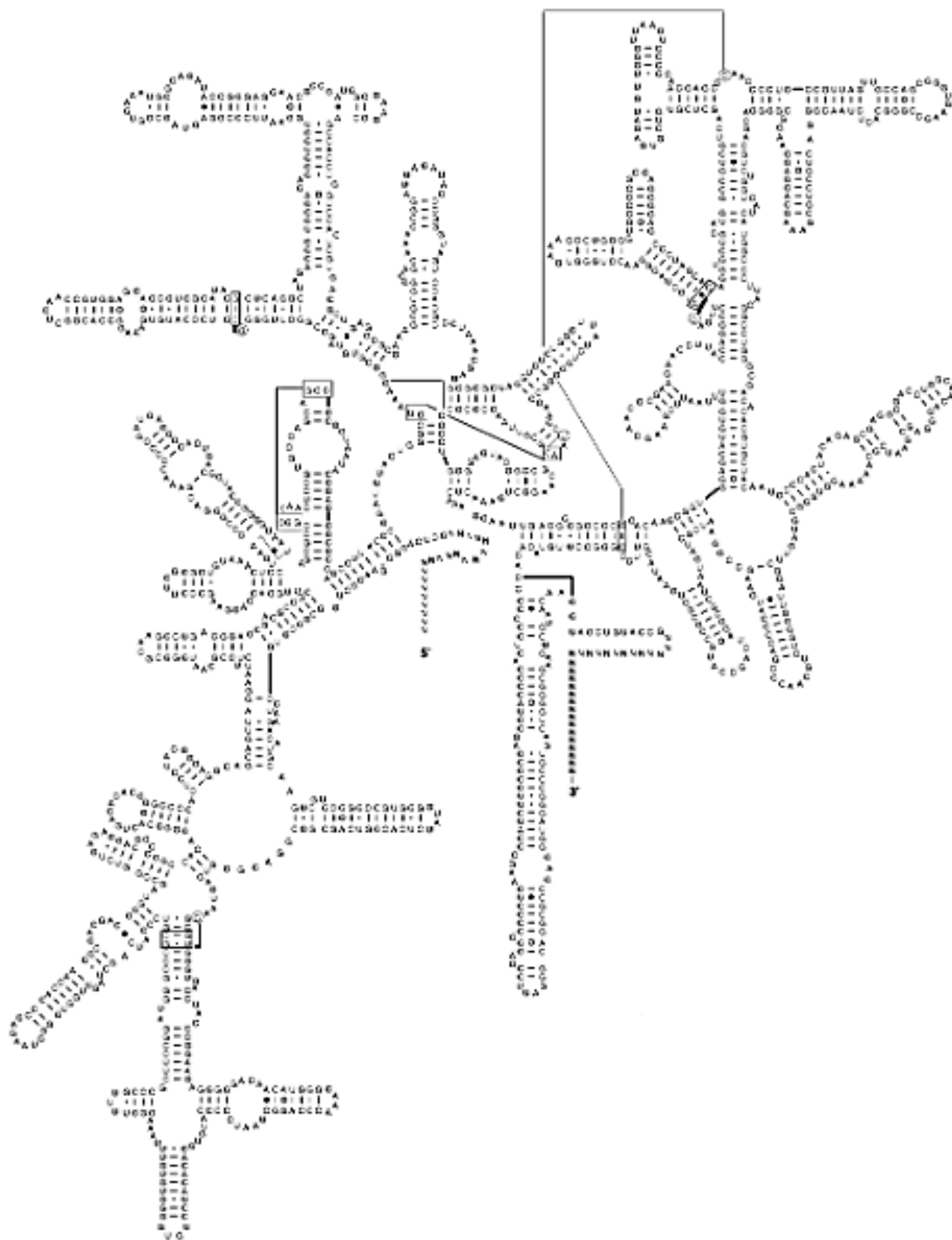


Figura 1. Estructura secundaria del ARN ribosómico 16S [40].

2. OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la introducción, la *Legionella* es un patógeno con una alta tasa de mortalidad, por ello es necesario el desarrollo de métodos que permitan una detección rápida y por lo tanto una prevención previa a cualquier riesgo de contagio.

En el presente trabajo se aborda el diseño de un genosensor electroquímico para la detección del gen 16S rRNA utilizando como transductor un electrodo de oro aprovechando el potencial de las monocapas autoensambladas. Se ha seleccionado el 4-ATP como reactivo bloqueante dado su potencial para reducir las uniones inespecíficas y la elevada conductividad que aporta a través de la monocapa.

Con el fin de desarrollar un sistema sencillo acoplable a sistemas portátiles que permitan la detección de *Legionella* en el punto de riesgo de proliferación (*point of care*) y con un precio aceptable se han fijado los siguientes objetivos:

- i. Desarrollo de un genosensor para *Legionella pneumophila* con formato sándwich empleando fluoresceína como etiqueta para la secuencia indicadora, un conjugado monovalente antiluoresceína peroxidasa como molécula marcadora y diferentes superficies de oro, provenientes de consumibles de discos para la detección por SPR y CD's, como superficie del transductor. Demostración de la universalidad de este ensayo comparándolo con trabajos anteriores realizados para Salmonella.
- ii. Optimización de las características de diseño del genosensor mediante el estudio de la influencia del sustrato y la cantidad de hebras de ADN inmovilizadas sobre el transductor. Se evaluarán las características de respuesta del sensor y especialmente el efecto que la naturaleza de la superficie electródica tiene sobre la estabilidad.
- iii. Evaluación de la capacidad del sensor para la detección de ufc de *Legionella pneumophila* utilizando el ARN ribosómico como secuencia diana.

3. MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS

3.1 Reactivos

Las secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo fueron sintetizadas por IDT España (*integrated DNA technologies*). Sus secuencias de bases se especifican en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias y función de los oligonucleótidos empleados.

Función	Secuencia de 5' a 3'
Sonda de captura	HS-AGTCAA CCAGTATTATCTGACCGTCCCA
Sonda de detección	GGTTAAGCCCAGGAATTCACAGATAACTT-(6-FAM)*
Sonda analito	AAGGGTGC GTAGGTGGTTGATT AAGTTATCTGTGAAATTCCTGG GCTTAACCTGGGACGGTCAGAT AATACTGG TTGACT

*El 6-FAM es un fluoróforo comúnmente utilizado como marca en hebras de ADN ya que posee un grupo carboxílico fácil de bioconjugarse al grupo fosfato del ADN.

La parte de la sonda analito coloreada de rojo son las bases que no se hibridan con las sondas de captura y detección, y que quedarán en forma de hebra simple en la parte más alejada del electrodo. De este modo se tiene en cuenta a pequeña escala la influencia de la longitud de la secuencia en la eficacia de la reacción de hibridación y el posterior marcaje enzimático y detección, en nuestro caso cuando se realice la reacción de hibridación con la secuencia diana, un fragmento del gen que codifica el 16S rRNA.

El oligonucleótido modificado con el grupo tiol se suministró en forma protegida con un grupo disulfuro para minimizar la oxidación que conduciría a la formación de disulfuros entre las propias hebras de ADN. Es necesario, por tanto, reducir el grupo disulfuro con ditioneitol (DTT).

La disolución posteriormente se purificó con una columna de exclusión por tamaños NAP-10 Sephadex G-25 DNA Grade (GE Healthcare) y finalmente se determinó la concentración del oligonucleótido tiolado espectrofotométricamente a 260 nm.

Otros reactivos generales utilizados en este trabajo se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Disoluciones y reactivos empleados en el ensayo.

Reactivo	Pureza	Casa comercial
20 × SSPE*		Sigma-Aldrich
10 × PBS*		Sigma-Aldrich
PBS-Caseína		Sigma-Aldrich
Alcohol isopropílico		Prolabo
3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB)	99%	Sigma-Aldrich
FAB anticuerpo antilfluoresceína-HRP		Roche
H₂SO₄	95-97%	Merck
H₂O₂	33 %	Sigma-Aldrich
Albúmina de suero bovino		Sigma-Aldrich
HNO₃	65%	Merck
Hexano	97%	Sigma-Aldrich

*El SSPE es una disolución reguladora de fosfato 0.2 M de pH aproximado 7.4 que contiene 2.98 M de NaCl y 0.02 M EDTA.

*El PBS es una disolución reguladora de fosfato 0.01 M, 0.0027 M de KCl y 0.137 M de NaCl, su pH aproximado es de 7.4.

La composición de las disoluciones empleadas en las diferentes etapas de construcción y operación del genosensor es la siguiente:

- Disolución de sonda de captura, bloqueante y lavado: 2×SSPE (dilución 1:10 de 20×).
- Disolución de hibridación: 2×SSPE + 0.25% albúmina de suero bovina.
- Disolución de marcaje: PBS 1× (dilución de la disolución comercial 1:10) + 0.5% caseína.

✚ 3.2. Instrumentación

La señal electroquímica se mide por medio de un potenciostato PGSTAT 10 controlado por un equipo informático que lleva incorporado el programa GPES 4.9.

Se trabajó con 3 tipos de electrodos de oro, el primer tipo es un modelo comercial de la casa BASi (**Figura 2**). Estos electrodos están recubiertos de un polímero y poseen una barra de oro en su extremo que proporciona una superficie de oro de 1.6 mm de diámetro.



Figura 2. Electrodos de oro de la casa comercial BASi.

Los otros dos tipos de electrodos son construidos manualmente en el laboratorio a partir de superficies de oro depositado mediante un proceso de *sputtering* sobre sustratos de diferente naturaleza. El primer tipo proviene de discos de vidrio para la detección por espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie, que incorporan sobre el vidrio una capa adherente de cromo y el segundo proviene de superficies de CD's de la marca MAM-A utilizados para el almacenaje de datos durante largos periodos de tiempo (**Figura 3**), en los que el oro se utiliza como capa reflectante sobre un sustrato de policarbonato.

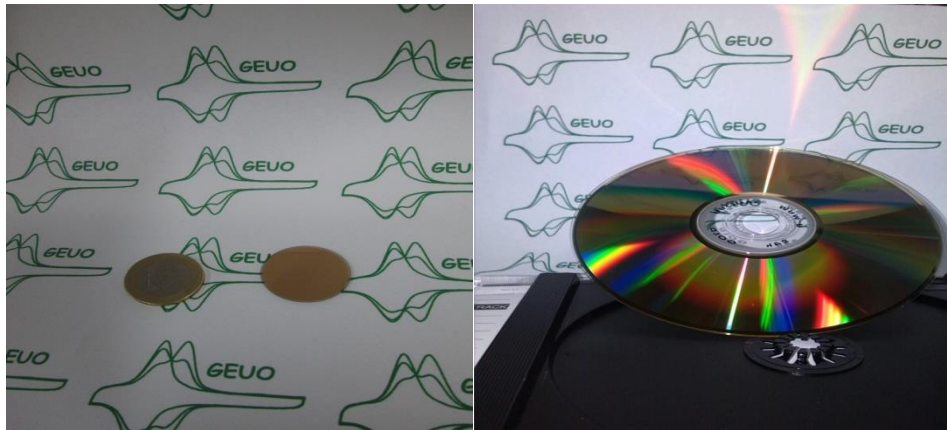


Figura 3. Discos de SPR (izquierda) y CD's de oro (derecha) utilizados para la construcción de electrodos.

3.3. Procedimientos experimentales

3.3.1. Preparación de los electrodos

Los electrodos de BASi son pulidos con alúmina en primera instancia para eliminar las primeras capas de oro y con ello eliminar la suciedad presente en su superficie, son por tanto reutilizables. Posteriormente se introducen en un baño de ultrasonidos durante un minuto para remover la alúmina que ha quedado y ya están listos para un posterior tratamiento electroquímico.

Los electrodos construidos manualmente se preparan de forma análoga. En primer lugar, se cortan del sustrato de partida porciones de 3 mm de ancho y 10 mm de largo aproximadamente a las que se les acopla una tira de cobre para obtener el contacto eléctrico. Posteriormente se define la superficie del electrodo de trabajo con dos tiras de teflón que además evitan que el resto del oro entre en contacto con la disolución. Finalmente se envuelve el conjunto con teflón con el fin de evitar que las disoluciones entren por el lateral y accedan a la tira de cobre. Se puede ver una secuencia resumida de la construcción en la **Figura 4.**

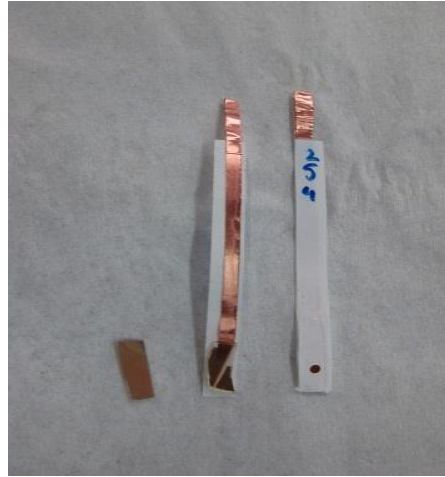


Figura 4. Etapas del proceso de construcción de los electrodos de izquierda a derecha.

La diferencia en el protocolo es previa a la propia construcción. Los discos de SPR son lavados con alcohol isopropílico y posteriormente se les expone a disolución *piranha* (70% H_2SO_4 :30% H_2O_2) 30 segundos habiendo enfriado la disolución *piranha* previamente durante 90 segundos. Una vez realizado este pretratamiento se lava con abundante agua y ya se puede realizar el montaje.

En el caso de los electrodos montados a partir de CD's el pretratamiento es más complejo. El CD posee comercialmente 4 capas, de abajo a arriba: un sustrato de policarbonato, un polímero fotodegradable, capa de oro de entre 50-100 nm y un polímero protector [41].

Para poder dejar al descubierto el oro es necesario eliminar el polímero protector, para ello la alternativa aconsejada por varios autores es poner en contacto el CD con ácido nítrico concentrado [41, 42]. El tiempo de exposición es variable, siendo necesario retirar el ácido con abundante agua cuando comienza a observarse que el polímero pierde su adherencia al oro. Una vez retirado el polímero se lava con hexano-agua-ácido nítrico: agua 1:1-agua repetidas veces (mínimo 3) para eliminar los diferentes restos de oligómeros que permanecen en la superficie del oro.

Una vez retirado el polímero totalmente se puede observar la difracción de la luz al incidir sobre el CD, esto es debido a que las pistas destinadas a la grabación siguen presentes en la superficie. Varios autores estudiaron la superficie del CD por AFM (microscopía de fuerza atómica) observando una distribución de pistas cada 1 μm y una

profundidad de aproximadamente 200 nm [42, 43]. Esta característica unida a la poca rugosidad mostrada por la superficie hace que este formato de electrodo sea adecuado para la construcción de un genosensor.

Los tres tipos de electrodos son sometidos después a tratamientos electroquímicos que serán explicados con más detalle en secciones posteriores.

3.3.2. Construcción del sensor

La construcción del sensor se inicia con la inmovilización de la sonda de captura tiolada sobre los electrodos limpios.

Para ello se añaden 6 μL de disolución de oligonucleótido tiolado (Sonda de captura) preparado en disolución reguladora 2 \times SSPE (**Esquema 1**, etapa 1). Los electrodos se dejan durante toda la noche en atmósfera húmeda a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$ en nevera. Posteriormente se lava con la misma disolución reguladora, se secan con corriente de nitrógeno y se añaden 6 μL de disolución de 4-ATP de la concentración adecuada, manteniéndose 50 minutos en nevera en las mismas condiciones de temperatura y humedad (**Esquema 1**, etapa 2)

3.3.3 Protocolo de operación

Con el genosensor construido se propone el empleo de un ensayo de hibridación con formato sándwich en el que se distinguen dos etapas: hibridación homogénea e hibridación heterogénea.

A) Hibridación homogénea

En un tubo eppendorf se añade un volumen adecuado de la disolución que contiene la secuencia analito y la disolución de sonda de detección, ambas en 2 \times SSPE con 2.5% de BSA (**Esquema 1**, etapa 3). Después de 30 minutos esta disolución es adecuada para su empleo en la segunda etapa. Todas las operaciones en las que se maneja la sonda marcada se han de realizar en protegidos de la luz ya que el 6-FAM se degrada en su presencia, por ello los eppendorf se cubren con papel de aluminio.

B) Hibridación heterogénea

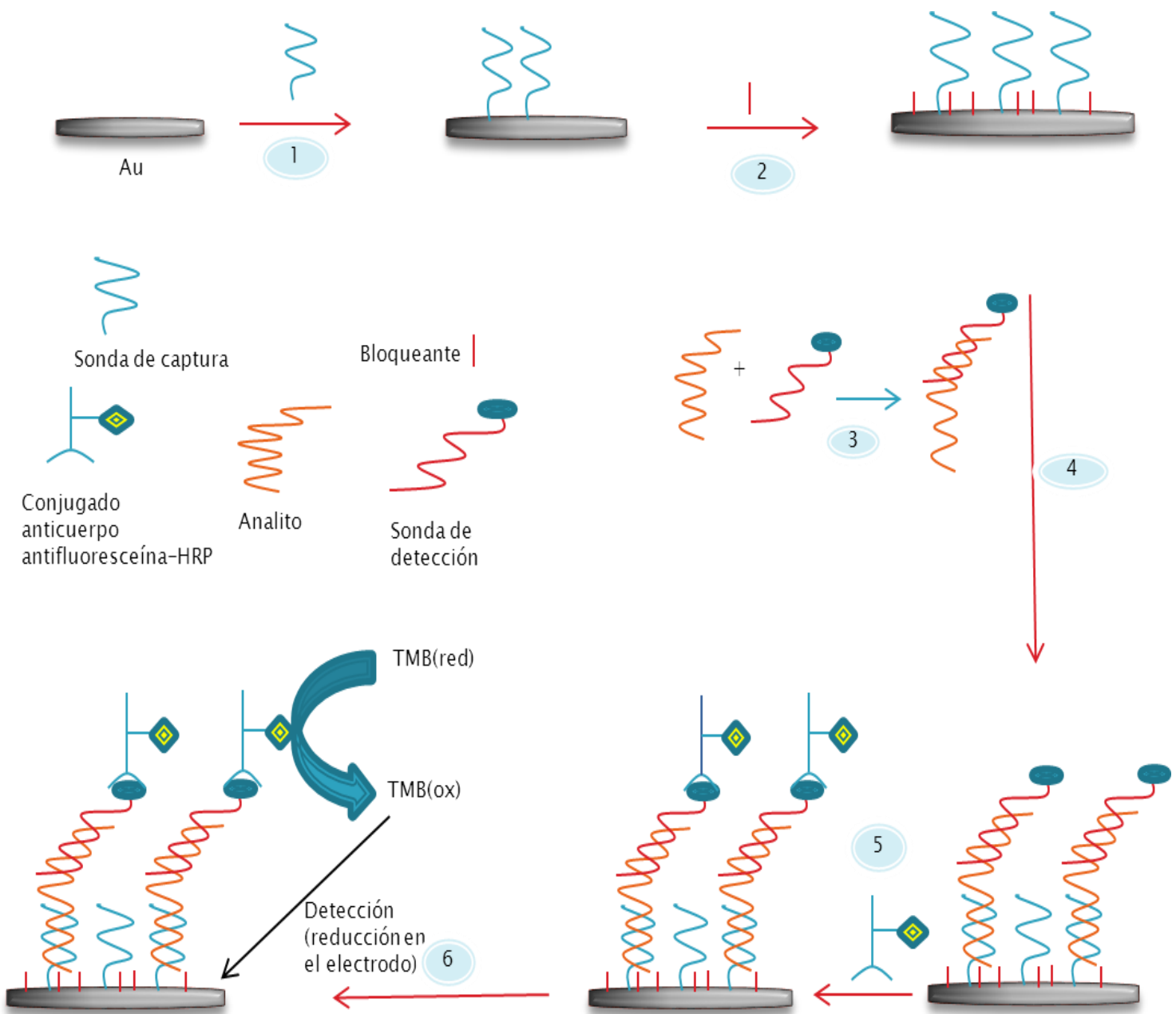
Una vez terminada la primera etapa de la hibridación, sobre los sensores limpios y secos se añaden 6 μL de la disolución preparada en la etapa anterior (**Esquema 1**, etapa **4**), para proteger los dispositivos de la luz las placas de Petri donde se introducen los electrodos se cubren con papel de aluminio.

En estas condiciones se mantienen los electrodos durante 120 minutos, tiempo suficiente para que el dúplex formado por analito y sonda de detección difunda hacia la superficie electródica donde se encuentra la sonda de captura, formándose el híbrido de tres componentes en superficie.

Para visualizar electroquímicamente que se ha producido el evento de la hibridación la siguiente etapa en la operación con el sensor es el marcaje enzimático. En esta etapa se utiliza una dilución 1/300 (150 U/mL) del conjugado anticuerpo antifluoresceína-HRP, fragmento Fab con PBS + 0.5% de caseína. Una vez limpiados los electrodos con disolución reguladora y secados con corriente de nitrógeno se añaden 6 μL de esta disolución y se mantienen protegidos de la luz durante 30 minutos (**Esquema 1**, etapa **5**).

A continuación, los electrodos se lavan con la disolución reguladora habitual y se secan con corriente de nitrógeno antes de ser introducidos en una microcelda con un puente salino de KCl saturado. En la microcelda se añaden 500 μL de la disolución comercial de TMB y H_2O_2 y después de 30 segundos de reacción se mide el producto de la reacción enzimática (**Esquema 1**, etapa **6**). Las medidas cronoamperométricas se llevan a cabo a un potencial de 0 voltios durante 60 segundos.

La enzima oxida el TMB y posteriormente se aplica un potencial de 0 V para reducir todo el TMB oxidado. Cuanta más enzima, más reactivo se oxida y más señal se registrará al reducirlo.



Esquema 1. Esquema que resume todos los pasos del procedimiento experimental. **1)** Inmovilización de la sonda de captura, **2)** Bloqueo de la superficie, **3)** Hibridación homogénea, **4)** Hibridación heterogénea, **5)** Marcaje enzimático, **6)** Detección.

4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

✚ 4.1. Diseño de las secuencias de nucleótidos

El proceso de diseño de un genosensor comienza con la elección de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a utilizar como diana. Esta debe ser lo más específica posible del patógeno que queremos detectar. Se busca una secuencia de ADN que no tenga cualquier otro ser vivo, y que, por tanto, pueda interferir en el análisis.

Como se ha comentado en la introducción el gen 16S rRNA puede considerarse como una huella dactilar de la evolución de las bacterias, siendo por tanto una buena elección para seleccionar la secuencia analito. En este trabajo se seleccionó una secuencia de 80 bases procedente del gen 16S rRNA que se muestra en la **Tabla 2**:

AAGGGTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTGGGACGGTC
AGATAATACTGGTTGACT

Para comprobar la especificidad se introduce esta secuencia en el programa BLAST[44, 45], donde es comparada con su base de datos que contiene secuencias de material genómico de todos los seres vivos. De las 100 comparaciones proporcionadas por el programa se obtuvo entre 99-100% de igualdad (coincidencia en número de bases), que se corresponden en un 100% a la especie *Legionella pneumophila*.

Durante el proceso de operación del sensor es necesario que la secuencia diana forme un híbrido estable con las secuencias de captura e indicadora, por tanto, otra característica importante de la secuencia seleccionada como analito es su capacidad para formar estructuras secundarias, que deben destruirse durante el proceso de hibridación.

En la **Figura 5** se muestran las estructuras más estables obtenidas por el programa MFOLD[46] ya sea en forma de ADN o ARN. Las energías son de -7.58 Kcal/mol y -22.60 Kcal/mol respectivamente.

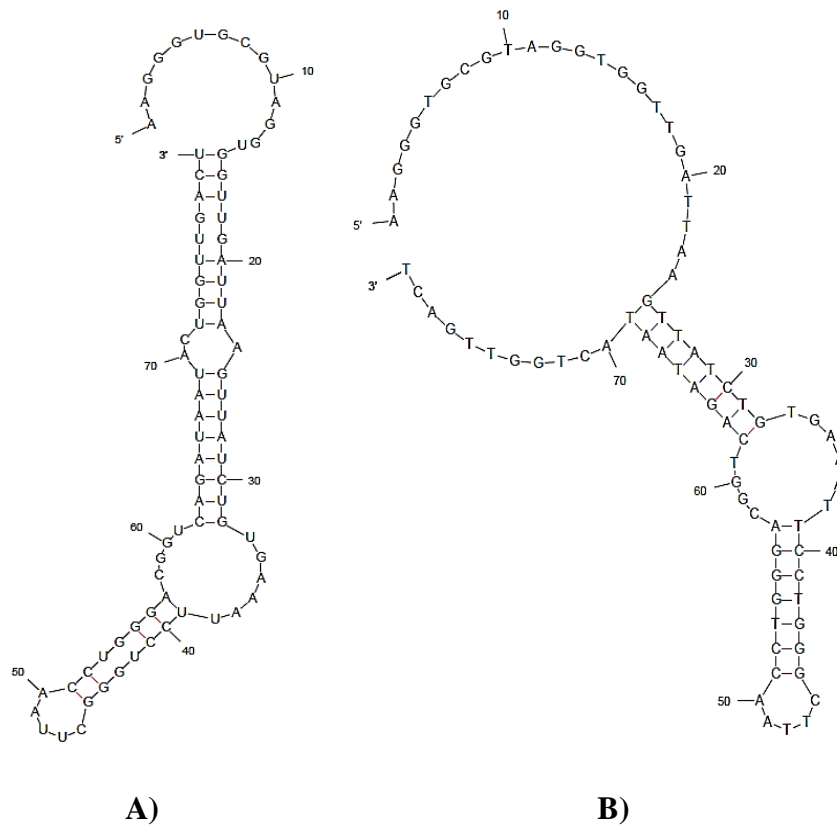


Figura 5. Estructuras secundarias de la secuencia analito. **A)** ARN. **B)** ADN.

Tal como se muestra gráficamente en el **Esquema 1**, el formato de ensayo seleccionado exige diseñar dos secuencias de ADN complementarias a distintas partes de la secuencia analito, una de ellas actuará como secuencia de captura y será, por tanto, inmovilizada sobre la superficie del transductor y la segunda funcionará como secuencia indicadora.

Al tener dos zonas de complementariedad se aumenta la selectividad del ensayo, aunque dividir la secuencia analito en dos partes iguales no es trivial ya que es necesario tener en cuenta las estructuras secundarias de todas las secuencias, que deben ser desfavorables con relación a la reacción de hibridación con la secuencia diana.

Para establecer la partición más adecuada para el diseño del ensayo se utiliza, de nuevo, el programa MFOLD con el fin de establecer las secuencias con el menor número de estructuras secundarias que permitan hibridar con una barrera energética lo menor posible.

4.2. Optimización de la superficie del transductor electroquímico.

En el presente trabajo se utiliza la afinidad del grupo tiol por el oro para formar monocapas autoensambladas. Es muy importante controlar el estado inicial del oro para posteriormente realizar el genoensayo.

Los átomos de oro se disponen en un empaquetamiento cúbico compacto pudiendo estar expuestos en la superficie diferentes planos cristalográficos. Los planos que se muestran en la **Figura 7** son los de un menor índice, siendo éstos los mayoritarios en cualquier superficie de oro.

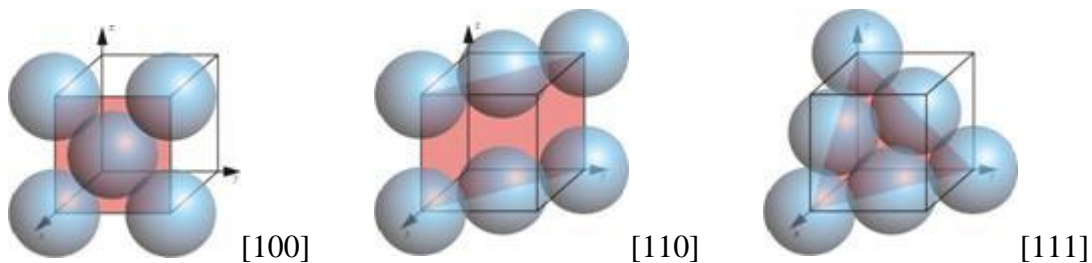


Figura 7. Planos cristalográficos mayoritarios en el oro.

El estudio de las características de la microestructura es el paso previo para la comprensión de sus propiedades macroscópicas. La adsorción de compuestos [48] y la deposición de monocapas autoensambladas de tioles [49] en los diferentes planos cristalográficos del oro muestran que dependiendo del plano se adoptan diferentes ángulos, densidades de empaquetamientos y geometrías.

Arvia y sus colaboradores [50] ya describieron tratamientos electroquímicos en ácido sulfúrico 0.5 M en los años 80 mediante los cuales se puede orientar preferente la superficie del oro con voltametría de onda cuadrada. La generación de los distintos planos depende de la frecuencia y de la amplitud del pulso, sobretodo del potencial menor aplicado. El proceso descrito se basa en la formación de óxidos “solubles” del oro y la posterior deposición controlada por reducción de estos.

Cada agrupación de átomos en superficie se refleja también en su reactividad electroquímica, pudiendo caracterizarse los distintos tipos de superficie por voltametría

cíclica. Un claro ejemplo es la zona capacitiva (zona del voltograma en la que no están implicados los procesos electroquímicos del oro) del voltograma del oro, en el cual se pueden observar diferentes procesos de la adsorción del hidrógeno en los diferentes planos del oro [51].

Basándose en estos tratamientos previos, en el presente trabajo se desarrollaron varios tratamientos electroquímicos con el fin de generar una superficie de oro policristalina (combinación de todos los planos) y otra orientada preferentemente en el plano [111]. No se ha descrito que efecto tiene la orientación superficial en la señal obtenida en un genoensayo, por lo que se intentó comparar una superficie orientada preferentemente [111] con otra “desordenada”. Esto es posible ya que los electrodos construidos a partir de discos de SPR y de CD's son fabricados por *sputtering*, siendo el plano [111] el más favorecido al utilizar esta técnica [43].

Los tratamientos electroquímicos se basan en 2 ciclos de anodización/catodización del electrodo en H_2SO_4 0.5 M desde -1 V a + 2 V para posteriormente realizar varios barridos cíclicos a 100 mV/s. El primer ciclo muestra una superficie policristalina mientras que la realización de aproximadamente 30 ciclos da como resultado una superficie orientada preferentemente [111]. Esto se puede entender si se tiene en cuenta los valores extremos de potencial aplicado, los cuales no permiten una deposición controlada del oro, en cambio cuando vamos removiendo capas de la superficie se observa el oro del sustrato, que como se ha comentado anteriormente es preferentemente [111]. Si se aplican potenciales menores (entre -0.8 y +1.7 V) se puede obtener la orientación [111] en apenas 7 ciclos.

Cuando se expone en el trabajo que es una orientación preferente hay que tener en cuenta que todavía un alto porcentaje del oro tiene las otras dos orientaciones. Wandlowski y colaboradores [52] desarrollaron un tratamiento electroquímico en el cual se generaba una superficie con un altísimo porcentaje de oro [111]. Este tratamiento consistía en realizar decenas de ciclos en la zona capacitiva (aproximadamente de 0 a 1 V) a 10 mV/s llevando a cabo una reconstrucción atómica de la superficie, sin embargo este tratamiento lleva un tiempo demasiado elevado y es inaceptable para la alta cantidad de electrodos que se necesitan para la puesta a punto de un genoensayo.

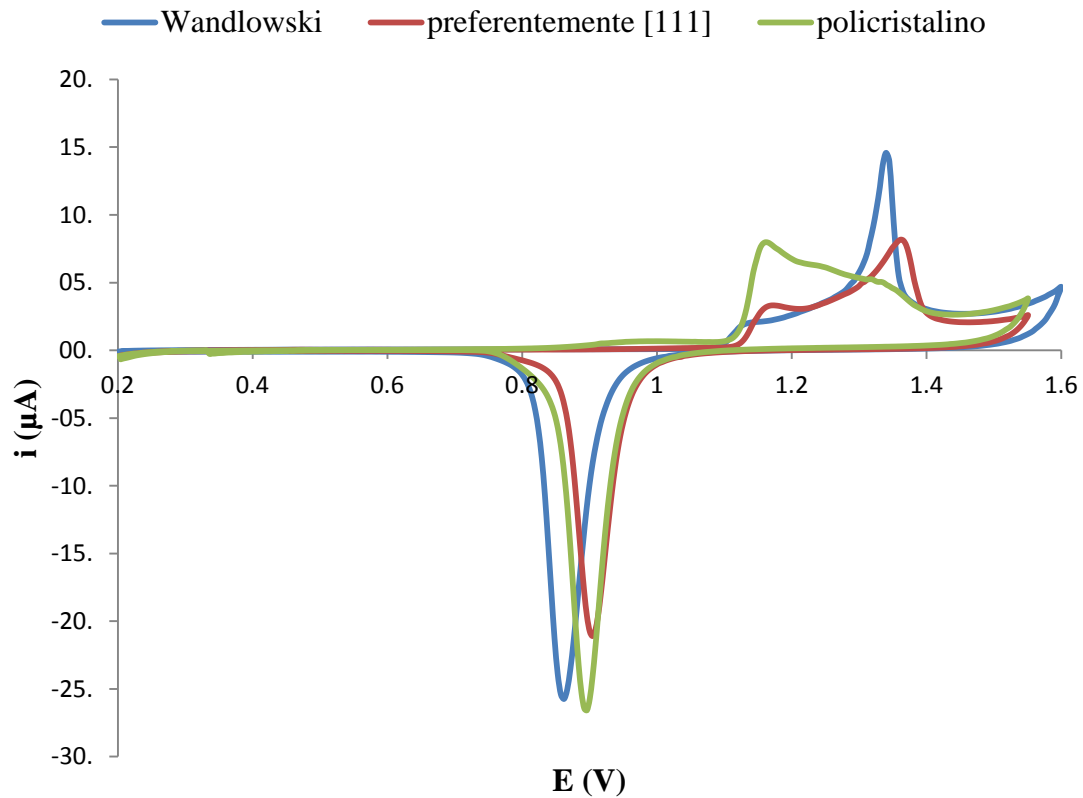


Figura 8. Voltagramas obtenidos para los diferentes tratamientos electroquímicos en H_2SO_4 0.5 M frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl con puente de KNO_3 saturado

En la **Figura 8** se puede observar el diferente comportamiento voltamétrico de las superficies de oro, dependiendo de cuál sea la conformación superficial de las mismas. Los dos primeros picos del voltagrama del oro policristalino (línea verde) son característicos de los planos [110] y [100] (de izquierda a derecha), siendo el último de ellos la huella dactilar del plano [111]. Esta sucesión de picos es debida a la termodinámica y a la cinética de la oxidación de los distintos planos, siendo el oro [110] el que menor densidad de átomos de oro posee y por tanto el más sensible a la coordinación de ligandos.

En la **Figura 9** se presenta el voltagrama característico de superficies de oro orientadas preferentemente [111] descrito en la bibliografía, que concuerda con el obtenido en este trabajo con electrodos de oro preparados por sputtering y sometidos a un tratamiento electroquímico.

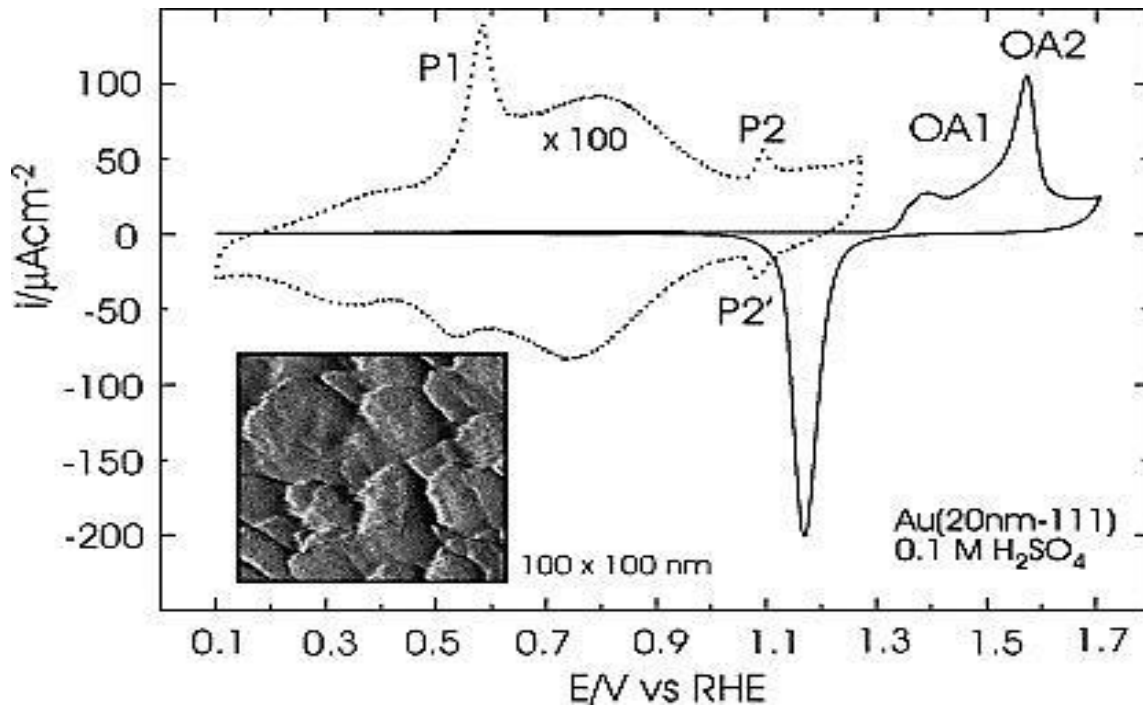


Figura 9. Voltagrama descrito en la bibliografía para el oro [111] [52].

El oro [111] tiene una característica especial, forma estructuras muy ordenadas a lo largo de una superficie denominadas “terrazas”. Estas estructuras han sido observadas por AFM, además tienen la capacidad de formar monocapas de sulfato en H_2SO_4 que solo son posibles en superficies altamente ordenadas [53]. Dichas monocapas de sulfatos se manifiestan en voltimetría cíclica mediante un pico simétrico en la zona capacitiva que se puede observar en la **Figura 9** (pico P2/P2'). Este pico también ha sido registrado en el presente trabajo (**Figura 10**), lo que indica que la superficie de análisis está orientada preferentemente [111].

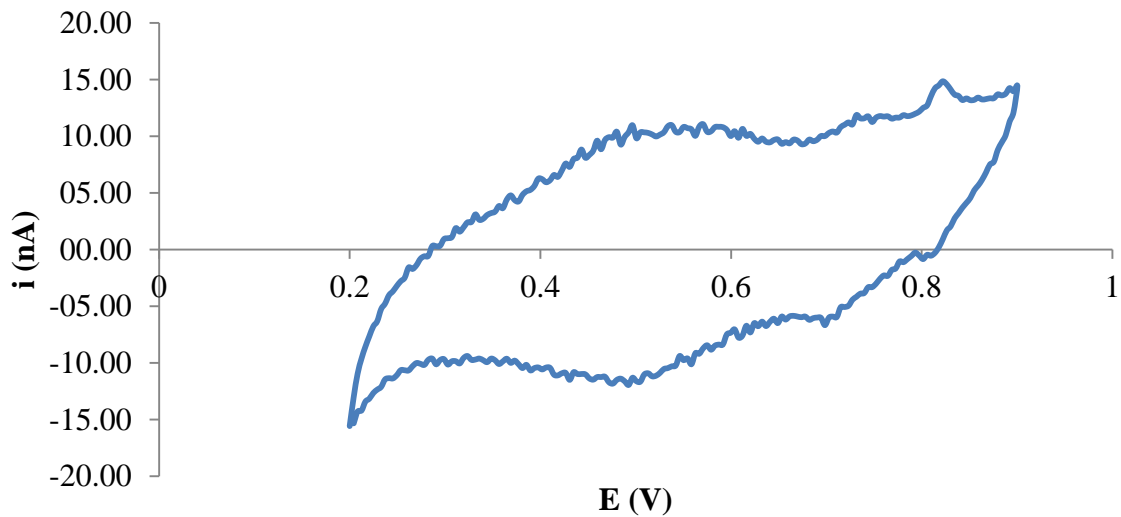


Figura 10. Voltagrama de la zona capacitiva de una superficie orientada [111] en H_2SO_4 0.5 M frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl con puente de KNO_3 saturado.

Entre las terrazas se forman escalones donde el desorden aumenta. En estos escalones la distribución de carga no es homogénea, esto implica que en aquellos lugares donde existen defectos superficiales como escalones se generan dipolos en superficie que influyen en la forma en la que las especies se adsorben [54].

En el presente trabajo se pretende evaluar cómo afecta el estado de la superficie en la formación de las monocapas autoensambladas. Se trata de validar mediante la realización de un genosenso electroquímico la influencia de desarrollar dicho ensayo sobre una superficie policristalina o sobre una orientada preferentemente [111].

Hay estudios previos con alcanotioles [49] en los que se demostró que su densidad superficial es mayor en el oro [100], seguido del [111] y siendo el menor recubrimiento para el plano [110]. Sin embargo una densidad superficial mayor no tiene necesariamente que conducir a un ensayo más sensible. Wandlowski y sus colaboradores [55] evaluaron la señal obtenida para una monocapa de alcanotioles marcados con ferroceno, obteniendo una sensibilidad mayor con la superficie orientada [111], seguida de la [100] y por último la [110]. Estos resultados se explican por la presencia de terrazas, que dan lugar a un mayor orden en la superficie y por tanto en la monocapa formada que permite una detección más sensible. También se comparó este comportamiento con el que muestra el oro policristalino llegando a la conclusión de que

estos electrodos no presentan terrazas y que los alcanotioles autoensamblados se desordenan en esta superficie disminuyendo la señal.

Con el fin de seleccionar la mejor superficie para el genoensayo y basándose en los tratamientos electroquímicos descritos se comenzó el estudio sobre electrodos construidos sobre discos de SPR. El estudio se realizó según los protocolos descritos en la sección 3. Con una concentración de sonda de captura de 0.1 μM y 1 mM de 4-aminotiofenol.

Se puede estimar el área electroquímica a partir de la carga necesaria para formar o redissolver electroquímicamente una monocapa compacta en la superficie [56]. Así el área electroquímicamente activa del electrodo de oro se puede obtener teniendo en cuenta que la carga necesaria para reducir una capa de óxidos de oro adsorbidos es 383 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$. En este trabajo, la respuesta de corriente obtenida en las diferentes medidas se expresará como densidad de corriente, corrigiendo así efectos sobre la señal debidos a diferencias en el área del electrodo.

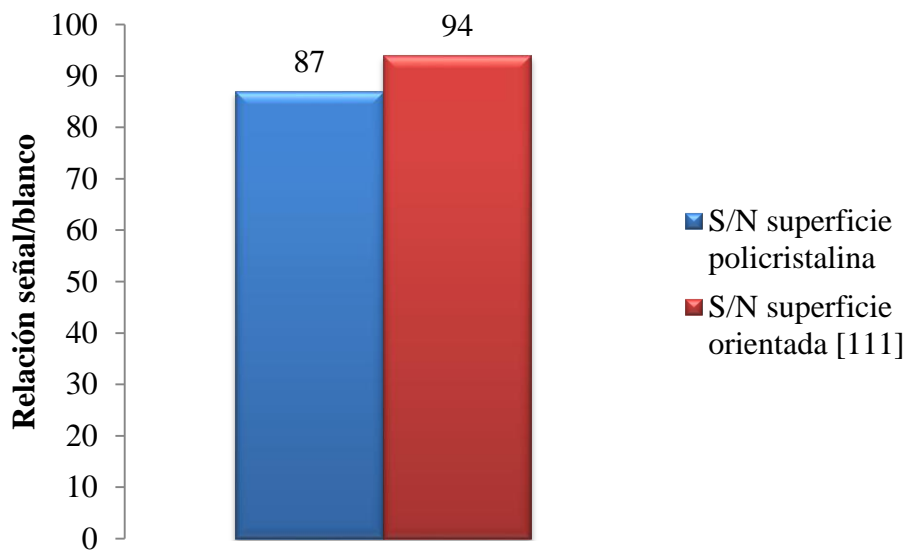


Figura 11. Relaciones señal/blanco obtenidas para una concentración de 0.5 nM de secuencia analito sobre electrodos construidos a partir de discos para la detección por SPR.

En el ensayo se obtuvo una densidad de corriente superior para el oro [111] que para la superficie policristalina para 0.5 nM de secuencia diana, en cambio los blancos muestran la misma tendencia. Se obtuvo una relación señal/blanco (S/N) de 87 para la superficie policristalina y de 94 para la orientada preferentemente [111] (**Figura 11**), lo que indica que no hay diferencia entre ambas opciones. También se observó una alta irreproducibilidad, con una RSD (*relative standard desviation*) del 44% para la superficie policristalina y del 34% para la orientada [111]. Esta irreproducibilidad se asoció a la reutilización de los discos de SPR y al tratamiento con disolución *piranha* [57], por lo que se continuó con el estudio sobre la superficie de electrodos construidos a partir de CD's.

Al realizar el ensayo sobre estos nuevos electrodos, con una concentración de sonda de captura de 0.1 μM y 1mM de 4-ATP, se obtuvieron resultados similares desde el punto de vista comparativo entre ambas superficies, obteniéndose una relación señal/blanco de 84 para el oro [111] y de 80 para la superficie policristalina (**Figura 12**), con una mejora apreciable de la reproducibilidad.

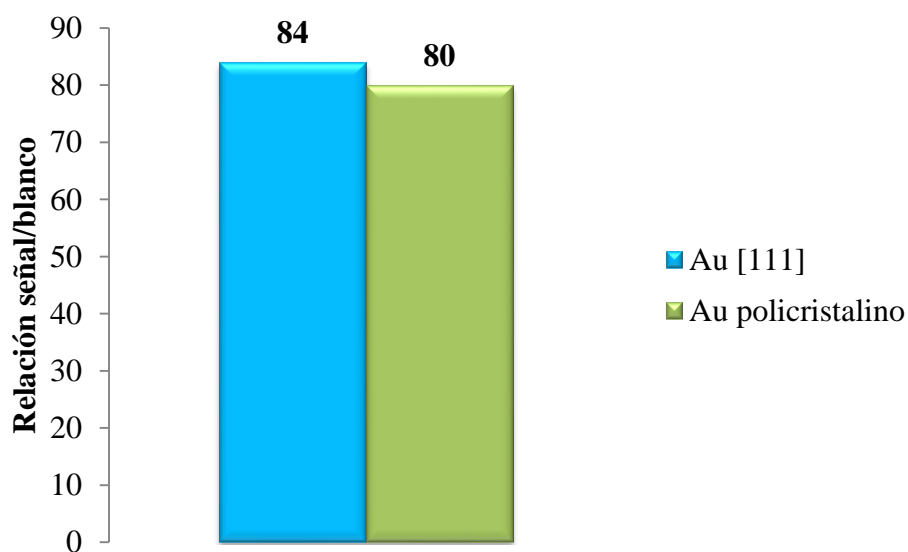


Figura 12. Relaciones señal/blanco obtenidas para una concentración de 0.5 nM de secuencia analito sobre electrodos construidos a partir de CD's.

Al realizar el pretratamiento electroquímico se detectó un aumento de la superficie activa del electrodo debida a las pistas del CD. Este aumento puede cambiar

la concentración óptima de sonda de captura para el ensayo. Además las concentraciones óptimas no tienen que ser necesariamente las mismas para las diferentes orientaciones en la superficie, por lo que se realizó un estudio a tres niveles de concentración de sonda de captura: 0.1, 0.5 y 1 μM .

Tabla 4. Optimización de la concentración de sonda de captura para las diferentes superficies sobre electrodos provenientes de CD's.

Tipo de superficie y concentración de sonda de captura(μM)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) Secuencia diaria 0.5 nM (RSD)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) Blancos (RSD)
Policristalino 0.1	5.4 \pm 0.1 (2%)	0.07 \pm 0.01 (14%)
Policristalino 0.5	20 \pm 5 (25%)	0.12 \pm 0.04 (33%)
Policristalino 1	24 \pm 8 (33%)	0.11 \pm 0.04 (36%)
[111] 0.1	15 \pm 2 (13%)	0.17 \pm 0.03 (18%)
[111] 0.5	27 \pm 8 (30%)	0.10 \pm 0.05 (50%)
[111] 1	27 \pm 6 (22%)	0.09 \pm 0.03 (33%)

Cuando el ensayo se realizó sobre electrodos provenientes de una sola porción del CD y el mismo día, la irreproducibilidad disminuye ostensiblemente como muestra la **Tabla 4** para las medidas del ensayo con 0.1 μM de sonda de captura, en cambio cuando los ensayos se realizaron en días distintos y sobre todo, cuando se realizaron distintos tratamientos con ácido nítrico concentrado la irreproducibilidad aumenta. No obstante, los valores de reproducibilidad obtenidos son aceptables teniendo en cuenta el sistema de construcción de electrodos, en el cual pueden sufrir agresiones mecánicas por parte del operador y los tratamientos no son siempre exactamente los mismos debido a la etapa de eliminación del polímero protector.

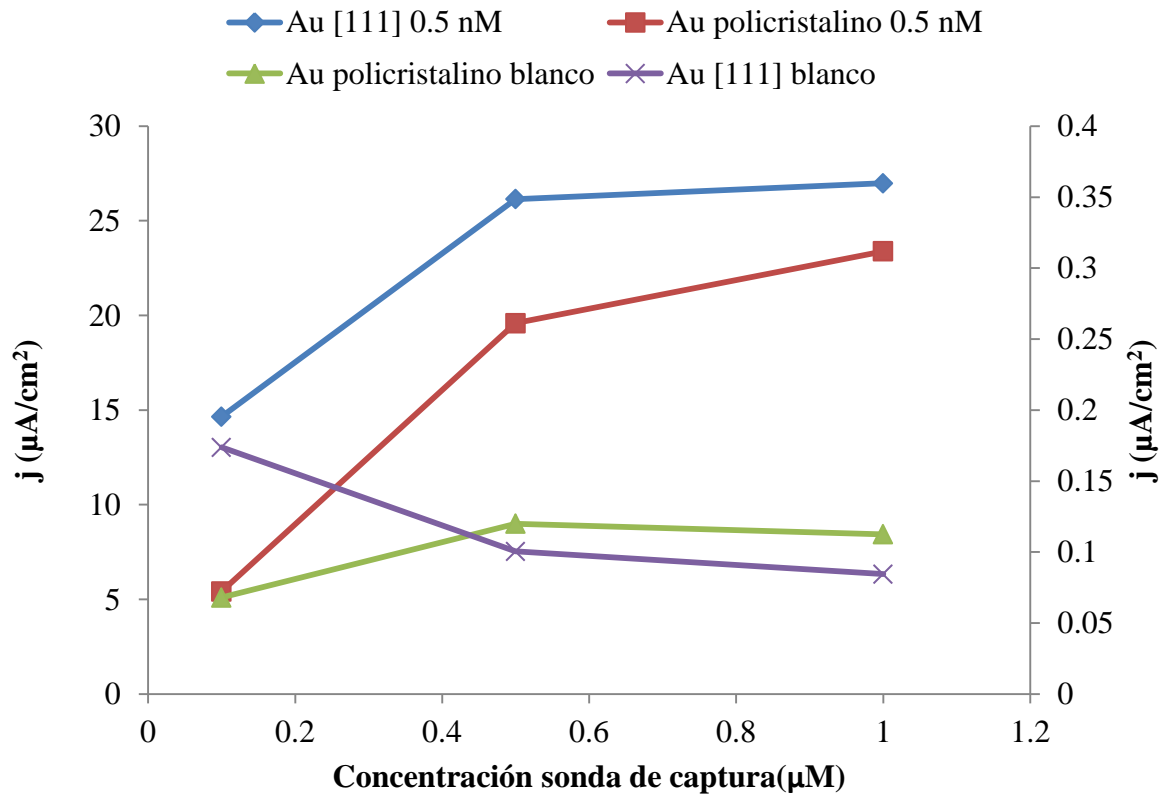


Figura 13. Tendencia de las señales de las muestras y los blancos (eje secundario) en la optimización de la concentración de sonda de captura.

El aumento de la concentración de sonda de captura en la construcción del sensor mejora la sensibilidad del genoensayo como muestra la **Figura 13**, aumentando las señales para la detección de secuencia diana, y disminuyendo los blancos en el caso de la superficie orientada preferentemente [111].

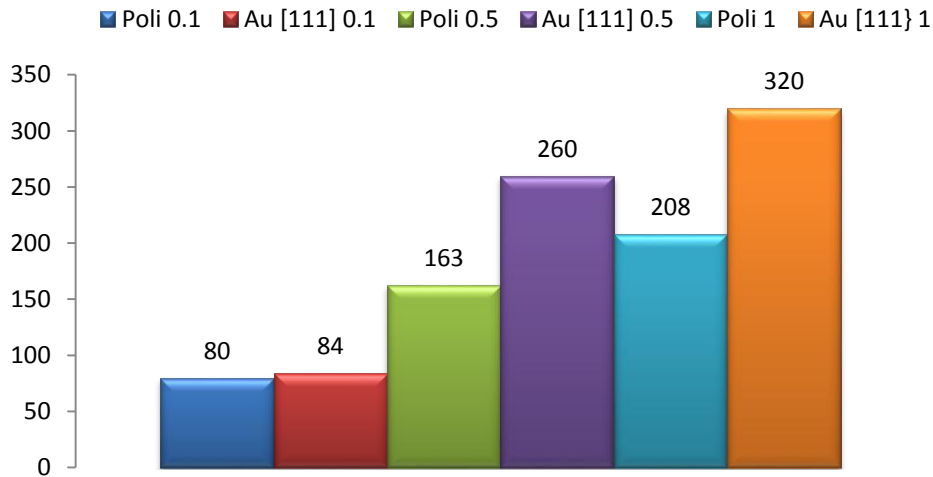


Figura 14. Evolución de la relación señal/blanco para la optimización de la sonda de captura en los dos tipos de superficies.

Como se observa en la **Figura 14**, para una concentración de sonda de captura de $1 \mu\text{M}$, la relación señal blanco es máxima para ambas orientaciones (320 para el oro [111] y 208 para el policristalino), siendo esta concentración la óptima para la inmovilización de la sonda en el transductor. Además es a ésta concentración donde se observa la mayor diferencia entre las dos orientaciones. Los datos obtenidos muestran una mayor S/N para el oro preferentemente orientado [111] frente a la superficie policristalina. Esta orientación proporciona una mayor sensibilidad debido al aumento del orden en la monocapa mixta, sin embargo no es totalmente determinante. Esta conclusión va en consonancia con la publicación de Wandlowski y colaboradores en sus estudios con alcanotioles marcados con ferroceno[55], en los que el aumento de señal para el oro [111] registrada por voltametría de onda cuadrada era de un 25% aproximadamente respecto a la orientación preferente en los otros planos.

Con el fin de hacer una comparación combinando naturaleza del sustrato y orientación preferente se estudió la sensibilidad del genoensayo sobre electrodos de CD's orientados [111] y electrodos policristalinos de la marca BASi.

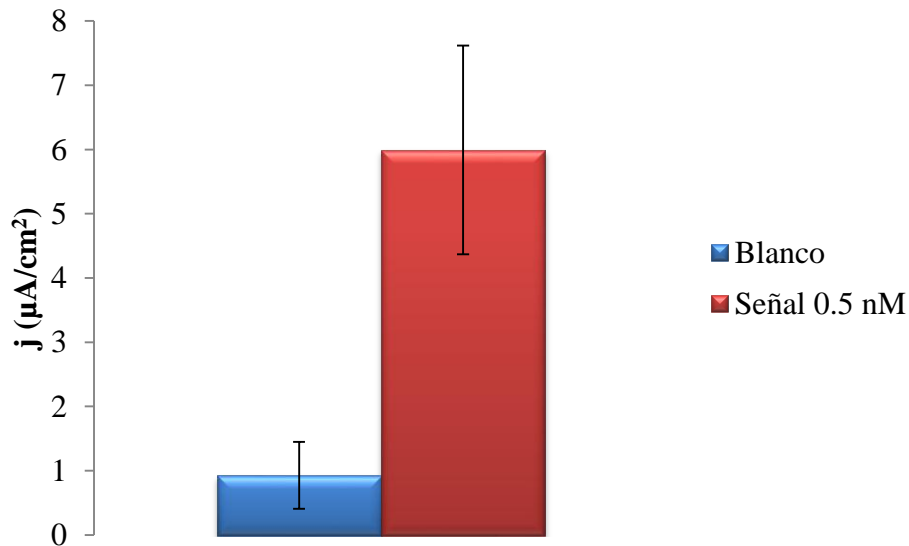


Figura 15. Datos obtenidos del genoensayo empleando electrodos policristalinos de la marca BASi.

La relación señal/blanco obtenida es de aproximadamente 7, notándose un gran incremento en la señal de los blancos (**Figura 15**). Este aumento puede atribuirse a la falta de continuidad en la superficie debido a la gran cantidad de defectos presentes, y evitando de esta manera que el *stacking II* de los grupos aromáticos del 4-ATP bloqueen con más eficacia las uniones inespecíficas. Si se compara con la relación señal/blanco para los electrodos fabricados por *sputtering*, tanto el orientado preferentemente [111] como el policristalino, se observa una gran diferencia de sensibilidad, por lo que se concluye que la orientación preferente puede ayudar a mejorar la sensibilidad, pero que es la ausencia de defectos superficiales lo que es decisivo en la deposición de monocapas autoensambladas.

Basándose en los resultados obtenidos se seleccionan los electrodos de oro orientados [111] preferentemente y construidos a partir de CD's con una concentración de 1 μM de sonda de captura para la realización del genoensayo.

4.3. Características analíticas del genosensor

Una vez seleccionadas las condiciones de diseño más adecuadas de la fase sensora con el objetivo de obtener la máxima relación señal/blanco, se procedió a caracterizar su respuesta. Se hicieron medidas para concentraciones crecientes de analito para establecer la sensibilidad, la linealidad y la reproducibilidad del método desarrollado.

Las medidas se realizaron siempre por triplicado utilizando 1 μM de sonda de captura inmovilizada sobre una superficie de oro orientada preferentemente [111].

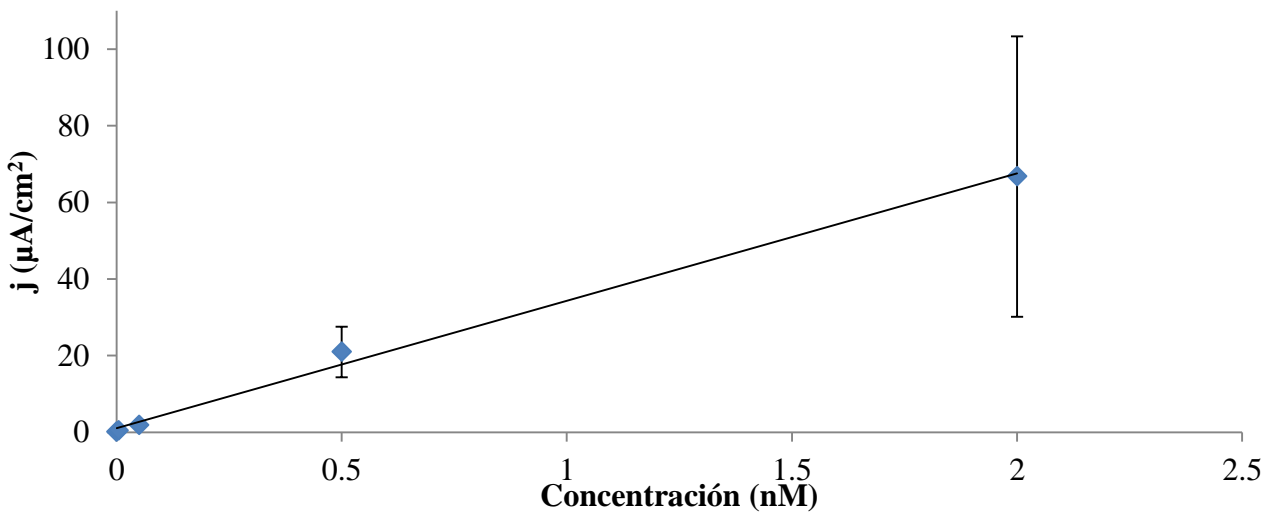


Figura 16. Respuesta del sensor a la concentración de secuencia analito.

La ecuación de calibración es:

$$j \text{ (}\mu\text{A/cm}^2\text{)} = (33\pm 2) [\text{Analito}]/\text{nM} + (1\pm 2)$$

$$r^2 = 0.997 \quad n = 3$$

De los datos obtenidos (**Figura 16**) podemos concluir que las características de respuesta del genosensor desarrollado son:

Intervalo lineal: El ensayo tiene un intervalo de linealidad de casi 3 órdenes de magnitud en el rango de concentraciones estudiadas (0.005-2 nM).

Reproducibilidad: Para niveles de concentración bajos el sensor muestra una reproducibilidad aceptable. La desviación estándar relativa de la respuesta expresada como coeficiente de variación (CV) es de 39% para 0.005 nM y del 51% al nivel de concentración 2 nM.

Límite de detección: Se calculó multiplicando tres veces la desviación del blanco dividido entre la pendiente de la recta, obteniéndose un valor de 1.8 pM.

Estos valores obtenidos están en consonancia con estudios anteriores con un sistema similar para la detección de *Salmonella*. En este sistema se obtuvo un intervalo lineal de 3 órdenes de magnitud, una desviación estándar relativa de la respuesta expresada como coeficiente de variación (CV) es de 37.1 % para 0.005 nM y de 2.2 % al nivel de concentración 5 nM y un límite de detección de 3.1 pM.

4.4. Estabilidad del sensor

La interacción del azufre con el oro ha sido objeto de estudio a lo largo de varias décadas con el fin de generar monocapas autoensambladas. En los últimos años esta interacción ha servido de avance en estudios de biomedicina y nanotecnología [58].

A pesar de todo el conocimiento descrito sobre de estos sistemas hay un factor limitante que impide que den el salto a una dimensión comercial: la estabilidad.

Se ha demostrado que las monocapas son fotosensibles, térmicamente inestables y se oxidan al aire. En las monocapas mixtas los problemas son aún mayores, observándose una pérdida aproximada del 60% de la señal registrada a los 10 días para una monocapa binaria de ADN y 6-mercaptohexanol [59]. Las monocapas mixtas de 3 componentes son por lo general más estables perdiendo aproximadamente el 30% de la señal registrada tras 90 días de almacenamiento.

En las monocapas mixtas se encuentran la hebra de ADN tiolada y el bloqueante de la superficie. Termodinámica y cinéticamente hablando, el grupo tiol de bloqueo puede desplazarse por la superficie eliminando las hebras de ADN, ya que las monocapas autoensambladas se comportan como líquidos de dos dimensiones capaces de desensamblarse y autoensamblarse en sitios de unión vecinales [60].

Con el fin de obtener recubrimientos más homogéneos se puede realizar un *annealing* de la superficie. Se ha comprobado que hay una temperatura de compromiso (373 K) en la cual los tioles comienzan a desorberse [61]. Este hecho pone de manifiesto que la temperatura es un factor determinante en la deposición y almacenamiento de la monocapa sobre el electrodo. A mayor temperatura más organización pero se obtiene un menor recubrimiento [60].

Un punto importante en la estabilidad de las monocapas es la existencia de defectos en superficie. Varios son los autores [60-62] que han apuntado que un mayor número de defectos tales como bordes de grano, escalones o la propia rugosidad de la superficie ayudan a la estabilización de la monocapa. Una cuestión importante es la curvatura de las nanopartículas, la cual ayuda a la estabilización evitando la repulsión entre los grupos de los tioles [62].

En el presente trabajo y como se ha descrito en secciones anteriores, se ha intentado liberar la superficie de defectos, cuestión que va según la bibliografía, en contra de la estabilidad del sensor. En cambio también se ha demostrado que el aumento del orden mejora la sensibilidad por lo que es necesario establecer las prioridades de construcción del sistema.

Los electrodos utilizados para el estudio son los fabricados a partir de CD's, siendo su superficie generada por *sputtering*. En general se ha descrito que las monocapas sobre oro policristalino son más estables que las generadas sobre superficies de oro depositado por *sputtering* ya que cuentan con un mayor número de defectos, siendo la unión del azufre a estos defectos 6 Kcal más estable que en las terrazas del oro [111] [61]. Un punto a favor de los electrodos obtenidos a partir de CD's es la nanoestructuración de su superficie, ya que ésta ayuda a que la monocapa no se desorba con tanta facilidad [61].

Las medidas de la estabilidad del sensor descrito para *Legionella* se han realizado evaluando la respuesta para una concentración de 0.5 nM de secuencia diana al día siguiente, a los 5 días y a los 16 días después de haber depositado la monocapa mixta. Se almacenaron al aire, en atmósfera húmeda y en nevera (4 °C). No se tuvo tampoco ninguna precaución en cuanto a su fotoinestabilidad y se almacenaron sin ningún tipo de recubrimiento con el fin de que el ensayo fuera lo más fiable posible.

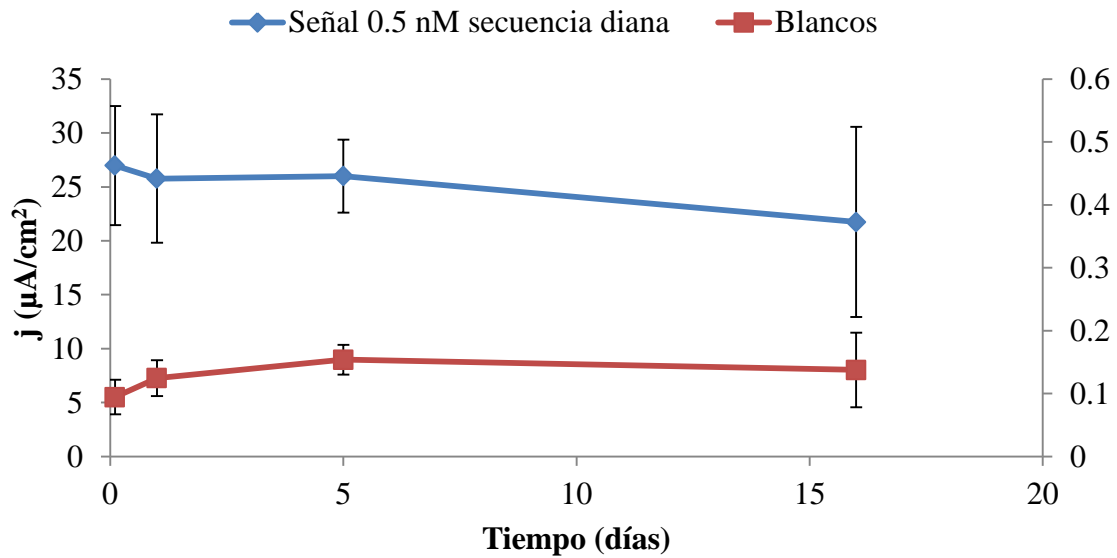


Figura 17. Variación a lo largo del tiempo de la señal obtenida (Blancos en el eje secundario).

Los datos obtenidos muestran un aumento de los blancos y disminución de la señal, siendo los blancos los más afectados (**Figura 17**). A los 5 días los blancos han aumentado un 32 % y en cambio la señal para una concentración de secuencia diana de 0.5 nM solo disminuye un 4%.

Después de 16 días, en términos globales de relación señal/blanco (**Figura 18**), hay una pérdida de señal del sensor del 45%. Este valor está en el intervalo normal para monocapas autoensambladas de una sola especie de alcanotioles, por lo que se puede concluir teniendo en cuenta que es una monocapa mixta y la baja proporción de defectos, que el sensor tiene una estabilidad aceptable.

Esta estabilidad está asociada a la nanoestructuración de la superficie y a las interacciones π del 4-aminotiofenol, las cuales restringen parcialmente la movilidad lateral de los tioles.

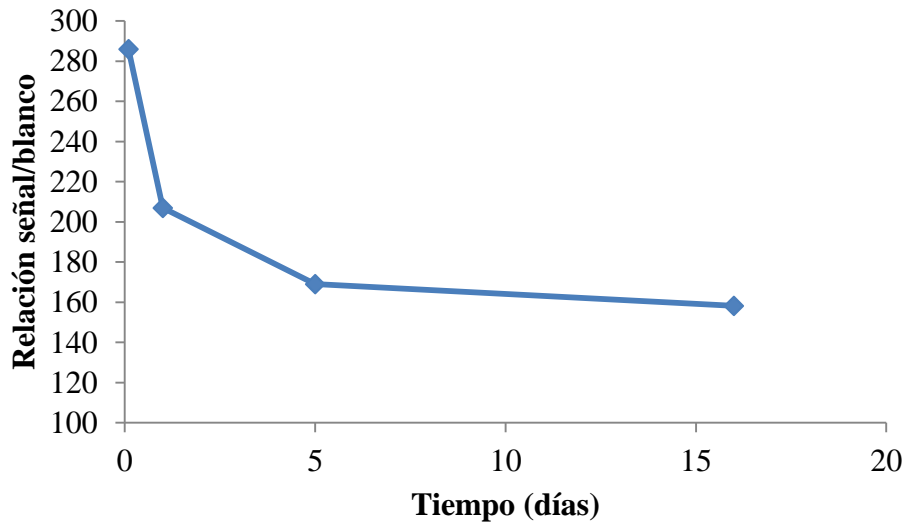


Figura 18. Variación de la señal global con el tiempo.

✚ 4.5. Determinación de las unidades formadoras de colonias de *Legionella pneumophila*.

Como se ha expuesto en la introducción, la detección de ARN ribosómico presenta unas ventajas derivadas de la amplificación que supone disponer de 6800 hebras de ARN por cada hebra de ADN presente en el gen. Además su presencia es prueba inequívoca de la actividad microbiana de la *Legionella* por lo que no se cometen errores al valorar la peligrosidad del contagio.

Por el contrario, la realización del genoensayo es más compleja y hay que tener en cuenta una serie de factores dada la inestabilidad del analito debido a la omnipresencia de ribonucleasas en todos los ambientes de trabajo. Las ribonucleasas, abreviadas como ARNasas, son unas enzimas que catalizan la hidrólisis de ARN a componentes más pequeños.

Debido al riesgo de hidrólisis del analito las medidas fueron realizadas utilizando los siguientes reactivos y protocolos:

- ❖ Agua mili-Q purificada a través de un filtro Biopak® Polisher que elimina las ARNasas para la preparación de cualquier tipo de disolución.

- ❖ Puntas de micropipetas y eppendorfs libres de ARNasas.
- ❖ Limpieza de la zona de trabajo con lejía.
- ❖ Limpieza de todo el material de plástico y vidrio con el reactivo RNaseZap® (Ambion) antes de su utilización.

En comparación con el protocolo descrito en la sección 3.3.3., el protocolo para la detección de ARN ribosómico consta de una etapa de hibridación homogénea diferente. Con el fin de favorecer la hibridación de la sonda de detección a la secuencia diana se realiza una etapa adicional. Esta etapa consta de una primera fase de calentamiento a 98°C durante 5 minutos y un enfriamiento en hielo durante otros 5 minutos. De esta manera se eliminan todas las posibles estructuras secundarias, y posteriormente, se enfría para evitar la competencia de dichas estructuras con la secuencia marcada que se ha hibridado. Finalmente se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se realiza la hibridación heterogénea.

Las muestras fueron suministradas por el servicio de microbiología del Hospital Universitario de Asturias (HUCA). Estas muestras son extractos de un cultivo enriquecido de *Legionella pneumophila*.

Se toma una muestra del cultivo, se reconstituye en 1mL de reguladora y se mide la turbidez por nefelometría. De los resultados de esta medida se calcula las ufc presentes en la muestra en base a la escala McFarland [63]. Las muestras suministradas tenían unos valores de 0.6 y 0.8 en la escala McFarland, lo que equivale a 1.8×10^8 ufc y 2.4×10^8 ufc respectivamente. Esta medida es una aproximación, ya que la medida nefelométrica no puede dar con elevada precisión una medida de las ufc presentes en cada muestra.

Una vez conocida la cantidad de ufc presente en la muestra se realiza una extracción del ADN y ARN presente mediante un kit comercial (COBAS Ampliprep Total Nucleic Acid Isolation Kit), preconcentrándose finalmente en un volumen de 70 μ L.

Todas las medidas se realizaron por triplicado realizando diluciones seriadas a partir de la alícuota más concentrada. Los valores de ufc estudiados varían de 6.2×10^4 a 3.1×10^7 .

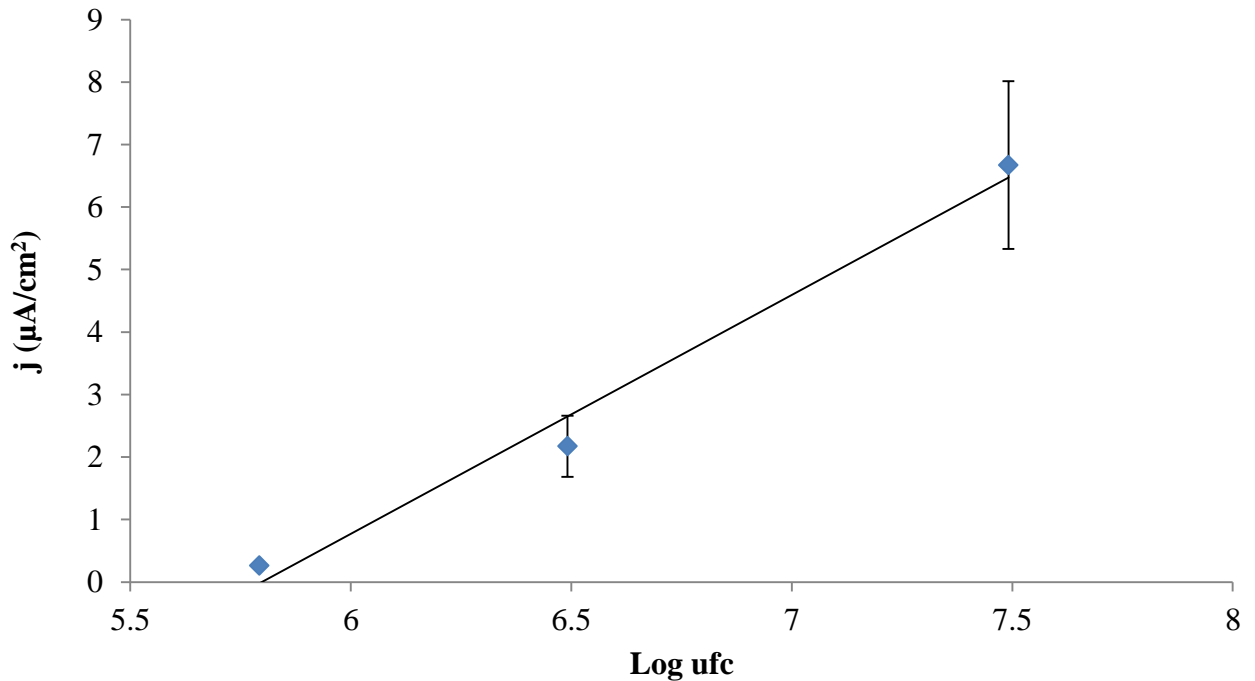


Figura 19. Variación de la señal del genosensor con las ufc de *Legionella pneumophila* en la muestra en la que se extrajeron los ácidos nucleicos.

La ecuación de calibración es:

$$j (\mu\text{A}/\text{cm}^2) = (3.9 \pm 0.5) \log \text{ ufc} - (22 \pm 4)$$

$$r^2 = 0.984 \quad n = 3$$

En la **Figura 19** se representan todas las señales corregidas con el blanco, se observa una variación lineal de la señal con el logaritmo del número de ufc en un intervalo de casi dos órdenes de magnitud (6.2×10^5 - 3.1×10^7).

Tabla 5. Valores obtenidos en la determinación de ufc de *Legionella pneumophila*.

ufc	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Desviación estándar	RSD (%)
0	0.14	0.05	36
6.2×10^4	0.12	0.05	42
6.2×10^5	0.41	0.08	19
3.1×10^6	2.4	0.6	25
3.1×10^7	7	2	28

Se detectaron las tres primeras diluciones de la muestra original, no pudiendo detectarse la última dilución que equivale aproximadamente a 62000 ufc. El límite de detección, obtenido como tres veces la desviación del blanco dividido entre la pendiente de la recta, es aproximadamente 4.9×10^5 ufc.

En términos de reproducibilidad, para niveles de ufc de 6.2×10^5 el sensor muestra una desviación estándar relativa expresada como el coeficiente de variación (CV) del 19%, del 25% para 3.1×10^6 y del 28% para 3.1×10^7 (**Tabla 5**).

Teniendo en cuenta la complejidad del analito y la cantidad de interferentes potenciales en la matriz de la muestra, los datos obtenidos son satisfactorios, en cambio en un segundo experimento realizado 3 días después de la extracción solo se detectó la dilución más concentrada del extracto (3.1×10^7 ufc).

Son varias las hipótesis planteadas, sobretodo basándose que en el primer experimento la realización por parte del operador no fue perfecta. La primera hipótesis está fundamentada en la inestabilidad de las muestras suministradas por el departamento de microbiología del HUCA, las cuales fueron almacenadas a -20°C . Esta temperatura puede no ser suficiente para una conservación óptima, por lo que en ensayos futuros se realizarán los ensayos con muestras extraídas en un espacio de tiempo menor.

Al realizar la primera determinación de las ufc, la etapa previa descrita anteriormente para la hibridación homogénea no se llevó a cabo a la temperatura fijada, sino que se realizó a una temperatura menor, lo que plantea dos posibilidades a los diferentes resultados obtenidos:

1. Al exponer al ARN a una temperatura de 98°C durante 5 minutos es posible que éste se fragmente, dando lugar a secuencias demasiado cortas que no permitan la hibridación de las hebras de captura y detección.
2. A 98°C es posible que el ADN genómico, que también ha sido extraído en la preparación de muestra, se desenrolle permitiendo que la secuencia que transcribe el ARN ribosómico pueda hibridarse con la secuencia diana. Este hecho limitaría la cantidad de secuencias analito disponibles para la hibridación con la sonda de captura inmovilizada en superficie y disminuiría la sensibilidad del genoensayo.

Para encontrar una explicación o comprobar si alguna de las dos hipótesis planteadas es correcta será necesario realizar nuevos experimentos con otros procedimientos y condiciones.

La presencia del ADN genómico puede ser eliminada mediante la utilización de kits comerciales que extraen únicamente el ARN proveniente de las células. De este modo no solo se evita la complementariedad entre ambas secuencias sino que se eliminan interferentes potenciales en la muestra.

La fragmentación del ARN, a diferencia de la complementariedad del ARN analito y el ADN genómico, presenta una doble interpretación. Por una parte resulta fundamental que se preserve la secuencia del ARN que hibrida con las secuencias desarrolladas, en cambio dicha fragmentación puede ser favorable desde el punto de vista de las dificultades de difusión e hibridación de una secuencia analito excesivamente larga.

Para poder determinar las condiciones de fragmentación adecuadas es necesario realizar estudios mediante electroforesis en gel o electroforesis capilar que aporten datos sobre el tamaño de las secuencias obtenidas. Se dispone de varias alternativas para la

fragmentación del ARN, entre ellas la propia temperatura, los ultrasonidos y los kits de fragmentación, aunque estos últimos no son tan específicos como los disponibles en el mercado para ADN.

4.6. Sugerencias para trabajos futuros

Se ha demostrado que el genosensor diseñado es un sistema robusto, capaz de detectar ARN ribosómico procedente de extractos de un cultivo de la bacteria. Aunque los límites de detección que hasta el momento se han conseguido no permiten alcanzar los extremadamente bajos límites impuestos en la legislación, se plantean las siguientes alternativas para mejorarlos:

La detección a través de resonancia de plasmón de superficie puede proporcionar, dado el tamaño de la secuencia analito, un aumento de la sensibilidad. Además la superficie de oro sobre la que se realizan las determinaciones de SPR ha sido utilizada en la construcción de electrodos de oro en el presente trabajo.

La espectroscopía de impedancia faradaica, de la misma manera que la detección por SPR, puede aprovechar el tamaño de la secuencia analito y permitiría mantener la mayor parte de los protocolos descritos, lo que hace que esta posibilidad pueda ser llevada a cabo en un corto espacio de tiempo.

La combinación de estas técnicas unidas a las ventajas proporcionadas por la capacidad de bloqueo aún no explorada del 4-ATP, y a la experiencia en el control de la superficie electródica contribuirían al aumento de detectabilidad del ensayo. Otra alternativa es la utilización de varias hebras de detección complementarias a distintas secuencias del ARN ribosómico, en cambio esta opción encarece el ensayo y es posible que la amplificación enzimática no tenga una respuesta lineal respecto al número de marcas.

Por último hay otra opción que proporcionaría ventajas desde el punto de vista de la sensibilidad, la utilización del código de barras biológico [64]. Este sistema permite la hibridación de un alto número de sondas de detección a una nanopartícula de oro, la cual dispone de otras secuencias de oligonucleótidos complementarias a la secuencia analito.

5. CONCLUSIONES

- i. Se han diseñado secuencias de oligonucleótidos para la detección específica de *Legionella pneumophila* y se han integrado en un genosensor por medio de monocapas autoensambladas de tioles sobre oro. Basándose en estudios previos del grupo de investigación, queda puesta de manifiesto la universalidad del sistema para la detección de distintos agentes patógenos.

- ii. La fabricación de electrodos de oro a partir de CD's de oro y sensores de SPR reciclados ha demostrado ser una opción muy válida y económica en la construcción de genosensores electroquímicos. La utilización de electrodos contruidos a partir de CD's presenta ventajas importantes de sensibilidad y reproducibilidad dada la nanoestructuración de la superficie.

- iii. Se han desarrollado varios tratamientos electroquímicos capaces de orientar preferentemente la superficie, aportando de este modo un control mayor sobre el desarrollo del sensor. El estudio de las orientaciones preferentes ha demostrado que el orden aportado por las terrazas [111] mejora la sensibilidad del sensor, sin embargo es la inexistencia de defectos superficiales el factor determinante en este aspecto.

- iv. La estabilidad de almacenamiento del sensor está limitada por la evolución de la monocapa que conduce fundamentalmente a un incremento de los blancos. Sin embargo esta estabilidad es claramente superior a la descrita para electrodos policristalinos y 6-mercaptohexanol como bloqueante. Estos resultados se asocian tanto al empleo de un bloqueante aromático como el 4-ATP como a la nanoestructuración aportada por la superficie de los electrodos contruidos a partir de CD's.

- v. El genosensor propuesto muestra un amplio intervalo dinámico lineal hasta 2 nM, una reproducibilidad aceptable y un límite de detección de 1.8 pM. Estas características del sensor van en consonancia con estudios previos y ponen de nuevo de manifiesto la universalidad del sensor.

- vi. Se ha llevado a cabo la determinación de ufc de *Legionella pneumophila* a partir de un cultivo enriquecido obteniéndose un intervalo dinámico lineal de casi 2 órdenes de magnitud, una buena reproducibilidad (20-30%) y un límite de detección de aproximadamente 5×10^5 ufc.

6. REFERENCIAS

1. Faris, B., et al., *Legionellosis from Legionella pneumophila serogroup 13*. Emerg. Infect. Dis., 2005. **11**(9): p. 1405-9.
2. Fields, B.S., R.F. Benson, and R.E. Besser, *Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation*. Clin. Microbiol. Rev., 2002. **15**(3): p. 506-526.
3. Hines, S.A., et al., *Assessment of relative potential for Legionella species or surrogates inhalation exposure from common water uses*. Water. Res., 2014. **56**: p. 203-13.
4. Palmer, C.J., et al., *Detection of Legionella species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods*. Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**(11): p. 3618-24.
5. Foudeh, A.M., et al., *Sub-femtomole detection of 16s rRNA from Legionella pneumophila using surface plasmon resonance imaging*. Biosens. Bioelectron., 2014. **52**: p. 129-35.
6. Swanson, M.S. and B.K. Hammer, *Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages*. Annu. Rev. Microbiol., 2000. **54**: p. 567-613.
7. NTP-691, Legionellosis: revisión de las normas reglamentarias (I). Aspectos generales.
8. (B.O.E), Real decreto 865/2003, 4 julio de 2003.
9. ISO-11731:1998, Calidad del agua: detección y recuento de Legionella. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 2007.
10. Wellinghausen, N., C. Frost, and R. Marre, *Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR*. Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(9): p. 3985-3993.
11. Saint, C.P. and L. Ho, *A PCR test for the identification and discrimination of Legionella longbeachae serogroups 1 and 2*. J. Microbiol. Methods, 1999. **37**(3): p. 245-253.
12. J H Helbig, J.B.K., M C Pastoris, C Pelaz and P C Lück, *Antigenic Lipopolysaccharide Components of Legionella pneumophila Recognized by Monoclonal Antibodies: Possibilities and Limitations for Division of the Species into Serogroups*. J. Clin. Microbiol., 1997. **35**(11): p. 2841-2845.
13. Leskelä, T., et al., *Sensitive genus-specific detection of Legionella by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay*. J. Microbiol. Methods, 2005. **62**(2): p. 167-179.
14. Mansi, A., et al., *Legionella spp. survival after different disinfection procedures: Comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR*. Microchem. J., 2014. **112**: p. 65-69.
15. Singh, R., et al., *Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis*. Sensor. and Actuat. B-Chem., 2014. **197**: p. 385-404.
16. Rai, V., et al., *Ultrasensitive cDNA detection of dengue virus RNA using electrochemical nanoporous membrane-based biosensor*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42346.
17. Xie, H., C. Zhang, and Z. Gao, *Amperometric detection of nucleic acid at femtomolar levels with a nucleic acid/electrochemical activator bilayer on gold electrode*. Anal. Chem., 2004. **76**(6): p. 1611-7.
18. Labib, M., et al., *Four-way junction formation promoting ultrasensitive electrochemical detection of microRNA*. Anal. Chem., 2013. **85**(20): p. 9422-7.

19. Gerasimova, Y.V. and D.M. Kolpashchikov, *Folding of 16S rRNA in a signal-producing structure for the detection of bacteria*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2013. **52**(40): p. 10586-8.
20. Gerasimova, Y.V. and D.M. Kolpashchikov, *Detection of bacterial 16S rRNA using a molecular beacon-based X sensor*. *Biosens. Bioelectron.*, 2013. **41**: p. 386-90.
21. Gerasimova, Y.V., et al., *Deoxyribozyme cascade for visual detection of bacterial RNA*. *Chembiochem.*, 2013. **14**(16): p. 2087-90.
22. Elsholz, B., et al., *Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays*. *Ana. Chem.*, 2006. **78**(14): p. 4794-802.
23. Joung, H.A., et al., *High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor*. *Anal. Chim. Acta*, 2008. **630**(2): p. 168-73.
24. Small, J., et al., *Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001. **67**(10): p. 4708-4716.
25. Love, J.C., et al., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. *Chem. Rev.*, 2005. **105**(4): p. 1103-1169.
26. Bardea, A., A. Dagan, and I. Willner, *Amplified electronic transduction of oligonucleotide interactions: novel routes for Tay-Sachs biosensors*. *Anal. Chim. Acta*, 1999. **385**(1-3): p. 33-43.
27. Levicky, R., et al., *Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. **120**(38): p. 9787-9792.
28. Herne, T.M. and M.J. Tarlov, *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997. **119**(38): p. 8916-8920.
29. Ferretti, S., et al., *Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces*. *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 2000. **19**(9): p. 530-540.
30. Arya, S.K., et al., *Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices*. *Biosens. Bioelectron.*, 2009. **24**(9): p. 2810-7.
31. Creager, S.E. and K.G. Olsen, *Self-Assembled Monolayers and Enzyme Electrodes - Progress, Problems and Prospects*. *Anal. Chim. Acta*, 1995. **307**(2-3): p. 277-289.
32. Bardavid, Y., et al., *Formation of polyaniline layer on DNA by electrochemical polymerization*. *Polymer*, 2008. **49**(9): p. 2217-2222.
33. Hayes, W.A. and C. Shannon, *Electrochemistry of Surface-Confined Mixed Monolayers of 4-Aminothiophenol and Thiophenol on Au*. *Langmuir*, 1996. **12**(15): p. 3688-3694.
34. Liu, A., et al., *Development of electrochemical DNA biosensors*. *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 2012. **37**: p. 101-111.
35. Sun, L., et al., *Selective Electrostatic Binding of Ions by Monolayers of Mercaptan Derivatives Adsorbed to Gold Substrates*. *J. Phys. Chem.*, 1990. **94**: p. 8869-8871.
36. Ganesh, V., et al., *Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol and aminothiophenols on polycrystalline Au: Effects of potential cycling and mixed SAM formation*. *J. Electroanal. Chem.*, 2008. **619-620**: p. 87-97.
37. Rosario-Castro, B.I., et al., *Electrochemical and surface characterization of 4-aminothiophenol adsorption at polycrystalline platinum electrodes*. *Langmuir*, 2006. **22**(14): p. 6102-8.

38. del Rosario Rodicio, M. and M. del Carmen Mendoza, *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2004. **22**(4): p. 238-245.
39. Bremer, H. and P.P. Dennis, *Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate*. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 1996. **2**: p. 1553-1569.
40. <http://www.rna.cccb.utexas.edu>.
41. Angnes, L., et al., *Gold Electrodes from Recordable CDs*. Anal. Chem., 2000. **72**(21): p. 5503-5506.
42. Cavalcanti, I.T., et al., *A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection*. Biochem. Eng. J., 2012. **67**: p. 225-230.
43. Lowinsohn, D., et al., *Disposable Gold Electrodes with Reproducible Area Using Recordable CDs and Toner Masks*. Electroanal., 2006. **18**(1): p. 89-94.
44. Morgulis, A., et al., *Database indexing for production MegaBLAST searches*. Bioinformatics, 2008. **24**(16): p. 1757-64.
45. Zhang, Z., et al., *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*. J. Comput. Biol., 2000. **7**(1-2): p. 203-14.
46. Miranda-Castro, R., et al., *Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of Legionella pneumophila*. Anal. Chem., 2007. **79**(11): p. 4050-5.
47. Castro, R.M., *Sensores electroquímicos de ADN para la detección de Legionella pneumophila*. Tesis doctoral, Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de química, Universidad de Oviedo, 2009.
48. Vivek, J.P. and I.J. Burgess, *Crystallographic dependence of 4-dimethylaminopyridine electroadsorption on gold*. Electrochim. Acta, 2013. **88**: p. 688-696.
49. Camillone, N., et al., *Substrate dependence of the surface structure and chain packing of docosyl mercaptan self-assembled on the (111), (110), and (100) faces of single crystal gold*. J. Chem. Phys., 1993. **98**(5): p. 4234.
50. Perdriel, C.L., A.J. Arvia, and M. Ipohorski, *Electrochemical faceting of polycrystalline gold in 1 M H₂SO₄*. J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem., 1986. **215**(1-2): p. 317-329.
51. Sustersic, G.M., D. Moreno, and A.E. Von Mengershausen, *La Deposición a Subpotencial de Hidrógeno sobre Oro Policristalino*. Información tecnológica, 2004. **15**: p. 85-90.
52. Wandlowski, T., et al., *Surface enhanced infrared spectroscopy—Au(111)/sulphuric acid—new aspects and challenges*. Electrochim. Acta, 2004. **49**(8): p. 1233-1247.
53. Berna, A., et al., *In-situ infrared study of the adsorption and oxidation of oxalic acid at single-crystal and thin-film gold electrodes: a combined external reflection infrared and ATR-SEIRAS approach*. Langmuir, 2006. **22**(17): p. 7192-202.
54. López, M.R., *Adsorción de compuestos quinoides en superficies nanocristalinas de Pt: nuevas sondas moleculares espectroelectroanalíticas*. Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, 2011.
55. Rudnev, A.V., K. Yoshida, and T. Wandlowski, *Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers*

- on low-index gold single crystal electrodes*. *Electrochim. Acta*, 2013. **87**: p. 770-778.
56. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications 2nd Ed.* John Wiley & Sons. 2001. **167**.
 57. Pensa, E., et al., *The chemistry of the sulfur-gold interface: in search of a unified model*. *Acc. Chem. Res.*, 2012. **45**(8): p. 1183-92.
 58. Hakkinen, H., *The gold-sulfur interface at the nanoscale*. *Nat. Chem.*, 2012. **4**(6): p. 443-55.
 59. Kuralay, F., S. Campuzano, and J. Wang, *Greatly extended storage stability of electrochemical DNA biosensors using ternary thiolated self-assembled monolayers*. *Talanta*, 2012. **99**: p. 155-60.
 60. Schlenoff, J.B., M. Li, and H. Ly, *Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995. **117**(50): p. 12528-12536.
 61. Vericat, C., et al., *Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system*. *Chem. Soc. Rev.*, 2010. **39**(5): p. 1805-34.
 62. Vericat, C., et al., *Thiol-capped gold: from planar to irregular surfaces*. *J. Phys: Condens. Matter*, 2008. **20**(18): p. 184004.
 63. Kimberley, A.W., *Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures*. First Edition. United States. Wiley-Blackwell, 2004.
 64. Taton, T.A., *Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes*. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1757-1760.