

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

TÍTULO:

**DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 A
TRAVÉS DE SU MATERIAL GENÉTICO**

AUTOR:

María Iglesias de la Arada

FECHA:

Julio 2012, Oviedo

MARÍA JESÚS LOBO CASTAÑÓN, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo

CERTIFICA

Que el presente trabajo, titulado "*Detección electroquímica de Escherichia coli O157:H7 a través de su material genético*", ha sido realizado en los laboratorios de investigación del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo por la licenciada **María Iglesias de la Arada** bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Master de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 18 de Julio de 2012.

Fdo. M^a Jesús Lobo Castañón

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1- La <i>Escherichia coli</i> como problema analítico.	2
1.2.- Métodos tradicionales de detección de <i>Escherichia coli</i> en alimentos.	6
1.3.- Genosensores electroquímicos como alternativa para la detección de <i>Escherichia coli</i> .	8
1.4.- Breve fundamento de la técnica electroquímica empleada.	17
2.- OBJETIVOS	19
3.- EXPERIMENTAL	21
3.1.- Material y reactivos.	22
3.2.- Instrumentación.	23
3.3.-Procedimientos generales.	23
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.- Selección de la secuencia analito y diseño de las secuencias utilizadas como sondas.	30
4.2.- Diseño y optimización de la fase sensora.	37

4.3.- Evaluación de las características analíticas.	48
5.- CONCLUSIONES	50
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO I: Tablas.	56
ANEXO II: Ecuaciones empleadas en el diseño experimental 2 ² .	58
LISTADO DE ABREVIATURAS	59

1.- INTRODUCCIÓN

La toxicidad e infecciones causadas por patógenos transmitidas por alimentos constituyen un problema de salud pública creciente. En la actualidad hay más de 250 enfermedades asociadas a diferentes microorganismos patógenos: virus, bacterias, hongos, etc. Entre ellos, las bacterias son los patógenos más comunes, responsables de aproximadamente el 91% de los brotes de intoxicaciones alimentarias en Estados Unidos [1]. Además este tipo de enfermedades son muy costosas, el departamento americano de agricultura (USDA) ha estimado pérdidas del orden de 7 billones de dólares al año debido a costes médicos y disminución de productividad. Los cuatros patógenos alimentarios más importantes son *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* O157:H7, siendo este último el objeto de este trabajo de investigación.

1.1- LA *ESCHERICHIA COLI* COMO PROBLEMA ANALÍTICO.

La *Escherichia coli* es un bacilo de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 1). La mayoría de las *Escherichia coli* son no patógenas formando parte de la micro flora normal del tracto intestinal de los humanos y animales [2]. Sin embargo, ciertos subtipos de esta especie bacteriana han adquirido genes que les permiten causar enfermedades tanto intestinales como extra intestinales [3].



Figura 1.- Bacteria *Escherichia Coli*.

La *Escherichia coli* que causa enfermedad entérica ha sido dividida en serogrupos, basándose en sus factores de virulencia y mecanismos por los que causa la enfermedad. Los principales serogrupos de *Escherichia coli* considerados enteropatógenos [4], todos ellos identificados a lo largo del pasado siglo son:

- ✓ ***Escherichia coli* enteropatógena clásica (ECEP clásica):** Identificada a principios de la década de los 40, asociada a brotes epidémicos de enteritis¹ grave en lactantes.
- ✓ ***Escherichia coli* enteroinvasora (ECEI):** Causa enteritis por un mecanismo invasor idéntico al de las *Shigellas*, otro bacilo de la misma familia.

¹ Se denomina *enteritis* a la enfermedad en que gérmenes que se establecen en el intestino delgado causan inflamación y edema que pueden provocar dolor y molestia de abdomen, cólicos, diarrea, estado febril y deshidratación. Es usualmente causada por consumir o beber sustancias contaminadas con bacterias o virus.

- ✓ ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)**: Identificada a finales de los 60, producen enteritis por liberación de enterotoxinas de dos tipos, termoestable (ST) y termolábil (LT). Estos microorganismos son poco frecuentes en nuestro medio pero causan diarrea entre los viajeros a países exóticos.
- ✓ ***Escherichia coli* verotoxigénica (ECVT o ECTS)**: Descubierta a principios de los 80, causa enteritis por producción de una toxina denominada verotoxina (VT) de la que pueden existir dos clases, VT1 y VT2, teniendo esta última diversas variantes. Esta verotoxina es homóloga a las toxinas *Shiga* de *Shigella*, por lo que a las ECVT también se las denomina *Escherichia coli* productoras de toxina *Shiga* (ECTS). Dicha toxina *Shiga* (Stx) es diferente de las toxinas ST y LT descritas anteriormente. Dentro de este serogrupo podemos encontrar algunas serotipos clasificados como ***Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**, debido a que causan una clase de enteritis hemorrágica.

De todos los serotipos de *Escherichia coli* verotoxigénicos, sólo algunos llamados colectivamente enterohemorrágicos producen enteritis y complicaciones. Las razones de esto pueden corresponder a que los otros serotipos toxigénicos producen menor cantidad de toxina o carecen de algún factor de patogenicidad. En la práctica, el criterio que se ha utilizado durante muchos años para diferenciar *Escherichia coli* de los diferentes grupos de patogenicidad de los no patógenos, ha sido el serogrupo. Esta prueba se basa en la determinación del tipo de antígeno O, presente en la pared celular. Sin embargo sólo algunos serotipos (O: H) dentro de cada serogrupo (O) son patógenos, refiriéndose H al tipo de antígeno presente en el flagelo. Para saber con rigor si una cepa de *Escherichia coli* es enteropatógena es necesario conocer el serotipo completo (antígenos O, K y H) o, aún mejor, determinar experimentalmente por pruebas de laboratorio si la cepa tiene factores de patogenicidad [2,4].

En la Tabla 1 se muestran los principales serotipos de cada serogrupo considerados enteropatógenos.

Serogrupo	Serotipo
<i>E. coli</i> enteropatógena clásica (ECEP clásica)	O26, O55, O111, O119, O125, O126, O128, O142
<i>E. coli</i> enteroinvasora (ECEI)	O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167, O173
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET)	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O68, O77, O78, O114, O115, O126, O128, O139, O148, O153, O159, O167
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	O4, O26, O45, O55, O111, O128, O145, O157

Tabla 1.- Principales serotipos enteropatógenos.

Dentro de los serotipos enterohemorrágicos se encuentra el O157:H7, causante de las más frecuentes y graves patologías transmitidas por los alimentos, y que será en el que nos centraremos en este trabajo.

- **Características de las ECEH - *Escherichia coli* O157:H7.**

Como se ha dicho, las *Escherichia coli* enterohemorrágicas (ECEH) son microorganismos verotoxigénicos, pertenecientes al serogrupo ECVT, que poseen factores de virulencia adicionales debido a que son un conjunto de *Escherichia coli* patógenas que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos [2]. En ocasiones la colitis hemorrágica puede derivar en síndrome urémico hemolítico (SUH)². El riesgo de desarrollarlo es mayor en aquellas personas con escasas defensas inmunitarias como ocurre en niños menores de 5 años y en ancianos.

Las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 han sido reconocidas como la causa de este síndrome desde la década de 1980. Una característica fundamental que se encuentra en la ECEH, pero que no es exclusiva de estos organismos, es la capacidad para causar lesiones de adherencia/destrucción (A/E) en el epitelio intestinal de los humanos. Algunos de los genes que están involucrados en la producción de las lesiones de A/E se pueden utilizar, junto con la presencia de verotoxina, para ayudar a identificar la ECEH.

Se vio que las cepas O157:H7 se adhieren a los enterocitos y borran las microvellosidades de estas células, proceso similar al que ocurre con las *Escherichia coli* enteropatogénicas clásicas (ECEP clásica). Posteriormente se descubrió que estas cepas se caracterizan por poseer el **gen eaeA**. Este gen se encarga de codificar la producción de la proteína “intimina”, imprescindible para la adherencia del microorganismo a la pared epitelial del intestino y una de las causas de las lesiones producidas en las infecciones causadas por este patógeno.

- **Formas de transmisión.**

Las ECEH se transmiten [2,4] por vía fecal-oral. Se pueden propagar entre animales por contacto directo o a través de bebederos, alimento compartido, lugares de pastaje contaminados u otras fuentes ambientales. Las aves y las moscas también son vectores potenciales.

Los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, son los reservorios más importantes de la ECEH O157:H7 que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Otros animales como conejos y cerdos también pueden transportar este organismo.

Los animales que no son reservorios habituales de la ECEH O157:H7 pueden funcionar como reservorios secundarios después del contacto con rumiantes. Esta cepa O157:H7 se transmite principalmente a los humanos a través del consumo de alimentos y agua contaminados, o por el contacto con animales, heces y suelo contaminado.

² Este síndrome es una consecuencia de la destrucción anormal y prematura de glóbulos rojos circulantes. Los restos de los hematíes destruidos atascan el sistema de filtración de los riñones, lo que provoca una insuficiencia renal aguda con acumulación de urea en la sangre (uremia). Dado que la insuficiencia renal se asocia con la hemólisis excesiva, el síndrome se denomina como hemolítico urémico.

La transmisión de persona a persona puede contribuir a la propagación de la enfermedad durante los brotes, sin embargo los humanos no parecen ser huésped de mantenimiento de este organismo. Las epidemias de ECEH O157:H7 de origen alimentario generalmente son causadas por la ingesta de productos de origen animal mal cocidos o no pasteurizados, en especial carne picada, pero también otras carnes y embutidos como carne de pavo y salami. También pueden ser debidos a leche y queso no pasteurizados, así como también el yogurt. Otros brotes han sido vinculados a la alfalfa o brotes de rábanos, lechuga, espinaca y otros vegetales, o derivados de frutas como la sidra no pasteurizada. Otra fuente importante es el agua contaminada utilizada para el riego en los vegetales.

Este organismo se puede adherir a las plantas y sobrevive bien en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. Puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios, ya que puede sobrevivir durante al menos 9 meses en carne picada almacenada a -20°C.

Tolera la acidez, de ahí que pueda permanecer de semanas a meses en alimentos ácidos como la mayonesa, salchichas o la sidra de manzana a temperaturas de refrigeración. Además, resiste la desecación y también puede sobrevivir durante 2 meses o más tiempo en algunas fuentes de agua dulce, especialmente en temperaturas frías o incluso puede permanecer viable durante 2 semanas en el agua de mar.

- **Epidemiología.**

La infección por *Escherichia coli* verotoxigénica (ECVT) [4] puede considerarse de distribución universal, aunque su prevalencia solamente se conoce con cierto detalle en Estados Unidos, Canadá, Argentina y Europa Occidental ya que en el resto de países no ha sido estudiada en profundidad. En España la frecuencia de *Escherichia coli* O157:H7 como causante de diarrea es muy baja, probablemente entre el 0,1 y 1% de las diarreas estudiadas, y normalmente es detectada siempre en forma de casos esporádicos. También han tenido lugar brotes epidémicos, aunque su número y extensión ha sido muy limitada.

En la Tabla 2 se presentan algunos brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7 en España, siendo el más importante hasta el momento el ocurrido en Barcelona en el año 2000.

LUGAR	AÑO	SITUACIÓN	Nº AFECTADOS
Ibiza (I. Baleares)	1986	Turistas británicos en hotel	3 (+3 asintomáticos)
Islas Baleares	1994	Turistas británicos	
Alava (País Vasco)	1995	Chicos en casa de campo	13
Fuerteventura (I. Canarias)	1997	Turistas europeos en hoteles	14 (3 con SUH)
Guipúzcoa (País Vasco)	1999	Niños en guardería	8 (1 con SUH) (+6 asintomáticos)
Barcelona	2000	Niños en colegios	158 (6 con SUH)

Tabla 2.- Brotes epidémicos en España [5].

A nivel mundial [2], se observa una cierta estacionalidad probablemente asociada a la expulsión estacional en los animales o debida a otros factores como la ingesta de carne mal cocinada en el verano; por ejemplo, en América del Norte las infecciones por O157:H7 son más frecuentes desde el verano hasta el otoño y sin embargo en el Reino Unido suelen producirse desde fines de la primavera hasta fines del verano.

En el 2004, la incidencia anual estimada de O157:H7 que se informó en Escocia, Estados Unidos, Alemania, Australia, Japón y la República de Corea osciló desde el 0,8 a 4,1 cada 100.000 habitantes, con la mayor incidencia en Escocia. El último caso conocido e importante se registró en Alemania, en Junio del 2011 debido a la cepa O104:H4, en el que se dieron alrededor de 3255 casos, según la OMS, con 33 fallecidos. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de disponer de métodos de análisis de este patógeno, rápidos y fiables, que puedan ser utilizados en las diferentes etapas de producción, procesado de alimentos, distribución y almacenamiento, para garantizar la seguridad de nuestro suministro de alimentos.

1.2.- MÉTODOS TRADICIONALES DE DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN ALIMENTOS.

Ya conocida la importancia de la detección e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, más concretamente centrado en el patógeno de *Escherichia coli*, en la actualidad existen diversas metodologías utilizadas con este fin [6].

En primer lugar es necesario tener en cuenta los requerimientos exigidos a los métodos de análisis empleados. De acuerdo al servicio de inspección y seguridad alimentaria (FSIS: Food Safety Inspectim Service) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la presencia de una unidad formadora de colonias (CFU) ya constituye un factor de riesgo para el consumidor. Por tanto, se demandan métodos de análisis con niveles de sensibilidad adecuados a estas exigencias.

Los métodos actualmente utilizados pueden clasificarse en tres grandes grupos: métodos de cultivo, métodos moleculares basados en la detección de sondas genéticas y métodos inmunoquímicos.

Los métodos de cultivo constituyen los métodos de detección más antiguo y siguen siendo el método estándar para la detección de patógenos. Numerosos medios de cultivo selectivos permiten la detección de *Escherichia coli* con tiempos de análisis no inferiores a 24 h. Entre ellos se encuentra el medio de agar MacConkey (MAC), el cual permite diferenciar las cepas de *Escherichia coli* O157 de las que no lo son gracias a la adición de sorbitol, debido a que las cepas O157 no fermentan este compuesto, a diferencia de las no-O157 que sí lo hacen. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que puede haber algunas cepas O157 que fermenten sorbitol o incluso que también lo hagan otras especies del patógeno, lo que llevaría a la obtención de falsos positivos en su detección. También se pueden utilizar otros medios de cultivo que permiten diferenciar los serotipos O157: NM y O157:H7 de los no-O157 gracias a la adición de otros compuestos, como la β -galactosidasa.

En muchas ocasiones se utilizan procedimientos de enriquecimiento de la muestra previos a la detección. Así, es común el uso de separaciones inmunomagnéticas para concentrar las células de analito de interés que se encuentran en bajos niveles en cantidades grandes de muestra y en las que podrían estar presentes tanto cepas de *Escherichia coli* que fueran sorbitol-positivas como negativas o incluso cepas O157:H7. Para llevarla a cabo se añaden a las muestras, durante la etapa de enriquecimiento, bolas magnéticas marcadas en la superficie con anticuerpos que reconocen específicamente los antígenos presentes en la superficie de las células del analito, facilitando así la limpieza y la pre-concentración de las células del patógeno de la muestra.

Uno de los inconvenientes asociados a estos métodos de cultivo y posterior enumeración de las unidades formadas de colonias, es el tiempo necesario para la determinación. La confirmación de resultados positivos puede prolongarse por más de 10 días.

Los métodos de detección rápidos están cobrando por tanto cada vez más importancia en la detección de patógenos en general, y en particular, en la industria alimentaria. Sin embargo estos métodos, en ocasiones menos sensibles que los cultivos, requieren confirmación por los métodos convencionales estandarizados. Entre este grupo de métodos se encuentran los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés "Polymerase Chain Reaction"). Esta es una tecnología de amplificación de ácidos nucleicos muy utilizada en la detección de bacterias. Está basada en el aislamiento, amplificación y cuantificación de secuencias cortas de ADN incluidas en el material genético de la bacteria y que sean específicas de éstas.

Están disponibles comercialmente diferentes kits para la detección de *Escherichia coli* del serotipo O157:H7 y O157 o combinaciones de genes con distintos factores de virulencia. Los productos obtenidos mediante PCR son observados mediante electroforesis en gel de agarosa, mediante ensayos de hibridación con marcas enzimáticas o ensayos Southern, usando sondas marcadas que puede servir para confirmar la identidad del producto. En general, la eficacia de cualquier protocolo de PCR depende de las propiedades de enriquecimiento y purificación de las muestras.

Otro grupo de métodos son los inmunoensayos. Con frecuencia se utilizan enzimo-inmunoensayos tipo ELISA con un formato sándwich, en los cuales antígenos característicos de la superficie de las células bacterianas interactúan con dos tipos de anticuerpos; el primer tipo unido a un compuesto indicador marcado enzimáticamente; y el segundo tipo enlazado covalentemente o adsorbido a una superficie sólida. Se trata de un ensayo heterogéneo, en el que tras sucesivas etapas de lavado se cuantifica la actividad enzimática inmovilizada, que se relaciona con la cantidad de unidades de patógeno presente. El uso de inmunoensayos enzimáticos para detectar el serogrupo ECVT (*Escherichia coli* verotoxigénica, descrita en el punto anterior) está siendo cada vez más común. Mientras que el serotipo O157:H7 ha sido históricamente el más asociado con infecciones de ECTS, la incidencia de este tipo de infecciones causadas por serotipos no-O157 hace que el uso de estos inmunoensayos para la toxina *Shiga* sea mayor que el uso de métodos basados en cultivos.

Como métodos de confirmación o identificación podemos encontrar que las características fenotípicas y genotípicas pueden ser usadas para confirmar la identidad o para clasificar un microorganismo. Los métodos fenotípicos incluyen conocer tanto las características bioquímicas o el serotipado (antígenos O, H, K) entre otros.

Una de las metodologías alternativas a las convencionales anteriormente señaladas, que está atrayendo un interés creciente para la resolución del problema analítico que se plantea, es el empleo de biosensores. Se han desarrollado biosensores basados en el empleo de anticuerpos (inmunosensores) así como en ácidos nucleicos (genosensores) como elemento de reconocimiento, acoplados a sistemas de detección ópticos, electroquímicos o piezoeléctricos. Estos biosensores permiten obtener resultados fiables en mucho menos tiempo (1 a 3 horas, aunque en algunos casos se pueden alcanzar tiempos de análisis del orden de 5 minutos). Sin embargo hay aún un largo camino por recorrer antes que este tipo de dispositivos lleguen a ser una alternativa comercial.

A pesar de que la sensibilidad y especificidad de estos dispositivos es igual o superior a la de los métodos de detección convencionales, es necesario validar cada método antes de que sea aceptado como opción viable para la detección de los diferentes serogrupos del microorganismo patógeno *Escherichia coli*.

1.3.- GENOSENSORES ELECTROQUÍMICOS COMO ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*.

De manera general, se puede definir un sensor químico como un dispositivo miniaturizado que es capaz de responder de manera inequívoca a un analito concreto en el seno de una muestra compleja [7]. Consta, principalmente, de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el analito de interés y del que depende, en gran medida, la selectividad del dispositivo y el transductor, el cual convierte esa interacción en una señal analítica. Cuando el transductor es un electrodo estaremos hablando de un sensor electroquímico, siendo este tipo el que usaremos en este estudio.

Igual que existen diferentes sensores en función del tipo de transductor, también podemos clasificar los sensores en función del tipo de elemento de reconocimiento que usemos. En el caso de que en el elemento de reconocimiento intervengan especies biológicas, el sensor químico es un biosensor.

En la Figura 2 se muestra el esquema general de un biosensor, usando como elemento de reconocimiento un anticuerpo, en el que se pueden diferenciar cada uno de los elementos que lo componen.

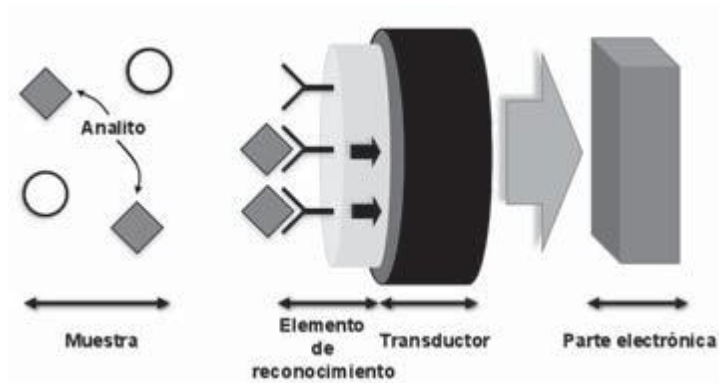


Figura 2.- Esquema de funcionamiento de un biosensor en el que el elemento de reconocimiento es un anticuerpo [7].

Una de las primeras cuestiones a tener en cuenta en el diseño de sensores es la naturaleza de la superficie del transductor sobre la que se inmovilizará el elemento de reconocimiento.

El desarrollo de electrodos serigrafiados resulta útil para la fabricación a gran escala de dispositivos que, con una mínima modificación, pueden ser usados como transductores. El desarrollo de dicha técnica ha ido avanzando de tal forma que proporciona a los electrodos una serie de ventajas frente a otras tecnologías, entre las que podemos citar una gran flexibilidad del diseño tanto por las diferentes geometrías que puede adoptar el electrodo de trabajo, como del diseño completo de la celda electroquímica, la cual se puede acomodar a las necesidades variando desde el número de electrodos hasta el volumen de la misma celda.

La gran variedad de tintas de serigrafado permite combinar distintos materiales dentro de un mismo dispositivo encontrando así desde electrodos de oro, platino, carbono o calomelanos.

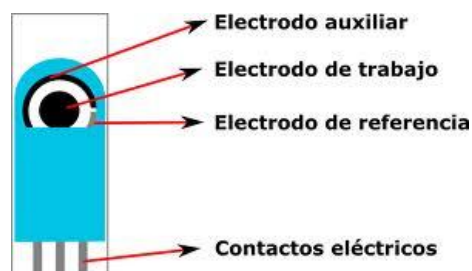


Figura 3.- Electrodo serigrafiado de 3 electrodos (trabajo, referencia y auxiliar).

En la Figura 3 se muestra un diseño de electrodo serigrafiado, similar a los que serán utilizados en este trabajo en el que se utilizan electrodos serigrafiados de oro como plataforma para la construcción de un genosensor o sensor de ADN.

- **Genosensores o sensores de ADN.**

Un sensor de ADN o genosensor es un biosensor en el que el elemento de reconocimiento son hebras de ácidos nucleicos, ADN o ARN. Su principio de funcionamiento se basa en la reacción de hibridación de dichas hebras (sonda de captura) con secuencias de ácidos nucleicos complementarias que constituyen el analito. Por su sencillez y sensibilidad los transductores electroquímicos son especialmente adecuados para el diseño de este tipo de sensores químicos, aunque también se han desarrollado genosensores ópticos o piezoeléctricos fundamentalmente.

En la Figura 4 se expone el principio general de funcionamiento de un genosensor.

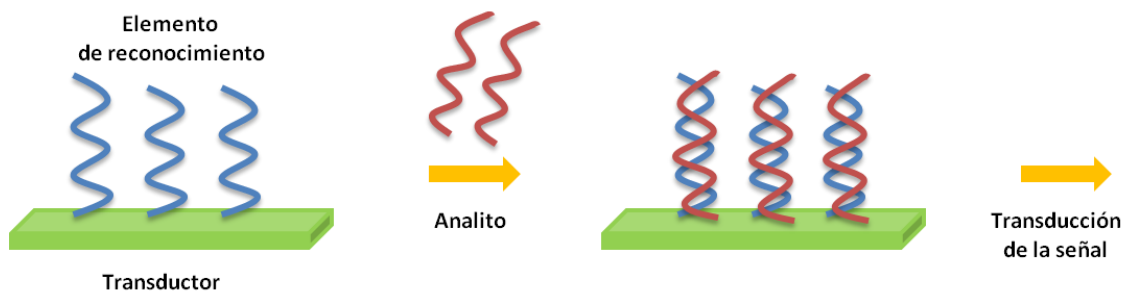


Figura 4.- Principio de funcionamiento de un genosensor o sensor de ADN.

A continuación se revisarán los pasos implicados en el diseño de genosensores: la selección y tipos de sondas que se pueden encontrar, los distintos métodos de inmovilización de las mismas sobre el transductor así como los métodos de detección, centrándose en los sistemas de transducción electroquímica, en los que se enmarca este trabajo.

I. **Tipos de sondas empleadas**

La interacción ADN-ADN o ADN-ARN es el fundamento de la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos [8,9]. Como se ha indicado, el principio de funcionamiento de los genosensores es la reacción de hibridación, proceso por el cual dos hebras de ácidos nucleicos se unen por reconocimiento de la complementariedad de sus secuencias bases para formar la doble hélice.

La reacción de hibridación presenta dos características: por un lado su especificidad, ya que la unión viene determinada por el reconocimiento de la secuencia de bases, y por otro la reversibilidad, proporcionada por las interacciones no covalentes entre ambas hebras.

Normalmente se llama sonda al ácido nucleico (elemento de reconocimiento) que se encuentra inmovilizado sobre la superficie del transductor. Son generalmente oligonucleótidos de una sola hebra y debe tener al menos una longitud de 16 bases para reconocer selectivamente una secuencia diana (analito). El origen del ADN sonda es muy diverso, inicialmente se usaba ADN o ARN purificado de organismos. Actualmente, se han desarrollado métodos de síntesis química eficientes y precisos que permiten disponer de las secuencias diseñadas con la pureza necesaria y a un bajo coste.

Con el fin de mejorar las características analíticas de sensibilidad y selectividad, se han buscado compuestos alternativos a los **ácidos nucleicos convencionales (ADN o ARN)**, que posean una estructura análoga a los mismos, manteniendo la capacidad de hibridación con ellos. Algunas de estas moléculas empleadas como sondas alternativas se esquematizan en la figura 5. Entre ellas destacan los **ácidos nucleicos peptídicos o PNAs**, análogos en estructura al ADN pero con mayor estabilidad térmica y que pueden formarse bajo una mayor variedad de condiciones de hibridación, entre otros motivos, por la ausencia de carga negativa en ellos.

Otra variante son los **ácidos nucleicos bloqueados o LNAs**, análogos al ARN, donde el anillo de la ribosa se encuentra bloqueado. Las cadenas de ácidos nucleicos modificados que incorporan estos nucleótidos LNA poseen mayor resistencia a los agentes degradantes del ADN, fundamentalmente nucleasas, y una discriminación de errores de emparejamiento mejorada. Los híbridos de LNA-ADN, por tanto, son más estables que los ADN-ADN. Por otro lado están los **dendrimeros de ADN**, estructuras altamente ramificadas con el fin de mejorar la sensibilidad ya que pueden hibridar mayor cantidad de analito. También podemos encontrar el ADN con forma de horquilla correspondiente a moléculas de cadena sencilla que presentan una estructura secundaria con forma de **mango-bucle**. El bucle es complementario a una secuencia del analito y se encuentra flanqueado entre sendas secuencias de bases autocomplementarias entre sí, formando el mango.

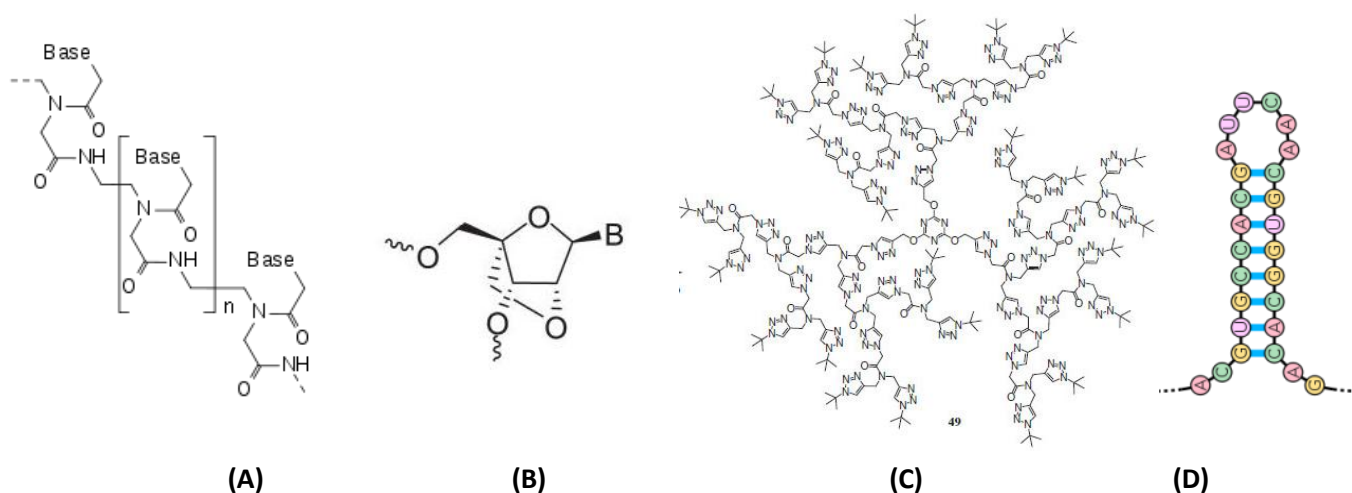


Figura 5.- Estructura de los diferentes tipos de ácidos nucleicos sonda:

(A) PNA, (B) LNA, (C) dendrímoro, (D) mango-bucle.

II. Métodos de inmovilización

La elección del método de inmovilización de la sonda de captura es determinante para el desarrollo del genosensor, ya que sus características finales se verán afectadas por la orientación, accesibilidad y densidad de inmovilización de la misma [8,9]. En general, los métodos deben favorecer la capacidad de enlace, minimizar las adsorciones inespecíficas y conseguir unas fases sensoras estables en el medio de operación.

Se han descrito diferentes métodos de inmovilización, entre los que se pueden destacar:

- ✓ Adsorción: Este es el método más sencillo de aplicar. No requiere modificación con grupos funcionales, tanto de la superficie como de los ácidos nucleicos. Sin embargo tiene como principal desventaja el escaso control que se consigue de la orientación de las moléculas adsorbidas. La adsorción de las moléculas de secuencia sonda puede producirse además por múltiples sitios, lo que confiere menor flexibilidad a la hebra limitando la capacidad para interactuar con la secuencia de analito.
- ✓ Atrapamiento en películas poliméricas: Es una variante de la adsorción. Se modifica la superficie con capas poliméricas que permiten una inmovilización más duradera. Se han utilizado con este fin polímeros cambiadores de iones como el Nafion o polímeros conductores, como el polipirrol.
- ✓ Incorporación a bicapas lipídicas: Incorporación de oligonucleótidos modificados con alcanos de cadena larga a bicapas lipídicas formadas sobre distintos materiales, incluido el oro.
- ✓ Enlace de afinidad: El enlace entre la proteína avidina (o proteínas análogas como la estreptavidina) y la vitamina biotina es la unión de afinidad más utilizada con este fin dada su estabilidad, próxima al enlace covalente. Lo habitual es la modificación de los ácidos nucleicos con biotina e inmovilizarlos sobre superficies funcionalizadas con avidina o estreptavidina.

Así por ejemplo, Lermo y colaboradores [10], desarrollaron un genosensor para la detección de *E. coli* en el que la inmovilización de la sonda marcada con biotina se realizó a través de dos estrategias distintas: inmovilización sobre superficies de carbono modificadas con avidina, y empleo de micropartículas magnéticas modificadas con estreptavidina como plataforma para la fase sensora. Según los investigadores, la estrategia de inmovilización a través de las bolas magnéticas promueve una mayor selectividad y sensibilidad, y permiten una rápida separación magnética de los compuestos que no se enlacen al elemento de reconocimiento.

- ✓ Enlace covalente: Se busca de este modo obtener superficies modificadas de forma permanente. Es necesario introducir grupos funcionales en la superficie mediante tratamientos químicos, así como en los ácidos nucleicos en uno de los extremos, añadiéndoles espaciadores con grupos funcionales consiguiendo así mejor orientación de las moléculas inmovilizadas.

- ✓ **Quimisorción:** Consiste en el empleo de monocapas autoensambladas (también conocidas como **SAMs**, del inglés “Self-Assembled Monolayers”) formadas por quimisorción de las sondas modificadas con grupos alcanotiol terminales. Dicha inmovilización tiene lugar sobre electrodos de oro, aprovechando la gran afinidad entre ambos. Con este método se consiguen capas más resistentes y estables termodinámicamente.

La reacción que tiene lugar entre el oro de la superficie del electrodo y los grupos alcanotiol de la sonda es la siguiente:



Siendo R la cadena correspondiente de la sonda oligonucleótido.

La modificación de superficies electródicas con nanopartículas de oro es otra estrategia para conseguir esta inmovilización [11]. Gracias a las propiedades de estas nanopartículas, retienen la actividad biológica de las biomoléculas dando interfaces con propiedades electrocatalíticas. El uso de superficies nanoestructuradas ofrece la ventaja de obtener amplios rangos lineales, bajos límites de detección y menores ruidos de fondo.

Otro tipo de estrategia ha sido el empleo de nanomateriales como matrices de inmovilización debido a sus propiedades inusuales ópticas, eléctricas y moleculares [12]. Los nanomateriales basados en óxidos de metales, como el óxido de zirconio nanoestructurado (NanoZrO₂), poseen mayor velocidad de transferencia electrónica, mayor capacidad de adsorción y elevada afinidad por los átomos de oxígeno de las biomoléculas.

III. Métodos de detección

Existen diferentes métodos de transducción para un genosensor: ópticos, microgravimétricos o electroquímicos, siendo éstos últimos en los que nos centremos en el trabajo.

En general podemos encontrar dos formatos de ensayos de hibridación (Figura 6), los más comunes, sobre superficies electródicas. El primero es la detección directa, consistente en inmovilizar la sonda sobre la superficie del transductor electroquímico y a continuación ponerlo en contacto con una muestra desconocida (llamada diana o analito) en la que puede estar presente una secuencia de ácidos nucleicos complementarios a la sonda que tenemos inmovilizada. Otro tipo de detección es el formato sándwich. En este caso la muestra desconocida tendrá una secuencia de ácidos nucleicos más larga, ya que por un extremo se hibridará con la sonda inmovilizada en la superficie (sonda de captura) y el otro extremo con una secuencia denominada sonda indicadora, modificada con algún tipo de marcador que servirá para la detección. En este segundo formato, lo habitual es realizar la hibridación de la secuencia diana y la indicadora previamente en disolución y luego ponerla en contacto con la sonda inmovilizada.

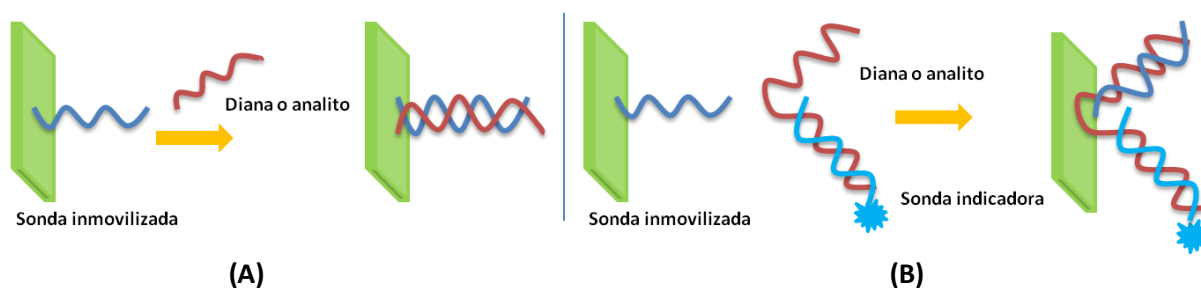


Figura 6.- Formatos de ensayo de hibridación: **(A)** Directo; **(B)** Sándwich

Además es posible realizar un marcaje directo de la propia secuencia amplificada obtenida por PCR. En este caso, además de llevar a cabo la amplificación del oligonucleótido, se obtiene un dúplex marcado con una molécula que facilita el posterior proceso de detección [10].

En cuanto a los métodos de transducción electroquímica, podemos clasificarlos según la manera de generar la señal electroquímica empleada para la cuantificación de los ácidos nucleicos. En la Figura 7 se recogen algunos de estos métodos.

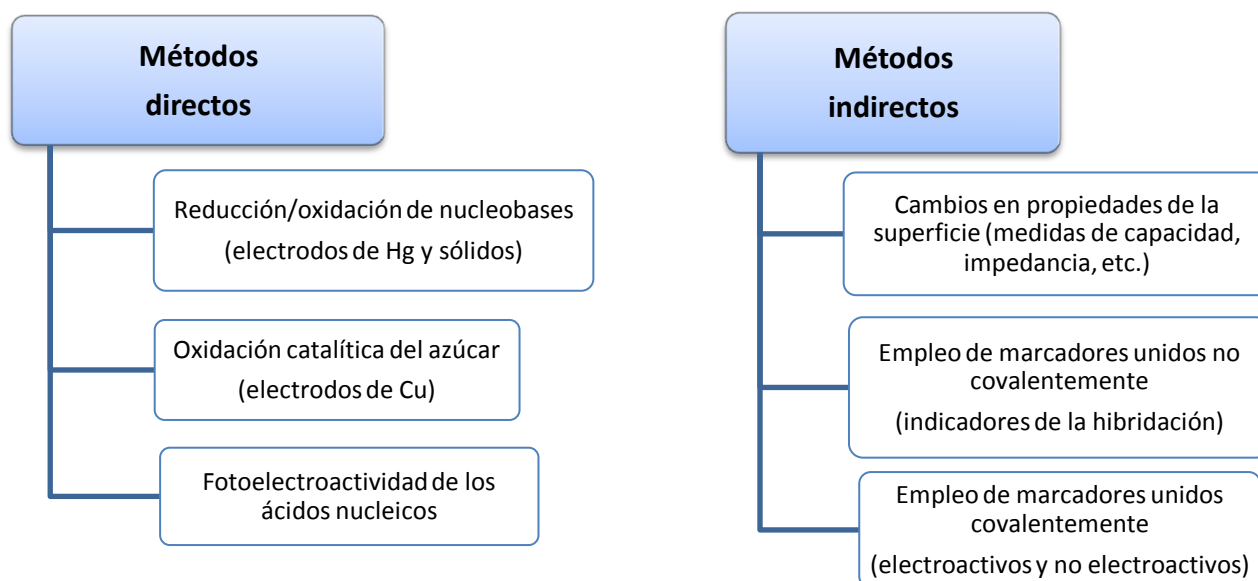


Figura 7.- Métodos de detección electroquímica.

Aunque se han desarrollado métodos directos, que no requieren la incorporación de marcadores, basados en la propiedad intrínseca de los ácidos nucleicos como son su electroactividad o sus propiedades fotoelectroactivas, estos en general dan lugar a sensibilidades inferiores a las que se obtienen con los métodos indirectos.

En este último grupo nos centraremos en los métodos de detección con marcadores. Este tipo de marcadores pueden ser, como se indica en la Figura 7, electroactivos o no electroactivos [9]. Las moléculas marcadoras pueden estar en los propios oligonucleótidos (marcados con biotina, por ejemplo) o también pueden ser incorporadas durante las etapas de tratamiento previo de la muestra para la amplificación de la secuencia analito mediante PCR, como se ha indicado anteriormente.

- ✓ **Marcadores electroactivos:** Una de las primeras moléculas empleadas como marcador electroactivo es el ferroceno o alguno de sus derivados. El grupo CMS [13] desarrolló un chip basado en la formación de una monocapa autoensamblada mixta que contiene la sonda y está formada sobre un electrodo de oro. Dicha monocapa facilita el contacto eléctrico entre el ferroceno unido a hebra indicadora y el electrodo de oro (ensayo tipo sándwich), ya que tiene fenilacetileno incorporado que actúa como cable molecular.

También se han utilizado como marcas electroactivas metales (oro, plata, etc.) o también el azul de metileno como indicador electroquímico [14], el cual da lugar a una señal distinta en función de la presencia de la hebra de oligonucleótido simple (ssDNA) o después de la hibridación y obtención del dúplex (dsDNA).

- ✓ **Marcadores no electroactivos:** En este grupo se encuentran principalmente enzimas, bien directamente unidos a la hebra de oligonucleótido, o indirectamente a través de enlaces de afinidad biotina-avidina/streptavidina o fluoresceína-anti-fluoresceína. El uso de dichos enzimas permite la amplificación de la señal analítica la cual está basada en la actividad redox del producto de la reacción enzimática.

Anne Walter et al. propusieron el empleo de agentes reductores como pueden ser el NADH, para la amplificación de la señal electroquímica debida al producto de la reacción enzimática [15]. Dicha estrategia beneficia la disminución de los límites de detección. En este caso, la marca enzimática utilizada, fosfatasa alcalina (AP), utiliza como sustrato p-aminofenilfosfato (p-APP) dando como producto enzimático p-aminofenol (p-AP), que es detectado amperométricamente. La p-quinoidina generada al potencial de trabajo reacciona con el NADH, regenerando el p-aminofenol y por tanto se produce una gran amplificación de la señal medida. Esta estrategia permite alcanzar límites de detección de 250 unidades formadas de colonias por μL de la bacteria *E. coli*.

Otra estrategia para la amplificación de la señal ha sido el uso de liposomas como amplificadores. Los liposomas son vesículas esféricas formadas por una bicapa fosfolipídica que encierra en su interior una disolución acuosa que puede contener diferentes moléculas y que puede modificarse en superficie con distintas biomoléculas (anticuerpos, ADN). Cuando el liposoma encapsula una disolución de una molécula electroactiva (por ej. $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6] \text{Cl}_3$) se pueden conseguir grandes amplificaciones de la señal en medidas electroquímicas. Así, Liao & Ho [16] proponen un genosensayo competitivo para la detección de *E. coli*, en el que se utilizan liposomas marcados con la secuencia analito como trazador. La reducción del $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ encapsulado en los liposomas es la señal medida. De esta forma se consiguen límites de detección de 0,75 amol del gen *rfbE* específico de *E. coli*.

Un ejemplo común de marcador no electroactivo es el uso de la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) como marca enzimática. La enzima HRP es una enzima peroxidasa que contiene el grupo hemo (Fe^{+3}) (Figura 8) y que a través de la reducción del peróxido de hidrógeno oxida una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos [17]. La raíz del rábano silvestre donde se encuentra contiene un número de isoenzimas peroxidasa distintivo, en el que la isoenzima C es la más abundante (HRP C), aunque el término peroxidasa de rábano silvestre es usado de forma genérica.

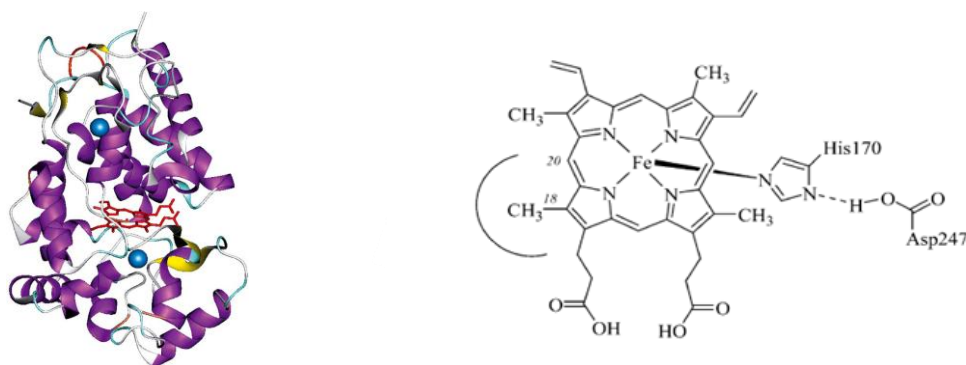
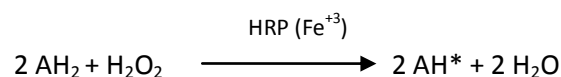


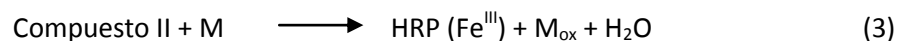
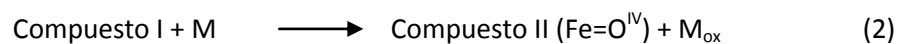
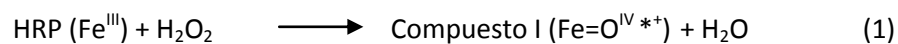
Figura 8.- Izquierda representación tridimensional de la HRP C con el grupo hemo en rojo. A la derecha estructura del grupo hemo responsable del ciclo catalítico de la HRP.

La mayoría de las reacciones catalizadas por las isoenzimas de HRP pueden ser representadas, de forma general, según la reacción siguiente:



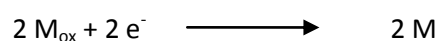
AH_2 y AH^* representan el sustrato reductor y el producto radical, respectivamente. Sustratos reductores típicos incluyen compuestos aromáticos, ácidos fenólicos, indoles, aminas y sulfonatos.

El ciclo catalítico de la peroxidasa se puede resumir del siguiente modo:



Siendo M el sustrato de la HRP en su forma reducida y M_{ox} en la forma oxidada correspondiente. La reacción (1) corresponde a la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el grupo hemo Fe^{III} de la HRP generando el compuesto I, un intermedio con alto estado de oxidación y catión radical. Este compuesto sufre dos procesos de reducción (2) y (3) por dos moléculas del sustrato (M), donador de electrones, para generar de nuevo la peroxidasa en su forma nativa, HRP (Fe^{III}).

A continuación, se regenerar electroquímicamente la forma reducida del sustrato, obteniéndose una corriente de reducción que se puede relacionar con la cantidad de enzima presente en el medio de reacción.



1.4.- BREVE FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA ELECTROQUÍMICA EMPLEADA.

Una de las técnicas electroquímicas más sencillas y con gran utilidad en el desarrollo de biosensores es la cronoamperometría. Esta técnica electroanalítica se encuentra en el grupo de técnicas denominadas "cronotécnicas" (cronoamperometría y cronocoulombimetría), que se caracterizan porque el tiempo es una variable dependiente [18]. Ambas técnicas emplean una misma función de excitación, consistente en uno o varios saltos de potencial aplicados a un electrodo con una disolución sin agitación, y la diferencia entre ambas técnicas radica en el tipo de respuesta obtenida.

En cronoamperometría, la función de excitación (Figura 9) es un salto de potencial desde un valor inicial E_i , en el que no se produce ningún proceso electródico, hasta un segundo potencial E_s seleccionado adecuadamente para que se produzca la transformación (oxidación o reducción) de la especie medida que se encuentra en disolución. Esto provoca un gradiente de concentración y por tanto un transporte de materia debido a la difusión de la especie medida, lo que implica que la velocidad de desaparición de la misma y la consiguiente velocidad de formación de la especie producida en su transformación electroquímica están controladas por dicha velocidad de difusión.

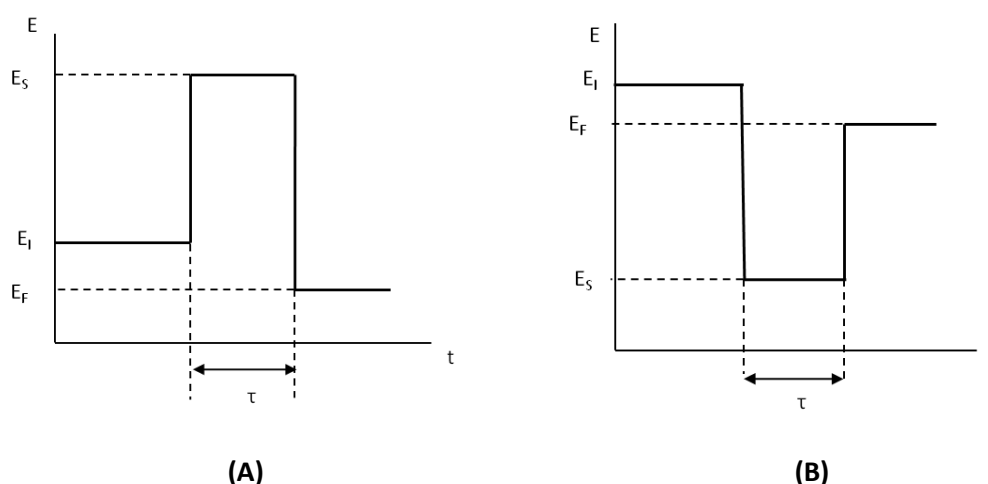


Figura 9.- Señal de excitación general empleada en las técnicas de salto de potencial. E_i : potencial inicial del que se parte; E_s : salto de potencial al cual sucede la reacción del electrodo; τ : duración del salto de potencial; E_f : potencial final. **(A)** Si la especie que se encuentra en disolución es oxidable; **(B)** Si la especie a medir es reducible.

El paso de E_i a E_s provoca la aparición de una corriente (Figura 10) instantánea como resultado de la oxidación o reducción de la especie medida. Puesto que dicha especie no puede existir en el electrodo al potencial E_s seleccionado, debe ser aportada de forma continua a la superficie electródica por difusión desde el seno de la disolución. El flujo de especie electroactiva, y por tanto también la corriente, es proporcional al gradiente de concentración en la superficie del electrodo. El flujo continuado de especie medida da lugar a que la zona de agotamiento de la misma se haga más grande; por lo tanto la pendiente del perfil de concentración en la superficie disminuye con el tiempo y del mismo modo ocurrirá con la corriente.

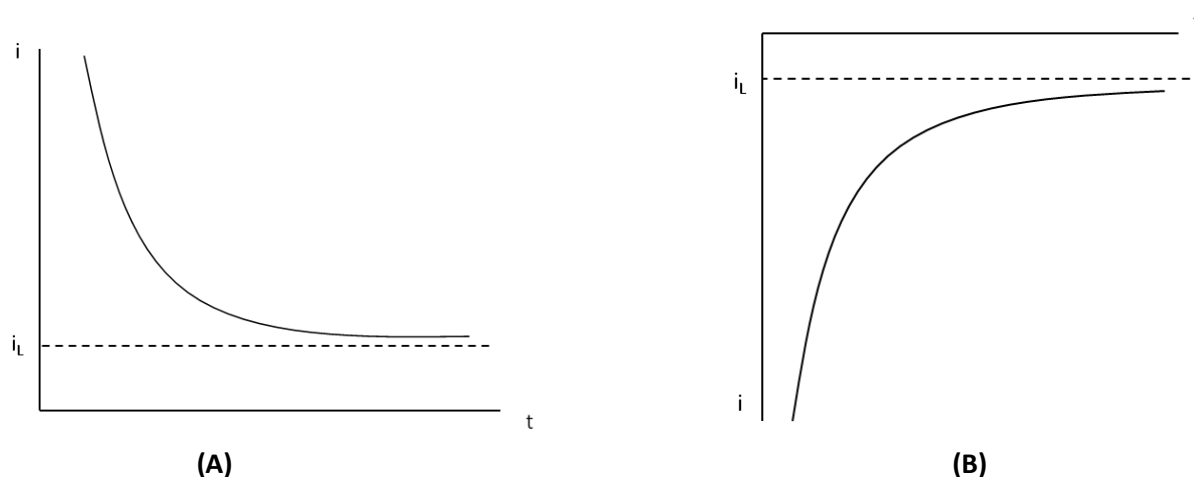


Figura 10.- Respuesta corriente-tiempo (cronoamperograma). **(A)** Oxidación; **(B)** Reducción.

Esta dependencia corriente-tiempo viene definida por la *ecuación de Cottrell*:

$$i(t) = i_d(t) = \frac{nFAD^{1/2}C^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

donde la corriente, $i(t)$, viene expresada en Amperios; el área del electrodo, A , en cm^2 ; la concentración de la especie medida, C^* , en mol/cm^3 y su coeficiente de difusión, D , en cm^2/s .

2.- OBJETIVOS

Como ya se ha indicado en la introducción de esta memoria, las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos constituyen un problema de salud pública de importancia creciente. Los continuos brotes de enfermedades asociadas a patógenos en alimentos han puesto de manifiesto la necesidad de incrementar los controles sobre los mismos y de disponer por tanto de métodos de inspección y detección lo suficientemente sensibles y rápidos para poder garantizar la seguridad de los alimentos que consumimos.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación más amplio cuyo objetivo general es el desarrollo y validación de métodos analíticos para la detección rápida, sensible y selectiva de microorganismos patógenos en alimentos. Concretamente se propone el desarrollo de un genosensor o sensor de hibridación, basado en el empleo como receptor de un oligonucleótido para la detección de secuencias de ADN específicas del microorganismo patógeno *Escherichia coli* O157:H7.

Este objetivo general se concreta en los objetivos específicos que se indican a continuación:

1. Selección de una secuencia de ácidos nucleicos comprendida en el material genético del microorganismo patógeno propuesto, que sea específica del mismo.
2. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos que serán empleadas como sonda de captura y sonda indicadora, que permitan el reconocimiento específico de la secuencia de ácidos nucleicos específica de *Escherichia coli* anteriormente seleccionada.
3. Diseño y construcción de una fase sensora basada en el empleo de electrodos de oro como superficie de transducción y oligonucleótidos tiolados para su inmovilización sobre el transductor por quimisorción.
4. Evaluación de las características analíticas del genosensor construido, empleando secuencias sintéticas del oligonucleótido seleccionado como analito.

3. - EXPERIMENTAL

3.1.- MATERIAL Y REACTIVOS.

Los oligonucleótidos empleados en el desarrollo de este trabajo fueron sintetizados por SIGMA-GENOSYS. En la tabla 3 se muestran la longitud y secuencia para cada uno.

Nombre	Longitud	Secuencia (5' – 3')	Purificación	Función
E.ColiT	81	TGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATCAGGAT TTTTCTGGTGATAATACCCGTTTAGGTATTGGTGCGAATA	Desalado	Analito
EColiCPtiol	31	ATGAAGACGTTATAGCCCAACATGTTTGCA[ThiC3]	Desalado	Sonda de captura marcada con tiol
EColiDPFluor	52	[FITC]TATTCGCCACCAATACCTAAACGG GTATTATCACCAGAAAAATCCTGATCA	Desalado	Sonda de detección marcada con fluoresceína

Tabla 3.- Oligonucleótidos empleados y su función.

Además de los oligonucleótidos, han sido necesarios otros reactivos adicionales, indicados en la tabla 4.

Reactivo ³	Casa comercial	Nº catálogo
PBS 10x	Sigma	P-5493
SSPE 20x	Sigma	S-2015
Ácido sulfúrico (95-97%)	Merck	100731
Caseína	Sigma	C-7594
BSA (≥ 98%)	Sigma	A-7906
SDS (99%)	Sigma	L-4509
Formamida (99,5%)	Sigma	F-9037
DTT	Sigma	D-9779
MCH (97%)	Aldrich	451088
HDT (96%)	Aldrich	H-12005
Anti-fluoresceína POD. Fragmentos Fab (150 u)	Roche	11426346910
TMB	Sigma	T-0440

Tabla 4.- Reactivos.

Las disoluciones salinas **PBS 10x** y **SSPE 20x** están formadas por una reguladora de fosfato 0,1 M de pH 7,4 con 1,54 M NaCl, libre de RNasas y una reguladora de fosfato 0,2 M de pH 7,4 con 2,98 M NaCl y 0,02 M EDTA, libre de DNasas y RNasas, respectivamente.

³ **DTT**: Ditionitrosol; **MCH**: 6-mercapto-1-hexanol; **HDT**: 1,6-Hexanoditiosol; **BSA**: Albúmina de suero bovino; **SDS**: Dodecilsulfato de sodio; **TMB**: Tetrametilbenzidina

Otros materiales empleados en el desarrollo del genosensor fueron:

- **Electrodos serigrafiados de oro (DRP-220BT):** De pasta de oro curado a baja temperatura (modelo BT). El electrodo de trabajo es de geometría circular y junto con el electrodo auxiliar están hechos de oro, mientras que el electrodo de referencia es de plata al igual que los contactos eléctricos [19].
- **Columnas de purificación GE Healthcare NAP-5:** Columna de exclusión por tamaños que retiene las moléculas grandes (funciona por gravedad). Quedará retenida la sonda modificada con el grupo funcional tiol y eluirá el exceso de DTT. Por último se eluye la sonda con agua milliQ.

3.2. - INSTRUMENTACIÓN.

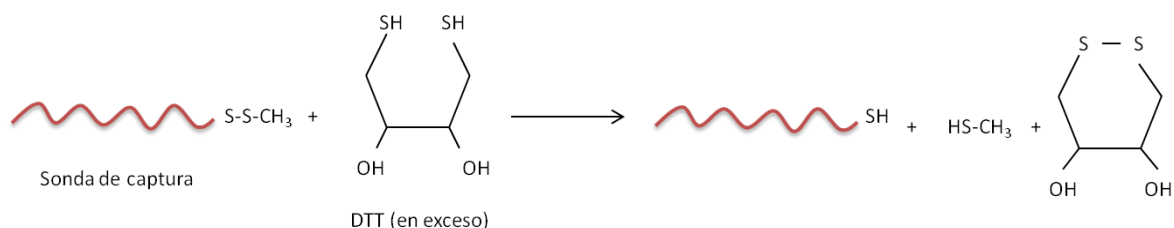
Los aparatos empleados en el desarrollo fueron:

- **Potenciostato AutoLab PGSTAT 10:** Con software incorporado GPES (versión 4.9) para las medidas de voltametría cíclica y cronoamperometría.
- **Espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 10s UV-VIS:** Se mide la absorbancia de la sonda de captura, una vez reducido el grupo funcional, a una longitud de onda de 260 nm.
- **Vortex, centrífuga o termostato:** Para los pasos intermedios del desarrollo.

3.3. - PROCEDIMIENTOS GENERALES.

➤ Reducción del grupo funcional de la sonda de captura.

La sonda de captura viene modificada con el grupo $\text{CH}_3\text{-S-S-}$. Para la inmovilización sobre el electrodo de oro es necesario, previamente, reducir el grupo a SH- con DTT (ditiotreititol) y luego llevar a cabo una purificación de la mezcla con columnas GE Healthcare NAP-5 para así eliminar el exceso de DTT que pueda quedar y los productos secundarios formados. La reacción que tiene lugar se indica a continuación [20]:



Se añaden 220 μL de DTT (0,1 M) en el vial donde se encuentra la sonda y se deja a 4°C durante toda la noche. A continuación la purificación de la mezcla se realiza mediante dos columnas GE Healthcare NAP-5. A los 220 μL de la disolución sonda + DTT se añaden 780 μL de agua milliQ para obtener un volumen final de 1000 μL . De este modo pasaremos la disolución en dos fracciones, de 500 μL cada una, por cada columna.

Previamente se elimina todo el líquido en el que se almacenan las columnas para su conservación y, procurando que no se sequen, se pasan 10 mL de agua milliQ para equilibrar las columnas. Después de los 10 mL se pasan las fracciones de disolución, 500 μL por cada columna. De este modo eluirá el exceso de DTT y los productos secundarios, y quedará retenida la sonda de captura tiolada, eluyéndola a continuación con 1 mL de agua milliQ y recogiénola en un tubo eppendorf. Con un espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 10s UV-VIS se mide la absorbancia de la disolución final (2 mL) a 260 nm, de una dilución 1:10 de la misma, usando como blanco agua. De este modo se sabrá la concentración que se tiene finalmente de sonda.

➤ **Limpieza electroquímica de los electrodos serigrafados.**

Antes de la preparación de las fases sensoras es necesario el acondicionamiento de los electrodos serigrafados de oro que se van a usar, con H_2SO_4 0,1 M. Previamente se lava cada electrodo con etanol, agua milliQ y a continuación se secan con N_2 .

Se hacen medidas por voltametría cíclica con un potenciostato AutoLab PGSTAT 10 para, por un lado, realizar un proceso de limpieza del electrodo y, por otro, estimar el área electródica disponible para procesos de transferencia electródica. Para ello se colocan 50 μL de la disolución de sulfúrico 0,1 M y se hacen las medidas. A continuación se lava con agua milliQ y se seca con N_2 .

Los parámetros de medida que se emplean en la voltametría cíclica se indican a continuación:

- Velocidad de barrido: 100 mV/s
- Potencial inicial: 0 V
- Potencial final: 1,25 V
- Número de ciclos en cada medida: 10.

En la figura 11 se muestra el comportamiento voltamétrico típico de los electrodos utilizados.

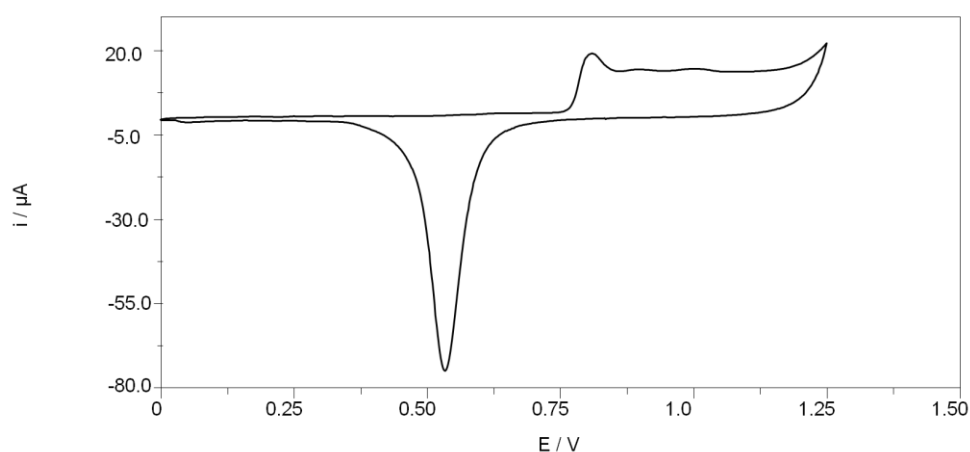


Figura 11.- Ejemplo de voltamperograma de limpieza electroquímica. Interesa en cada caso el área del pico de reducción.

A partir de la integración del pico correspondiente a la reducción de los óxidos de oro se puede estimar el área activa del electrodo de trabajo. Los diferentes electrodos de oro utilizados tienen un **área activa** de $0,13 \pm 0,031 \text{ cm}^2$.

➤ Desarrollo del genosensor.

Después de la limpieza electroquímica se tapa con cinta adhesiva tanto el electrodo de referencia como el auxiliar, con el fin de asegurar que los pasos intermedios hasta la colocación del sustrato se lleven a cabo sólo en el electrodo de trabajo. Después de cada incubación se lavan los electrodos con agua milliQ y se secan con una corriente de N_2 .

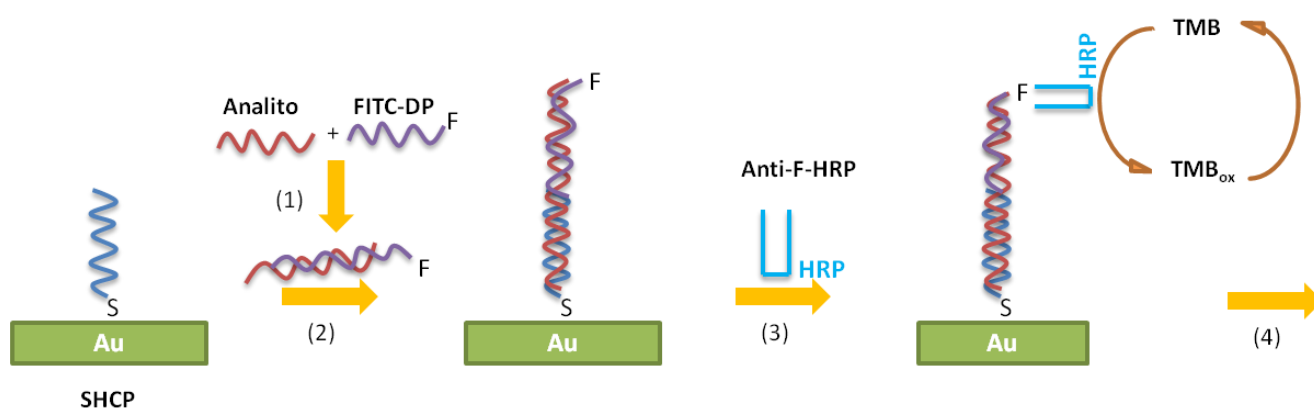


Figura 12.- Esquema del formato de genosensor propuesto y las distintas etapas. **SHCP**: Sonda de captura tiolada, **FITC-DP**: Sonda de detección marcada con fluoresceína, **Anti-F-HRP**: Fragmento Fab de anticuerpo anti-fluoresceína marcado con enzima HRP, **HRP**: peroxidasa de rábano silvestre, **TMB**: Tetrametilbenzidina, sustrato de HRP.

El protocolo a seguir para el desarrollo del genosensor, resumido en la Figura 12, se detalla a continuación. Después de cada etapa se realiza un lavado con agua milliQ y la fase sensora se seca con nitrógeno.

✓ Construcción de la fase sensora.

Previamente tendremos que preparar la fase sensora que vayamos a usar. Dependiendo de la misma, tendremos metodologías distintas:

- Para una fase sensora binaria será necesario inmovilizar sobre la superficie del electrodo la sonda de captura tiolada. Ésta se prepara en todos los casos de una concentración 0,05 μM preparada en una disolución reguladora SSPE 2x.
- Para una fase sensora ternaria será necesario inmovilizar además de la sonda de captura, hexanoditiol preparando una disolución de ambos en una disolución reguladora SSPE 2x.

En ambos casos, se colocan 10 μL de la disolución que corresponda, sobre el electrodo de trabajo, dejando en atmósfera húmeda toda la noche a 4°C. Una vez inmovilizada se prepara una disolución de MCH 1 mM en buffer SSPE 2x y se colocan 10 μL sobre el electrodo de trabajo, dejando un tiempo de 50 min a temperatura ambiente.

✓ Etapa de hibridación.⁴

Para una mayor efectividad se realiza una hibridación en disolución (hibridación homogénea, etapa 1 en Figura 12) de la secuencia diana con la sonda de detección. Se prepara una disolución con la secuencia del analito a la concentración que se desee y 0,25 μM de la secuencia indicadora marcada en el extremo 5' con fluoresceína (FITC-DP) en distintos medios de hibridación, dejando a temperatura ambiente 10-15 minutos como mínimo. A continuación de la inmovilización de MCH, se lleva a cabo la hibridación heterogénea, etapa 2 en Figura 12, colocando 10 μL de la disolución sobre el electrodo de trabajo durante 50 minutos. Siempre se realizan medidas del blanco, en las que en la mezcla del proceso de hibridación homogénea se utiliza únicamente sonda de detección, sin analito.

✓ Incubación del conjugado (etapa 3 en Figura 12)

Se prepara una disolución del conjugado, fragmento Fab de anticuerpos anti-fluoresceína unidos a la enzima HRP (anti-FITC-HRP) en caseína 0,5 % (dilución 1/300 del reactivo comercial) y se colocan 10 μL en cada electrodo durante un tiempo de 20 minutos.

⁴ A partir de aquí es necesario tapar los electrodos y disoluciones que lleven fluoresceína, ya que es sensible a la luz.

✓ Medidas cronoamperométricas (etapa 4 en Figura 12)

Para la realización de las medidas se retira el adhesivo y se lava el sensor. Se colocan 50 μL del sustrato TMB y al cabo de 30 segundos se realizan las medidas cronoamperométricas.

Los parámetros de medida se indican a continuación:

- Potencial inicial: 0 V
- Potencial final: - 0,2 V
- Tiempo de registro de la medida: 60 segundos.

A modo de resumen, en la tabla 6 se muestran los pasos para el desarrollo del genosensor.

ETAPAS	VOLÚMENES DISOLUCIÓN	TIEMPO NECESARIO
Construcción de la fase sensora	Binaria: 10 μL disolución SHCP	Toda la noche en atmósfera húmeda a 4°C
	Ternaria: 10 μL disolución SHCP + HDT	
Inmovilización MCH	10 μL MCH 1mM	50 min
Hibridación	10 μL disolución analito + sonda detección	Homogénea: 10-15 min mínimo
		Heterogénea: 50 min
Incubación conjugado	10 μL anti-FITC-HRP/caseína 0,5 %	20 min
Medidas cronoamperométricas	50 μL TMB	Medida a los 30 s

Tabla 6.- Resumen de las operaciones y tiempo necesario.

4. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha indicado en los objetivos del trabajo, se propone el desarrollo de un genosensor para la detección de secuencias específicas para el patógeno *Escherichia coli* O157:H7. Empleándose electrodos serigrafados de oro como transductor es posible la formación de monocapas autoensambladas de oligonucleótidos, mediante quimisorción, gracias a su modificación en uno de los extremos con un grupo tiol facilitando así su inmovilización, para construir la fase sensora. El diseño de esta interfase juega un papel crucial en el desarrollo de genosensores. Debe tenerse en cuenta la posibilidad de que se produzca bloqueo de la superficie debido a adsorciones no específicas de otras biomoléculas presentes en el medio, disminuyendo así la eficiencia de hibridación lo que conduciría a una disminución de la señal de respuesta dando lugar a falsos negativos. Además estas adsorciones inespecíficas pueden ocasionar aumentos de la señal de blanco, lo que constituye una de las principales limitaciones a la hora de alcanzar límites de detección tan bajos como los necesarios para resolver el problema analítico que se plantea.

El formato de ensayo que se propone es tipo sándwich y como método de detección se emplea un método cronoamperométrico, usando para ello como molécula indicadora la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP) considerando la posibilidad que esta molécula ofrece de amplificación de la señal. En la etapa final de medida se trata, por tanto, de determinar la actividad de HRP unida al anticuerpo anti-fluoresceína, para lo que se ha seleccionado como sustrato de dicha enzima la tetrametilbenzidina (TMB) (Figura 13).

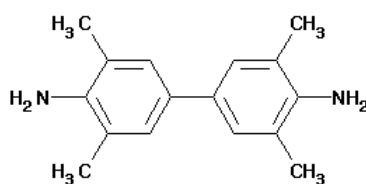


Figura 13.- Estructura química de la TMB

Los pasos necesarios para el desarrollo del genosensor son los siguientes:

1. Selección de una secuencia analito, de una longitud adecuada como para asegurar que ésta sea característica de la bacteria que pretende determinarse.
2. Una vez seleccionada ésta, se debe diseñar tanto la secuencia de captura como la secuencia indicadora, que se utilizarán en el formato de ensayo tipo sándwich propuesto.
3. Diseño y optimización de la fase sensora.
4. Evaluación de las características de respuesta del genosensor desarrollado.

A continuación se describirá cómo se abordó cada una de estas etapas, así como los resultados obtenidos.

4.1.- SELECCIÓN DE LA SECUENCIA ANALITO Y DISEÑO DE LAS SECUENCIAS UTILIZADAS COMO SONDAS.

De la revisión bibliográfica realizada se ha concluido que uno de los genes más ampliamente utilizados en la identificación y cuantificación de las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas es el gen **eaeA**, encargado de codificar la proteína “intimina” y que se encuentra en las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (ECEH). Este gen es, como se indicó anteriormente, el responsable de la adhesión de la bacteria a las paredes del enterocito y causante de su posterior lesión debido a que borra las microvellosidades que se encuentran en dichas paredes.

A través del programa *GenBank* [21] se obtiene la secuencia completa de la parte de ese gen característico de la cepa O157:H7 (*Número de acceso EU627771.1*) siendo su tamaño de 1110 bp. Esta secuencia se recoge en la Figura 14.

```

1      TCGTACAGTTGCAGGCCTGGTTACAACATTATGGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAGAGT
61     GGTAATAACTTTGACGGTAGTTCACTGGACTTCTTATTACCGTTCTATGATTCCGAAAAA
121    ATGCTGGCATTGGTGCAGGTCGGAGCGGTTACATTGACTCCCGCTTACGGCAAATTTA
181    GGTGCGGGTCAGCGTTTTTCTCTCTGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGAT
241    CAGGATTTTTCTGGTGATAATACCCGTTTAGGTATTGGTGGCGAATACTGGCGAGACTAT
301    TTCAAAAGTAGCGTTAACGGCTATTTCCGCATGAGCGGCTGGCATGAGTCATACAATAAG
361    AAAGACTATGATGAGCGCCAGCAAATGGCTTCGATATCCGTTTTAATGGCTATCTACCG
421    TCATATCCGGCATTAGGCGCCAAGCTGATATATGAGCAGTATTATGGTGATAATGTTGCT
481    TTGTTAATTCTGATAAGCTGCAGTCGAATCCTGGTGCGGCGACCGTTGGTGAAACTAT
541    ACTCCGATTCCTCTGGTGACGATGGGGATCGATTACCGTCATGGTACGGGTAATGAAAAT
601    GATCTCCTTACTCAATGCAGTTCCGTTATCAGTTTGATAAATCGTGGTCTCAGCAAAT
661    GAACCACAGTATGTTAACGAGTTAAGAACATTATCAGGCAGCCGTTACGATCTGGTTCAG
721    CGTAATAACAATATTATTCTGGAGTACAAGAAGCAGGATATTCTTCTCTGAATATCCG
781    CATGATATTAATGGTACTGAACACAGTACGCAGAAGATTCAGTTGATCGTTAAGAGCAAA
841    TACGGTCTGGATCGTATCGTCTGGGATGATAGTGCATTACGCAGTCAGGGCGGTCAGATT
901    CAGCATAGCGGAAGCCAAAGCGCACAAAGACTACCAGGCTATTTGCCTGCTTATGTGCAA
961    GGTGGCAGCAATATTTATAAAGTGACGGCTCGCGCCTATGACCGTAATGGCAATAGCTCT
1021   AACAATGTACAGCTTACTATTACCGTTCTGTGAATGGTCAAGTTGTCGACCAGGTTGGG
1081   GTAACGGACTTTACGGCGGATAAGACTTCG

```

Figura 14.- Secuencia del gen eaeA escogido. GI|186462597|GB|EU627771.1| *Escherichia coli* O157:H7 Sakai intimin gamma (eae) gene, partial cds.

Teniendo en cuenta los límites de detección reportados para la mayor parte de los genosensores descritos hasta el momento en la bibliografía y los requerimientos de detectabilidad comentados para el problema analítico que se trata de resolver, se prevé que será necesario realizar un tratamiento previo de la muestra que permita no sólo aislar los posibles contaminantes bacterianos y extraer su material genético, sino además que consiga una amplificación del mismo. Para su acoplamiento a genosensores electroquímicos se considera especialmente adecuada una técnica de amplificación de ácidos nucleicos, recientemente desarrollada, y que transcurre en condiciones isotérmicas, denominada amplificación de ácidos nucleicos isotérmica dependiente de helicasa (HDA, del inglés “Helicase Dependent Amplification”) [22].

En la actualidad existe una compañía Biohelix [23] que comercializa kits para la realización de esta amplificación y que describe unas condiciones para la selección del analito y cebadores a utilizar en el proceso HDA (Tabla 7).

Tamaño del producto	T _m del producto	Tamaño del cebador	T _m del cebador	GC% del cebador
80-120 bp	Min. 68 Opt. 71 Max. 75	Min. 24 Opt. 27 Max. 33	Min. 60 Opt. 68 Max. 74	Min. 35 Opt. 44 Max. 60

Tabla 7.- Condiciones utilizadas para la selección de cebadores para el proceso HDA.

Utilizando este protocolo, restringiendo el tamaño de los amplicones obtenidos tras el proceso de amplificación entre 80-100 pares de bases (bp) se buscan los cebadores más adecuados para la amplificación de este gen con ayuda del programa *Primer3* [24]. Este programa da como resultado una serie de secuencias adecuadas para su uso como cebadores, así como la longitud del amplicón producto, indicando en qué base del gen se encuentra el inicio y final del amplicón (Tabla 8). Se buscan las bases inicial y final en la secuencia del gen, ya que el cebador izquierdo coincidirá con las bases en la secuencia y el cebador derecho será el complementario.

Región	Tamaño del producto	T _m del producto	Tamaño del cebador	T _m del cebador	GC% del cebador	Secuencia
972-1071	100 bp	71,5329	27	Izq.: 68,02 Dcho.: 68,02	Izq.: 44,44 Dcho.: 48,15	Izq.: TATTATAAAGTGACGGCTCGGCCTA Dcho.: GTCGACAACCTTGACCATTGACAGAAC
207-291	85 bp	69,7264	27	Izq.: 67,29 Dcho.: 67,89	Izq.: 40,74 Dcho.: 48,15	Izq.: TGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCTT Dcho.: CCAGTATTGCCACCAATACCTAAACG
856-942	87 bp	74,2132	27	Izq.: 68,82 Dcho.: 68,18	Izq.: 48,15 Dcho.: 48,15	Izq.: ATCGTCTGGGATGATAGTGCATTACGC Dcho.: AATAGCCTGGTAGTCTTGTGCGCTTTG
206-291	86 bp	70,0889	27	Izq.: 67,05 Dcho.: 67,89	Izq.: 44,44 Dcho.: 48,15	Izq.: CTGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCT Dcho.: CCAGTATTGCCACCAATACCTAAACG
207-287	81 bp	68,6930	27	Izq.: 67,29 Dcho.: 67,63	Izq.: 40,74 Dcho.: 44,44	Izq.: TGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCTT Dcho.: TATTGCCACCAATACCTAAACGGGTA
862-942	81 bp	73,7548	27	Izq.: 68,93 Dcho.: 68,18	Izq.: 48,15 Dcho.: 48,15	Izq.: TGGGATGATAGTGCATTACGCAGTCAG Dcho.: AATAGCCTGGTAGTCTTGTGCGCTTTG
861-942	82 bp	74,0858	27	Izq.: 68,93 Dcho.: 68,18	Izq.: 48,15 Dcho.: 48,15	Izq.: CTGGGATGATAGTGCATTACGCAGTCA Dcho.: AATAGCCTGGTAGTCTTGTGCGCTTTG

Tabla 8.- Cebadores propuestos por el programa Primer3 con sus parámetros de ajuste y secuencia.

A continuación, se evaluaron mediante el programa *BLAST* [25] las homologías de esas secuencias, del serotipo O157:H7, con otras posibles cepas (Tabla 9).

Región	Tamaño del producto	Homologías con otros serotipos
972-1071	100 bp	O63:H6, O55:H6, O53, O145, O8, O172, O55:H7, O126:H6, O21:H6, Shigella, Homo sapiens.
207-291	85 bp	O55:H7, O53, O145, O8, O172, Shigella.
856-942	87 bp	O55:H7, E. Albertii, O165, O165:H-, O103:H2, O53, O145, O8, O172, O146:H7, O108:H40, O152:H38, O51:H40, Shigella, Homo sapiens.
206-291	86 bp	O55:H7, O53, O145, O8, O172, O168: HND, Shigella.
207-287	81 bp	O55:H7, O53, O145, O8, O172, O168: HND, Shigella.
862-942	81 bp	O55:H7, E. Albertii, O165, O165: H-, O103:H2, O53, O145, O8, O172, O146:H7, O108:H40, O152:H38, O51:H40, Shigella, Homo sapiens.
861-942	82 bp	O55:H7, E. Albertii, O165, O165: H-, O103:H2, O53, O145, O8, O172, O146:H7, O108:H40, O152:H38, O51:H40, Shigella, Homo sapiens.

Tabla 9.- Homologías con otras cepas de *E. coli* con una coincidencia del 100%.

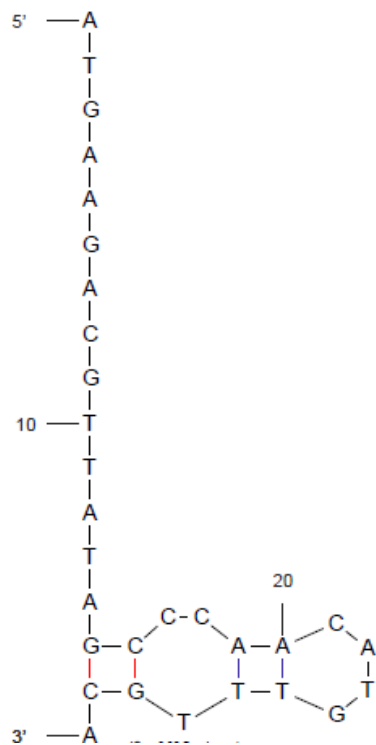
Se observa que las homologías son prácticamente siempre con los mismos serotipos. Sin embargo, se puede comprobar que en el caso de que la región en la secuencia del gen *eaeA* se encuentra en la zona alta (entre 800-1000 bp) existe homología con el genoma del *Homo sapiens* e incluso con otro tipo de bacilo de la familia Enterobacteriaceae, la *Escherichia*

albertii. De este modo se concluye que la región más adecuada para el desarrollo del genosensor será la que se encuentra localizada en las posiciones entre 200-300 bp, concretamente se seleccionó la que da un tamaño de amplicón de 81 bp y está comprendida entre 207-288 bp (Figura 15). Además se comprueba que los otros serotipos que dan homología corresponden también al serogrupo enterohemorrágico (ECEH), en el que se encuentra el serotipo objeto de estudio, O157:H7, o incluso al serogrupo enterotoxigénico (ECET), todos ellos considerados serotipos enteropatógenicos. Además también existe homología con el bacilo *Shigella*, de la misma familia que la *Escherichia*. Esto puede ser ventajoso ya que con esa región de secuencia para el desarrollo del genosensor se podría detectar no sólo una cepa concreta de *Escherichia coli* sino más de una cepa patógena para el ser humano.

```
5' TGCAAACATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATCAGG
ATTTTTCTGGTGATAATACCCGTTTAGGTATTGGTGGCGAATA 3'
```

Figura 15.- Secuencia del amplicón escogido (81 bp) como diana.

Una vez seleccionada la secuencia analito, el siguiente paso es abordar el diseño de las sondas, de captura e indicadora, por complementariedad de las bases (A-T, G-C) con la secuencia diana. Se opta por utilizar la secuencia indicadora complementaria al extremo 3' de la secuencia analito, ya que la introducción de marcadores en el extremo 5' resulta menos costoso. Además, se escoge inicialmente una longitud de 30 bp para la sonda de captura y de 51 bp para la indicadora ya que la hibridación en fase homogénea entre la secuencia analito y la indicadora será más favorable y contribuirá a eliminar la posible estructura secundaria del analito que puede hacer más lenta la fase de hibridación heterogénea. Mediante la ayuda del programa *Mfold Web Server* [26] se determina cuál es la estructura más estable de las secuencias así obtenidas. Estas estructuras, así como sus parámetros termodinámicos que las caracterizan (ΔG , ΔH y ΔS) y su temperatura de fusión (T_m), se resumen en las Figuras 16-18 para las secuencias diana, indicadora y de captura, respectivamente.

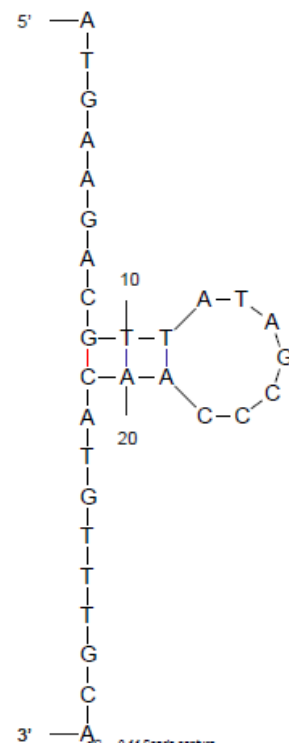


ΔG : -0.92 Kcal/mol (25 °C) ($\pm 5\%$)

ΔH : -39.30 Kcal/mol ($\pm 10\%$)

ΔS : -128.7 cal/ (K mol) ($\pm 11\%$)

T_m : 32.1 °C ($\pm 2 - 4$ °C)



ΔG : -0.44 Kcal/mol (25 °C) ($\pm 5\%$)

ΔH : -28.80 Kcal/mol ($\pm 10\%$)

ΔS : -95.1 cal/ (K mol) ($\pm 11\%$)

T_m : 29.6 °C ($\pm 2 - 4$ °C)

Figura 18.- Estructuras más estables propuestas por el programa para la sonda de captura y sus características termodinámicas.

Se puede observar que ninguna de las secuencias propuestas tiene una estructura secundaria muy fuerte por lo que el desarrollo de la reacción de hibridación será favorable. Además, la formación del dúplex “sonda indicadora-diana” en el paso de hibridación homogénea en disolución con estas estructuras será estable a temperatura ambiente ya que comprobamos que la T_m del híbrido es de 77.8 °C.

Se consultaron distintas posibilidades de marcaje de las sondas, ya fuese con distintos modificadores como en distintas posiciones (Tabla 10).

4.2.- DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LA FASE SENSORA.

Como ya se indicó en el protocolo de desarrollo del genosensor electroquímico para la detección de secuencias específicas para *Escherichia coli*, se evaluaron dos fases sensoras distintas, binaria y ternaria, con el fin de analizar sus características.

En el caso de la fase sensora binaria se desarrollaron monocapas autoensambladas mixtas immobilizando, a continuación de la sonda de captura tiolada, un alcanotiol (MCH). Tarlov y colaboradores [27] ya estudiaron la introducción de este compuesto para controlar las propiedades superficiales de las sondas de ADN immobilizadas. Además de servir como espaciador entre ellas, modula la densidad superficial de las hebras y previene interacciones inespecíficas entre los nucleótidos y la superficie electródica de oro permitiendo así que las sondas tioladas immobilizadas tengan una orientación casi perpendicular favoreciendo de este modo la hibridación.

También se ha descrito el uso de otros alcanotioles para el desarrollo de monocapas autoensambladas, como el octadecanotiol [28], que produce una monocapa más densamente empaquetada favoreciendo un mayor recubrimiento de la superficie para la inmovilización de los oligonucleótidos.

En la Figura 20 se presenta el esquema del genosensor empleando una fase sensora binaria.

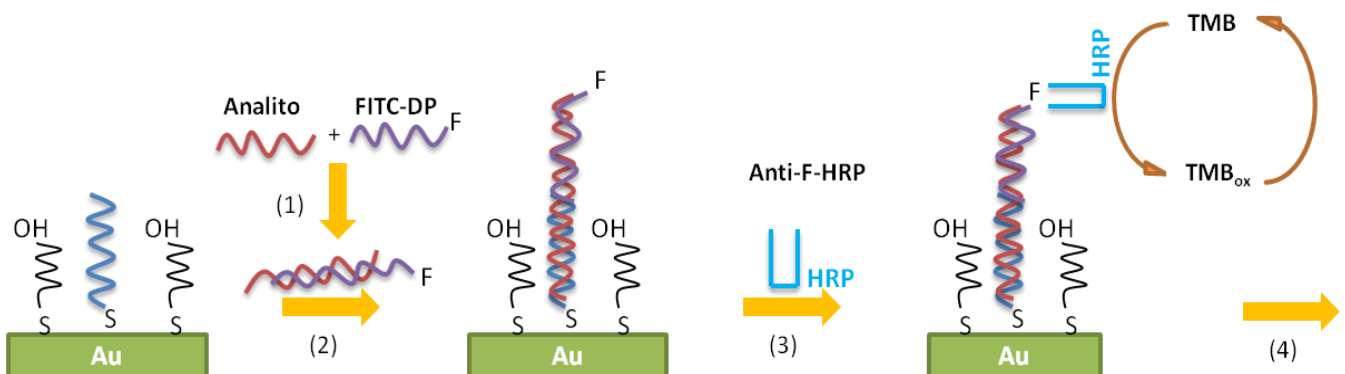


Figura 20.- Diseño del genosensor electroquímico empleando la fase sensora binaria con las mismas etapas explicadas en el diseño general. **MCH:** 6-mercapto-1-hexanol.

Con este tipo de fase sensora se analizaron cuatro medios de hibridación distintos, para una misma concentración de analito de 5 nM. Dichos medios de hibridación⁵ fueron:

- 2,5 % BSA + Disolución reguladora SSPE 6x.
- 0,1 % SDS + Disolución reguladora SSPE 6x.
- 25 % Formamida + 0,1 % SDS + Disolución reguladora SSPE 6x.
- 25 % Formamida + 0,1 % SDS + Disolución reguladora SSPE 6x (con previo bloqueo con el medio 2,5 % BSA + Disolución reguladora SSPE 6x durante 10 min).

Los resultados obtenidos con cada uno de los medios de hibridación se presentan en la figura 21.

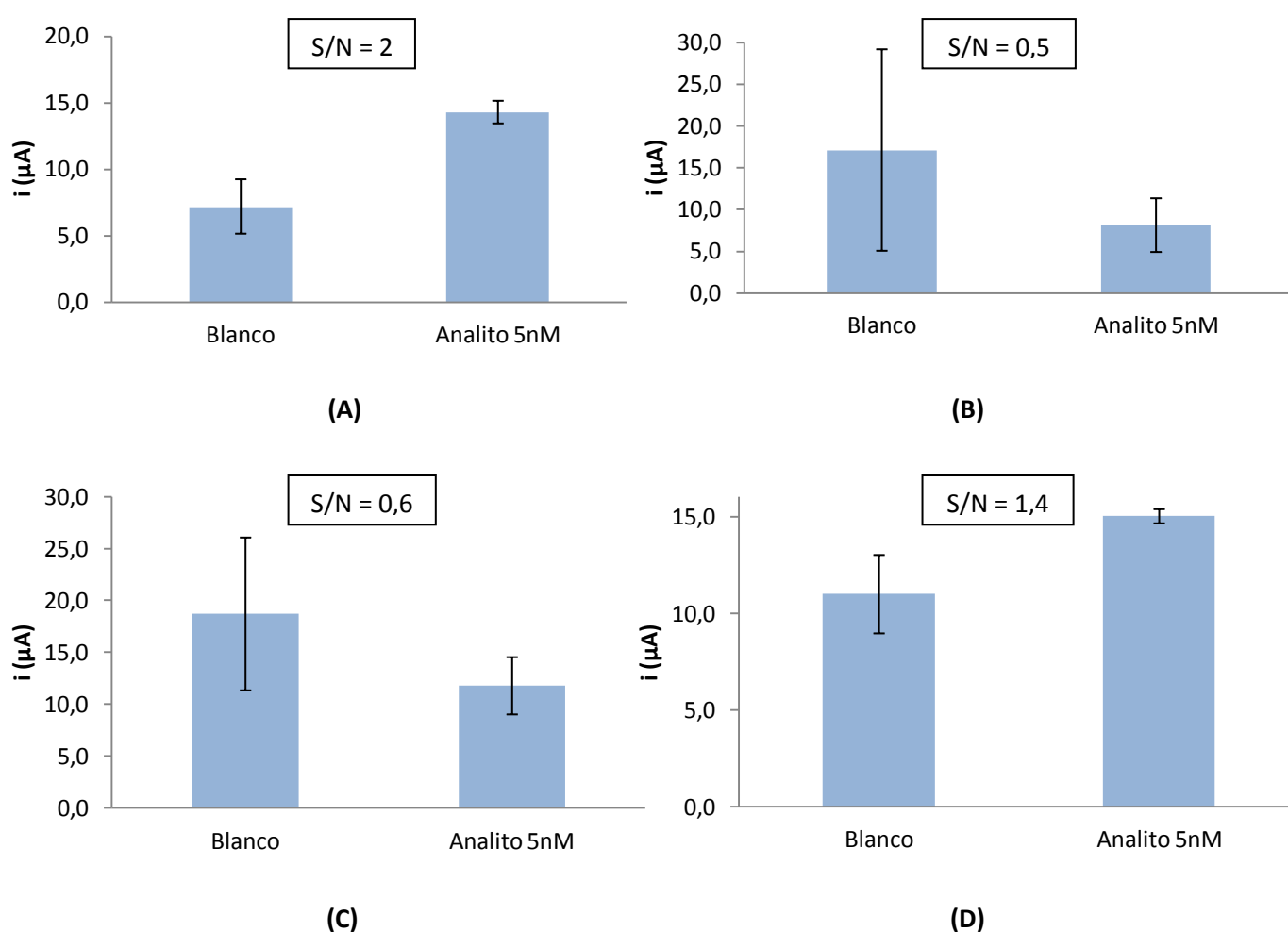


Figura 21.- Representación de resultados obtenidos para el blanco y para una concentración de secuencia analito 5nM empleando distintos medios de hibridación. **(A)** 2,5 % BSA en SSPE 6x; **(B)** 0,1 % SDS en SSPE 6x; **(C)** 25 % Formamida + 0,1 % SDS en SSPE 6x; **(D)** 25 % Formamida + 0,1 % SDS en SSPE 6x (previo bloqueo con 2,5 % BSA en SSPE 6x)

⁵ Salvo en el caso de la BSA, con los demás medios se favoreció la etapa de hibridación homogénea con calentamiento a 98° C y posterior enfriamiento en hielo.

Como se puede observar, en todos los casos se obtiene una señal del blanco elevada, lo que puede ser debido a interacciones inespecíficas originadas por el escaso bloqueo de la superficie del electrodo. Además la presencia de formamida en el medio de hibridación, un agente caotrópico, no permite disminuir los blancos y sí disminuye en gran medida la señal. La Tabla 11 resume las relaciones señal/blanco obtenidas en cada caso. La mayor relación se obtiene cuando se utiliza como disolución de hibridación la reguladora SSPE 6x con 2,5% BSA como agente bloqueante. Ésta puede favorecer junto con el MCH la orientación de las hebras de ADN de las sondas de captura facilitado la hibridación heterogénea.

Medio de hibridación	Relación señal /blanco (S/N)
2,5 % BSA en SPE 6x	2
0,1 % SDS en SSPE 6x	0,5
0,1 % SDS + 25 % Formamida en SSPE 6x	0,6
0,1 % SDS + 25 % Formamida en SSPE 6x (Bloqueo con 2,5 % BSA en SSPE 6x)	1,4

Tabla 11.- Relaciones S/N obtenidas para una concentración de analito 5 nM para cada medio de hibridación ensayado en la fase sensora binaria.

A pesar de que el medio de hibridación que incorpora BSA conduce a la mayor relación señal/blanco, la señal del blanco obtenida es alta lo que podría llevar a confusión y estar obteniendo entonces falsos positivos que estén falseando la señal del analito observada y limitando además la mínima concentración de secuencia analito detectable.

Posteriormente se estudió el uso de fases sensoras ternarias. Campuzano et al. [29] desarrollaron por primera vez el uso de estas monocapas ternarias introduciendo un tercer tiol. Comparando ditioles lineales de distintas longitudes como tercer componente de la fase sensora se observó que la relación señal-blanco obtenida por las distintas interfases indicaba que las propiedades de las nuevas capas obtenidas eran dependientes de la estructura y de la configuración que adoptaba ese tercer componente durante el ensamblaje.

En el desarrollo del genosensor propuesto se planteó utilizar en la construcción de la fase sensora un tercer componente, el 1,6-hexanoditiol (HDT), que se inmoviliza junto con la sonda de captura tiolada (Figura 22). La superficie cubierta de fase sensora y el espaciado de las sondas de captura es dependiente de la concentración de ditiol que se utilice ya que se puede asumir cierta competitividad entre los grupos tioles del oligonucleótido y el ditiol, hasta que se establezca el equilibrio. Una concentración baja de ditiol puede dar lugar a mayor número de adsorciones inespecíficas debido a un recubrimiento incompleto de la superficie del oro con una consiguiente disminución de la relación señal-blanco, por el contrario, una concentración alta podría desplazar algunas secuencias sonda disminuyendo la eficacia de hibridación y bajando entonces la señal de respuesta.

Se prevé por tanto que exista una interrelación entre las concentraciones de sonda y el ditiol utilizadas en la construcción del sensor, por lo que sería interesante estudiar simultáneamente la influencia que tienen estos dos factores en el diseño del sensor, tanto sobre la señal del analito como sobre el blanco.

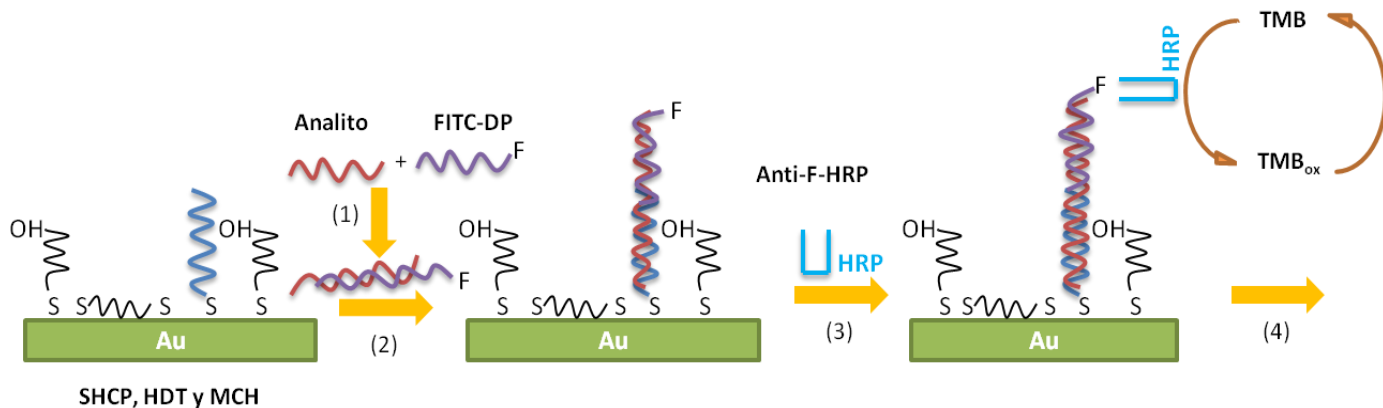


Figura 22.- Diseño del genosensor electroquímico empleando la fase sensora ternaria con las mismas etapas explicadas en el diseño general. **HDT:** 1,6-hexanoditiol.

En los estudios preliminares se evaluó el efecto del medio de hibridación, seleccionando nuevamente dos medios de hibridación distintos, para una misma concentración de analito de 5 nM y con unas concentraciones de sonda de captura y HDT de 0,05 μ M y 300 μ M, respectivamente. Dichos medios fueron:

- 2,5 % BSA + Disolución reguladora SSPE 6x.
- 25 % Formamida + 0,1 % SDS Disolución reguladora SSPE 6x (con previo bloqueo con el medio 2,5 % BSA + Disolución reguladora SSPE 6x durante 10 min).

Los resultados obtenidos con ambos medios de hibridación se muestran en la figura 23.

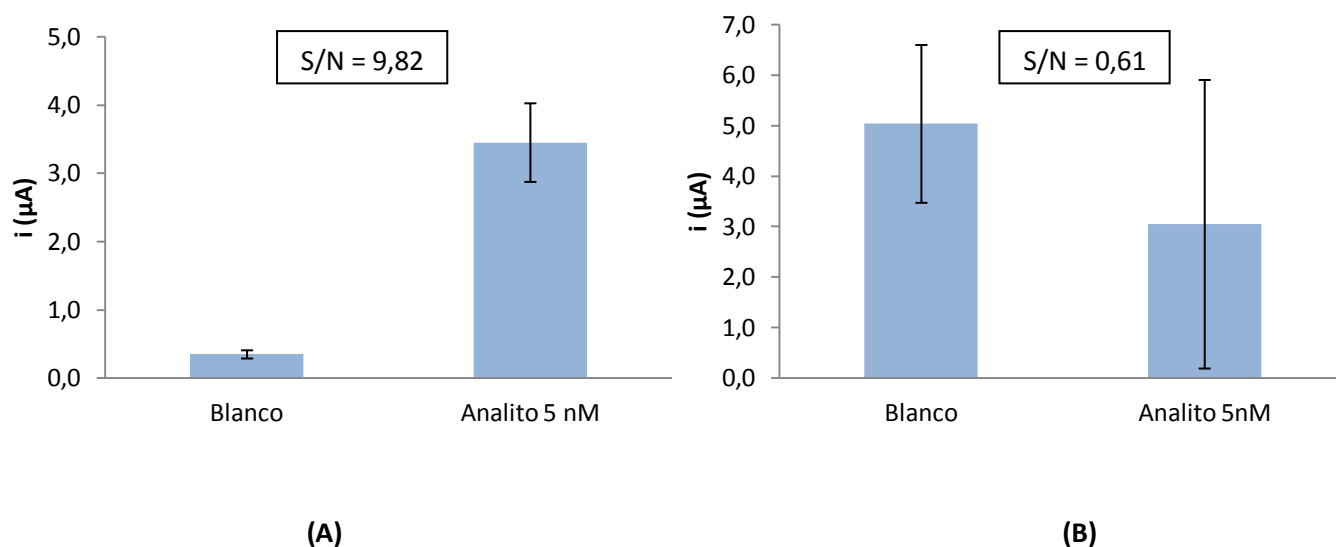


Figura 23.- Representación de resultados obtenidos para el blanco y para una concentración de secuencia analito 5nM empleando distintos medios de hibridación. **(A)** 2,5 % BSA en SSPE 6x; **(B)** 25 % Formamida + 0,1 % SDS en SSPE 6x (previo bloqueo con 2,5 % BSA en SSPE 6x).

Se observa que se obtienen mejores resultados con el medio de hibridación 2,5 % BSA en SSPE 6x. En el caso del otro medio de hibridación se siguen obteniendo blancos mayores pudiendo ser debido, nuevamente, a un bloqueo parcial de la fase sensora. También, visto que la señal del analito decrece en contraposición a lo esperado, que sería un aumento ya que aumenta la señal del blanco, se puede pensar que además del bloqueo parcial dando interacciones inespecíficas existe un desfavorecimiento de la hibridación heterogénea lo que conlleva a una disminución en la señal de respuesta del analito. Además, obtenemos desviaciones muy altas para esta medida a diferencia de lo que se observa con el otro medio. Las relaciones señal/blanco para este caso se muestran en la Tabla 12.

Medio de hibridación	Relación señal /blanco (S/N)
2,5 % BSA en SSPE 6x	9,82
0,1 % SDS + 25 % Formamida en SSPE 6x (Bloqueo con 2,5 % BSA en SSPE 6x)	0,61

Tabla 12.- Relaciones S/N obtenidas para una concentración de analito 5 nM para cada medio de hibridación ensayado en la fase sensora ternaria.

En términos de relación señal/blanco, se comprueba que el mejor medio de los evaluados para la fase sensora ternaria fue el 2,5 % BSA en SSPE 6x. Este es entonces el medio escogido para las posteriores medidas y optimización de la fase sensora. Como se ha indicado anteriormente las concentraciones de sonda de captura y HDT utilizadas en la preparación de la fase sensora se identifican como los principales factores de diseño, que afectan en gran medida a las características de respuesta del sensor.

Con el objetivo de evaluar su efecto, se prepararon diferentes fases sensoras con las combinaciones de sonda de captura y hexanoditiol que se indican en la Tabla 13, utilizando dichas fases sensoras para medir la respuesta que se obtiene para una concentración de analito 5 nM (señal), así como para el blanco.

[SHCP]/ μM	[HDT]/ μM	Relación [HDT]/[SHCP]
0,05	300	6000
0,25	300	1200
0,25	60	240
0,05	60	1200

Tabla 13.- Relación de concentraciones usadas para la construcción de la fase sensora ternaria.

Para el estudio de estas relaciones se realizó un **diseño factorial** [30, 31]. Este tipo de diseño es empleado cuando se quiere estudiar el efecto de un conjunto de factores sobre una respuesta. Empleamos un diseño factorial 2^k , siendo la base (2) el número de niveles (nombrados “alto” o “bajo”) y el exponente (k) el número de factores estudiados. Puesto que en nuestro experimento se han identificado dos factores, la concentración de hexanoditiol (HDT) y la concentración de la sonda de captura (SHCP), el **diseño factorial** que se elabora es un 2^2 .

Se analiza por separado el efecto que la concentración de ambos componentes utilizada en la preparación tiene sobre el blanco y sobre la señal para una concentración fija de analito con dos niveles de concentraciones para cada caso, por lo que será necesario realizar 4 combinaciones de experimentos posibles ($2^2 = 2 \times 2$) para cada respuesta. Sea la concentración de sonda el factor A, la concentración de HDT el factor B, el factor AB la interacción entre ambos y los niveles “alto” y “bajo” denotados por +1 y -1 respectivamente.

En el estudio realizado se seleccionó como nivel “alto”, en el caso de la concentración de sonda, 0,25 μM y para la concentración de HDT, 300 μM . Para el nivel “bajo” la concentración de sonda será 0,05 μM y para el HDT, 60 μM . Con cada una de estas combinaciones se construyen seis sensores diferentes con los que se hacen tres medidas del blanco y dos medidas del analito (réplicas). Los datos obtenidos experimentalmente para cada caso se indican en las tablas 14 y 15.

Factor A [SHCP]/ μM	Factor B [HDT]/ μM	Combinación x_1, x_2	Replica I	Replica II	Replica III	Total
0,05	60	-1, -1	0,88	0,50	0,90	2,28 (y_1)
0,25	60	+1, -1	1,14	1,06	2,18	4,38 (y_2)
0,05	300	-1, +1	0,41	0,30	0,29	1,01 (y_3)
0,25	300	+1, +1	0,18	0,24	0,28	0,69 (y_4)

Tabla 14.- Resultados obtenidos para las diferentes medidas del blanco.

Factor A [SHCP]/ μM	Factor B [HDT]/ μM	Combinación x_1, x_2	Replica I	Replica II	Total
0,05	60	-1, -1	9,72	8,42	18,14 (y_1)
0,25	60	+1, -1	7,83	8,56	16,39 (y_2)
0,05	300	-1, +1	3,33	3,57	6,90 (y_3)
0,25	300	+1, +1	7,56	8,97	16,53 (y_4)

Tabla 15.- Resultados obtenidos para las diferentes medidas del analito.

Donde x_1 es una variable codificada que representa la concentración de sonda de captura (SHCP) y x_2 una variable codificada que representa la concentración de HDT. La relación entre las variables naturales (concentraciones) y codificadas (x_1 y x_2) es:

$$x_1 = \frac{[\text{SHCP}] - \left\{ \frac{[\text{SHCP}]_{\text{baja}} + [\text{SHCP}]_{\text{alta}}}{2} \right\}}{\left\{ \frac{[\text{SHCP}]_{\text{alta}} - [\text{SHCP}]_{\text{baja}}}{2} \right\}} \quad x_2 = \frac{[\text{HDT}] - \left\{ \frac{[\text{HDT}]_{\text{baja}} + [\text{HDT}]_{\text{alta}}}{2} \right\}}{\left\{ \frac{[\text{HDT}]_{\text{alta}} - [\text{HDT}]_{\text{baja}}}{2} \right\}}$$

Las cuatro combinaciones, tanto para la respuesta del blanco como para la respuesta del analito, pueden representarse como se muestra en la figura 24.

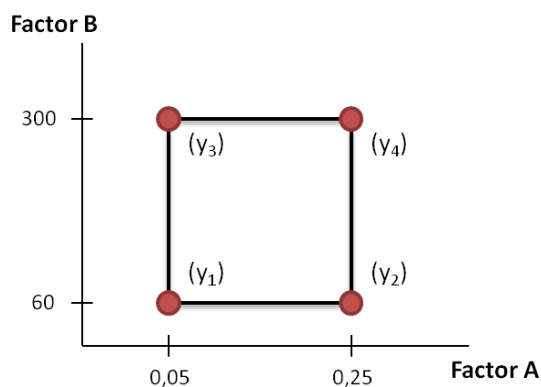


Figura 24.- Combinaciones de los tratamiento en un diseño factorial 2^2 .

El efecto principal para cada factor A y B indica la variación promedio de la respuesta cuando cambia ese factor. En el caso del efecto de interacción AB, ésta existe cuando el efecto de un factor depende de qué valor tome el otro factor. En nuestro estudio, los valores de los efectos principales para cada respuesta se indican en la Tabla 16.

Señal del blanco			Señal del analito		
Efecto principal A	Efecto principal B	Efecto de la interacción AB	Efecto principal A	Efecto principal B	Efecto de la interacción AB
0,298	- 0,826	- 0,403	1,97	- 2.775	2,845

Tabla 16.- Valores para los efectos principales A, B y AB. (Ecuaciones en Anexo II)

Los efectos de A son positivos en ambos casos, lo que indica que al incrementar A (sonda de captura) del nivel bajo al nivel alto se observa un aumento en la señal. El efecto de B sin embargo es negativo en ambas respuestas, esto sugiere que un aumento en este factor (HDT) dará lugar a una disminución en la señal de respuesta. El efecto de la interacción, AB, en ambos casos es significativo en comparación con los dos efectos principales.

El grado de interacción se puede observar con los gráficos de interacción. Estos gráficos muestran el cambio de respuesta al variar un factor para distintos valores del otro factor. En la Figura 25 se muestran dichos gráficos para cada respuesta.

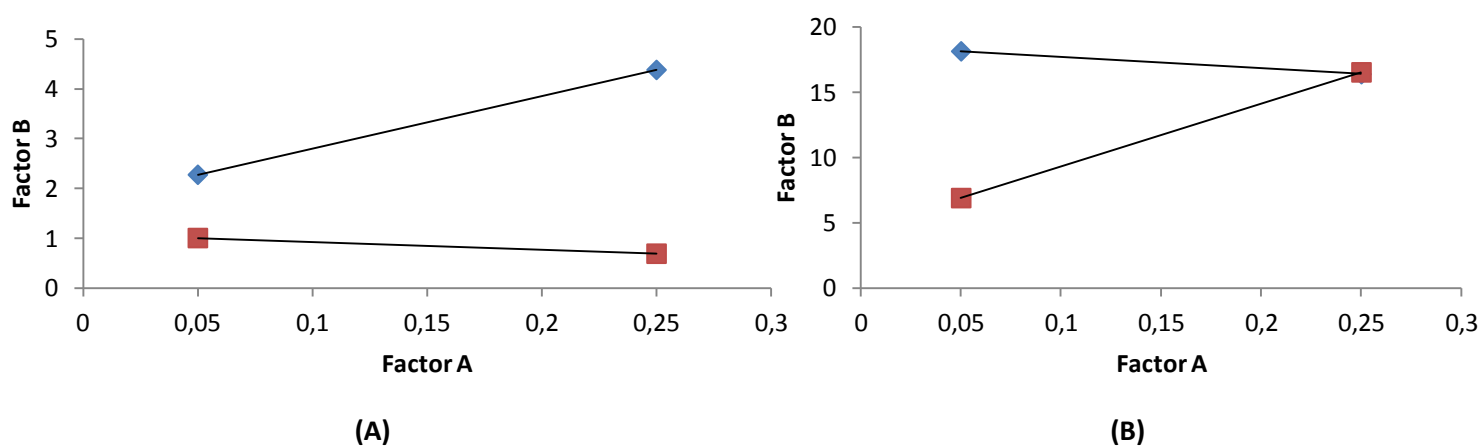


Figura 25.- Gráficos de interacción. Indica cómo cambia el factor B para distintos valores de A (azul nivel bajo de B y rojo nivel alto de B). **(A)** Blanco; **(B)** Analito.

Se observa que en ambos casos las líneas obtenidas no son paralelas lo que señala la interacción entre ambos factores.

Para determinar si los efectos principales son estadísticamente significativos o no y confirmar la interpretación de los datos que se hizo anteriormente se realiza un análisis de varianza. Los resultados obtenidos de este análisis se resumen en la Tabla 17.

Fuente de variación	Señal del blanco					Señal del analito				
	SS	GL	CM	F ₀	Valor P	SS	GL	CM	F ₀	Valor P
A	0,267	1	0,267	2,38	0,1612	7,762	1	7,762	14,56	0,0188
B	2,048	1	2,048	18,29	0,0027	15,401	1	15,401	28,89	0,0058
AB	0,487	1	0,487	4,35	0,0705	16,188	1	16,188	30,37	0,0053
Error exp.	0,897	8	0,112			2,134	4	0,533		
Total	3,699	11				41,485	7			

Tabla 17.- Análisis de varianza para cada respuesta. **SS:** Suma de cuadrados; **GL:** Grados de libertad; **CM:** Cuadrado medio; **F₀:** Parámetro F.

Con base en los valores P se confirma que los efectos principales son significativos y que existe interacción entre ambos factores.

Los resultados se expresan en términos de un modelo de regresión. Este modelo viene dado por la ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Donde β_1 y β_2 son los coeficientes de regresión para cada factor, β_0 es el término independiente dado por el promedio de todas las observaciones, x_1 y x_2 son las variables codificadas descritas anteriormente, y β_{12} es el coeficiente que indica la interacción entre ambos factores. Cada coeficiente de regresión está relacionado con el efecto principal correspondiente (A, B y AB), siendo:

$$\beta_1 = A/2$$

$$\beta_2 = B/2$$

$$\beta_{12} = AB/2$$

De este modo, se obtienen los modelos de regresión ajustados para cada señal de respuesta.

Blanco: $y_b = 0,696 + 0,149 x_1 - 0,413 x_2 - 0,202 x_1 x_2$

Analito: $y_s = 7,245 + 0,985 x_1 - 1,388 x_2 + 1,423 x_1 x_2$

Para evaluar el efecto de cada variable x_1 y x_2 se saca factor común a la variable de estudio. Así, para evaluar el efecto de x_1 se obtienen las ecuaciones siguientes:

Blanco: $y_b = 0,696 + (0,149 - 0,202 x_2) x_1 + 0,413 x_2$

Analito: $y_s = 7,245 + (0,985 + 1,423 x_2) x_1 - 1,388 x_2$

En el caso del efecto de x_2 se obtienen las ecuaciones:

$$\text{Blanco:} \quad y_b = 0,696 - (0,413 + 0,202 x_1) x_2 + 0,149 x_1$$

$$\text{Analito:} \quad y_s = 7,245 + (1,423 x_1 - 1,388) x_2 + 0,985 x_1$$

Por tanto, del estudio se puede concluir que:

- ✓ El efecto de la concentración de SHCP es siempre positivo sobre la señal, sin embargo para el blanco depende de la concentración de HDT.
- ✓ Para concentraciones de HDT superiores a 270 μM se observa un efecto negativo sobre el blanco, es decir, este disminuye al aumentar la concentración de SHCP. Por otro lado, para concentraciones inferiores a 270 μM se observa un efecto positivo sobre el blanco, es decir, este aumenta al aumentar la concentración de SHCP.
- ✓ El efecto de la concentración de HDT es siempre negativo sobre el blanco, sin embargo para la señal depende del valor de la concentración de SHCP.
- ✓ Para concentraciones de SHCP superiores a 0,25 μM se observa un efecto positivo sobre la señal, esta aumenta al aumentar la concentración de HDT. Del mismo modo, para concentraciones inferiores a 0,25 μM el modelo predice un efecto negativo sobre la señal, esta disminuye al aumentar la concentración de HDT.

El objetivo es encontrar las concentraciones de los dos componentes que permiten obtener una máxima relación señal/blanco. Para ello es útil utilizar el modelo de regresión para generar gráficas de superficie de respuesta (Figura 26).

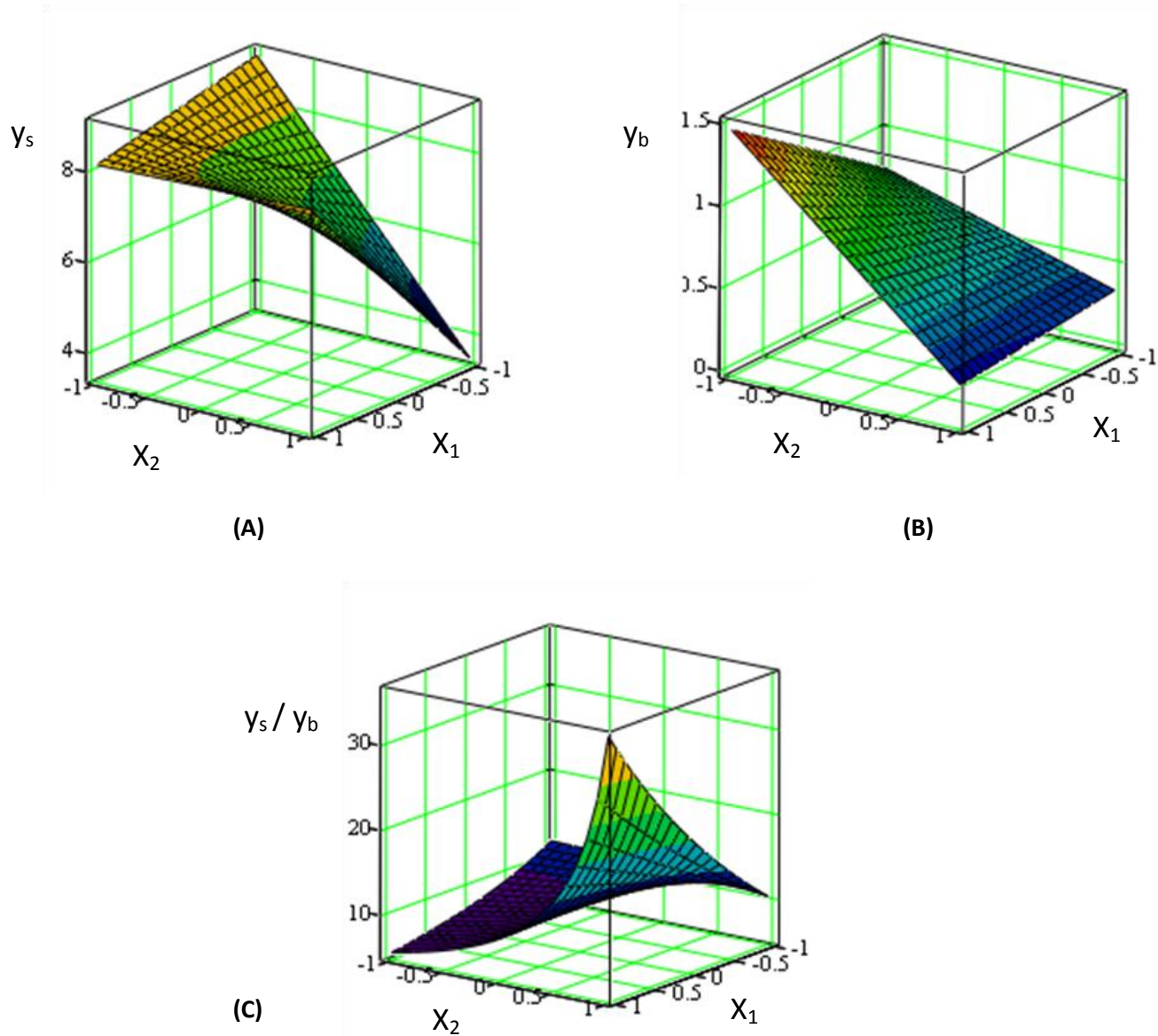


Figura 26.- Gráficas de superficie de respuesta. **(A)** Analito. **(B)** Blanco. **(C)** Relación Señal/Blanco.

De acuerdo con estos resultados se ha seleccionado una concentración de HDT de 300 μM y una concentración de sonda de captura de 0,25 μM para construir la fase sensora y caracterizar su respuesta.

4.3.- EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Con el fin de evaluar las características analíticas del genosensor electroquímico (límite de detección, reproducibilidad, rango de linealidad, etc.) se realizaron medidas para cantidades crecientes de secuencia analito en un rango de concentraciones comprendiente entre 0 nM y 10 nM manteniendo la concentración de secuencia indicadora en 0,25 μ M y utilizando como fase sensora la monocapa ternaria obtenida según se describió en la sección anterior.

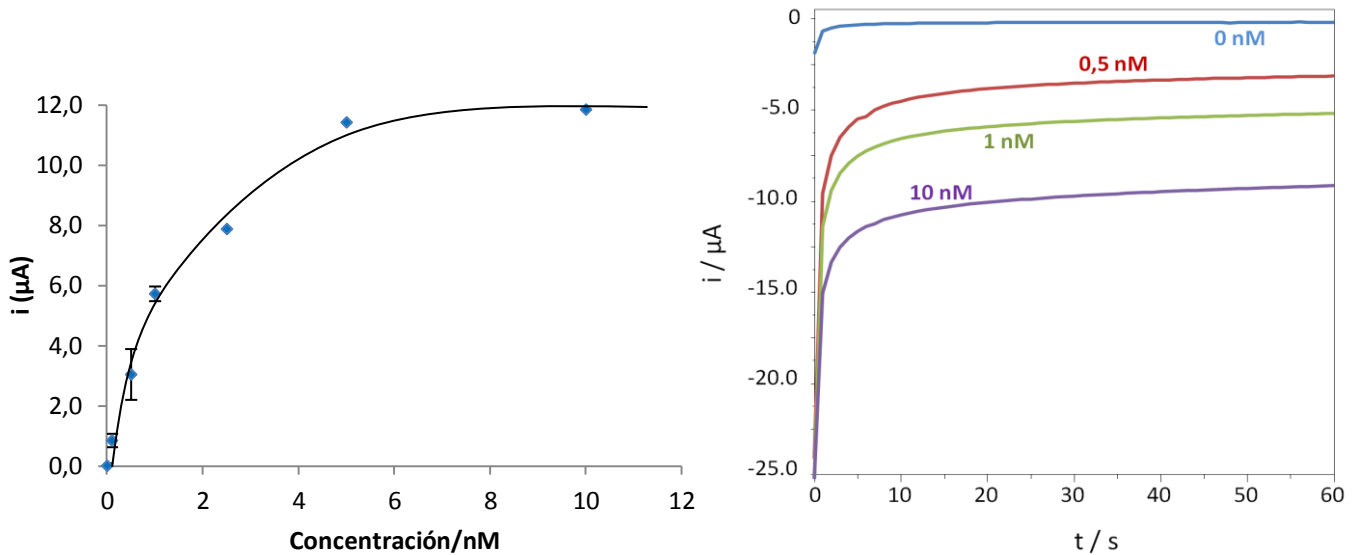


Figura 27.- Respuesta del sensor para un rango amplio de concentraciones de analito.

En la Figura 26 se resumen los resultados obtenidos. Se observa un aumento no lineal de la señal medida con la concentración de analito, hasta alcanzar una máxima señal de saturación a concentraciones de analito superiores a 5 nM.

Con el objetivo de evaluar si el sensor muestra una variación lineal de la respuesta con la concentración de analito en la zona de concentraciones más bajas, se midió la señal para concentraciones crecientes de la secuencia específica de *E. coli* en el intervalo entre 0,1 y 1,5 nM. La Figura 27 resume los resultados obtenidos.

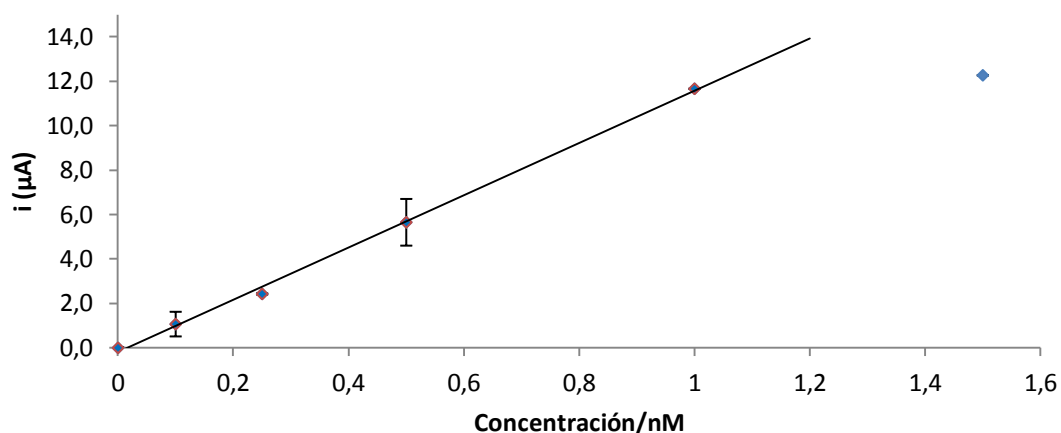


Figura 28.- Respuesta del sensor en un intervalo pequeño de concentraciones de analito.

Se observa que el intervalo lineal de respuesta del sensor se extiende hasta una concentración máxima de 1 nM. La ecuación de calibración en este intervalo de concentraciones es:

$$i / \mu A = (11,8 \pm 0,3) [\text{analito}]/\text{nM} + (-0,2 \pm 0,2)$$

$$r^2 = 0,9982; \quad n = 5$$

Por tanto, podemos concluir que las características de respuesta del genosensor desarrollado son:

- Límite de detección). Se encuentra que el valor más bajo de concentraciones de analito que se puede detectar con este sensor es de 0,06 nM. Este valor corresponde a 0,6 femtomoles de analito ($1,505 \times 10^{-11}$ gramos de analito) teniendo en cuenta el pequeño volumen de muestra empleado en la detección.
- Intervalo lineal. La respuesta del sensor varía linealmente con la concentración hasta 1 nM.
- Reproducibilidad. Para un nivel de concentraciones de 1 nM, realizándose 5 medidas en días distintos, se obtuvo una media de 11,10 y una desviación estándar de 0,82, obteniéndose así una desviación estándar relativa (RSD) del 7 %.

5.- CONCLUSIONES

- ✓ De acuerdo a la revisión bibliográfica, se observa que uno de los genes más ampliamente utilizados para la identificación y cuantificación del microorganismo patógeno *Escherichia coli* (ECEH) es el gen *eaeA*, característico también de la cepa O157:H7 objeto de estudio, con una secuencia completa del gen de 1100 bp.
- ✓ Se selecciona como secuencia de analito un fragmento de dicho gen, que cumpla las condiciones necesarias para llevar a cabo un proceso previo de amplificación isotérmica (HDA). Esta secuencia tiene un tamaño de 81 bp y se encuentra comprendida entre 207-287 bp de la secuencia gen completa y además es homóloga para otros serotipos enterohemorrágicos. Se escoge un tamaño de sonda indicadora de 51 bp para favorecer la hibridación en fase homogénea entre ésta y la secuencia analito y eliminar así las posibles estructuras secundarias que pueda adoptar este último. En el caso de la sonda de captura se opta por un tamaño de 30 bp de forma que en la superficie sensora se forme un dúplex perfecto en presencia de la secuencia analito. Por cuestiones económicas se marca la sonda de captura con C₆SH en el extremo 3' y la indicadora en el extremo 5' con fluoresceína.
- ✓ En el desarrollo del genosensor electroquímico se evaluaron dos fases sensoras distintas, monocapa binaria y monocapa ternaria, con el fin de analizar sus características. La fase sensora binaria se obtiene inmovilizando, además de la sonda de captura, un alcanotiol (6-mercapto-1-hexanol) que modula la densidad superficial de las hebras y previene interacciones inespecíficas. La mayor relación señal/blanco, para una concentración de analito 5 nM, se consigue cuando se utiliza como disolución de hibridación la reguladora SSPE 6x + 2,5% BSA como agente bloqueante con un valor de 2. Esto parece que favorece, junto con el MCH, la orientación de las hebras facilitando la hibridación. Sin embargo, se obtiene una señal del blanco elevada (7,2 µA en el caso más favorable) lo que puede conducir a falsos positivos y limita la detectabilidad alcanzable con la misma
- ✓ La preparación de la fase sensora ternaria, obtenida al coinmovilizar junto con la sonda de captura 1,6-hexanoditiol, permite obtener blancos 18 veces inferiores y así conseguir relaciones señal/blanco de 9,82 para una concentración de analito 5 nM, empleando como medio de hibridación 2,5% BSA en SSPE 6x.
- ✓ En el caso de la fase sensora ternaria puede asumirse cierta competitividad entre los grupos tioles del oligonucleótido de captura y del ditiol por la superficie electródica por lo que se estudia la influencia que estos dos factores tienen sobre el diseño del genosensor, tanto sobre la señal del analito como sobre el blanco, realizando un diseño factorial 2². Se concluye que el efecto de la concentración de sonda es siempre positivo para la señal del analito, sin embargo para la señal del blanco depende de la concentración de ditiol: para concentraciones de ditiol superiores a 270 µM existe efecto negativo, y para concentraciones inferiores da lugar a un efecto positivo. Por otro lado el efecto de la concentración de ditiol es siempre negativo sobre la señal del blanco, sin embargo para la señal del analito depende de la concentración de sonda: Para concentraciones de sonda superiores a 0,25 µM existe un efecto positivo sobre la

señal y para concentraciones inferiores da lugar a un efecto negativo. Se seleccionaron para la construcción del genosensor concentraciones de ditiol y sonda de captura 300 μM y 0,25 μM , respectivamente.

- ✓ Se evalúan las características analíticas de genosensor propuesto observando que tiene un límite de detección de 0,06 nM (0,6 femtomoles), un intervalo lineal hasta una concentración de analito 1 nM y que la desviación estándar relativa (RSD), para 5 medidas realizadas con distintos sensores y una concentración de analito 1 nM, es del 7 %.

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Yang, R. Bashir. *Biotechnology Advances*. **2008**, 26, 135-150.
- [2] *Enterohemorrhagic Escherichia coli Infections*. Technical Factsheets. Center for Food Security & Public Health. Iowa State University, **2009**. (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets>).
- [3] C. L. Gyles. *J. Anim. Sci.* **2007**. 85 (E. Suppl.): E45-E62
- [4] N. Margall; A. Doínguez; G. Prats; L. Salleras. *Rev Esp Salud Pública*. **1997**, 71, 437-443
- [5] <http://www.lugo.usc.es/ecoli/BROTES.html>
- [6] *Pathogens and toxins in foods*. V. K. Juneja; J. N. Sofos. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington DC, **2010**.
- [7] M.B. González García; A. Costa García. *Monografía XXX de la Real Academia Nacional de Farmacia*. **2010**, 197 – 222.
- [8] R. Miranda Castro. *Tesis Doctoral*. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo. **2009**, Págs. 19-52.
- [9] P. De Los Santos Álvarez. *Tesis Doctoral*. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo. **2003**, Págs. 31-48.
- [10] A. Lermo; E. Zacco; J. Barack; M. Delwiche; S. Campoy; J. Barbé; S. Alegret; M.I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1805-1811.
- [11] G. Martínez-Paredes; M.B. González-García; A. Costa-García. *Electroanalysis*, **2009**, 21, 379-385.
- [12] P.R. Solanki; A. Kaushik; P.M. Chavhan; S.N. Maheshwari; B.D. Malhotra. *Electrochem. Comm.* **2009**, 11, 2272-2277.
- [13] R.M Umek; S.W. Lin; J. Vielmetter; R.H. Terbrueggen; B. Irvine; C.J. Yu; J.F. Kayyem; H. Yowanto; G.F. Balckburn; D.H. Farkas; Y.P. Chen. *Journal of Molecular Diagnostics*, **2001**, 3, 74-84.
- [14] O.A. Loaiza; S. Campuzano; M. Pedrero; J.M Pingarrón. *Talanta*, **2007**, 73, 838-844.
- [15] A. Walter; J. Wu; G.U. Flechsig; D.A. Haake; J. Wang. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 689, 29-33.
- [16] L. Wei-Ching; A.H. Ja-an. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2470-2476.
- [17] N.C. Veitch. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 249–259.
- [18] *Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones*. J.M Pingarrón Carrazón; P. Sánchez Batanero. Editorial Síntesis S.A. Madrid, **1999**.
- [19] Página web de DropSens. http://www.dropsens.com/screen_printed_electrodes_pag.html.
- [20] *Bioquímica*. J.M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko. Editorial Reverté S.A. **2008**.

- [21] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- [22] M. Vicent; Y. Xu; H. Kong. *Embo Reports*. 2004, 5, 795-800.
- [23] Página web de Biohelix. <http://www.biohelix.com/>
- [24] <http://simgene.com/Primer3>
- [25] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [26] M. Zuker; *MFold Web Server*. *Nucleic Acids. Res.* **2003**, 31, 3408-3415. (<http://mfold.rna.albany.edu>)
- [27] T.M. Herne; M.J. Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8916-8920.
- [28] C.M. Pandey; R. Singh; G. Sumana; M.K. Pandey; B.D. Malhotra. *Sens. Actuat. B.* **2011**, 151, 333-340.
- [29] S. Campuzano; F. Kuralay; M.J. Lobo-Castañón; M. Bartošík; K. Vyavahare; E. Paleček; D.A. Haake; J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 3577-3583.
- [30] J. Ferré. *Técnicas de laboratorio.* **2003**, 287, 984-988.
- [31] *Diseño y Análisis de experimentos*. D. C. Montgomery. Universidad Estatal de Anzona. Ed. Limsa S.A. 2ª Edición, **2002**.

ANEXO I: Tablas.

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	7,2	2,05
Analito	14,3	0,85

(A)

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	17,1	12,06
Analito	8,1	3,22

(B)

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	18,7	7,37
Analito	11,8	2,76

(C)

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	11,0	2,02
Analito	15,0	0,37

(D)

Tabla 1.- Datos experimentales correspondientes a la figura 21 (A), (B), (C) y (D).

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	0,4	0,06
Analito	3,5	0,57

(A)

	Señal i (μA)	σ_{n-1}
Blanco	5	1,56
Analito	3,1	2,86

(B)

Tabla 2.- Datos experimentales correspondientes a la figura 23 (A) y (B).

Señal Blanco			Señal analito		
Factor A	B-	B+	Factor A	B-	B+
0,05	2,276	1,006	0,05	18,14	6,9
0,25	4,38	0,692	0,25	16,39	16,53

Tabla 3.- Datos experimentales correspondientes a la figura 25 (A) y (B).

Concentración/nM	Medida 1	Medida 2	Promedio	Promedio - blanco	Desviación
0	-9,63E-08	-2,10E-07	0,15	0,00	0,080
0,1	-1,15E-06	-8,36E-07	0,99	0,84	0,223
0,5	-3,19E-06	-	3,19	3,04	-
1	-5,27E-06	-6,47E-06	5,87	5,72	0,844
2,5	-8,03E-06	-	8,03	7,87	-
5	-1,14E-05	-1,17E-05	11,57	11,42	0,244
10	-	-1,20E-05	12,00	11,85	-

Tabla 4.- Datos experimentales correspondientes a la figura 27.

Concentración/nM	Medida 1	Medida 2	Promedio	Promedio - blanco	Desviación
0	-3,03E-07	-2,46E-07	0,27	0,00	0,040
0,1	-9,53E-07	-1,74E-06	1,34	1,07	0,554
0,25	-2,68E-06	-2,73E-06	2,70	2,43	0,03
0,5	-5,19E-06	-6,67E-06	5,93	5,65	1,051
1	-1,19E-05	-	11,94	11,67	-
1,5	-	-1,25E-05	12,55	12,27	-

Tabla 5.- Datos experimentales correspondientes a la figura 28.

**ANEXO II: Ecuaciones empleadas en el
diseño experimental 2².**

Efecto principal A	$A = \frac{(y_2+y_4) - (y_1+y_3)}{2n}$
Efecto principal B	$B = \frac{(y_3+y_4) - (y_1+y_2)}{2n}$
Efecto de la interacción AB	$AB = \frac{(y_4-y_3) - (y_2-y_1)}{2n}$

Figura 1.- Ecuaciones empleadas para obtener los valores numéricos de la tabla 16. **n:** Número de replicas del experimento.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANTI-F-HRP: Anticuerpo antiluoresceína marcado con con peroxidasa de rábado silvestre.

AP: Fosfatasa alcalina.

ARN: Ácido ribonucleico.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CFU: Unidad formadora de colonias.

DTT: Ditiotreitól.

ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica.

ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasora.

ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena clásica.

ECET: *Escherichia coli* enterotoxigénica.

ECTS: *Escherichia coli* productora de toxina *Shiga*.

ECVT: *Escherichia coli* verotoxigénica.

FITC-DP: Sonda de detección marcada con fluoresceína.

HDA: Amplificación dependiente de Helicasa.

HDT: 1,6-hexanoditiol.

HRP: Peroxidasa de rábano silvestre.

LNA: Ácido nucleico bloqueado.

MAC: Medio de agar MacConkey.

MCH: 6-mercapto-1-hexanol.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

p-AP: p-aminofenol.

p-APP: p-aminofenilfosfato.

PBS: Disolución salina de fosfato y NaCl, libre de ARNasas.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PNA: Ácido peptidonucleico.

SAM: Monocapas autoensambladas.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

SHCP: Sonda de captura tiolada.

SSPE: Disolución salina de fosfato, NaCl y EDTA, libre de DNasas y RNasas.

SUH: Síndrome urémico hemolítico.

TMB: Tetrametilbenzidina.