

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**Desarrollo de un genoensayo
electroquímico para la detección de
*Salmonella***

Ana Puerta Suárez

Julio 2012, Oviedo

NOEMÍ DE LOS SANTOS ÁLVAREZ, Investigadora Contratada “Ramón y Cajal” del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado “**Desarrollo de un genoensayo electroquímico para la detección de Salmonella**” ha sido realizado en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo por la diplomada **Ana Puerta Suárez** bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 18 Julio de 2012

Fdo. Noemí de los Santos Álvarez

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Salmonella. Un problema de salud pública	2
1.2. Métodos analíticos de detección.	5
1.2.1. Métodos de diagnóstico convencionales	5
1.2.2. Métodos de diagnóstico rápidos	6
1.3. Fundamentos de los genoensayos electroquímicos	11
1.3.1. Soportes	11
1.3.2. Formatos de ensayo	14
1.4. Fundamento de la Cronoamperometría	18
2. Objetivos	20
3. Materiales, Instrumentos y Protocolos	22
3.1. Reactivos	23
3.2. Instrumentación	24
3.3. Procedimientos generales	26
3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos serigrafados	26
3.3.2. Protocolo de formación de la fase sensora	26
3.3.3. Protocolo de hibridación	27
3.3.4. Protocolo de marcaje enzimático	28
3.3.5. Protocolo de detección	28
4. Resultados y discusión	30
4.1. Selección de la secuencia analito	31
4.2. Selección de las sondas de captura e indicadora	34
4.3. Optimización de las condiciones experimentales	37
4.3.1. Efecto de la temperatura previa a la hibridación homogénea sobre la marcasobre la marca (fluoresceína)	37
4.3.2. Tiempo de hibridación	39
4.3.3. Tiempo de marcaje enzimático	39
4.4. Características analíticas del genoensayo	41
4.5. Selectividad	42
5. Conclusiones	43
6. Referencias	45
Anexo I: Tablas de datos	51

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Salmonella*. Un problema de salud pública

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, fue denominado así en honor a su descubridor, el científico americano Dr. Daniel Elmer Salmon (1850-1914), un veterinario estadounidense, y Theobald Smith en el año 1885 a partir de una cepa aislada de cerdo con peste porcina clásica. Morfológica y bioquímicamente, es un grupo homogéneo de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, móviles, no formadores de esporas y con flagelos peritricos. Se multiplica a temperaturas que van desde los 7°C a los 45°C y puede sobrevivir durante meses en substratos orgánicos [1].



Figura 1. Bacteria *Salmonella* - (Shutterstock-Michael Taylor)

Pese a los avances tecnológicos, las enfermedades transmitidas por alimentos siguen siendo un serio problema de salud pública a nivel mundial. La importancia de la *Salmonella* radica en que es la primera causa de toxiinfecciones de origen alimentario en países desarrollados. En las últimas décadas se ha informado del aumento en el número de brotes y casos esporádicos, representando en España aproximadamente 2.3 casos por cada 100.000 habitantes [2].

La ubicuidad de las salmonelas en el medio natural y en varios sectores de la industria agro-alimentaria subraya la importancia de estos patógenos en la cadena alimentaria y su papel como agentes causantes de enfermedad humana, reflejado en el incremento del registro de brotes alimentarios por *Salmonella*, cada vez mayor, frente a otras bacterias patógenas.

La mayoría de los casos de salmonelosis son causados por la ingestión de alimento de origen animal contaminado, también en algunas verduras, tomates, etc. Entre los alimentos involucrados en el aumento de la incidencia de *Salmonella*, tanto en brotes como en casos esporádicos, se encuentran la leche, los huevos y las carnes [3].

Las clasificaciones utilizadas por los bacteriólogos son diversas y obedecen a una serie de propiedades bioquímicas, antigénicas, etc., comunes a determinadas cepas.

El género *Salmonella* agrupa a más de 2200 serotipos diferentes. B.J. Tindall *et al* [4] proponen que el género *Salmonella* esté formado por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella Bongori* y seis subespecies.

A. *Salmonella enterica*

- *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (subespecie I)
- *Salmonella enterica* subespecie *salamae* (subespecie II)
- *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* (subespecie III)
- *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* (subespecie IV)
- *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* (subespecie V)
- *Salmonella enterica* subespecie *indica* (subespecie VI)

B. *Salmonella bongori*

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* tienen tres clases de antígenos, somáticos “O”, flagelares “H” y el antígeno capsular “Vi”, que dan lugar a los distintos serovares o serotipos. Recientemente, en 2004, Shelobolina *et al.*[5], han propuesto el nombre de *Salmonella subterranea* para una nueva cepa aislada en la superficie de un sedimento contaminado. El nombre fue validado en 2005.

La subespecie I representa al 99,5% de todos los aislados patógenos de *Salmonella* y en ella se incluyen los serovares typhi (responsable de la fiebre tifoidea), enteritidis y typhimurium (gastroenteritis) y paratyphi (fiebre paratifoidea en humanos).

La mayor parte de los serotipos pueden causar gastroenteritis en el hombre, aunque *Salmonella enteritidis* es el principal responsable de los casos en España, seguido de *Salmonella typhimurium*. La bacteria penetra en el huésped por vía digestiva, generalmente a través de los alimentos contaminados. Se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado, invadiéndolas y atravesando la mucosa. Una vez en la submucosa se multiplica, provocando un cuadro diarreico [6].

En el hombre, *Salmonella typhi* es capaz de diseminarse sistémicamente, multiplicándose en ganglios linfáticos, bazo e hígado, y causando un cuadro febril conocido como fiebre tifoidea, a diferencia de la mayoría del resto de serotipos conocidos como no tifoideos.

Es ampliamente conocido que los productos elaborados con huevo son los principales alimentos implicados en los brotes de salmonelosis, y sobre estos recaen medidas de control de diversa índole, tanto a nivel nacional como en el resto de los países europeos o en los Estados Unidos. Así por ejemplo, en España, el Real Decreto 1254/1991 establece las normas para la preparación y conservación de la mahonesa y otros alimentos de consumo inmediato en restauración en los que el huevo es un ingrediente.

La vigilancia epidemiológica nos permite conocer el comportamiento de la *Salmonella* y poder establecer oportunas medidas preventivas, ya que la salmonelosis

es la toxiinfección alimentaria transmitida a través de productos y subproductos de origen animal más importante en los países desarrollados. Éstas se producen tras ingerir alimentos contaminados por microorganismos que, al desarrollarse en el interior del consumidor, segregan distintas toxinas. [7]

Los brotes pueden ser causados por diversos serotipos relacionados con el consumo de diferentes alimentos, tales como huevos, leche no pasteurizada, frutas y vegetales [4]. A las causas de incremento de la salmonelosis en los últimos años podríamos además añadir la contaminación cruzada y la posible contaminación de productos cárnicos elaborados. Todos estos factores representan un problema continuo requiriendo atención cada eslabón de la cadena.

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, resulta necesario un inóculo grande (10^6 - 10^8 bacterias) para el desarrollo de enfermedad sintomática tras un período de incubación de 6 a 72 horas. La enfermedad se produce cuando el microorganismo tiene las condiciones favorables para multiplicarse (alimento, temperatura, humedad, etc.) hasta alcanzar una concentración alta, aumentando de esta forma la posibilidad de que se produzca la infección. Por ejemplo, alimentos mal refrigerados, ya que las temperaturas mínimas de crecimiento en los alimentos varían de 6-10 °C, dependiendo del alimento.

La susceptibilidad es general pero niños, ancianos, enfermos y/o personas inmunodeprimidas son los que presentan las manifestaciones clínicas más graves. A ello hay que añadir la existencia de portadores asintomáticos. Es el caso de Mary Mallon, también conocida como María Tifoidea. Fue la primera persona en ser identificada como una portadora sana de fiebres tifoideas en los EEUU. Entre 1900 y 1907 trabajó como cocinera en Nueva York y durante este periodo infectó a 22 personas. Pasó por diferentes familias que enfermaban al poco tiempo de su llegada, esto la obligó a ir de familia en familia, lo que contribuyó a que la enfermedad se extendiera aún más. La protagonista rehusaba dejar de trabajar como cocinera. Las autoridades de salud pública la obligaron a entrar en cuarentena en dos ocasiones. Aunque se negó a proporcionar muestras analizables, las autoridades consiguieron demostrar que era portadora y tras una cuarentena de tres años, fue liberada a condición de que no trabajase con comida. Mary Mallon cambió su nombre por el de Mary Brown y volvió a trabajar como cocinera, tras lo cual se produjeron otros 25 infectados y 2 muertos. Tras ser localizada de nuevo, le fue impuesta una cuarentena de por vida [8].

Pueden darse formas asintomáticas, la mayoría de las cuales ocurren en adultos sin que aparezca ningún tipo de síntomas o sólo presenten cefalea y ocasionales deposiciones sueltas. Estos casos no son diagnosticados, salvo que se busquen en el transcurso de la investigación epidemiológica de un brote colectivo, pero dada la sintomatología leve y la evolución autolimitada, la gran mayoría de los pacientes no reciben atención médica y, otra parte importante, fuera de brotes, son diagnosticados como gastroenteritis vírica.

1.2. Métodos analíticos de detección

La aparición cada vez más frecuente de brotes de contaminaciones bacterianas en alimentos, algunas mortales, ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas de diagnóstico, cada vez más rápidas, sensibles, específicas, de bajo coste y facilidad de uso [9].

1.2.1. Métodos de diagnóstico convencionales

Las técnicas microbiológicas clásicas basadas en el cultivo bacteriano para la detección de *Salmonella* requieren 3 a 4 días para la obtención de un resultado y 1 ó 2 días más para la confirmación bioquímica. Requieren las siguientes etapas [1]:

- Toma de muestra
- Preenriquecimiento
- Enriquecimiento selectivo
- Cultivo selectivo en placas
- Pruebas bioquímicas
- Investigación serológica

La recuperación de *Salmonella* de los alimentos es difícil, ya que se requiere detectar muy pocos organismos en una gran cantidad de producto. De ahí la importancia de una buena **toma de muestra** [10].

El **preenriquecimiento** es la etapa inicial durante la cual la muestra se cultiva en un medio no selectivo para restablecer las células dañadas a condiciones fisiológicas estables. Los medios más utilizados son agua de peptona tamponada o caldo de lactosa. Esta etapa se realiza usualmente durante 16 a 20 horas a 37°C.

En el **enriquecimiento en un medio selectivo** la muestra se cultiva adicionalmente en un medio promotor del crecimiento que contiene agentes inhibidores selectivos. Se trata de una fase crítica porque suprime la microflora competitiva y permite la proliferación de *Salmonella* a niveles que puedan ser detectados después en un medio sólido. Los caldos de enriquecimiento más utilizados son el caldo de Rappaport-Vassiliadis (RV) y el caldo de selenito [11].

Durante el **cultivo selectivo en placas** se han desarrollado varios medios de agar para el aislamiento de *Salmonella* basados en la adición de sustancias que permitan distinguir visualmente las colonias de *Salmonella* de las de otras bacterias.

Las presuntas colonias de *Salmonella* finalmente se confirman y se clasifican en especies mediante **métodos bioquímicos**.

Para la clasificación en serotipos se utilizan **métodos serológicos**. Estos métodos sí dan una identificación específica de las colonias y se basan en el análisis de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Usualmente se realizan por métodos de aglutinación.

1.2.2. Métodos de diagnóstico rápidos

La necesidad de análisis de diferentes componentes a tiempo real en áreas cada vez más diversas ha promovido en estos últimos años que los esfuerzos realizados en el desarrollo de instrumentación analítica se dirijan hacia la construcción de dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor. Como resultado de esta demanda de información relacionada con el análisis de forma rápida, fiable y descentralizada se ha favorecido el desarrollo de sensores químicos y biosensores como alternativa de análisis a la instrumentación analítica convencional.

A pesar de los ingentes avances, los métodos denominados rápidos de detección de *Salmonella* y otros patógenos, todavía se apoyan en métodos de cultivo. Por tanto, resultados negativos, se consideran definitivos, pero los resultados positivos deben ser confirmados por métodos convencionales y serológicos [1].

- **Métodos inmunoquímicos**

En las últimas décadas, la detección inmunológica de bacterias ha empezado a ser cada vez más sensible, específica y reproducible. Los avances en la producción de anticuerpos específicos, de forma cada vez más rápida y económica, han sido decisivos para el desarrollo de **inmunoensayos** comercialmente disponibles tales como:

- Ensayos de aglutinación en látex: Oxoid Salmonella Latex Test; MicroScreen®, Spectate®, Bactigen®
- ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Assurance®, Salmonella Tek.
- Inmunodifusión: Salmonella 1-2 Test™
- Inmunoseparación-que elimina la etapa de enriquecimiento selectivo-: Tecra®Unique™ Salmonella, Path-Stick.

La especificidad de estos métodos inmunoquímicos depende de la eliminación de la reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados en los kits diagnósticos.

Comúnmente, el ELISA sigue un formato de ensayo tipo sándwich empleando anticuerpos de captura y de detección (ya sean anticuerpos policlonales o monoclonales, Mab). En primer lugar, el antígeno de la muestra problema se captura mediante un anticuerpo policlonal o MAb específico unido a un soporte en fase sólida y su presencia se detecta utilizando un segundo anticuerpo policlonal o MAb, que puede estar marcado con radioisótopos o más generalmente, con enzimas. En definitiva, se trata de un método de detección basado en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo.

Croci *et al.* [12] describen la aplicación de un inmunosensor con formato sándwich para detectar *Salmonella* en carne de cerdo, pollo y vacuno. La actividad de la enzima HRP se midió electroquímicamente utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato. Los resultados muestran que el método es sensible y rápido, fue posible detectar *Salmonella* en bajas concentraciones (1-10 células/25 g).

- **Métodos basados en ADN**

Estos métodos tienen ventajas distintivas sobre los métodos de cultivo e inmunológicos, tal como una mayor especificidad, rapidez y sensibilidad. Además son capaces de detectar varios patógenos simultáneamente en un único ensayo.

El desarrollo de técnicas de amplificación *in vitro* del ADN, como la PCR, ha contribuido de manera decisiva a aumentar la sensibilidad y selectividad de los ensayos basados en ácidos nucleicos [9].

a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1983, Kary Mullis (Premio Nobel de Química, 1993) ideó una metodología para duplicar hebras de ADN de manera artificial, que ha cambiado el curso de la biología molecular [13-15].

La PCR se basa en la repetición de ciclos de síntesis de ADN dirigida por oligonucleótidos para realizar la replicación *in vitro* de secuencias diana de ácidos nucleicos (Figura 2).

Es una técnica de síntesis enzimática *in vitro* de secuencias definidas de ADN por la extensión simultánea de cebadores complementarios a las hebras de ADN de la muestra. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (cebadores), que se hibridan a las cadenas complementarias de ADN de manera que flanquean la secuencia de ADN que se desea amplificar. La elongación de los cebadores es catalizada por la enzima Taq polimerasa, cuya principal peculiaridad es ser estable al calor. La ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de ADN en la dirección 5'→3' usando una hebra simple de molde.

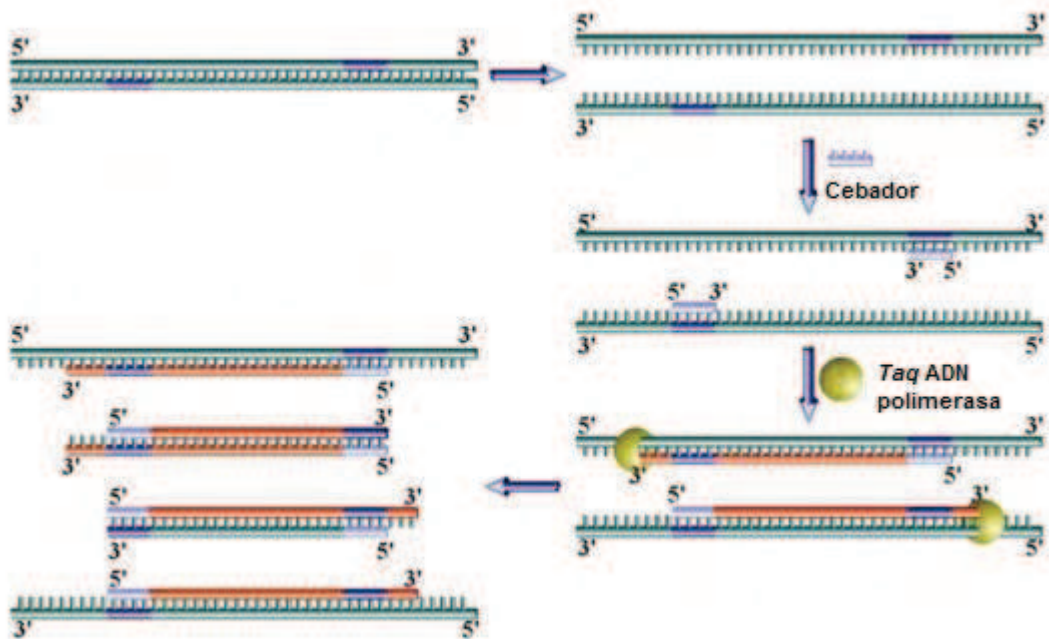


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa (Cultex S.L.U.)

La PCR emplea dos cebadores, uno complementario a cada una de las hebras de ADN, que han sido separadas de su estructura de doble hélice por calor.

La PCR es, entonces, una metodología analítica que se realiza por repetición de un ciclo que involucra tres etapas de menos de 1 minuto cada una:

- ❖ Etapa de desnaturalización: En ella, el ADN diana se incuba a elevada temperatura (90-95°C) de tal manera que las hebras se separan quedando accesibles a la hibridación de los cebadores.
- ❖ Etapa de Hibridación: la mezcla de reacción se enfría (40-60°C) para permitir que los cebadores hibriden con la secuencia complementaria.
- ❖ Etapa de extensión: consiste en un calentamiento a 72°C en el que los cebadores se extienden mediante una ADN polimerasa, utilizando el ADN diana como molde, realizándose entre 20-40 ciclos en cada reacción.
- ❖ Elongación final entre 70-74°C durante 5-15 minutos.

Las etapas de cada ciclo se consiguen simplemente variando la temperatura de la mezcla de reacción. Debido a que el producto generado por extensión de los cebadores sintetizado durante un ciclo determinado puede servir como ADN analito en el próximo ciclo, el número de copias de la secuencia de interés aproximadamente se dobla durante cada ciclo. Por lo tanto, 20 ciclos de PCR rinden más de 1 millón de copias (2^{20}) del ADN analito.

El análisis por PCR puede ser de dos tipos: cualitativo (detección de la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado) o cuantitativo (detección de la cantidad de un fragmento de ADN determinado).

➔ **Análisis cualitativo de ADN mediante PCR convencional**

Este tipo de análisis se suele realizar cuando tan sólo es necesario conocer la presencia o ausencia de alguna secuencia específica de ADN o ARN, como por ejemplo la detección de la presencia de un patógeno en una muestra. El análisis del producto amplificado suele realizarse mediante electroforesis en gel y su visualización por tinción en bromuro de etidio o por detección fluorescente si previamente hemos utilizado uno de los cebadores marcado con algún tipo de fluoróforo. En algunos análisis resulta necesario identificar la secuencia del producto amplificado y el producto de la PCR debe ser sometido a un análisis específico (secuenciación, digestión con enzimas de restricción, etc.) [16].

➔ **Análisis cuantitativo de ADN mediante PCR (RT-PCR)**

Actualmente los métodos clásicos de la PCR para el diagnóstico de patógenos se complementan y en algunos casos se reemplazan por ensayos de PCR en tiempo real, que permite no sólo la identificación sino también la cuantificación del organismo. Con esta técnica se pueden obtener resultados 24-48 horas después de la llegada de la muestra. Esto la convierte en un método particularmente útil para el control de focos potenciales de contaminación ya que, en un período de tiempo en el que los resultados de un cultivo aún no estarían disponibles, es posible iniciar las acciones correctoras oportunas.

La PCR en tiempo real controla la acumulación del producto de la PCR durante la reacción de amplificación, así permite la identificación de los ciclos durante los cuales se produce la generación del producto de la PCR casi exponencialmente. El ensayo puede utilizarse para cuantificar de forma segura el contenido de ADN o ARN en una muestra dada. En contraste con la PCR convencional, la PCR en tiempo real es más rápida, tiene un formato en tubo cerrado, por lo que decrece el riesgo de contaminación cruzada, es altamente sensible y específica, por lo que retiene la eficacia cualitativa y proporciona información cuantitativa. En muchos casos, los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser más sensibles que los métodos de referencia existentes. El desarrollo reciente de ensayos y máquinas portátiles de PCR en tiempo real aumenta las perspectivas de estas técnicas para ser utilizadas en el diagnóstico rápido (menos de 2 horas) de brotes de enfermedad en el campo.

En cuanto a la instrumentación, la PCR en tiempo real es una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección fluorescente (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y quenchers. Ambos factores, nos va a permitir monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación [17,18].

Un ejemplo de RT-PCR es descrito por Malorny *et al.* [19]. El ensayo identificó correctamente todas las 110 cepas de Salmonella probadas y otras 87 cepas de otros patógenos dieron resultados negativos.

b) Ensayos de hibridación

En estas técnicas, la secuencia de interés o analito es reconocida por una sonda de ADN cuya secuencia es complementaria y ambas forman la estructura de doble hélice o dúplex. Esta reacción de hibridación ocurre con gran afinidad y especificidad, al igual que ocurre *in vivo*.

Como resultado de la demanda creciente de información relacionada con el análisis de forma rápida, fiable y descentralizada, se ha favorecido el desarrollo de sensores químicos y biosensores como alternativa de análisis a la instrumentación analítica convencional.

Con la aparición de los biosensores a principios de los años 60, se generó una nueva dimensión en los sensores químicos en cuanto al reconocimiento molecular de un analito: el biorreconocimiento [20]. Esto implica una selectividad similar a lo que ocurre *in vivo*, que es la máxima que se puede obtener.

Se define como biosensor al dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico de reconocimiento selectivo denominado biorreceptor, en íntimo contacto con un transductor capaz de detectar el evento de reconocimiento molecular entre el analito y la biomolécula y transformarlo en una señal analítica, usualmente eléctrica.

Las etapas básicas de funcionamiento de un biosensor son las siguientes (Figura 3):

1. Interacción específica del analito de la muestra con el material biológico inmovilizado sobre el transductor de manera directa o sobre un soporte en contacto íntimo.
2. Detección, por parte del transductor, de la variación de alguna propiedad física o química del sistema, provocada por la reacción de reconocimiento selectivo.
3. Procesamiento de la señal y obtención de resultados.

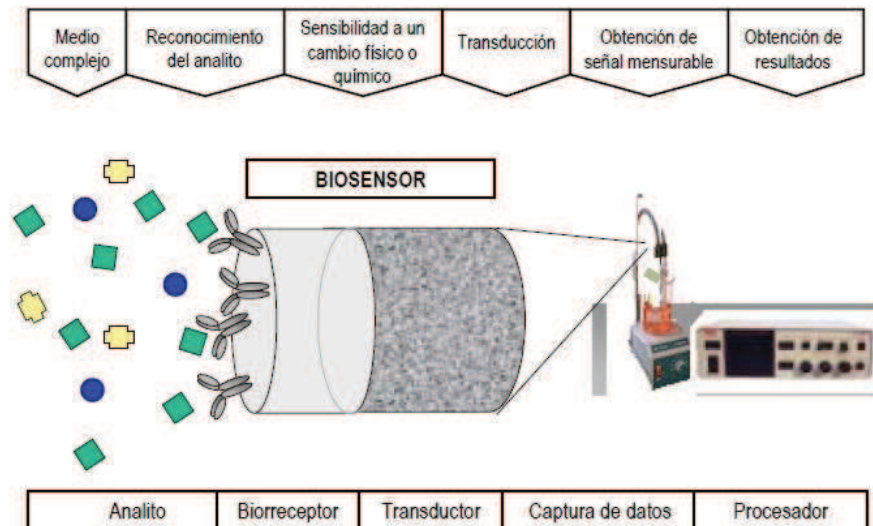


Figura 3. Principio de funcionamiento de un biosensor.

Los **genosensores** constituyen un subgrupo dentro de los biosensores, en los cuales el elemento de reconocimiento molecular es el ADN (sonda de ADN). Cuando la sonda no está directamente inmovilizada sobre el elemento de transducción se habla de **genoensayo**. En estos casos, dicha sonda puede estar en disolución o bien inmovilizada sobre un soporte que no constituya el elemento de transducción, por ejemplo partículas magnéticas, como es el caso del presente trabajo.

La detección de los eventos de hibridación puede ser: electroquímica (amperométrica, voltamétrica, potenciométrica, impedimétrica y conductimétrica), óptica (dispositivos basados en fibras ópticas, resonancia de plasmón superficial), térmica o piezoeléctrica (dispositivos de onda acústica, microbalanzas) [21].

Los transductores electroquímicos presentan numerosas ventajas respecto a otros sistemas de transducción: son económicos, de fácil miniaturización y automatización y ofrecen una respuesta rápida, además de una alta sensibilidad.

Los ensayos de hibridación generalmente no tienen sensibilidad suficiente, ya que las metodologías de análisis de bacterias patógenas en alimentos deben ser capaces de llegar a detectar concentraciones del orden de 1 CFU por 25 g de alimento o inferiores, lo que hace necesario la incorporación de una etapa previa de enriquecimiento por cultivo o PCR convencional.

En las secciones siguientes, nos centraremos de forma exclusiva en los genoensayos con sistema de detección electroquímica por ser la metodología que se ha adoptado en el presente trabajo.

1.3. Fundamentos de los genoensayos electroquímicos

Los genoensayos se caracterizan por su rapidez en la obtención de resultados y por la simplificación del procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas respecto a las metodologías clásicas.

Con este tipo de dispositivos, las posibilidades de miniaturización de la instrumentación asociada, es otro aspecto importante.

Las características deseables de un genoensayo son las siguientes:

- Precisión y exactitud
- Elevada especificidad; insensibilidad frente a interferencias de la matriz de la muestra
- Amplio intervalo dinámico de trabajo
- Tiempo de respuesta breve y rapidez en las medidas
- Bajo coste de producción y realización

1.3.1. Soportes

En los genoensayos, únicamente la etapa de detección se realiza sobre el transductor, ya que la sonda de captura está inmovilizada sobre un soporte que no constituye el elemento de transducción, como pueden ser membranas, geles o partículas magnéticas.

Por su relación con el presente trabajo, a continuación se van a explicar dos tipos de soportes concretos:

Partículas magnéticas

Las micropartículas y nanopartículas magnéticas, constituidas por un núcleo de ferrita de propiedades paramagnéticas y recubiertas por un polímero inerte, representan una de las estrategias más prometedoras en bioanálisis y bioseparación [22-24]. Pueden ser modificadas con diferentes grupos orgánicos para acoplarse covalentemente a biomoléculas (enzimas, ADN o anticuerpos), o ser modificadas directamente con biomoléculas como estreptavidina, proteína A o poli (dT) [25,26]. Las partículas magnéticas están disponibles comercialmente con una variedad de grupos funcionales y de tamaños (Figuras 4 y 5).

Las moléculas que se quieren analizar pueden unirse a las partículas magnéticas mediante una reacción de reconocimiento específica y separarse de la matriz biológica mediante la aplicación de un campo magnético, y así el analito presente en la muestra alimentaria se preconcentra en la superficie de las esferas. Son, por tanto, superparamagnéticas, lo cual implica que adquieren propiedades

magnéticas cuando se encuentran bajo la acción de un campo magnético fuerte, pero no presentan magnetismo residual una vez que se elimina la acción de ese campo.

Las reacciones de afinidad (de inmovilización, de reacción inmunológica y de hibridación) se llevan a cabo en las partículas magnéticas, consiguiéndose que las bioreacciones, así como las etapas de lavado sean más efectivas, se evitan de este modo procesos de filtración o centrifugación para separar las especies enlazadas de las no enlazadas [27].

Su diámetro está normalmente comprendido entre 0.5 y 10 μm , son por tanto micropartículas [28].

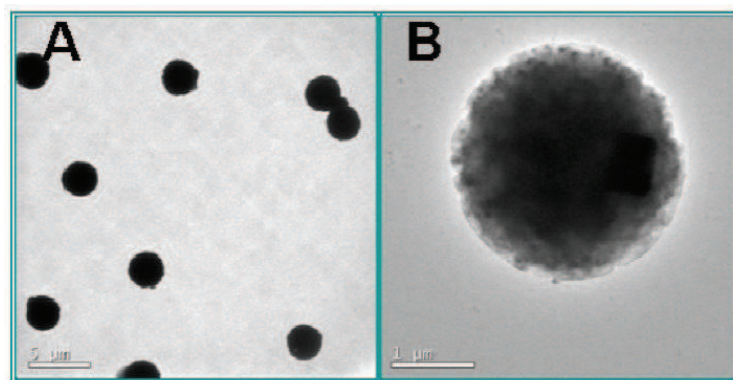


Figura 4. TEM imágenes de partículas magnéticas de 2.8 μm de diámetro, A) 600X y B) 4000X de aumento*

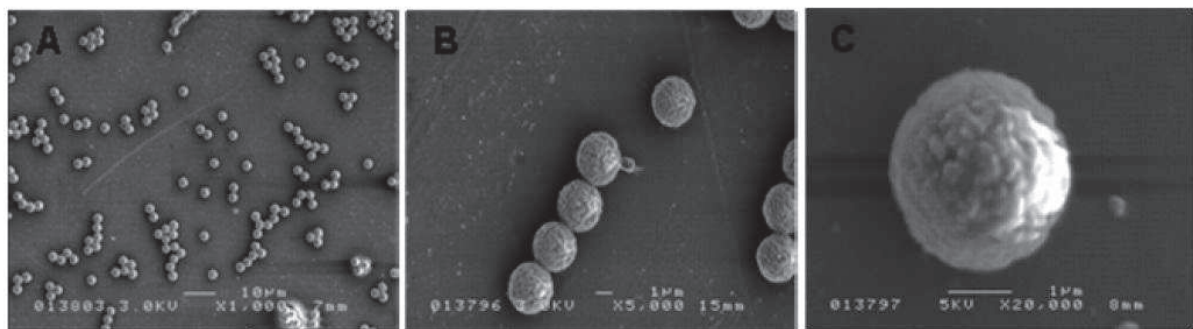


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (2.8 μm) a A) 1000X, B) 5000X, C) 20000X de aumento.

Electrodos serigrafiados

La aplicación de la nanotecnología a los biosensores de ADN ha permitido aumentar mucho su eficacia y se les están encontrando aplicaciones en ámbitos tan variados como el control de contaminación de las aguas o los alimentos, el diagnóstico médico detectando patógenos o enfermedades genéticas, el fraude alimentario, o la medicina forense. La incorporación de técnicas procedentes de la industria microelectrónica en la fabricación de electrodos ha permitido desarrollar dispositivos sensores miniaturizados [29].

Últimamente, el uso de los materiales en la nanoescala para el desarrollo de biosensores electroquímicos ha mostrado un incremento exponencial. El gran interés por los nanomateriales se centra en la posibilidad de adaptar sus dimensiones y estructura a las especies que se detectan. Entre los diferentes formatos posibles, destacan los electrodos serigrafiados (Figura 6).

Así, mediante la deposición secuencial de varias capas de pastas o tintas especiales sobre un soporte aislante es posible reproducir una celda electroquímica convencional a pequeña escala y en formato plano.

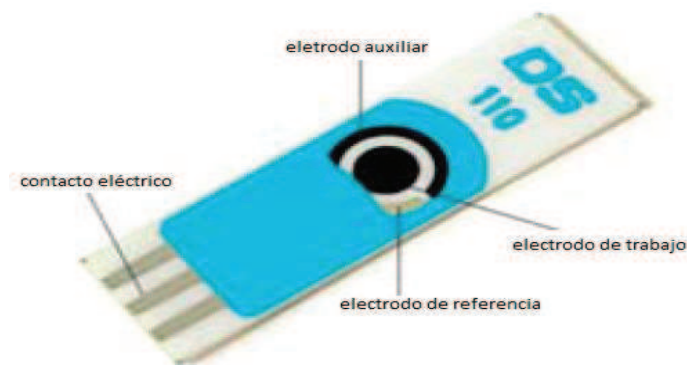


Figura 6. Esquema de un electrodo serigrafiado. (www.dropsens.com)

El electrodo de trabajo y el auxiliar son de carbono mientras que el electrodo de referencia es de plata, al igual que los contactos eléctricos. El electrodo de trabajo es circular y presenta un diámetro de 4 mm. Son óptimos para trabajar con volúmenes de 50 µl.

En este trabajo, el electrodo se empleará únicamente en la etapa final de detección, como elemento de transducción.

1.3.2. Formatos de ensayo.

La señal electroquímica empleada para la cuantificación de las secuencias específicas del patógeno se puede generar de maneras muy diversas.

En principio, la reacción de hibridación entre dos hebras de ADN no es fácil de medir electroquímicamente. Aunque el ADN es electroactivo sobre electrodos sólidos debido principalmente a la oxidación de guanina y adenina, estos procesos ocurren a potenciales elevados y no son específicos, ya que cualquier secuencia presente, hibridada o no, origina este tipo de señales.

Tras la hibridación, la electroactividad del ADN disminuye debido a que las bases electroactivas quedan ocultas dentro de la doble hélice [30]. Aunque es posible usar la oxidación directa de las bases, su actividad catalítica hacia el NADH [31], o la electrocatálisis de las bases por complejos metálicos [32], es preferible emplear otras estrategias.

A continuación, se describen brevemente las distintas estrategias de transducción como criterio de clasificación de los formatos de ensayo, estableciendo dos categorías distintas: ensayos que no utilizan marcadores y ensayos basados en el empleo de sondas marcadas.

Metodologías sin marcadores

El marcaje de sondas de ADN puede llegar a ser un problema para el desarrollo de biosensores reduciendo significativamente su tiempo de vida. Los métodos de detección del ADN en los que no se usan marcas son los conocidos como métodos directos (Figura 7). En ellos, se detecta la interacción entre la sonda de captura y la sonda diana, que son complementarias, y ninguna de ellas está marcada.

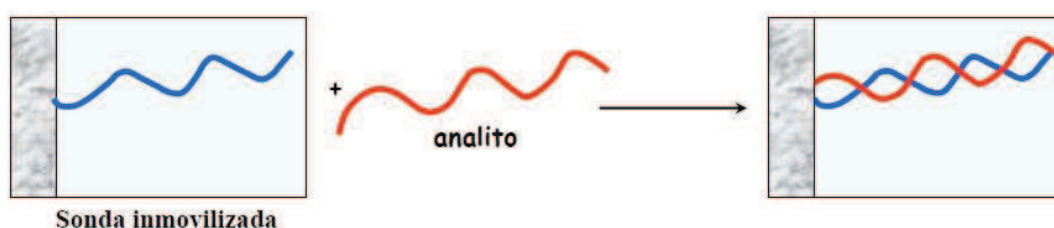


Figura 7. Esquema de un ensayo directo de hibridación.

Una de las técnicas electroquímicas más empleadas en este tipo de ensayo es la espectroscopía de impedancia electroquímica, que tiene el potencial inherente para detectar secuencias de ADN evitando el empleo de marcas. Esta técnica es particularmente adecuada para estudiar reacciones de unión en superficie como la hibridación entre hebras de ADN ya que es muy sensible a cambios en la interfase electrodo-disolución. Así, cuando en presencia del analito se forma el correspondiente dúplex con la secuencia diana, se altera esa interfase provocando un cambio en la resistencia a la transferencia electrónica (R_{et}) desde una molécula electroactiva, típicamente una mezcla equimolar de ferricianuro y ferrocianuro, presente en la disolución a la superficie electródica [33].

Otros métodos emplean moléculas electroactivas en disolución que se unen de forma preferente a la doble hélice (indicadores de hibridación). Un ejemplo reciente de indicador de la hibridación es el complejo “RuL”. Este complejo tiene una doble función. Por un lado, la estructura planar de los grupos aromáticos del ligando 3-(2-fenantren-9-il-vinil) piridina (L) confiere un carácter intercalativo al complejo y le permite unirse a ácidos nucleicos de doble cadena de una manera muy específica. Por otro lado, el centro redox del metal (Ru) sirve de indicador electroquímico para detectar el evento de hibridación. Un ejemplo de la utilización de este complejo en la detección selectiva de *Salmonella* en presencia de otros patógenos [29].

Metodologías basadas en el empleo de marcadores

En estos ensayos, la presencia de las secuencias específicas del patógeno se evidencia mediante otra secuencia complementaria marcada que genera la señal analítica, luego de la reacción de hibridación (reconocimiento específico) entre ambas.

Dentro de la metodología con marcas existen varios formatos de ensayo. En el presente trabajo se utiliza un formato tipo sándwich en el que la sonda de captura se diseña de manera que sólo sea complementaria a una parte de la secuencia diana. El analito reacciona con esta sonda de captura y con una sonda indicadora, que lleva unida la marca, generando el correspondiente dúplex ternario, como se muestra en la Figura 8. Dado que hay dos reacciones de reconocimiento, los ensayos tipo sándwich aumentan la selectividad de la detección.

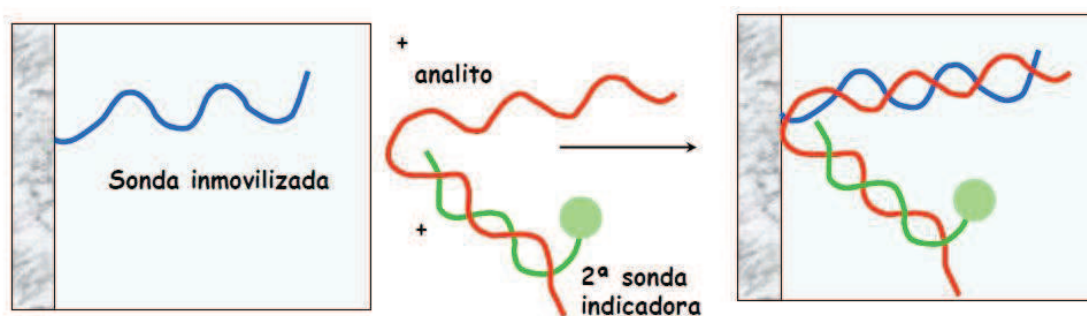


Figura 8. Esquema de un ensayo de hibridación tipo sándwich.

Esta metodología implica que el marcador se une directamente de manera covalente a la sonda: marcadores electroactivos, enzimas o, más recientemente, nanopartículas metálicas o semiconductoras.

Existen distintos compuestos electroactivos que pueden unirse covalentemente al ADN y así ser detectados por oxidación-reducción aplicando un potencial al electrodo. Dado que estos marcadores electroactivos poseen mejores propiedades de oxido-reducción que el ADN, su utilización permite obtener una relación señal/ruido superior y una mejor sensibilidad.

Las sondas de captura de ADN que además están marcadas con una molécula electroactiva son el análogo electroquímico de los denominados faros moleculares. El grupo de Plaxco fue pionero en su desarrollo empleando **azul de metileno** (MB) como marca. Es un colorante orgánico que ha sido ampliamente estudiado en este campo. Plaxco *et al.* [35] describe un ejemplo para la detección de *Salmonella typhimurium* utilizando una sonda con estructura mango-bucle inmovilizada sobre la superficie del electrodo (Figura 9). La hibridación con la secuencia diana complementaria provoca la apertura de la horquilla acompañada de una disminución de la señal redox al producirse un aumento de la distancia entre la marca y la superficie electroquímica. Dado que en la etapa de detección se registra un decrecimiento de la señal, el sensor resultante se conoce como *signal-off*.



Figura 9. Esquema de un ensayo de hibridación *signal-off*.

En los métodos que emplean enzimas como marcas, estas pueden estar unidas a la cadena de ADN directamente (enlace covalente), indirectamente a través de enlaces de afinidad biotina-estreptavidina o enlaces fluoresceína-anticuerpo antifluoresceína. Además de su selectividad intrínseca, la principal ventaja que presenta el uso de enzimas como marca es que consigue amplificar en gran medida la señal, lo que hace que estas marcas ofrezcan una gran sensibilidad.

Actualmente es posible disponer comercialmente de oligonucleótidos marcados con las marcas más habituales de una forma simple y a un precio razonable (Tabla 1) [34].

Tabla 1. Marcas en sistemas de hibridación y detección de ADN.

Sonda de ADN funcionalizada con	Receptor específico	marcado con
biotina	avidina o estreptavidina	fosfatasa alcalina β-galactosidasa ferrotina fluoresceína peroxidasa
digoxigenina	Anticuerpo antidigoxigenina	fosfatasa alcalina peroxidasa
glucosil	concavalina A	fosfatasa ácida glucosa oxidasa
IgG	Anticuerpo IgG	peroxidasa
proteína A	IgG	peroxidasa
proteína G	IgG	peroxidasa

Con estos marcadores, la señal analítica generalmente se obtiene midiendo la corriente de oxidación o reducción del producto de reacción enzimática [36], aunque es posible utilizar otras reacciones acopladas [37]. Las enzimas más ampliamente usadas como marcadores han sido las peroxidasa, más en concreto la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) dado su alto número de intercambio.

En este trabajo, la marca enzimática utilizada es HRP y el sustrato de la enzima es tetrametilbencidina (TMB). El sustrato sufre un proceso de oxidación en medio de peróxidos como se puede observar en la Figura 10. El producto electroactivo, $TMB_{(Ox)}$, se determina por métodos electroquímicos.

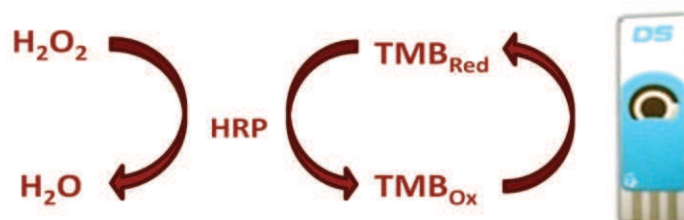


Figura 10. Reacción de oxidación enzimática de TMB y posterior detección electroquímica.

También es frecuente el empleo de la fosfatasa alcalina (ALP) [36,38].

1.4. Fundamento de la cronoamperometría

Para las medidas cronoamperométricas se emplearon electrodos serigrafiados de tinta de carbono que reproducen una celda electroquímica convencional de 3 electrodos en formato plano y a pequeña escala. Como su nombre indica, en esta técnica se registra la corriente que se genera en el electrodo de trabajo en función del tiempo a un potencial constante, al cual la especie electroactiva esté completamente oxidada o reducida.

Desde el punto de vista práctico, esta técnica implica la aplicación de un potencial inicial E_1 (Figura 11), en el que no ocurre ninguna reacción de tipo faradaico. Una vez se alcanza el equilibrio, se produce un pulso de potencial hasta un potencial final, E_2 , el cual provoca que se lleve a cabo la oxidación o reducción del compuesto electroactivo.

En este trabajo, la oxidación se lleva a cabo enzimáticamente y lo que se mide es la intensidad de corriente de reducción del producto oxidado previamente por la enzima. El experimento consiste en mantener el potencial constante durante un tiempo determinado, durante el cual se registra la intensidad de corriente en función del tiempo, dando lugar a una curva $I-t$ (Figura 12). La corriente es proporcional al gradiente de concentración en la superficie del electrodo [39].

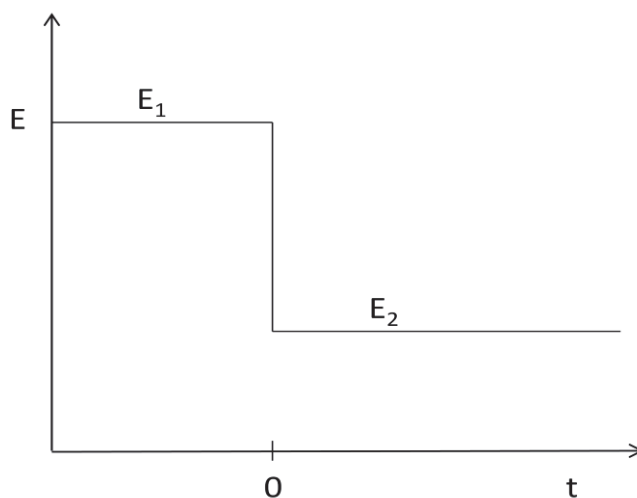


Figura 11. Señal de excitación utilizada en un experimento cronoamperométrico básico.

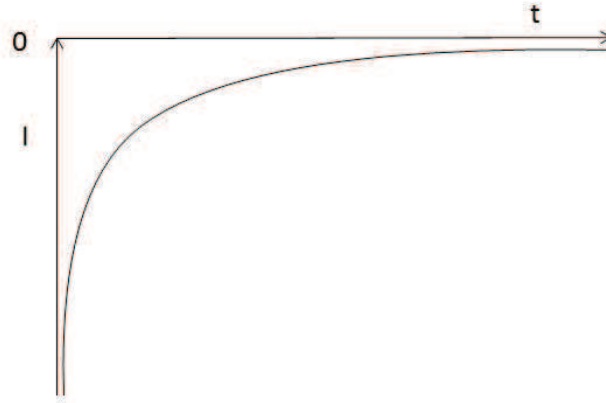


Figura 12. Respuesta intensidad de corriente-tiempo para una corriente de reducción (cronoamperograma).

Cuando se consideran reacciones en disolución, la caída de la corriente faradaica tras el salto hasta E_2 es descrita por la **ecuación de Cottrell**.

$$I_f(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

Donde n es el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica, F es la constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$), A es el área de electrodo (cm^2), D el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_0 la concentración de analito en el seno de la disolución (mol cm^{-3}), y t es el tiempo (s) transcurrido desde la aplicación del pulso de potencial.

La corriente registrada contiene también una componente capacitativa. Ésta decae muy rápidamente, por lo que sólo será significativa a tiempos muy cortos. Además, lo hace de manera exponencial con el tiempo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I_c(t) = \frac{\Delta E}{R} e^{-\frac{t}{RC}}$$

Donde R = resistencia (Ohmios) y C = capacidad (Faradios).

2. OBJETIVOS

Existe un elevado número de microorganismos cuyo control exhaustivo resulta esencial para garantizar la seguridad medioambiental y agroalimentaria. La enorme incidencia de brotes de toxiinfecciones causados por estos microorganismos ha obligado a la búsqueda de métodos para su rápida detección.

En este trabajo se aborda la identificación y cuantificación de la *Salmonella* mediante la detección de secuencias de ADN específicas de la misma.

La industria, por ejemplo, requiere dispositivos cuya utilización no suponga supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea bajo. La alta sensibilidad de los transductores electroquímicos, sumados al hecho de su compatibilidad con tecnologías de miniaturización/microfabricación, los convierten en dispositivos atractivos para el diagnóstico rápido y simple de ADN en campos tales como el alimentario, el biológico y el medioambiental. Con el fin de facilitar las etapas de separación en el transcurso del genoensayo, se propone el uso de partículas magnéticas como soporte del mismo. Sobre ellas se inmovilizará la sonda de captura.

Para incrementar la selectividad de la detección se propone un formato de ensayo tipo sándwich en el que la sonda de captura reconoce al analito, el cual es también reconocido por una sonda indicadora, que lleva unida la marca, generando el correspondiente dúplex ternario. Se producen, por tanto, dos reacciones de reconocimiento. Dada su capacidad de amplificación, se empleará una marca enzimática para llevar a cabo la transducción cronoamperométrica.

Los objetivos concretos del presente trabajo son los siguientes:

1. Selección de la secuencia analito específica.
2. Diseño de una sonda de ADN de captura así como de una sonda indicadora adecuada, que permitan reconocer la secuencia analito.
3. Preparación de una fase sensora basada en el uso de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, de manera que el analito se una a la misma mediante una reacción de reconocimiento específico y se separe de la matriz mediante la aplicación de un campo magnético.
4. Optimización de algunos parámetros con el fin de obtener un método lo más sensible posible mediante un genoensayo tipo sándwich con amplificación enzimática (HRP).
5. Evaluación de las características de respuesta analítica del genoensayo y estudio de la selectividad en presencia de otros patógenos.

3. MATERIALES, INTRUMENTACIÓN Y PROTOCOLOS

3.1. Reactivos

Los **oligonucleótidos** empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Life Sciences (Madrid, España). Sus secuencias de bases se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Nombre, función y secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Nombre	Función	Secuencia de bases 5' → 3'
SalCPBiotin	Sonda de captura	GCGCGCGGCATCCGCATCAATAATACCGGCCTTCAAAT[BtnTg]
SalDPFluor	Sonda indicadora	[Fic]ACCGTAAAGCTGGCTTTCCCTTTCCAGTACGCTTCGCCGTTC
SalT	analito	ATTTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCCGCGCGCGAAC GGCGAAGCGTACTGGAAAGGGAAAGCCAGCTTTACGGT

Las **partículas magnéticas** de 1.0 μm de diámetro funcionalizadas con estreptavidina, Dynabeads MyOne Streptavidin C1, fueron adquiridas en Life Technologies (Madrid, España). Las partículas se suministran en forma de suspensión líquida de concentración 10 mg/mL ($7\text{-}12\cdot 10^9$ micropartículas/mL) en una disolución reguladora de fosfato (PBS) de pH 7.4 que contiene 0.01% Tween-20 y 0.09% NaN_3 como conservante.

En el proceso de acondicionamiento de los electrodos, éstos se lavan con agua y etanol y su superficie se seca con una corriente de nitrógeno (N45, Air Liquide). El resto de reactivos utilizados, incluyendo las sales empleadas para la preparación de las disoluciones reguladoras, se detallan en la Tabla 3.

Todos los compuestos fueron obtenidos comercialmente y usados sin tratamiento previo. Las disoluciones se prepararon en agua Milli-Q purificada con un sistema Direct-Q de MilliPore.

Tabla 3. Reactivos empleados.

Reactivo	Pureza	Casa Comercial
Etanol	96%	Prolabo
Tween 20	70%	Sigma
20x SSPE*		Sigma
10x PBS		Sigma
PBS-caseína		Sigma
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	99%	Sigma
anticuerpo antifuoreceína-HRP		Sigma

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

La composición de las disoluciones empleadas es la siguiente:

- **Disolución Hibridación (H):** 2x SSPE (dilución 1:10 de 20x)
- **Disolución Lavado (L):** 2x + 0.005% Tween-20
- **Disolución Marcaje (M):** PBS (1x) + 0.5% caseína

3.2. Instrumentación

La señal electroquímica se midió en todos los casos con un **potenciostato** μ Autolab Type II (Ecochemie, Holanda) controlado por un equipo informático provisto del software GPES 4.9.

Para las medidas de cronoamperometría se emplearon **electrodos serigrafiados de tinta de carbono DRP-110** de Dropsens (Oviedo, España) que constan de un electrodo de trabajo de 4 mm de diámetro fabricado con tinta de carbono, un electrodo auxiliar también de tinta de carbono y un electrodo de referencia, que es en realidad un pseudoreferencia, de plata.

Como interfase entre la celda serigrafiada y el potenciostato se empleó un conector específico de Dropsens (Oviedo, España).

Las etapas de incubación y lavado con partículas magnéticas se llevaron a cabo bajo agitación en una rueda con capacidad para 12 viales (Dynal MX1) que se muestra en la Figura 13:



Figura 13. Rueda de mezcla para eppendorf de 1.5 mL

La separación mediante la aplicación de un campo magnético se realizó en un imán (DynaMag-2). Ambos son de Life Technologies (Madrid, España).



Figura 14. DynaMag™-2

En la etapa de detección, para asegurar que las partículas magnéticas modificadas se depositan exclusivamente en el electrodo de trabajo, se emplea un imán de 4 mm de diámetro.

El control de la temperatura durante la reacción de hibridación del analito y la sonda indicadora se realizó en un termostato de bloque metálico para tubos de centrifugación; Tembloc, Selecta (Figura 15).

Las disoluciones de oligonucleótidos y partículas magnéticas contenidas en los eppendorf se homogeneizaron mediante agitación en un vórtex y también se empleó una centrifuga Hereaus Biofuge, Thermo Scientific (Figura 16).

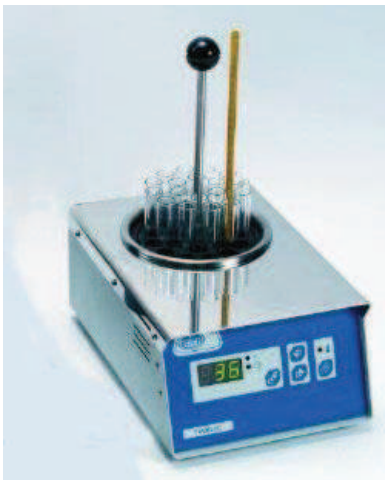


Figura 15. Termostato Tembloc



Figura 16. Centrifuga Hereaus Biofuge 1L-R

3.3. Procedimientos experimentales

3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos serigrafiados

Los electrodos serigrafiados de tinta de carbono se lavaron con etanol y agua para eliminar las impurezas que pueden estar presentes en la tinta tanto orgánicas como inorgánicas, y se secaron en corriente de nitrógeno. De esta forma, los electrodos quedan listos para ser utilizados.

3.3.2. Protocolo de formación de la fase sensora (modificación de las partículas magnéticas)

En primer lugar, es necesario realizar una etapa de lavado de las partículas magnéticas antes de su utilización para eliminar los conservantes que contiene la disolución. Para ello, se transfiere un volumen de 50 μL de la suspensión comercial de micropartículas a un eppendorf de 1.5 mL. Seguidamente, son resuspendidas en 450 μL de disolución reguladora L, que contiene detergente para facilitar la separación magnética, y la solución resultante se incubó 2 minutos bajo rotación en la rueda (Figura 17).

Una vez transcurrido este período, se someten a un pulso corto en la centrifuga y el eppendorf es colocado sobre un imán que aplica un campo magnético y, dado que las partículas están constituidas por un núcleo de ferrita de propiedades paramagnéticas, se acumulan en la pared, permitiendo así la separación del sobrenadante tras 2 minutos. El lavado se repitió empleando 500 μL de disolución L.

Posteriormente se llevó a cabo la funcionalización de las micropartículas con la sonda de ADN de captura (Figura 17). Para ello, las partículas se resuspendieron en 500 μL de disolución 1 μM de la sonda biotinada en disolución H, dejando transcurrir la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo rotación. La sonda de captura se une así a las partículas magnéticas mediante una reacción de reconocimiento específica. Esta suspensión se almacena para que tenga lugar la reacción de inmovilización durante toda una noche a 4°C.

A continuación, se someten a 2 lavados, el primero con disolución L y el segundo con disolución H, y finalmente se reconstituyen en 500 μL de disolución H (disolución stock). Esta suspensión se almacena a 4 °C hasta su utilización.

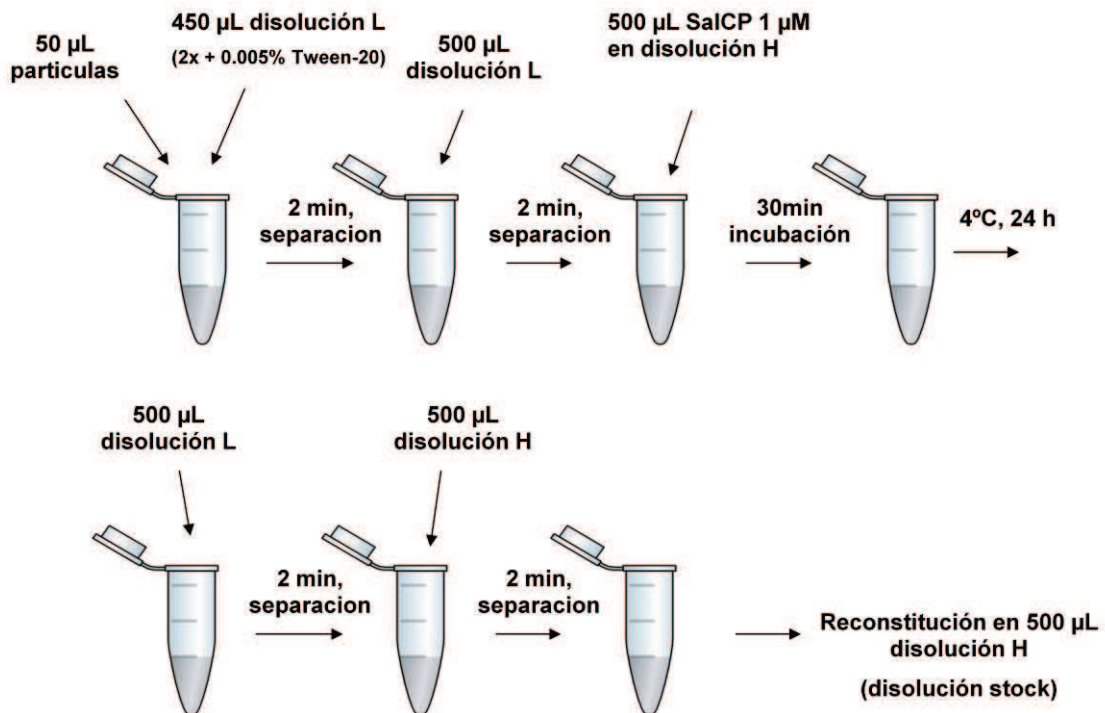


Figura 17. Modificación de las partículas magnéticas.

3.3.3. Protocolo de hibridación.

Para llevar a cabo la cuantificación de la secuencia analito se emplea un formato tipo sándwich.

- Hibridación en fase homogénea

En primer lugar se realizó la hibridación homogénea entre la secuencia diana y la sonda indicadora (Figura 18, etapa 2, recuadro). Para ello, se mezclaron cantidades crecientes de secuencia analito con una cantidad fija de secuencia indicadora en eppendorf independientes, de manera que la concentración final de secuencia indicadora fuese 0.5 μM y la de analito entre 0 y 10 nM, en un volumen final de 500 μL de disolución H.

Seguidamente, los eppendorfs se introdujeron en un termostato de bloque metálico y se mantuvieron a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, para asegurar que la sonda analito y la indicadora no se autohibridan generando posibles estructuras secundarias que dificulten la hibridación entre ambas. Después se enfriaron en un baño de hielo a 0 $^{\circ}\text{C}$ durante otros 5 minutos.

- Hibridación heterogénea

A continuación, se realizó la hibridación heterogénea (Figura 18, etapa 3) entre la sonda de captura inmovilizada sobre las partículas magnéticas y el dúplex previamente formado entre la sonda indicadora y el analito durante la hibridación homogénea. Para cada concentración de analito, se añadieron 50 μL de la suspensión de partículas magnéticas modificadas con la sonda de captura a las disoluciones anteriormente descritas, que contenían concentraciones variables de analito y la secuencia indicadora 0.5 μM , y se dejó que la reacción de hibridación transcurriera durante 1 hora a temperatura ambiente y bajo rotación.

Por último, se realizaron 3 lavados, dos con disolución L y el tercero con disolución M. Esta última contiene caseína 0.5% que impide que, en la posterior etapa de marcaje enzimático, se produzcan adsorciones inespecíficas del conjugado enzimático.

3.3.4. Protocolo del marcaje enzimático

Para realizar la inmovilización de la marca enzimática sobre la sonda indicadora marcada con fluoresceína, se añadieron 500 μL de disolución M sobre las partículas magnéticas modificadas con el ADN y, seguidamente, 1.7 μL del conjugado enzimático anticuerpo antifluoresceína-HRP (Figura 18, etapa 4).

Para conseguir la inmovilización del enzima se dejaron transcurrir 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y bajo rotación. Posteriormente se realizaron 2 lavados, uno con la disolución M y otro con la disolución de hibridación H y por último, las micropartículas completamente modificadas se resuspendieron en 50 μL de la disolución en la que se va a llevar a cabo la detección (disolución H).

3.3.5. Protocolo de detección.

Para realizar la detección electroquímica (Figura 18, etapa 5), se deposita una alícuota de la disolución de las partículas magnéticas completamente modificadas sólo sobre el electrodo de trabajo de la celda serigrafiada. Esta condición es indispensable para tener medidas reproducibles. Para conseguirlo se fija un imán con el mismo diámetro del electrodo (4 mm) bajo la superficie del mismo, de tal manera que las micropartículas magnéticas sean atraídas por la acción de su campo magnético.

Tras colocar el imán, se depositaron 15 μL de la disolución de partículas modificadas sobre el electrodo de trabajo y se esperaron 2 minutos para asegurar que el imán atrapa todas las partículas. A continuación, se añadieron 45 μL de disolución del sustrato enzimático (TMB) en la disolución de detección. Se deja transcurrir 1 minuto y se realiza la medida.

La medida electroquímica del producto electroactivo generado enzimáticamente se llevó a cabo por cronoamperometría.

Los parámetros instrumentales empleados fueron los siguientes:

- Potencial: 0 V
- Duración del pulso: 60 s

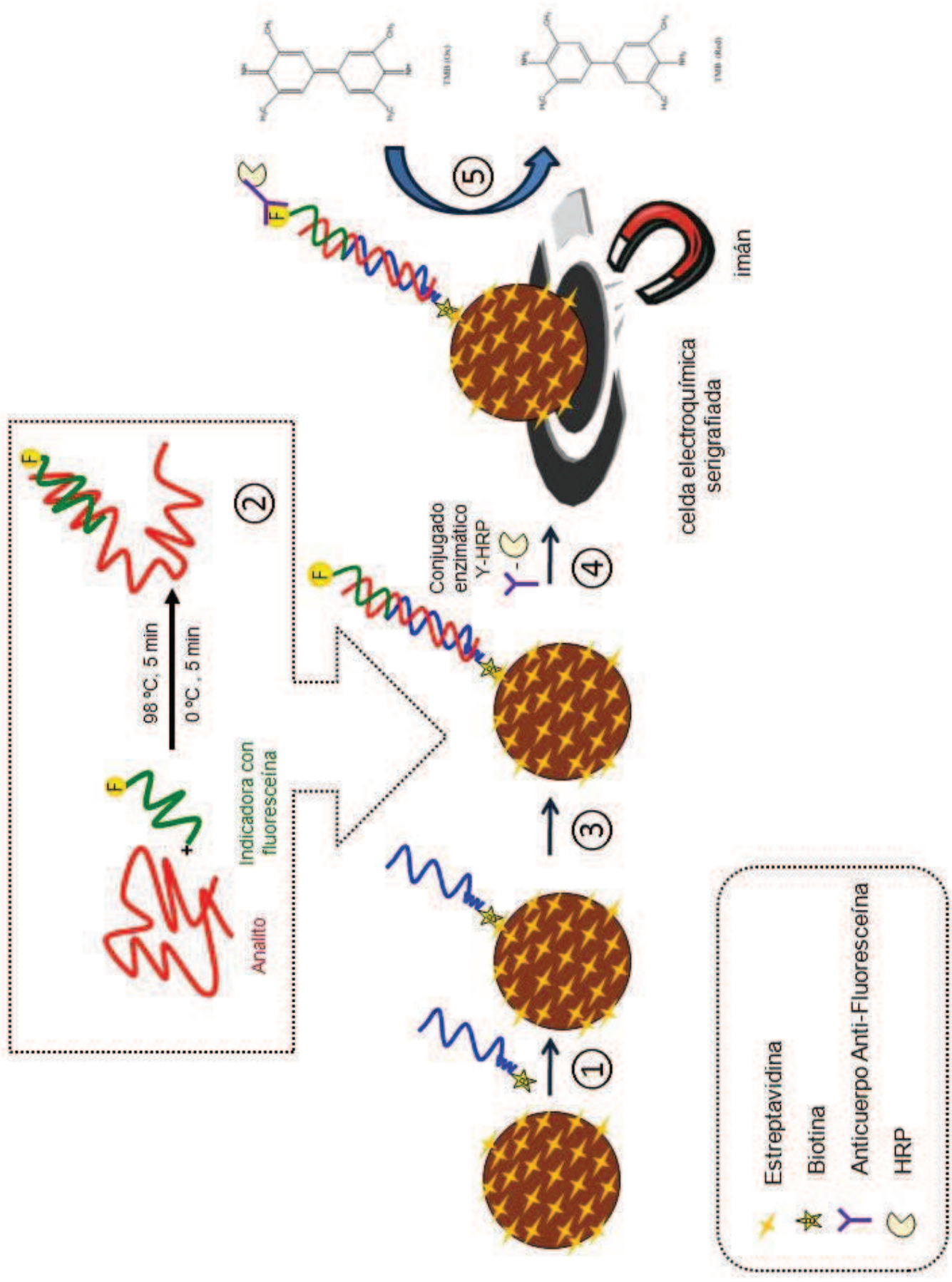


Figura 18. Esquema que ilustra las distintas etapas del genosenayo: (1) Inmovilización de la sonda biotinada sobre las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. (2) Hibridación homogénea. (3) Hibridación heterogénea. (4) Marcaje enzimático. (5) Determinación enzimática de la actividad enzimática.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de la secuencia analito

En este trabajo se lleva a cabo el diseño de un ensayo basado en el análisis del genoma bacteriano de *Salmonella*. El proceso comienza con la selección de la secuencia genética de interés, la denominada secuencia diana o analito, que deberá ser específica de la bacteria a analizar.

Algunas cepas de *Salmonella* contienen plásmidos que codifican genes de virulencia que están altamente asociados con la diseminación de la infección. El conocimiento de los genes que conforman el genoma bacteriano, de las proteínas que codifican y de sus funciones, permite comprender los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos para prevenir exitosamente estas infecciones.

La capacidad de *Salmonella* para adherirse y entrar a las células del epitelio intestinal es un paso esencial en el ciclo de vida de estos microorganismos. Esta propiedad determina la virulencia del patógeno y está localizada en un grupo de genes denominados *invA*, *hilA* y la secuencia de inserción *IS200*, específica de este género [40-42].

El gen *invA* presente en diferentes serotipos de *Salmonella* codifica un componente esencial del aparato de excreción de proteínas asociadas con la invasión. Por este motivo, se usa como marcador genotípico en estudios epidemiológicos del género *Salmonella*. Este gen está compuesto por 2176 bases, las cuales vienen recogidas en la base de datos del Genbank cuyo número de acceso es M90846.1 (*Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium*)

La secuencia diana empleada es un fragmento de 80 nucleótidos obtenida del banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information) [38] que se describe a continuación. Las bases ocupan las posiciones entre 557 y 636.

El criterio de elección de la secuencia diana se basó en dos premisas:

- ✓ Es condición indispensable que dicho fragmento pueda ser amplificado por PCR y debe ser menor de 100 nucleótidos.
- ✓ Debe ser específico de *Salmonella*.

Por ello, se procedió a buscar una secuencia para la que existan cebadores que cumplan las siguientes condiciones que permitan su amplificación mediante un programa informático (Primer3) [43].

Los criterios de selección fueron los siguientes:

- **Tamaño del producto:** 80-120 bp
- **Tm* producto:** Min:68, Óptimo:71, Máx: 75
- **Tamaño del cebador:** Min:24, Ópt:27, Máx: 33
- **Tm cebador:** Min:60, Ópt:68, Máx: 74
- **% GC cebador:** Min:35, Ópt:44, Máx: 60

*Tm: Temperatura de fusión

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP003386.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 798, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
JN982041.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OEHST5 nonfunctional invasion protein A (invA) gene, partial sequence	147	147	100%	8e-33	100%
JN982040.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain J4STEHO nonfunctional invasion protein A (invA) gene, partial sequence	147	147	100%	8e-33	100%
JF951189.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain XY25 putative secretory protein (invA) gene, partial cds	147	147	100%	8e-33	100%
JF951188.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain DY1 putative secretory protein (invA) gene, partial cds	147	147	100%	8e-33	100%
JF951187.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain XT11 putative secretory protein (invA) gene, partial cds	147	147	100%	8e-33	100%
JF951186.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain DT4 putative secretory protein (invA) gene, partial cds	147	147	100%	8e-33	100%
CP002614.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
CP002487.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
AP011957.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240 DNA, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
FQ312003.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
CP001363.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 14026S, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
FN424405.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580 complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
CP000857.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain RKS4594, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
AE006468.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%
FJ496648.1	Salmonella enterica subsp. salamae serovar Sofia pathogenicity island 1, complete sequence	147	147	100%	8e-33	100%
CP001138.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483, complete genome	147	147	100%	8e-33	100%

Figura 20. Cepas que contienen la secuencia analito seleccionada.

4.2. Selección de las sondas de captura e indicadora

Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se desarrolla un formato de ensayo tipo sándwich, en el que el analito reacciona con una sonda de captura y una sonda indicadora, que lleva unida una marca, generando el correspondiente dúplex ternario. Por tanto, la sonda de captura se diseña de manera que sólo sea complementaria a una parte de la secuencia diana. El resto de la sonda diana será complementaria a la secuencia indicadora, de forma que se forme un dúplex ternario perfecto.

Dado que hay dos reacciones de reconocimiento, los ensayos tipo sándwich aumentan la selectividad de la detección.

Para el diseño de las sondas, se empleó el programa Mfold [45]. Esta herramienta permite predecir en unas condiciones de temperatura y concentración salina dadas, las estructuras secundarias de un fragmento de ADN y sus parámetros termodinámicos: temperatura de fusión, energía libre de formación, entalpía y entropía.

Se procedió a dividir la secuencia analito en dos fragmentos, uno para la sonda de captura y otro para la indicadora. Dado que dicha secuencia está formada por 80 bp, se probaron diferentes particiones hasta obtener una en la que ambas sondas sean lo más lineales posibles, es decir, tengan menos estructuras secundarias.

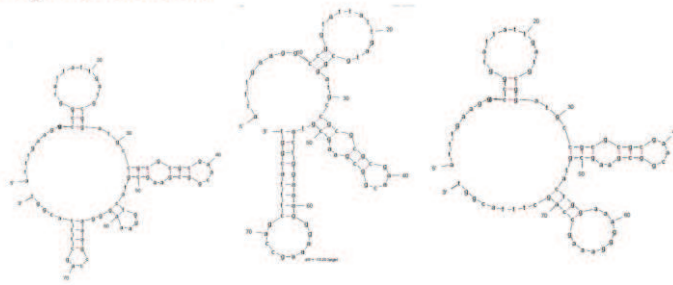
La primera opción (Figura 21) consistió en una partición de 30 nucleótidos para la sonda de captura y los 50 restantes para la sonda indicadora, para así formar por complementariedad un dúplex ternario perfecto. Después se comprobó su estructura usando el programa citado anteriormente en unas condiciones determinadas:

- Concentración salina: $[\text{Na}^+] = 0.298 \text{ M}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 0 \text{ M}$.
- $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como se muestra en la figura 21, se encontraron estructuras secundarias considerables que podían dificultar la hibridación y se optó por otra partición de la secuencia analito.

En la segunda opción (Figura 22), la división empleada fueron 38 nucleótidos para la sonda de captura y los 42 restantes para la sonda indicadora. En este caso, las sondas presentaban una conformación más lineal, propicia para detectar el evento de hibridación.

Captura 30 bases



Indicadora 50 bases

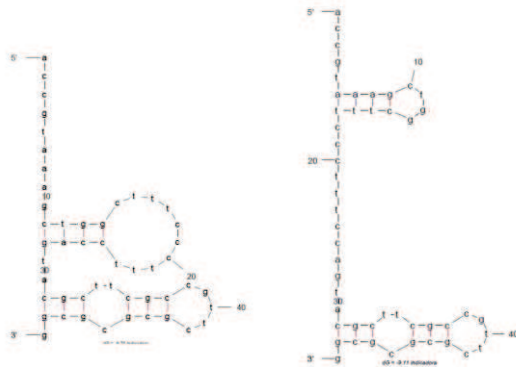


Figura 21. Estructuras secundarias (primera opción)

Captura 38 bases



Indicadora 42 bases

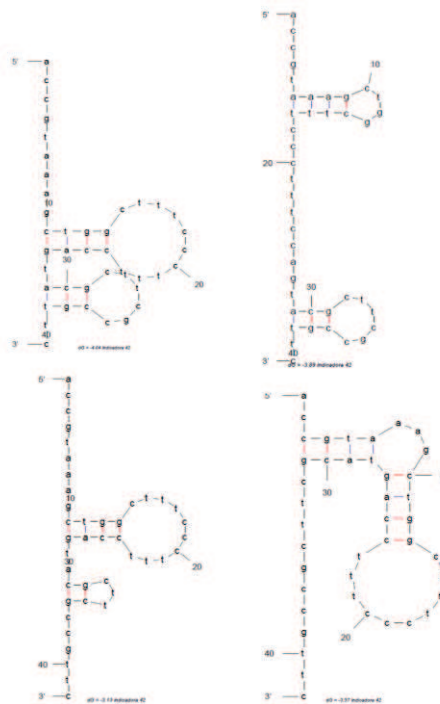


Figura 22. Estructuras secundarias (segunda opción).

En la tabla 4 se muestran los parámetros termodinámicos predichos por el programa para la sonda de captura y el dúplex resultante de su hibridación con la secuencia analito para 25 °C y 0.298 M Na⁺.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos.

	Tm (°C)	AG (Kcal.mol-1)
Sonda captura	66,9	-4,72
Dúplex	90,2	-128,3

Los datos termodinámicos que nos proporciona esta herramienta son la temperatura de fusión (Tm) y la energía libre de formación ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). A la vista de estos datos se comprueba que el dúplex que se forma en presencia del analito es mucho más estable ya que presenta valores mayores, en valor absoluto, de energía libre de formación.

Todo esto nos indica que, en presencia del analito debería tener lugar la hibridación, lo que posteriormente permitirá la unión del conjugado enzimático y la detección del producto generado tras la adición del sustrato (Figura 23)

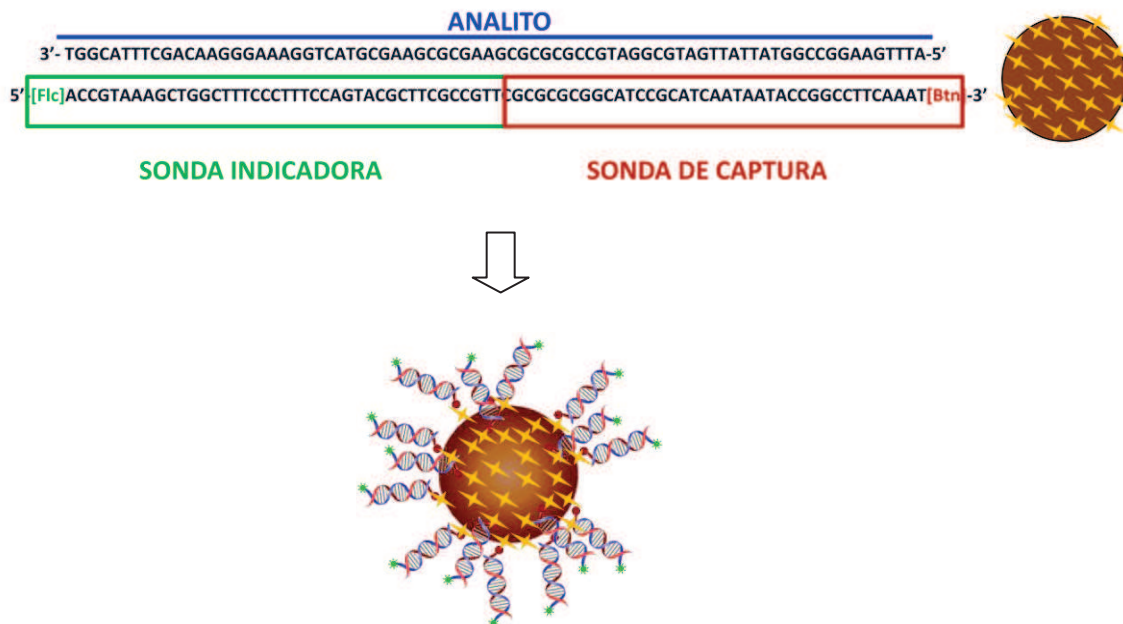


Figura 23. Reacción de hibridación por complementariedad de bases.

4.3. Optimización de las condiciones experimentales.

Atendiendo al propósito del trabajo, el desarrollo de un genoensayo implica la selección de un sistema adecuado de detección de la reacción de hibridación, acorde al tipo de transducción seleccionado.

En el presente estudio, se emplea la enzima HRP para cuantificar la cantidad de producto generado enzimáticamente.

Los parámetros que se optimizaron fueron: temperatura de la hibridación homogénea, tiempo de hibridación heterogénea y tiempo de reacción enzimática.

Los datos obtenidos en todos los experimentos son la media de 3 determinaciones y las barras de error representan la desviación estándar.

4.3.1. Efecto de la temperatura previa a la hibridación homogénea sobre la marca (fluoresceína).

En primer lugar se quiso comprobar el efecto de la temperatura previa a la hibridación homogénea sobre la marca (fluoresceína). Esta reacción puede verse favorecida por el calentamiento previo de las hebras, con la finalidad de eliminar cualquier tipo de estructura autohibridada. Sin embargo, esto podría afectar a la estabilidad de la molécula fluorescente usada como marca.

El experimento se realizó por duplicado de tal manera que uno de los eppendorf se introdujo en el termostato y se mantuvo a 98°C durante 5 minutos y después se enfrió en un baño de hielo a 0°C durante otros 5 minutos, mientras que la otra réplica se mantuvo a temperatura ambiente.

Tal y como se describió en el apartado experimental, después se tomaron 50 µL de la disolución stock (partículas magnéticas modificadas con la sonda de captura) y se incubaron en presencia de la sonda indicadora pero en ausencia de analito.

A continuación, se añadió el conjugado enzimático anticuerpo antifuoresceína-HRP y se dejaron transcurrir 30 minutos de reacción de marcaje enzimático bajo rotación. Finalmente se realizó la detección sobre electrodos serigrafiados de carbono en presencia del sustrato TMB. Como se observa en la Figura 24, la intensidad de corriente es muy pequeña $< 0.1 \mu\text{A}$.

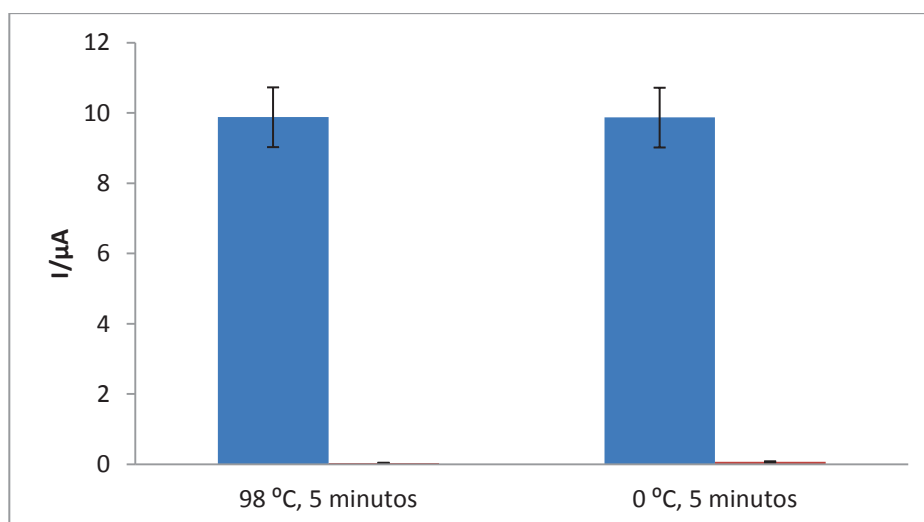


Figura 24. Intensidad de corriente medida para el blanco (■) y una concentración de analito 20 nM (■).

Cuando se lleva a cabo el mismo experimento en presencia de 20 nM de analito prehibridado con la sonda indicadora, se obtienen intensidades de corriente mucho mayores (Figura 24). Esto indica que, efectivamente, en presencia de analito tiene lugar la formación del dúplex ternario. Por tanto, hay fluoresceína sobre las partículas magnéticas y ésto permite la unión del conjugado anticuerpo antilfluoresceína-HRP y la detección del producto generado enzimáticamente.

En ausencia de analito, únicamente se observa una pequeña señal analítica probablemente debida a la adsorción inespecífica del conjugado a las partículas magnéticas modificadas.

Los resultados proporcionan una intensidad de corriente similar en ambos casos, por tanto, la temperatura no afecta a la estabilidad de la fluoresceína. Se estimó oportuno realizar los experimentos a temperatura elevada, ya que permite un considerable ahorro de tiempo de análisis.

En la Figura 25 se muestran los cronoamperogramas obtenidos para el blanco y una concentración de analito 20 nM. Se puede observar el gran aumento de señal cuando se produce hibridación.

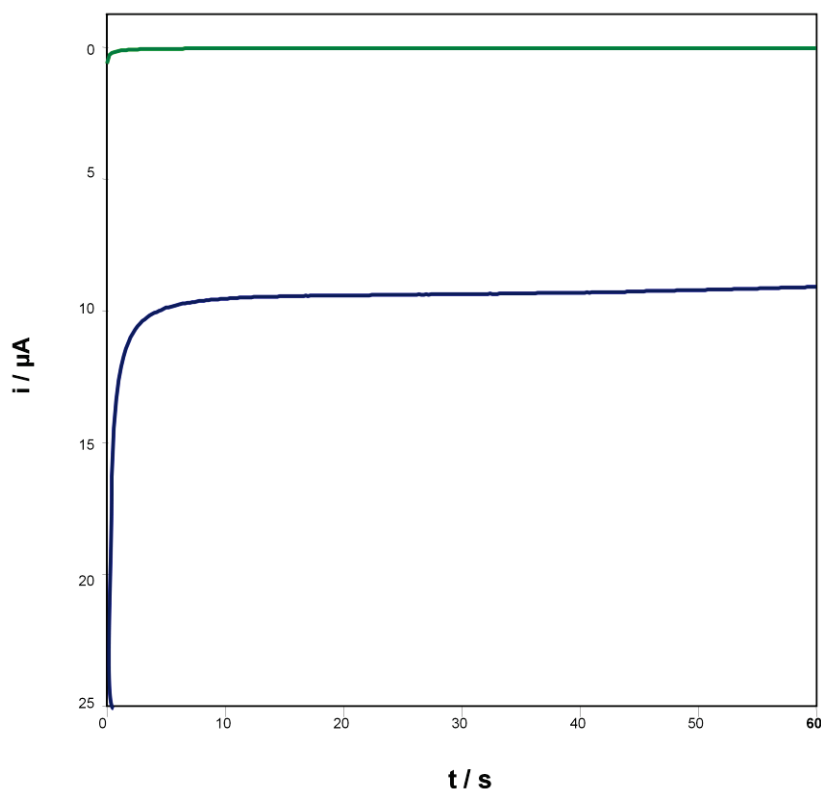


Figura 25. Cronoamperogramas obtenidos para el blanco (línea verde) y una concentración de analito 20 nM (línea azul).

4.3.2. Tiempo de hibridación

Para seleccionar el tiempo óptimo, se realizó un estudio en el que se tomaron 50 μL de la disolución de micropartículas modificadas con la sonda y se incubaron en un volumen final de 500 μL de disolución H que contiene una concentración final 10 nM de analito y 0.5 μM de sonda indicadora.

Los tiempos ensayados fueron 30 y 60 minutos. Se dejó que la reacción de hibridación transcurriese a temperatura ambiente y bajo rotación.

Simultáneamente, se realizó el mismo experimento para cada tiempo seleccionado, en ausencia de analito. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26.

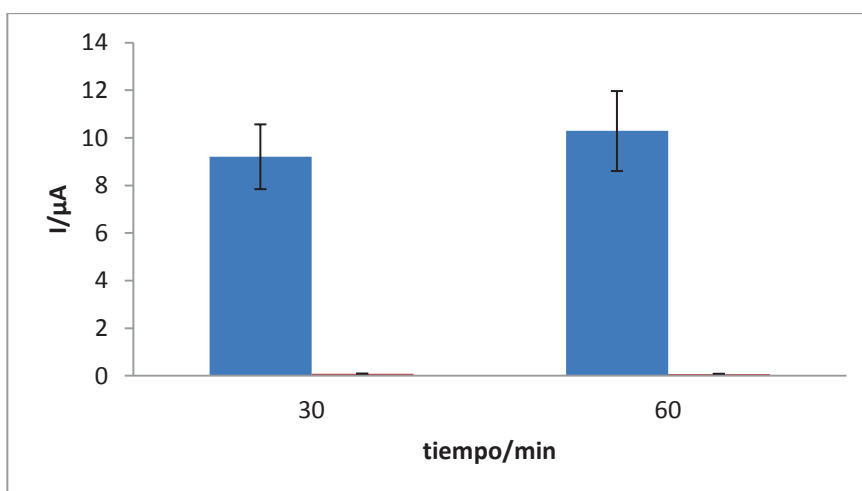


Figura 26. Intensidad de corriente obtenida en ausencia (■) y presencia de 10 nM de analito (■) tras 30 ó 60 minutos de incubación.

En el caso de 30 minutos, se observa una señal de corriente de aproximadamente 1 μA inferior a la obtenida tras 60 minutos de hibridación heterogénea. Por tanto, se escogió 60 minutos como tiempo óptimo para llevar a cabo la hibridación en superficie.

Es conveniente indicar que la señal para 30 minutos es muy elevada, lo que permitiría llevar a cabo también la detección de *Salmonella* de forma más rápida, pero dado que la finalidad es obtener la mayor sensibilidad posible, eligiéremos 60 minutos en detrimento de la rapidez de análisis.

4.3.3. Tiempo de marcaje enzimático.

Otro parámetro que afecta a la señal registrada es el tiempo de marcaje enzimático, tras la adición del conjugado anticuerpo antifluoresceína-HRP, para conseguir su inmovilización sobre la sonda indicadora marcada con fluoresceína. La concentración de analito empleada para la medida es 10 nM.

Un tiempo de marcaje demasiado corto podría implicar que la reacción de afinidad no llegase al equilibrio, con lo que obtendríamos señales menos reproducibles y más pequeñas. Por otro lado, un tiempo excesivamente largo podría favorecer la adsorción inespecífica del conjugado y, por tanto, el aumento de los blancos, lo que perjudicaría la detectabilidad.

Los tiempos ensayados fueron 15 y 30 minutos. Se realizó simultáneamente para cada experimento un blanco, igual que en el caso anterior. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 27.

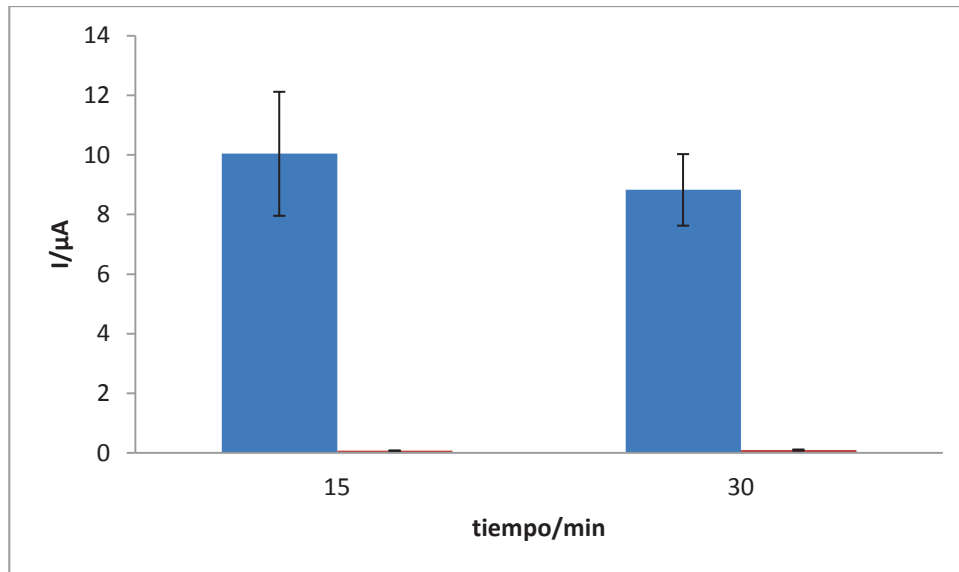


Figura 27. Efecto del tiempo de marcaje sobre la intensidad de corriente para una concentración de analito de 10 nM (■) y para el blanco(■)

Se observa que la señal obtenida para el tiempo de 15 minutos es mayor que para 30 minutos y los blancos fueron muy similares. Por tanto, para reducir el tiempo de análisis se estimó oportuno la elección de 15 minutos como tiempo de marcaje enzimático óptimo.

4.4. Características analíticas del genoensayo

En apartados anteriores se ha evaluado la influencia de distintos parámetros, determinando en cada caso las condiciones óptimas del ensayo.

Para estudiar las características de respuesta del genoensayo en función de la concentración de analito, se realizó un calibrado evaluando la sensibilidad, intervalo de linealidad y reproducibilidad.

En la Figura 28 se representa la intensidad de corriente medida para 60 minutos de tiempo de hibridación y 15 minutos de marcaje enzimático, frente a la concentración de analito.

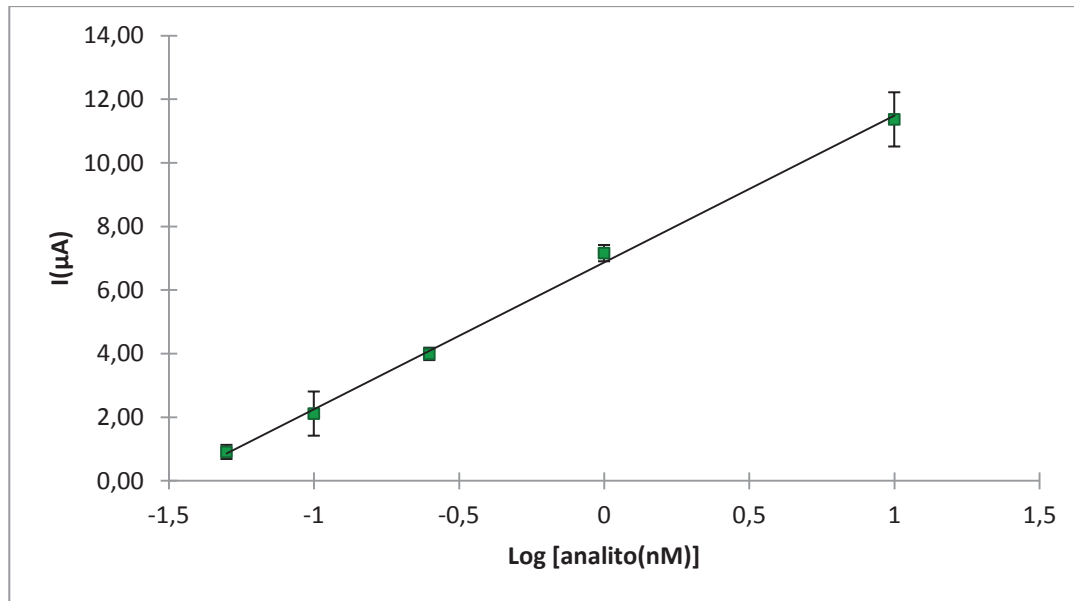


Figura 30. Curva de calibrado que representa la intensidad de corriente neta frente al logaritmo de la concentración de ADN de Salmonella.

En el intervalo de concentraciones ensayadas (0.05-10 nM) se observa una variación lineal de la intensidad de corriente con el logaritmo de la concentración de analito según la siguiente ecuación:

$$I_{neta} (\mu A) = (4.62 \pm 0.02) \log [Salmonella(nM)] + (6.78 \pm 0.02); r^2 = 0.9982$$

La dependencia lineal de la señal con el logaritmo de la concentración, en lugar de una dependencia directa con la concentración de secuencia de ADN ya ha sido observada previamente [46].

El límite de detección calculado como la concentración que da una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del mismo, resultó ser 30 pM. Se halló la reproducibilidad de la respuesta cronoamperométrica y se obtuvo un valor de desviación estándar relativa (RSD) para una concentración de 0.25 nM de 4.9%.

4.5. Selectividad

La innovación y el desarrollo de la industria agroalimentaria pasan de forma general por dos ejes fundamentales: la seguridad y la calidad de los alimentos. La cada vez más compleja cadena alimentaria exige el desarrollo de sistemas de trazabilidad eficaces que aseguren la solidez de todos los eslabones de la cadena.

El objetivo principal del presente trabajo es la detección de *Salmonella* a través de su material genético. Un parámetro esencial, es su detección incluso en presencia de otros patógenos. Por esta razón, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta para la aplicación analítica del genoensayo, es el estudio del efecto de posibles interferentes. Para este propósito, fue evaluada la respuesta del genoensayo en presencia de la secuencia diana de *Salmonella* y dos posibles interfeerentes: *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados se muestran en la Figura 31.

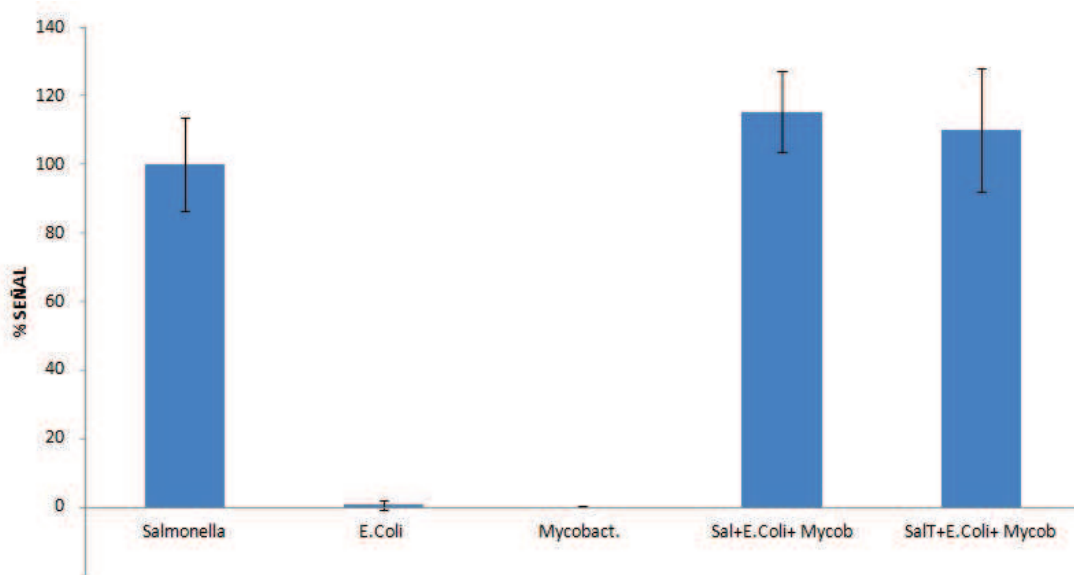


Figura 31. Señales analíticas obtenidas en presencia de varios interferentes expresadas como porcentaje respecto de la intensidad de corriente correspondiente a [*Salmonella*]=1 nM

En primer lugar, se realizó un estudio evaluando la respuesta del genoensayo a los 3 patógenos por separado con una concentración de analito 1 nM. En la Figura 31 se representa la señal de *Salmonella* 1 nM como 100% sirviendo de base para la comparación con otros patógenos. La respuesta de una muestra que contiene sólo *E. Coli* o *M. Tuberculosis* es despreciable.

Posteriormente, se realizaron 2 mezclas con la secuencia diana de cada uno de los patógenos. La primera contenía una concentración 1 nM de cada analito, mientras que en la segunda mezcla, los interferentes estaban presentes en una concentración 10 veces mayor que la *Salmonella*.

Se puede observar que incluso cuando las secuencias de *E. Coli* y *M. tuberculosis* están presentes en una concentración 10 nM, la respuesta del genoensayo es similar a la obtenida en ausencia de estos interferentes, dentro del error experimental.

De estos resultados se puede concluir que es posible detectar una secuencia diana de *Salmonella* en presencia de una secuencia de otro patógeno que generalmente puede estar presente en muestras que puedan contener *Salmonella*, como es el caso de *E. Coli*.

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un ensayo genomagnético para la detección de una secuencia específica de *Salmonella* de 80 nucleótidos presente en el gen *invA*, basado en la medida de la señal croamperométrica sobre electrodos serigrafiados de carbono.

Para ello se ha diseñado una sonda de captura formada por 38 bases que enlazan con la secuencia analito. Esta secuencia ha sido funcionalizada en el extremo 5' con biotina para permitir su inmovilización sobre las partículas magnéticas cuya superficie está modificada con estreptavidina. Se ha empleado un formato tipo sándwich, lo que ha requerido el diseño de una sonda indicadora con una secuencia de 42 bases complementaria al resto de la secuencia analito. La sonda fue marcada con fluoresceína para conseguir la inmovilización del conjugado enzimático Anticuerpo Antifluoresceína-HRP que generará el producto electroactivo cuya reducción dará lugar a la medida electroquímica.

Se han optimizado varios parámetros que afectan a la sensibilidad de la detección.

El genoensayo permite la detección de ADN de la bacteria en un intervalo de concentraciones entre 0.05 y 10 nM, con un límite de detección de 30 pM.

El ensayo presenta una excelente selectividad en presencia de otros patógenos en concentraciones 10 veces superior al analito.

Este genoensayo se podría aplicar a muestras reales alimentarias, realizando previamente una amplificación por PCR convencional.

6. REFERENCIAS

1. M. Tietjen, D.Y.C. Fung, *Salmonellae and food safety*, Crit. Rev. Microbiol., 1995, **21**, p: 53-83.
2. M.A. Usera, R. Diez, A. Echeita, *Análisis de los serotipos de Salmonella sp. aisladas en España en el año 1995*, Boletín Epidemiológico Semanal, 1996, **4**, p: 121- 128.
3. H. Herikstad, Y. Motarjemi, R.V. Tauxe, *Salmonella Surveillance: a global survey of public health serotyping*, Epidemiol. Infect., 2002, **129**, p:1-8.
4. B. Mishu, P.M. Griffin, R.V. Tauxe, D.N. Cameron, R.H. Hutcheson, W. Schaffner, *Salmonella enteritidis gastroenteritidis transmitted by intact chicken eggs*. Ann. Intern. Med., 1991, **115**, p: 190-194.
5. E.S. Shelobolina, S.A. Sullivan, K.R. O'Neill, K.P. Nevin, D.R. Lovley, *Isolation, characterization, and U(VI)- reducing potential of a facultative anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)- contaminated subsurface sediment and description of Salmonella Subterranea sp.*, Appl. Envirom. Microbiol., 2004, **70**, p: 2959-2965
6. R. Rotger, J. Casadesús, *The virulence plasmids of Salmonella*, Int. Microbiol., 1999, **2**, p:177-184
7. M. Repetto, A. Camean, *Toxicología Avanzada*, Ed. Diaz de Santos, Madrid, 1995.
8. K. Y. Chan, D.D. Reidpath, *"Typhoid Mary" and "HIV Jane": Responsibility, Agency and Disease Prevention*, Reproductive Health Matters, 2003, **22**, p: 40-50.
9. J. Wan, K. King, H. Craven, C. McAuley, S.E. Tan, M.J. Coventry, *ProbeliaTM PCR system for rapid detection of Salmonella in milk powder and ricotta cheese*, Lett. Appl. Microbiol., 2000; **30**: p. 267-271.
10. M. Aho, *Problems of Salmonella sampling*, Int. J. Food Microbiol., 1992, **15**, p: 225-235.
11. W.D. Waltman, *Salmonella in domestic animals*, C. Wray and A. Wray Eds, Methods for cultural isolation of Salmonella in CABI Publishing, NY, 2000, **21**, p: 355-372.
12. L. Croci, E. Delibato, G. Volpe, G. Palleschi, *A rapid electrochemical ELISA for the detection of salmonella in meat samples*, Anal. Lett, 2001, **34**, p: 2597-2607.

13. R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia*, Science, 1985, **230**, p: 1350-1354.
14. R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, *primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase*, Science, 1988, **239**:p. 487-491.
15. K.B. Mullis, *The unusual origin of the Polymerase Chain-Reaction*, Sci. Am., 1990, **262**, p: 56-65.
16. H. J. Cohen, S. M. Mechanda, W. Lein, *PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella spp.*, App. Environ. Microbiol., 1996, **62**, p: 4303-4308.
17. A. Anderson, K. Pietsch, R. Zucker, *Validation of a duplex Real-Time PCR for the detection of Salmonella spp. in different food products*, 2011, **4**, p: 259-267.
18. P.Y. Cheung, K. M. Kam, *Salmonella in food surveillance: PCR, inmunoassays, and other rapid detection and quantification methods*, Food Res. Int., 2012, **45**, p: 802-808.
19. B. Malorny, E. Paccassoni, P. Fach, C. Bunge, A. Martin, R. Helmuth, *Diagnostic Real-Time PCR for detection of Salmonella in food*, App. Environ. Microbiol., 2004, **70**, p: 7046-7052.
20. A. Lermo, S. Campoy, J. Barbe, S. Hernández, S. Alegret, M.I. Pividori, *In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens*, Biosens. Bioelectron., 2007,**22**,p:2010-2017
21. I. Palchetti, M. Mascini, *Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection*, Anal. Bional. Chem., 2008, **391**, p: 455-471.
22. W. Göpel, *Chemical sensing, molecular electronics and nanotechnology: Interface technologies down to the molecular scale*, Sens. Actuators B, 1991, **4**, p: 7-21
23. B.I. Haukanes, C. Kvam, *Application of magnetic beads in bioassays*, Biotechnology, 1993, **11**, p: 60–63.

24. K. Larsson, K. Kriz, D. Kriz, *Magnetic transducers in biosensors and bioassays*, *Analisis*, 1999, **27**, p: 617–621.
25. S. Solé, A. Merkoci, S. Alegret, *New materials for electrochemical sensing III. Beads*, *Trends Anal. Chem.*, 2001, **20**, p: 102–110.
26. S. Liébana, A. Lermo, S. Campoy, M.P. Cortés, S. Alegret, M.I. Pividori, *Rapid detection of Salmonella in milk by electrochemical magneto immunosensing*, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, p: 510–513
27. E. González-Fernández, N. de los Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Aptamer-based inhibition assay for the electrochemical detection of tobramycin using magnetic microparticle*, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **23**, p: 43-49.
28. A.H. Lu, E. L. Salabas, Ferdi Schüth, *Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application*, *Angew. Chem. Int.*, 2007, **46**, p: 1222 – 1244.
29. T. García, M. Revenga-Parra, L. Añorga, S. Arana, F. Pariente, E. Lorenzo. *Disposable DNA biosensor based on thin-film gold electrodes for selective Salmonella detection*. *Sens. Actuators B*, 2012, **161**, p: 1030-1037.
30. P. de los Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón Blanco, *Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications*, *Electroanalysis*, 2004, **16**, p: 1193-1204.
31. P. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Voltammetric determination of underivatized oligonucleotides on graphite electrodes based on their oxidation products*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, p: 3342-3347
32. D. H. Johnston, H. H. Thorp, *Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: homogeneous electron-transfer kinetics*, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, p: 13837-13843.
33. F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction*, *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**, p: 253-257.
34. P. de los Santos-Álvarez, M.J. Lobo Castañón, A.J. Miranda Ordieres, P.Tuñón Blanco, *Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, p: 104-118.
35. R.Y. Lai, E.T. Lagally, S.-H. Lee, T.H. Soh, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, *Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, p: 4017-4021.

36. R. Miranda-Castro, P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of Legionella pneumophila*, Anal. Chem., 2007, **79**, p: 4050-4055
37. D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, M.B. González-García, A. Costa García, *Alkaline phosphatase-catalyzed silver deposition for electrochemical detection*, Anal Chem, 2007, **79**, p: 5272-5277.
38. R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Structured nucleic acid probes for electrochemical devices*, Electroanalysis, 2009, **21**, p: 2077-2090
39. J.M. Pingarrón, P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica*, Ed. Síntesis, Madrid, 1999.
40. C.H. Chiu, J.T. Ou, *Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture multiplex PCR combination assay*, J Clin. Microbiol., 1996, 34, p :2619-22.
41. S. Kumar, K. Balakrishna, H. Batra, *Detection of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of invA, viaB, fliC-d and prt genes by polymerase chain reaction in mutiplex format*, Lett Appl Microbiol, 2006, **42**, p:149-54.
42. C.J. Hueck, *Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants*, Microbiology and molecular biology reviews, 1998, **62**, p: 379-433.
43. S. Krawetz, S. Misener (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. ([Source code available at http://fokker.wi.mit.edu/primer3/.](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/))
44. Base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
45. M. Zucker, *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*, Nucleic Acids Res., 2003, **31**, p: 3406-3415
46. R. Miranda-Castro, N. de los Santos Álvarez, M.J. Lobo Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón Blanco, *PCR-Coupled electrochemical sensing of Legionella pneumophila*, Biosens. Bioelectron., 2009, **24**, p: 2390-2396.

ANEXO I: Tablas de datos

Tabla 1. Datos experimentales correspondientes a la Figura 24.

Condiciones temperatura	Intensidad blanco/ μA	Intensidad analito[20 nM]/ μA
98 °C, 5 minutos	0,04	9,88
0 °C, 5 minutos	0,07	9,87

desviaciones estándar	blanco	analito
98 °C, 5 minutos	0,01	0,85
0 °C, 5 minutos	0,02	0,85

Tabla 2. Datos experimentales correspondientes a la Figura 26.

Tiempo hibridación/min	Intensidad blanco/ μA	Intensidad analito [10 nM]/ μA
30	0,08	9,21
60	0,07	10,29

desviación estándar	blanco	analito
30 minutos	0,02	1,36
60 minutos	0,02	1,68

Tabla 3. Datos experimentales correspondientes a la representación de la Figura 27.

Tiempo Marcaje/min	Intensidad blanco/ μA	Intensidad analito[10 nM]/ μA
15	0,08	10,04
30	0,1	8,83

desviación estándar	blanco	analito
15 minutos	0,01	2,08
30 minutos	0,02	1,2

Tabla 4. Datos experimentales correspondientes a la representación de la Figura 30.

[analito]/nM	Log [analito]	Intensidad neta/ μA	desviación estándar
0,05	-1,30	0,91	0,22
0,10	-1,00	2,12	0,69
0,25	-0,60	4,00	0,19
1,00	0	7,16	0,26
10,00	1,00	11,37	0,85

Tabla 5. Datos experimentales correspondientes a la representación de la Figura 31.

	I neta/μA	desviación estándar
<i>Salmonella</i>	100	13,59
<i>E.Coli</i>	0,50	1,27
<i>Mycobact.</i>	0	0,08
<i>Sal+E.Coli+ Mycob</i>	115,52	11,95
<i>SalT+E.Coli+ Mycob</i>	110,15	18,02