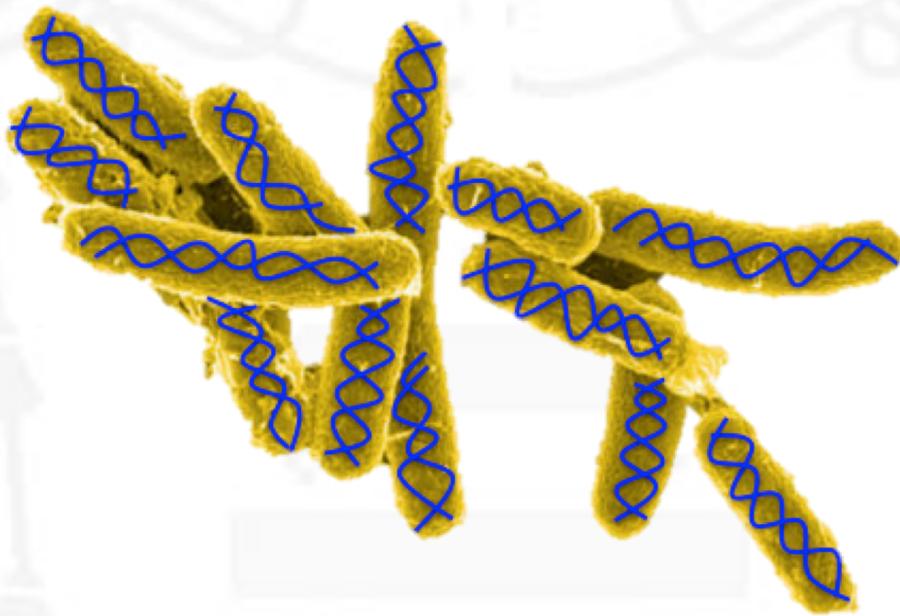


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Control de *Salmonella* en alimentos mediante una plataforma sensora basada en su material genético



Inés García Rodríguez

Química Física y Analítica/Grupo Electroanálisis Universidad de Oviedo

Julio/2017



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



RESUMEN

Salmonella es un patógeno alimentario que plantea un importante problema de salud, además de provocar considerables pérdidas económicas en el sector agroalimentario mundialmente. Por ello, su detección rápida y fiable en todas las etapas de la cadena de producción de alimentos es vital para evitar su propagación. Los métodos moleculares basados en la detección de secuencias de ADN específicas de las especies patógenas son una atractiva alternativa a los métodos microbiológicos tradicionales que requieren de 5 a 6 días para obtener el resultado. De entre estas técnicas moleculares, y dada su fácil miniaturización, los genosensores electroquímicos son la opción más adecuada para su comercialización. En este trabajo se propone un método sencillo y sensible para la detección de ADN genómico de *Salmonella* que combina su amplificación isotérmica por recombinasa-polimerasa (RPA) con detección electroquímica sobre la misma plataforma. Se seleccionó una secuencia de ADN de 86 nucleótidos específica para el gen *bipA* de *Salmonella* cuya amplificación se realizó a una temperatura de 37°C, empleando oligonucleótidos cortos que flanquean esta región actuando como cebadores. Uno de ellos, el inverso, se inmoviliza sobre la superficie de oro del electrodo de trabajo a través de un grupo tiol presente en su extremo 5', incorporando en la disolución el cebador directo modificado con 6-carboxifluoresceína (6FAM). Como resultado se obtienen dúplex de ADN anclados a la superficie metálica cuyo marcaje enzimático se consigue mediante fragmentos Fab dirigidos contra la 6FAM, conjugados con la enzima peroxidasa (POD). Esta enzima cataliza la oxidación de tetrametilbencidina y su forma oxidada se detecta cronoamperométricamente aplicando un potencial de 0 V y midiendo la corriente durante 60 s. La señal analítica registrada permite determinar la presencia de genoma de *Salmonella*. La plataforma sensora integrada desarrollada permite la detección de 10³ unidades genómicas de *Salmonella* en poco más de una hora.

ABSTRACT

Salmonella represents one of the major causes of foodborne diseases in humans, in addition to causing important economic losses in the agri-food sector worldwide. Therefore, fast and reliable detection of *Salmonella* in food at all stages in the "farm to fork" production chain is the only way for preventing foodborne outbreaks. Molecular methods based on the detection of DNA sequences specific to pathogenic species are an attractive alternative to traditional microbiological methods that require 5 to 6 days to obtain a definitive result. Among these molecular techniques, and due to its easy miniaturization, electrochemical genosensors are the most suitable option for commercialization. In this work, a simple and sensitive method for the detection of *Salmonella* genomic DNA combining isothermal recombinase-polymerase amplification (RPA) with electrochemical detection on the same platform has been proposed. An 86 bp DNA sequence specific for the *bipA* gene of *Salmonella* is selected as target, and the amplification process is carried out at 37°C with short oligonucleotides flanking this region, which act as primers. The reverse primer is attached to the gold surface of the working electrode through a thiol group present at its 5' end, and 6-carboxyfluorescein (6FAM)-forward primer is incorporated in solution. As a result, DNA duplexes are anchored to the metal surface and their enzymatic labeling is achieved by Fab fragments directed against 6FAM, conjugated with the enzyme peroxidase (POD). This enzyme catalyzes the oxidation of tetramethylbenzidine (TMB) and its oxidized form is detected chronoamperometrically, applying a constant potential of 0V during 60 s. The recorded analytical signal allows determining the presence of *Salmonella* genome. The integrated sensing platform here developed allows the detection of 10³ genomic units in just over an hour.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

antiFITC-POD: fragmento Fab
antifluoresceína-peroxidasa

ATP: adenoxina trifosfato

BAM: del inglés *bacteriological analytical manual* que significa manual de análisis bacteriológicos

BSA: albúmina de suero bovino

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneítrito

ELISA: del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay* que significa ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FDA: del inglés *Food and Drug Administration* que significa Administración de Alimentos y Medicamentos

HDA: del inglés *helicase-dependent amplification* que significa amplificación dependiente de helicasa

ISO: Organización Internacional de Normalización

LAMP: del inglés *loop-mediated amplification* que significa amplificación mediada por bucle

p-ATP: p-aminotiofenol

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: del inglés *polymerase chain reaction* que significa reacción en cadena de la polimerasa

POD: peroxidasa

proteína SSB: proteínas ligantes de ADN de cadena sencilla

RPA: del inglés *recombinase polymerase amplification* que significa amplificación por recombinasa-polimerasa

SAM: del inglés *self-assembled monolayers* que significa monocapas autoensambladas

SSPE: tampón fosfato salino con AEDT (ácido etilendiaminotetraacético)

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

ufc: unidad formadora de colonia

UG: unidades genómicas

V/S: relación volumen de disolución de p-ATP/superficie sensora

6FAM: 6-carboxifluoresceína

ÍNDICE

1	Introducción	4
2	Objetivo.....	8
3	Materiales y métodos	9
3.1	Reactivos	9
3.2	Instrumentación	10
3.3	Protocolos	11
3.3.1	Limpieza y pretratamiento del electrodo de trabajo	11
3.3.2	Preparación de oligonucleótidos tiolados.....	12
3.3.3	Construcción de la fase sensora	12
3.3.4	Etapas de hibridación	13
3.3.5	Marcaje enzimático.....	14
3.3.6	Detección electroquímica.....	14
3.3.7	Amplificación isotérmica RPA.....	15
4	Resultados y Discusión.....	15
4.1	Selección de la secuencia diana	15
4.2	Condiciones experimentales de medida.....	16
4.3	Diseño del genosensor.....	18
4.3.1	Selección de la sonda de captura e indicadora	18
4.3.2	Optimización de la construcción de la fase sensora	18
4.4	Amplificación RPA en superficie: diseño y optimización	22
4.4.1	Diseño de cebadores para RPA.....	24
4.4.2	Optimización de las condiciones para RPA.....	24
5	Conclusiones	27
6	Bibliografía	28
	Anexo I. Estructura secundaria de las sondas de captura e indicadora	31



1 INTRODUCCIÓN

Salmonella es un género de bacterias Gram negativas y anaerobias facultativas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Son parásitos intestinales de muchos mamíferos y de otros huéspedes como aves, réptiles y anfibios ^{1,2}. Se trata de bacterias ubicuas y con alta resistencia que son capaces de vivir durante semanas en ambientes secos (como comida) y durante meses en agua ³.

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, siendo una subespecie de la primera de ellas (*S. enterica* subsp. *enterica*) la principal causante de enfermedades en humanos ¹.

Algunas especies de *Salmonella*, junto con otras bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, constituyen la principal causa de enfermedades diarreicas producidas por intoxicación alimentaria. En el caso de la salmonelosis (intoxicación alimentaria provocada por alguna especie de *Salmonella*) supone un episodio de gastroenteritis que desaparece sin necesidad de fármacos, únicamente los casos extremos, en los que se produce una infección sistémica, requieren la utilización de antibióticos ^{2,3}.

La mayoría de los casos de salmonelosis en humanos están asociados con el consumo de huevos, aves de corral, cerdo, ternera o lácteos contaminados. Esto supone un gran problema de salud pública y para las empresas de alimentación ². Por lo tanto, se hace necesaria una detección de alimentos contaminados con *Salmonella* que sea rápida y eficaz ².

Con este objetivo, se han ido desarrollando diversos métodos de detección que se dividen en: métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo.

Los primeros constituyen los métodos establecidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO) ⁴ y por el Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM) de la *Food and Drugs Administration* (FDA) ⁵. Estos métodos son largos y laboriosos y requieren personal y equipamiento adecuado; sin embargo, son métodos fiables y sensibles (límite de detección de 1 ufc ²) que permiten obtener aislados de bacterias vivas ⁶. Esencialmente estos métodos se basan en la incubación de la muestra de comida en sucesivos medios



de cultivo específicos para *Salmonella*, tras lo cual se buscan colonias con su morfología típica y se determina si pertenecen al género por diferentes test bioquímicos ⁵.

Como alternativa a estos métodos, han surgido los métodos independientes de cultivo, que son más rápidos, específicos y suponen un menor gasto de material y recursos humanos ².

Dentro de estos cabe destacar los métodos inmunológicos, como los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Estos consisten en la fijación en una matriz sólida de un antígeno específico del microorganismo de interés al que se une un anticuerpo marcado enzimáticamente. En el caso de la detección de *Salmonella* se utilizan antígenos somáticos o flagelares. Para determinar la concentración de este antígeno en la muestra se utilizan sustratos que tras su transformación enzimática dan un compuesto coloreado o fluorescente que se pueda medir ⁷. Se comercializan muchos ensayos ELISA automatizados que se emplean para la detección de este patógeno en la industria cárnica y avícola ⁷. Sin embargo, el límite de detección de este tipo de ensayos es peor que el de los métodos de cultivo (aproximadamente 10^5 ufc/mL ⁸) y requieren un enriquecimiento previo en medios estándar, lo que también aumenta el tiempo del ensayo. Aunque la especificidad de estos ensayos es alta (96 % ^{7,8}), la elección incorrecta del antígeno a detectar puede dar falsos positivos por su similitud con especies próximas como *Citrobacter freundii* ⁸.

Por otro lado, se encuentran los biosensores, dispositivos que permiten cuantificar analitos químicos o bioquímicos por diferentes metodologías. Constan de dos elementos: transductor y elemento de reconocimiento (fijado en el transductor). De tal manera que, en presencia del analito, el elemento de reconocimiento provoca un cambio en una propiedad medible por el transductor ⁹. La principal ventaja de estos es que son portátiles y se pueden utilizar para el análisis *in situ*, además son rápidos y permiten analizar varias muestras simultáneamente ¹⁰. Para la detección de microorganismos se pueden emplear distintos analitos que caracterizan al microorganismo en cuestión como los patrones metabólicos de utilización de un determinado sustrato o el análisis de ácidos nucleicos (genosensores). Estos últimos se basan en la inmovilización de una sonda de ADN que hibrida con una secuencia complementaria del genoma del patógeno a



detectar (secuencia diana), la hibridación de estas produce una señal que puede medirse utilizando un transductor adecuado. La sonda de ADN empleada debe ser complementaria a una región del genoma del patógeno que sea única, es decir, que hibride únicamente cuando el patógeno específico esté presente. Para permitir la hibridación del genoma bacteriano con la sonda específica es necesario romper la doble hebra de ADN, lo que se suele conseguir aumentando la temperatura ¹¹.

Los biosensores también pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios, según el método de transducción empleado ^{12,13} es posible distinguir entre biosensores ópticos (fluorescentes, de resonancia de plasmón superficial, fibras ópticas), térmicos, piezoeléctricos (sensibles a la masa) y electroquímicos. Estos últimos, dependiendo de la propiedad electroquímica medida por el sistema de detección se pueden dividir en biosensores amperométricos (detectan cambios de corriente), potenciométricos (detectan cambios de potencial) o sensores conductométricos (detectan cambios de conductividad).

En los últimos años los biosensores electroquímicos han crecido considerablemente en importancia debido a que combinan la especificidad de los sistemas biológicos con las ventajas de los transductores electroquímicos: pueden operar en medios turbios, el instrumental es sencillo, su coste bajo y son compatibles con los procesos de miniaturización. Dentro de los biosensores electroquímicos, los más usados para la detección de patógenos son los sensores amperométricos ¹², estos se basan en la medida de la corriente generada por oxidación/reducción de un compuesto mientras el potencial suministrado, que actúa como fuerza impulsora para la transferencia de electrones, se mantiene constante. Normalmente se emplean electrodos de trabajo de metales nobles como puede ser el oro, de grafito o de formas modificadas de carbono como transductor y soporte de la fase sensora ¹³.

Sin embargo, la sensibilidad de este tipo de biosensores puede no ser suficiente para resolver el problema analítico planteado, siendo necesario amplificar la cantidad inicial de analito ¹¹. Para el caso de los sensores de ADN se suele incorporar una etapa previa de enriquecimiento por PCR o reacción en cadena de la polimerasa.



Pero desde un punto de vista instrumental, la necesidad de ciclos de temperatura y un control preciso de la misma también limita el empleo de la PCR a laboratorios centralizados. Para superar estos problemas, se han desarrollado diferentes métodos de amplificación isotérmica que emplean diversas estrategias para conseguir separar las hebras de ADN a una temperatura constante y que resultan más favorables para llevar a cabo el análisis *in situ* ^{14,15}. Algunos de los más usados son LAMP (*loop-mediated amplification* o amplificación mediada por bucle) y HDA (*helicase-dependent amplification* o amplificación dependiente de helicasa). De entre todos ellos, la amplificación isotérmica por recombinasa-polimerasa o RPA (del inglés *recombinase polymerase amplification*) resulta especialmente interesante debido a su naturaleza exponencial y a su esquema sencillo muy similar al de la PCR en el que participan tres proteínas: una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento, una proteína recombinasa (*Escherichia coli* RecA) y una proteína ligante de ADN de cadena sencilla (SSB); así como dos cebadores.

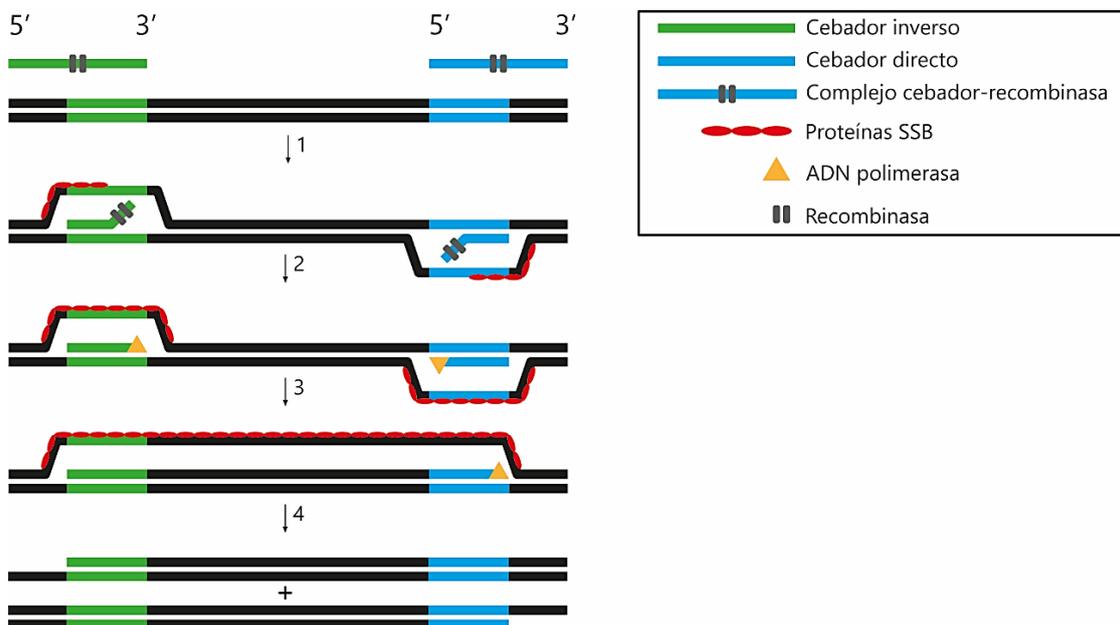


Figura 1. Esquema del proceso de amplificación mediante RPA. Figura adaptada de la referencia ¹⁶.

Típicamente, la reacción transcurre a 37°C y se inicia con la formación de complejos cebador-recombinasa (paso 1, Figura 1) que escanean la secuencia diana de doble hebra en busca de secuencias homólogas con el cebador para proceder al intercambio de hebras. Como consecuencia, se forman bucles de cadena sencilla que son estabilizados por proteínas SSB que interactúan con la hebra molde (paso 2, Figura 1). Posteriormente,



el desacoplamiento de la recombinasa deja libre el extremo 3' del cebador y permite la unión de una ADN polimerasa (paso 3, Figura 1) que empezará la elongación del cebador hasta replicar toda la hebra molde (paso 4, Figura 1). Este proceso se repite de manera cíclica consiguiendo la amplificación exponencial de la secuencia diana ^{17,18}. La metodología RPA fue descrita por primera vez en 2006 por Piepenburg *et al.* ¹⁶ y posteriormente patentada en 2010 ¹⁹.

2 OBJETIVO

El objetivo general que se plantea en este trabajo es el desarrollo de una plataforma sensora para la detección del patógeno alimentario *Salmonella* a través de su material genético. La estrategia a evaluar consiste en la integración de un sensor de ADN que posee amplificación enzimática de la señal y detección electroquímica con un método de amplificación isotérmica de la secuencia de ADN específica de la bacteria sobre una misma plataforma miniaturizada. Su empleo permitiría el control *in situ* de *Salmonella* en las distintas etapas de la cadena de producción alimentaria.

Los objetivos específicos que se plantean para lograr este fin son:

- 1.- Optimizar la construcción de la fase sensora, actuando sobre los parámetros que puedan afectar a su respuesta, particularmente aquellos involucrados en la etapa de bloqueo de la superficie sensora, crucial para evitar adsorciones inespecíficas.
- 2.- Evaluar las características de respuesta de la fase sensora mediante un ensayo de hibridación tipo sándwich con detección electroquímica empleando amplicones específicos de *Salmonella*.
- 3.- Integrar la plataforma sensora electroquímica con un método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos por recombinasa-polimerasa (RPA) que permita detectar el ADN genómico de la bacteria.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo han sido sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) y suministrados en su forma libre de sales. Todas las secuencias se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Nombre, función y secuencia de los oligonucleótidos empleados.

	Función	Nombre	Secuencia (5'→3')
Ensayo de hibridación	Sonda de captura	HS-SC	SH-CCG TTC TGA CGC TGG CCC ACT TCA C
	Sonda indicadora	SI-6FAM ^a	CC GGA CGA ATA TCG TCG TAA TGG CTG AAG GTG GAG TAC AGC AGA CC-6FAM
Generación diana 86 pb (PCR)	Cebador directo	CD ₂₃	GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AG
	Cebador inverso	CI ₂₂	TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T
Amplificación en superficie	Cebador inverso (inmovilizado)	HS-T ₁₅ -CI ₂₂	SH-(TTT TTT TTT TTT TTT) TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T
	Cebador directo (en disolución)	6FAM-CD ₂₄	6FAM-GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AGC
	Cebador inverso (en disolución)	CI ₂₂	TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T

^a 6FAM: 6-carboxifluoresceína; se trata de un fluoróforo muy utilizado como marca en oligonucleótidos ya que posee un grupo carboxilo fácil de conjugar al grupo fosfato del ADN.

El ADN genómico de *S. enterica* subsp. *enterica* se adquirió en forma liofilizada de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España); referencia CECT878. Se reconstituyó en agua Milli-Q ($5 \cdot 10^6$ UG/ μ L) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para purificar las muestras de PCR (obtención de la secuencia diana) se empleó el *kit* MiniElute PCR amplification de Qiagen (N.º cat. 28004) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Por otro lado, para llevar a cabo la amplificación por recombinasa-polimerasa se utilizó el *kit* TwistAmp[®] Basic de TwistDx.

Por último, en la Tabla 2 se recogen otros reactivos empleados en el trabajo.



Tabla 2. Reactivos empleados durante el desarrollo del presente trabajo.

Reactivo	Casa comercial	Pureza	N.º catálogo
Fragmento Fab antifluoresceína-peroxidasa (antiFITC-POD)	Roche	---	11426346910
<i>p</i> -aminotiofenol (<i>p</i> -ATP)	Sigma-Aldrich	97%	422967
Seroalbúmina bovina (BSA)	Sigma	≥ 98%	B4287
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	Sigma	≥ 99%	T0440
PBS-caseína	Sigma-Aldrich	---	37528
20× SSPE ^b	Sigma-Aldrich	---	S2015
10× PBS ^c	Sigma-Aldrich	---	P5493
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	≥ 98%	D0632
H ₂ SO ₄ concentrado	J.T. Baker	95-97%	Cas: 64-17-5
Etanol	J.T. Baker	Absoluto	Cas: 7664-93-9

^b Solución reguladora de fosfato 0,2 M de pH 7,4 con NaCl 2,98 M, AEDT 0,02 M y libre de ADNasas y ARNasas.

^c Solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 7,4 que contiene 1,54 M de NaCl, libre de ADNasas y ARNasas.

Las disoluciones utilizadas durante el transcurso de este trabajo se prepararon con agua MilliQ (Direct-Q, MilliPore), excepto que se indique lo contrario.

3.2 Instrumentación

Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 controlado por ordenador mediante el programa Nova 2.1 (EcoChemie) con un módulo multiplexor (MUX.MULTI4) y un conector (DRP-CAC8X, DropSens) que permite hacer 8 medidas secuenciales.

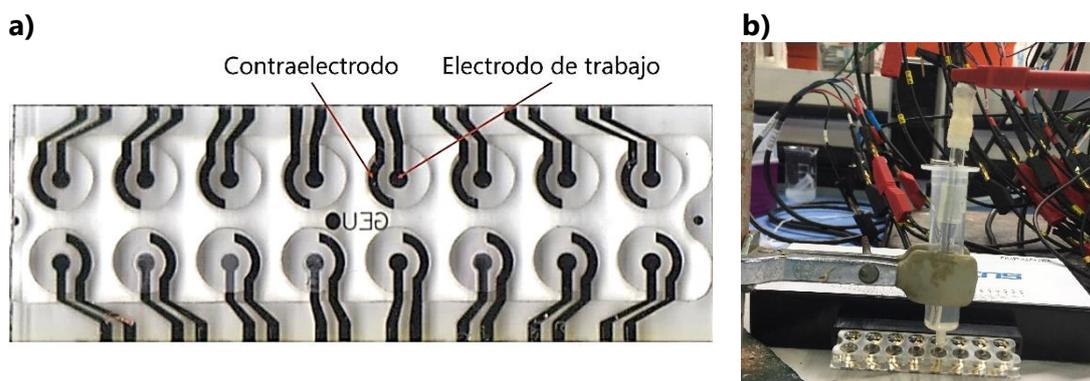


Figura 2. a) *Chip* de oro empleado para los diferentes ensayos en el que se pueden ver las 16 celdas delimitadas y los electrodos que componen cada una. **b)** Disposición del electrodo de referencia sobre una de las celdas del *chip* de oro.

Los ensayos se llevaron a cabo sobre *chips* que constan de 16 celdas electroquímicas delimitadas con una pieza de policarbonato y distribuidas en 2 filas, como se muestra en



la Figura 2a. Cada celda consta de un electrodo de trabajo de oro de 2 mm de diámetro, rodeado de un contraelectrodo o electrodo auxiliar del mismo metal. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo de Ag|AgCl|KCl (sat) aislado de la disolución de prueba mediante un puente salino de KNO₃ (3 M) en el interior de una jeringa, que se dispone sobre la parte superior de cada celda en contacto con la disolución que contiene (Figura 2b).

Para controlar la temperatura durante la reacción de hibridación de la secuencia diana y la sonda indicadora se empleó un termobloque (Eppendorf Thermomixer Comfort). Por su parte, para controlarla durante la amplificación mediante RPA se utilizó una estufa Heraus VT6025 de precisión $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

La medida espectrofotométrica de la concentración de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro GENESIS™ 10S (ThermoFisher Scientific).

3.3 Protocolos

3.3.1 Limpieza y pretratamiento del electrodo de trabajo

Antes de su utilización, el *chip* se lavó con etanol y agua (MilliQ) para eliminar restos del proceso de fabricación. A continuación, se sometió a un pretratamiento electroquímico en ácido sulfúrico 0,5 M consistente en 5 barridos cíclicos de potencial entre 0,2 y 1,6 V a una velocidad de 0,1 V/s. En la Figura 3 se muestra el voltagrama cíclico propio de una superficie de oro limpia.

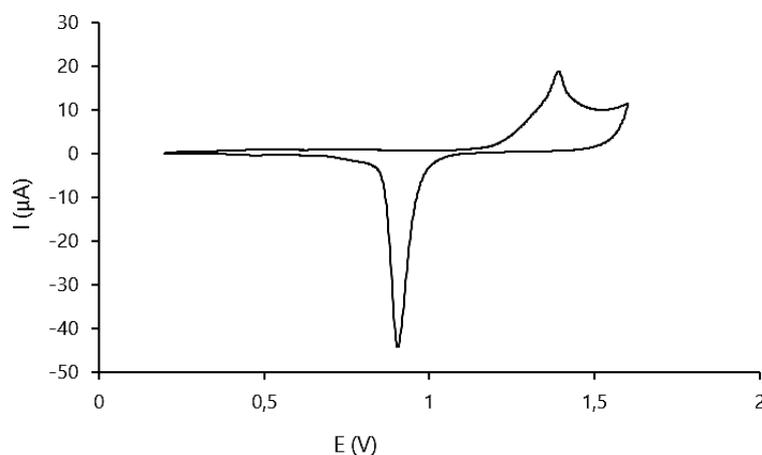


Figura 3. Voltagrama cíclico característico de una superficie de oro limpia. Electrolyte de fondo: H₂SO₄ 0,5 M. Velocidad de barrido 0,1 V/s.



3.3.2 Preparación de oligonucleótidos tiolados

Los oligonucleótidos tiolados son preparados comercialmente en forma de disulfuro por lo que para recuperar el grupo tiol es necesario realizar una etapa de reducción. Para ello se añadieron 100 μL de una disolución 0,1 M de ditioneitol (DTT) al vial que contenía el oligonucleótido. Esta mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 16 h, pasadas las cuales se añadieron 900 μL de agua y la disolución final se dejó pasar por una columna NAP-10 de Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) para aislar el oligonucleótido tiolado mediante exclusión por tamaños.

Finalmente, se determinó la concentración del oligonucleótido tiolado midiendo la absorbancia a 260 nm (absorción debida al carácter aromático de las bases púricas y pirimidínicas que conforman el ADN) y el valor obtenido junto con el coeficiente de extinción molar suministrado por la casa comercial permitió calcular la concentración aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

donde A es la absorbancia, ε el coeficiente de extinción molar (L/mol·cm), c la concentración del analito (mol/L) y l el paso óptico (cm).

3.3.3 Construcción de la fase sensora

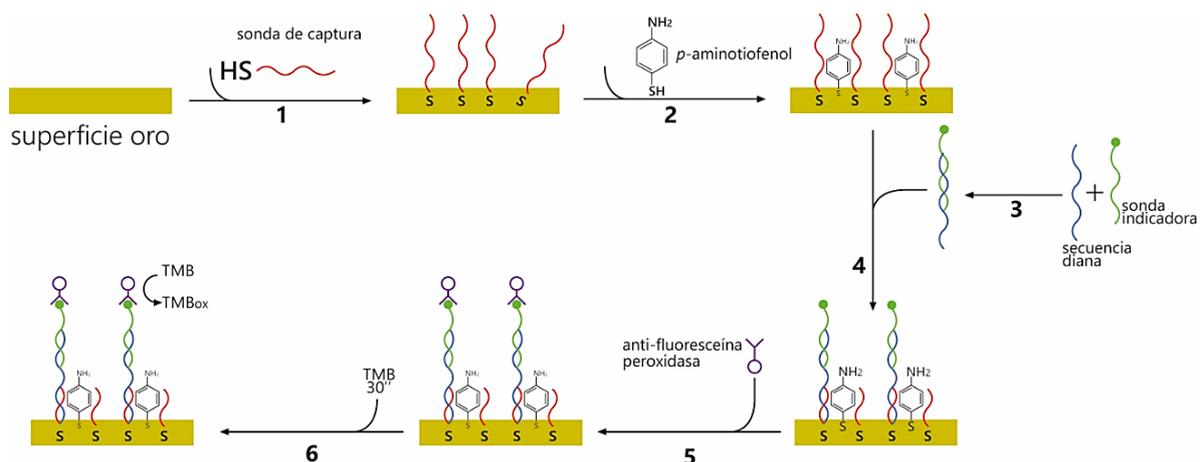


Figura 4. Esquema del genosensor de hibridación tipo sándwich. **(1)** Inmovilización de la sonda de captura. **(2)** Bloqueo de los sitios activos. **(3)** Hibridación homogénea. **(4)** Hibridación heterogénea. **(5)** Marcaje enzimático. **(6)** Reacción enzimática y detección electroquímica.

El procedimiento experimental de la formación de la fase sensora se detalla a continuación:



3.3.3.1 Inmovilización de la sonda de captura tiolada

Sobre el electrodo de oro limpio y acondicionado se depositaron 5 μL de una disolución 1 μM de sonda de captura tiolada, HS-SC, en 2 \times SSPE de pH 7,4; y se incubó durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ y atmósfera húmeda para evitar la evaporación de la disolución (paso 1, Figura 4).

Posteriormente, se lavó la superficie con el tampón 2 \times SSPE para retirar la sonda unida débilmente al oro y se secó con nitrógeno.

3.3.3.2 Bloqueo con *p*-aminotiofenol

A continuación, se bloqueó la superficie de oro libre con un compuesto tiolado inerte: *p*-aminotiofenol (*p*-ATP). Esta etapa tiene una doble función: evitar uniones inespecíficas de otros compuestos con el oro y conseguir que las sondas de ADN ancladas se orienten perpendicularmente a la superficie lo que favorecerá su posterior hibridación con la secuencia complementaria.

Para ello se depositó una disolución 0,25 mM de *p*-ATP en tampón 2 \times SSPE por toda la celda (40 μL) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min (paso 2, Figura 4). La concentración del compuesto tiolado en la disolución, así como el volumen de trabajo y el tiempo de interacción han sido optimizados en este trabajo.

Finalmente, tras la incubación se volvió a lavar con tampón 2 \times SSPE y se secó cada celda con corriente de N_2 .

3.3.4 **Etapa de hibridación**

Para detectar la secuencia diana se empleó un ensayo de hibridación tipo sándwich en dos pasos: hibridación homogénea e hibridación heterogénea.

3.3.4.1 Hibridación en fase homogénea

Inicialmente se llevó a cabo la hibridación homogénea entre la secuencia diana, D_{86} , en cantidad variable y la sonda indicadora marcada con 6-carboxifluoresceína (SI-6FAM) en concentración constante de 1 μM en disolución 2 \times SSPE.

Para ello, 25 μL de tampón 2 \times SSPE que contiene 2 μM de SI-6FAM y la secuencia diana (secuencia de ADN de doble cadena obtenida mediante amplificación PCR del genoma



bacteriano) se calentaron a 98°C durante 5 min para separar las dos hebras que forman el fragmento amplificado e inmediatamente después se introdujo en hielo durante 5 min para evitar la rehibridación del amplicón y favorecer su unión con la sonda indicadora. Una vez atemperada la disolución anterior, se añadieron 25 µL de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en 2× SSPE, de tal manera que las concentraciones iniciales se redujeron a la mitad (paso 3, Figura 4).

3.3.4.2 Hibridación en fase heterogénea

El dúplex SI-6FAM-D₈₆ generado en la etapa anterior se hizo interaccionar con la sonda de captura inmovilizada (paso 4, Figura 4). Para ello, se añadieron 3 µL de la disolución que resultó de la hibridación homogénea sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

3.3.5 **Marcaje enzimático**

El siguiente paso consiste en la incorporación de una marca enzimática: la enzima peroxidasa (POD) para revelar la etapa de hibridación (paso 5, Figura 4).

Tras un lavado con 2× SSPE y un acondicionamiento con tampón bloqueante 1x PBS de pH 7,4 y 1% (peso/volumen) de caseína durante 15 min, se procedió al marcaje de los dúplex formados en superficie mediante incubación con el conjugado fragmento Fab antifluoresceína-peroxidasa (0,5 U/mL) en la disolución bloqueante de caseína anterior (40 µL) durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

Transcurrido este tiempo, se realizó un nuevo lavado de la superficie con 2× SSPE para eliminar el conjugado enzimático no enlazado específicamente a la molécula de fluoresceína situada en el extremo 3' de la sonda indicadora.

3.3.6 **Detección electroquímica**

Las medidas cronoamperométricas se realizaron tras 30 s de reacción enzimática con 100 µL de una mezcla comercial que contiene los sustratos de la enzima (H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)), aplicando un potencial constante de 0 V durante 60 s, y tomando como señal la media de los 10 últimos segundos del cronoamperograma (paso 6, Figura 4).



3.3.7 Amplificación isotérmica RPA

En la amplificación isotérmica se empleó el *kit* TwistAmp[®] Basic (TwistDx). Este consta de una serie de viales con un liofilizado que contiene: dNTPs, adenosina trifosfato (ATP), polimerasa I de *Bacillus subtilis*, proteínas gp32 (proteínas SSB), uvsX (recombinasa) y uvsY (factor de carga de la recombinasa). Este liofilizado se resuspendió con 1× de tampón de rehidratación, incorporando 480 nM de los cebadores directo e inverso en disolución (6FAM-CD₂₄ y Cl₂₂, Tabla 1), así como cantidades variables de genoma de *Salmonella*. La reacción se inició añadiendo 14 mM de acetato de magnesio. La mezcla se añadió a uno de los pocillos del *chip* de oro y se cubrió con un adhesivo transparente para evitar la evaporación de la misma. La amplificación se llevó a cabo en una estufa a 37°C durante 40 min.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como alternativa a los métodos clásicos de cultivo, en este trabajo se propone el desarrollo de un método de control de *Salmonella* que emplea el material genético del microorganismo para su detección ya que presenta una secuencia de ADN específica que permite su identificación inequívoca y que se utilizó como molécula diana. Para su detección se diseñó una fase sensora capaz de reconocer el fragmento de ADN característico de la especie patógena, utilizando la reacción de hibridación entre hebras de ADN complementarias como reacción de reconocimiento molecular.

4.1 Selección de la secuencia diana

Se han descrito una serie de genes implicados en la infectividad y virulencia de las distintas especies de *Salmonella* que podrían ser óptimos para su empleo como secuencia diana a detectar. Sin embargo, muchos de estos genes están sometidos a variabilidad por mutaciones silenciosas en alguno de sus codones, lo que implica que las secuencias no se mantengan entre las distintas especies²⁰. Con el fin de aumentar la eficiencia empleando regiones más conservadas se ha seleccionado como gen diana el gen *bipA* o *typA*. Se trata de un gen regulador muy conservado en todas las especies de *Salmonella*²⁰ cuya secuencia de nucleótidos aparece recogida en la base de datos del GenBank²¹ y cuyo número de acceso es AE006468.2. Concretamente, se empleó un



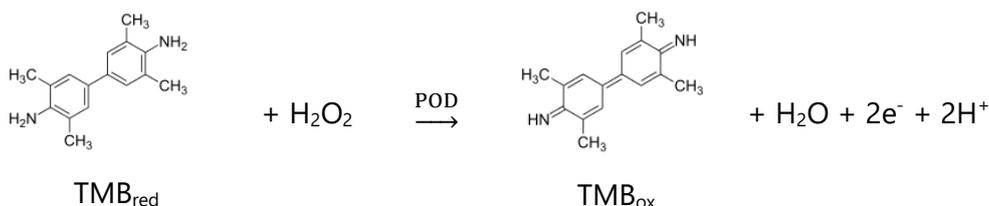
fragmento de 86 nucleótidos de longitud cuyas bases están comprendidas entre los números 4218770 y 5218855, ambos inclusive. La elección de este fragmento se realizó en base a publicaciones previas ²⁰ donde demuestran su especificidad para detectar todas las especies de *Salmonella* patógenas.

Para desarrollar el ensayo de hibridación se empleó como secuencia diana el fragmento de doble cadena de 86 pb obtenido mediante amplificación por PCR ²⁰ del genoma de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, utilizando los cebadores CD₂₃ y Cl₂₂ descritos en la Tabla 1.

4.2 Condiciones experimentales de medida

Para transformar la señal química derivada de la reacción de reconocimiento (reacción de hibridación) en una señal eléctrica medible, se seleccionó un método cronoamperométrico que se caracteriza por ser sencillo y rápido. Como molécula indicadora se utilizó una enzima debido a su enorme poder amplificador de la señal. Por su disponibilidad comercial, bajo coste y elevado número de recambio se escogió la peroxidasa (POD). Esta enzima cataliza la oxidación de muchos sustratos como la bencidina y otras aminas aromáticas. Sin embargo, la bencidina es carcinogénica por lo que se buscaron compuestos menos dañinos. Así, en 1974 se sintetizó el compuesto 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en el cual los grupos amino están protegidos por metilación en las posiciones del anillo adyacentes y hacen que el compuesto sea más inocuo, además de aumentar la sensibilidad ²².

En la oxidación de la TMB catalizada por la peroxidasa en presencia de H₂O₂ se produce un compuesto azul (TMB_{ox}) según la reacción que se puede ver en el Esquema 1 ²³.

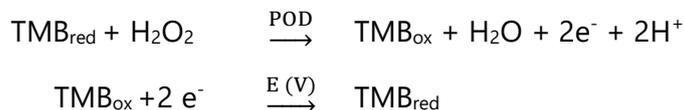


Esquema 1. Reacción de oxidación del TMB catalizada por la peroxidasa en presencia de H₂O₂.

La actividad enzimática de la peroxidasa se puede determinar electroquímicamente aplicando un potencial adecuado que permita reducir la TMB oxidada por la enzima



(TMB_{ox}) a su forma reducida (TMB_{red}) (ver Esquema 2), generándose una corriente catódica que es la señal analítica. La técnica electroquímica de medida fue la cronoamperometría en la que fijando un potencial constante se mide la intensidad de corriente durante un tiempo determinado ²⁴.



Esquema 2. Reacciones que tienen lugar en los procesos enzimáticos y electroquímicos, que ocurren en la superficie del electrodo.

El potencial que se ha de aplicar al sistema debe permitir la reducción completa de la TMB oxidada por la enzima peroxidasa. Para seleccionar este potencial se estudió el comportamiento electroquímico del sustrato TMB mediante voltametría cíclica, esta técnica se utiliza para estudiar especies electroactivas y consiste en aplicar al electrodo de trabajo una variación lineal de potencial de manera cíclica para medir la corriente resultante ²⁴. En este caso se hizo un barrido cíclico de potencial entre -0,2 y 1,2 V a una velocidad de barrido de 0,1 V/s. En la Figura 5 se puede observar el voltograma obtenido, el cual nos permite fijar el valor de potencial para realizar la cronoamperometría en 0 V ya que a ese potencial la TMB se encuentra completamente reducida.

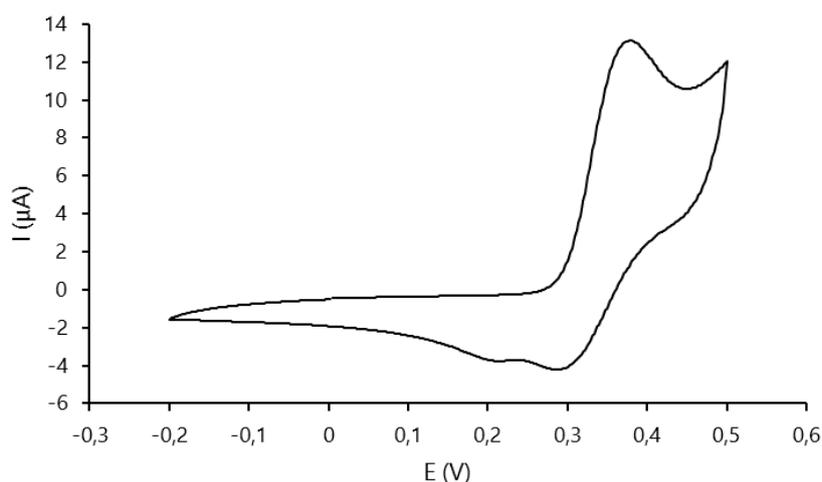


Figura 5. Voltograma cíclico de la TMB sobre electrodo de oro. Velocidad de barrido 0,1 V/s.



4.3 Diseño del genosensor

4.3.1 Selección de la sonda de captura e indicadora

Como se muestra en la Figura 4, el formato del ensayo seleccionado precisa diseñar dos secuencias de ADN complementarias a distintas regiones de la secuencia diana, de las cuales una actúa como sonda de captura, y se inmoviliza en la superficie de oro, y la otra como sonda indicadora.

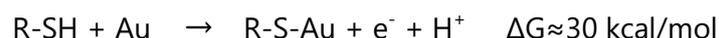
Para seleccionar las secuencias de captura e indicadora se debe considerar también sus estructuras secundarias que han de ser termodinámicamente desfavorables respecto a la reacción de hibridación. Con este criterio se divide la secuencia diana en dos partes, de manera que las sondas de captura e indicadora sean complementarias a cada una de ellas.

En el Anexo I se muestran las estructuras secundarias de la sonda de captura e indicadora, así como su energía libre de Gibbs, proporcionadas por el programa mfold²⁵.

La sonda de captura, HS-SC, está marcada con un tiol en 5' para su inmovilización en la superficie del electrodo de oro y la sonda indicadora, SI-6FAM, con 6-carboxifluoresceína en 3' para el posterior marcaje enzimático (ver secuencias en Tabla 1).

4.3.2 Optimización de la construcción de la fase sensora

Uno de los métodos más frecuentemente empleados para el anclaje de ADN sobre superficies sólidas que permite una inmovilización orientada es la formación de monocapas autoensambladas o SAMs (del inglés *self-assembled monolayers*). Entre las opciones existentes, la más utilizada es la unión oro-azufre que supone emplear un electrodo de oro como soporte sólido y secuencias de ADN modificadas con un grupo tiol^{26,27}.



Mediante este método se consiguen películas resistentes y estables termodinámicamente por inmersión del sustrato de oro en una disolución que contiene la hebra tiolada. Este proceso se denomina quimisorción.



Durante la formación de la monocapa, la hebra de ADN se une a la superficie de oro mediante el grupo tiol terminal; sin embargo, los átomos de nitrógeno de las bases del ADN también poseen cierta afinidad por el oro. Para eliminar estas interacciones entre los nucleótidos y el electrodo de oro, dejando el ADN enlazado a través del grupo tiol terminal, se emplea un compuesto tiolado que permite modular la densidad superficial del ADN y bloquea los sitios libres sobre la superficie del metal, minimizando la unión inespecífica de otras moléculas como proteínas. El tiol bloqueante más utilizado en la literatura es el 6-mercapto-1-hexanol ²⁸, si bien el grupo de investigación receptor (Grupo Electroanálisis Universidad de Oviedo, GEUO) ha demostrado que el empleo de tioles aromáticos como el *p*-aminotiofenol (*p*-ATP) puede ser más beneficioso ²⁹.

Por tanto, en este trabajo se desarrolló una fase sensora obtenida por quimisorción de la sonda de captura modificada con un grupo tiol en su extremo 5' y posterior bloqueo con *p*-ATP (Figura 4). Esta fase sensora se preparó de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 3.3 optimizando distintos parámetros relacionados con la etapa de bloqueo y se evaluó la respuesta del genosensor siguiendo el ensayo descrito en la Figura 4 para distintas concentraciones del producto de amplificación específico D₈₆. En paralelo se llevó a cabo un control negativo o blanco, en ausencia de D₈₆, que permite determinar la señal debida a interacciones inespecíficas con la fase de reconocimiento.

Se comenzó incubando el electrodo de trabajo de oro previamente modificado con la sonda tiolada con 3 μ L de una disolución 1 mM de *p*-ATP durante 50 min a temperatura ambiente. Estas condiciones de partida se escogieron a partir de trabajos previos ³⁰. Tras completar el ensayo de hibridación con detección electroquímica se obtuvieron altas intensidades de corriente para el control negativo con bastante irreproducibilidad (Figura 6a). Esto se podría atribuir a interacciones inespecíficas del conjugado enzimático con el contraelectrodo de oro que no ha sido bloqueado y que se encuentra muy próximo al electrodo de trabajo (ver Figura 2a), por ello, las disoluciones empleadas en la modificación del electrodo de trabajo podrían alcanzar en mayor o menor medida el contraelectrodo contribuyendo al aumento de la señal registrada.

Tratando de evitar este problema se incubó toda la celda (también el contraelectrodo) con la disolución de 1 mM de *p*-ATP durante 50 min empleando 40 μ L en lugar de 3 μ L.



De esta manera se consiguió reducir la señal del blanco, aunque distintas concentraciones de D₈₆ dieron lugar a señales muy similares para todas ellas que apenas duplicaban la señal del blanco (Figura 6b). Estos resultados podrían indicar el desplazamiento de la sonda de captura durante la etapa de bloqueo con *p*-ATP que reduciría la cantidad de receptor inmovilizado sobre oro y, en consecuencia, la sensibilidad del genosensor.

Este fenómeno ha sido previamente descrito para la formación de SAMs mixtas, empleando concentraciones y tiempos de incubación similares a los aquí descritos, aunque en mucha menor extensión³¹. El mayor desplazamiento de la sonda de captura tiolada que aquí se observa se debería, muy probablemente, al aumento de la relación volumen de disolución de *p*-ATP/ superficie sensora (V/S). Para una misma superficie sensora (área del electrodo de trabajo 0,03 cm²) se ha pasado de utilizar 3 μL de disolución de *p*-ATP a 40 μL, manteniendo la misma concentración y tiempo de incubación.

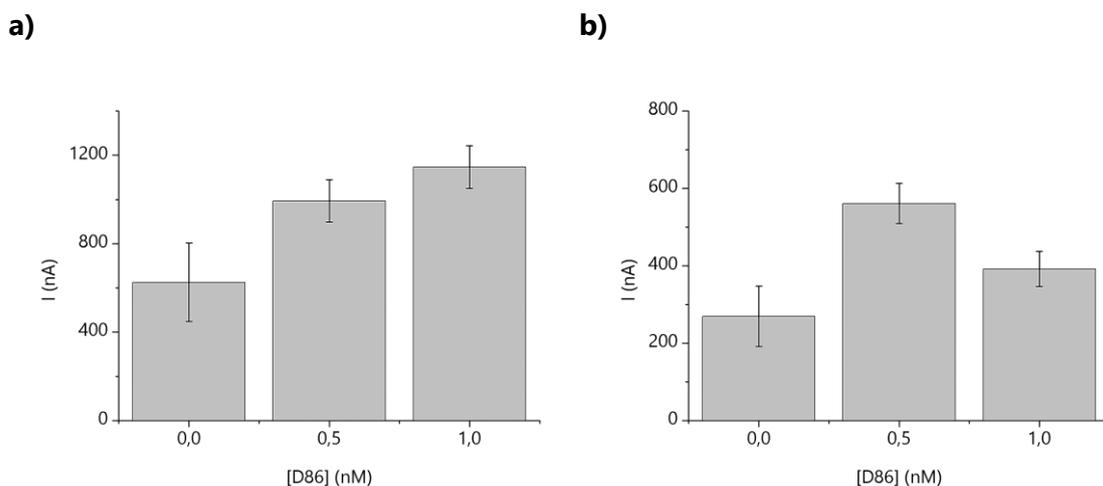


Figura 6. Optimización de la etapa de bloqueo con *p*-aminotiofenol. Efecto del volumen de disolución para el mismo área de fase sensora: **a)** 3 μL **b)** 40 μL, empleando 1 mM de *p*-ATP durante 50 min.

A la vista de los resultados, se estudió el efecto del tiempo de incubación con la disolución de *p*-ATP (1 mM), empleando 40 μL para cubrir toda la celda ya que, como ya se ha comentado, de esta forma se minimizaban las uniones inespecíficas (la señal del control negativo se redujo en un 43%). De acuerdo con la Figura 7a, la disminución del tiempo de incubación con el tiol bloqueante no afecta de manera significativa a la señal registrada electroquímicamente.



A continuación, se estudió el efecto de la concentración de *p*-ATP fijando un tiempo de incubación de 30 min y un volumen de disolución de 40 μ L. Como se aprecia en la Figura 7b, al reducir la concentración de *p*-ATP en la disolución de bloqueo se consigue aumentar la relación señal/blanco debido a un menor desplazamiento de la sonda tiolada previamente quimisorbida. En base a estos resultados, se seleccionó una concentración de *p*-ATP de 0,25 mM, ya que proporciona una mayor relación señal/blanco y una mayor reproducibilidad de las medidas.

Por consiguiente, las condiciones óptimas fijadas para la etapa de bloqueo con *p*-aminotiofenol fueron 30 min de incubación con una disolución 0,25 mM cubriendo toda la celda con 40 μ L.

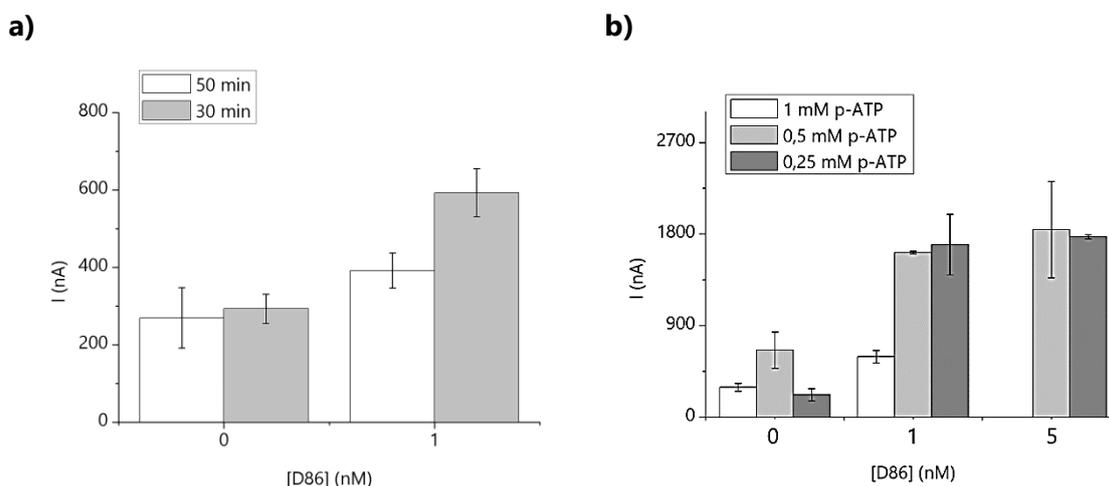


Figura 7. Optimización de la etapa de bloqueo con *p*-aminotiofenol. **a)** Efecto del tiempo de incubación empleando 40 μ L de 1 mM de *p*-ATP. 50 min (blanco) 30 min (gris). **b)** Efecto de la concentración de *p*-ATP: 1 mM (blanco); 0,5 mM (gris claro); 0,25 mM (gris oscuro); incubando 40 μ L de disolución durante 30 min.

Con el fin de evaluar las características analíticas del genosensor desarrollado (límite de detección, intervalo de respuesta lineal y reproducibilidad), aplicando las condiciones optimizadas, se ensayaron cantidades crecientes de amplicón D_{86} en un intervalo de concentraciones entre 100 pM y 5 nM.

En la Figura 8a se representa la respuesta del genosensor frente a la concentración de D_{86} . Se obtuvo una relación lineal entre la intensidad de corriente registrada y la concentración de secuencia diana en el intervalo (0,1-1) nM siendo la ecuación de calibración:

$$I \text{ (nA)} = (1441 \pm 50) \cdot [D_{86}] \text{ (nM)} + (268 \pm 26); R = 0,998$$



Para concentraciones de D_{86} superiores a 1 nM no se observaron cambios en la intensidad de corriente, lo que indica la saturación del sistema (como se puede ver para la concentración de 5 nM en la Figura 8a).

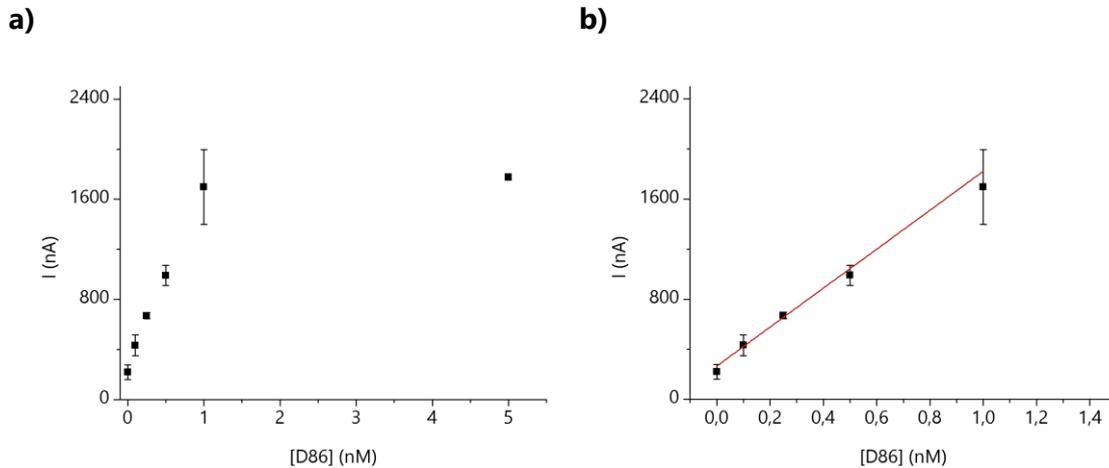


Figura 8. a) Representación de la intensidad de corriente frente a las distintas concentraciones de secuencia diana. **b)** Calibrado del proceso de hibridación tipo sándwich. Se representan la intensidad de corriente en valor absoluto respecto a cada una de las concentraciones de secuencia diana empleadas. Las barras representan la desviación estándar de los datos y la línea roja la tendencia de regresión lineal.

La reproducibilidad obtenida, expresada como coeficiente de variación promedio es de un 13%. El límite de detección del sistema calculado como tres veces la desviación estándar del blanco entre la pendiente de la ecuación de regresión ³² es 123 pM. Aunque este valor es similar a los encontrados en la literatura para otros genosensores de hibridación tipo sándwich (9 pM para una secuencia diana de 80 pb ³⁰), no alcanza los exigentes umbrales de detección que la legislación demanda para su implantación en la industria alimentaria.

Para superar este problema se trató de integrar en la plataforma sensora un método de amplificación de ADN isotérmico. De entre todas las variantes isotérmicas de PCR descritas en la literatura, debido a su sencillez y versatilidad, se seleccionó la amplificación por recombinasa-polimerasa o RPA, cuyo fundamento se detalla en la introducción de este trabajo.

4.4 Amplificación RPA en superficie: diseño y optimización

Con el fin de obtener dispositivos sensores capaces de operar en el punto de necesidad, es decir, que no requieran de laboratorios especializados para su implementación, se



trató de diseñar una plataforma sensora capaz de integrar la amplificación isotérmica de la secuencia diana y su detección electroquímica. Esto conlleva la puesta a punto de la metodología RPA sobre superficies de oro, es decir, la extensión de uno de los cebadores directamente sobre la superficie de detección. Para ello se ensayó la estrategia de amplificación isotérmica que se muestra en la Figura 9.

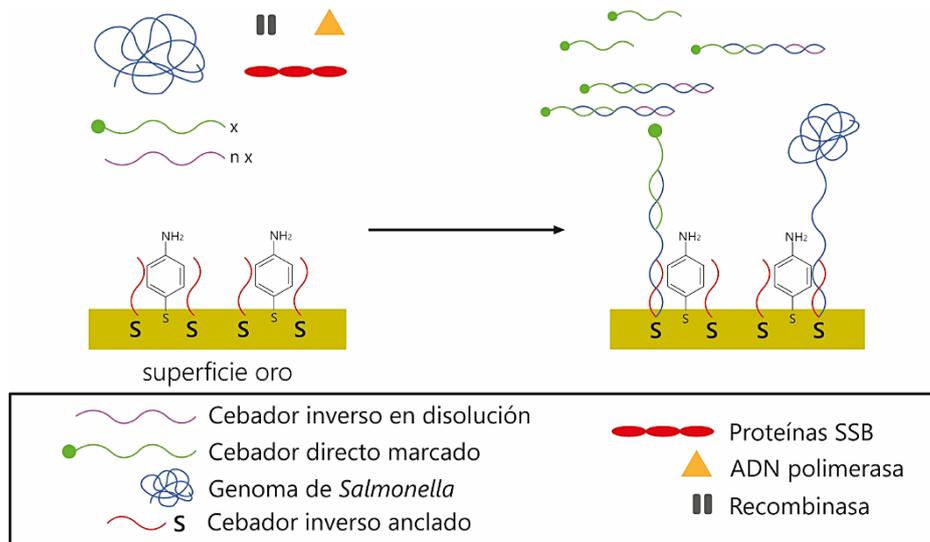


Figura 9. Esquema de amplificación mediante recombinasa-polimerasa en superficie. La amplificación se inicia en disolución y los amplicones generados hibridan con el cebador anclado que es elongado en superficie por la enzima polimerasa. Se distinguen tres casos (a) amplificación con un cebador en disolución: $n=0$; (b) amplificación con dos cebadores en disolución en relación asimétrica: $0 < n < 1$; (c) amplificación con dos cebadores en disolución en relación simétrica: $n=1$.

Según la estrategia representada arriba, el cebador inverso se encuentra quimisorbido sobre la superficie de oro a través de su extremo 5'. El cebador directo marcado con fluoresceína y el genoma de *Salmonella* se incorporan a la disolución, así como las enzimas necesarias para la amplificación RPA. En estas condiciones se distinguen dos etapas de amplificación. En la primera, el proceso de amplificación en fase líquida acorta el genoma de *Salmonella* generando amplicones modificados con 6FAM. Éstos, en una segunda etapa, hibridan con el cebador inverso inmovilizado sobre el *chip* de oro, que se extiende por acción de la polimerasa.

Transcurrido el tiempo de amplificación fijado, los dúplex de ADN generados sobre la superficie de oro y marcados con 6FAM pueden detectarse cronoamperométricamente, tras una etapa de marcaje con el conjugado enzimático antiFITC-POD. Tanto la etapa de



marcaje enzimático como la de detección se desarrollarán de manera análoga a lo descrito previamente para el ensayo sándwich (apartado 4.2)

4.4.1 Diseño de cebadores para RPA

De manera general, el diseño de los cebadores empleados en las metodologías de amplificación de ADN es un aspecto muy importante. Sin embargo, a diferencia de las numerosas reglas que existen para diseñar cebadores de PCR o HDA, en el caso de la RPA se recomienda únicamente el empleo de cebadores de entre 30 y 35 nucleótidos de longitud. No obstante, algunos trabajos de RPA descritos en la literatura con cebadores propios de PCR (en torno a 18 nucleótidos de longitud) han proporcionado resultados satisfactorios³³.

Por este motivo, en este trabajo se adaptaron los cebadores de PCR empleados previamente en la obtención del amplicón D₈₆, utilizado como diana en el ensayo sándwich, para la amplificación RPA sobre superficies de oro. El cebador directo se modificó en su extremo 5' con una molécula 6FAM para su posterior marcaje enzimático (6FAM-CD₂₄, Tabla 1), mientras que el cebador inverso se marcó en 5' con un grupo tiol permitiendo su inmovilización sobre los electrodos de oro. Además, entre la secuencia de bases del cebador inverso y el grupo SH se introdujo un espaciador de 15 timinas (HS-T₁₅-Cl₂₂, Tabla 1). Esto contribuye a que el cebador esté más accesible y que su hibridación con la diana se vea favorecida³⁴.

Por tanto, la nueva fase sensora se obtiene por quimisorción del cebador inverso HS-T₁₅-Cl₂₂ sobre el electrodo de trabajo de oro del *chip*, y el resto de superficie metálica libre se bloquea con *p*-aminotiofenol según el procedimiento optimizado en el apartado 4.3.1 para el ensayo de hibridación, empleando el cebador inverso en lugar de la sonda de captura.

4.4.2 Optimización de las condiciones para RPA

A continuación, se procedió a la optimización de las condiciones de amplificación isotérmica en superficie empleando la fase sensora descrita anteriormente, y los amplicones resultantes inmovilizados sobre el soporte de oro se detectaron por cronoamperometría a 0 V, tras el marcaje con la enzima peroxidasa. Además de ensayar



distintas cantidades de genoma de *Salmonella* expresadas en unidades genómicas (UG), en paralelo, se evaluó un control negativo o blanco en el cual no se añadió genoma de *Salmonella*.

Inicialmente se llevó a cabo la amplificación RPA empleando únicamente el cebador directo, 6FAM-CD₂₄, en disolución en concentración 480 nM a 37°C durante 40 minutos. Estas condiciones son las recomendadas por el *kit* TwistAmp® Basic de TwistDx utilizado a lo largo de este trabajo.

Como se observa en la Figura 10a, se obtuvieron valores de intensidad de corriente muy bajos tanto para el control negativo como para altas concentraciones de genoma de *Salmonella* (10⁷ UG) lo que parece indicar que no se produce ningún tipo de amplificación. Aunque se han descrito algunos ejemplos de RPA en superficie empleando un único cebador en la disolución^{35,36}, el tiempo total del análisis es significativamente elevado.

Posteriormente, tomando como referencia recomendaciones establecidas para lograr una amplificación mediante PCR en superficie exitosa³⁴, se decidió incorporar a la disolución de amplificación no sólo el cebador directo 6FAM-CD₂₄, sino también una pequeña cantidad de cebador inverso sin marcar CI₂₂. De esta manera, la amplificación comienza en fase líquida y, una vez el cebador CI₂₂ se agota, la amplificación continúa en superficie. Concretamente se fijó la concentración de 6FAM-CD₂₄ en 480 nM y se evaluó la amplificación en presencia de una concentración 10 veces menor de CI₂₂ en disolución.

Como refleja la Figura 10b, las intensidades de corriente aumentaron ligeramente con respecto al caso anterior, aunque tampoco fue posible diferenciar entre controles negativos y distintas concentraciones de genoma de *Salmonella*. Esta relación de cebadores en disolución 1:10 ha sido recientemente descrita como óptima por Kersting *et al.*³⁷ para amplificación RPA sobre una superficie de vidrio, por tanto, la química de inmovilización del cebador es diferente a utilizada en este trabajo, y también la detección ya que empleaban medidas de fluorescencia.



Por último, se evaluó la amplificación RPA de *Salmonella* sobre la superficie de oro empleando una relación simétrica de ambos cebadores en disolución, es decir, 480 nM de 6FAM-CD₂₄ y Cl₂₂. En estas condiciones y de acuerdo con la Figura 10c se obtuvieron intensidades de corriente claramente diferentes entre el blanco y distintas concentraciones de genoma de *Salmonella*, llegándose a distinguir hasta 10³ UG. Si bien, no se puede afirmar que éste sea el límite de detección del método ya que no fue posible explorar cantidades inferiores de genoma bacteriano. Aun así, comparando con otros estudios de identificación de patógenos mediante RPA en superficie y detección electroquímica, se han descrito límites de detección de 10⁵ UG³⁵ y 10³ UG³⁶, lo que pone de manifiesto los buenos resultados obtenidos en este trabajo.

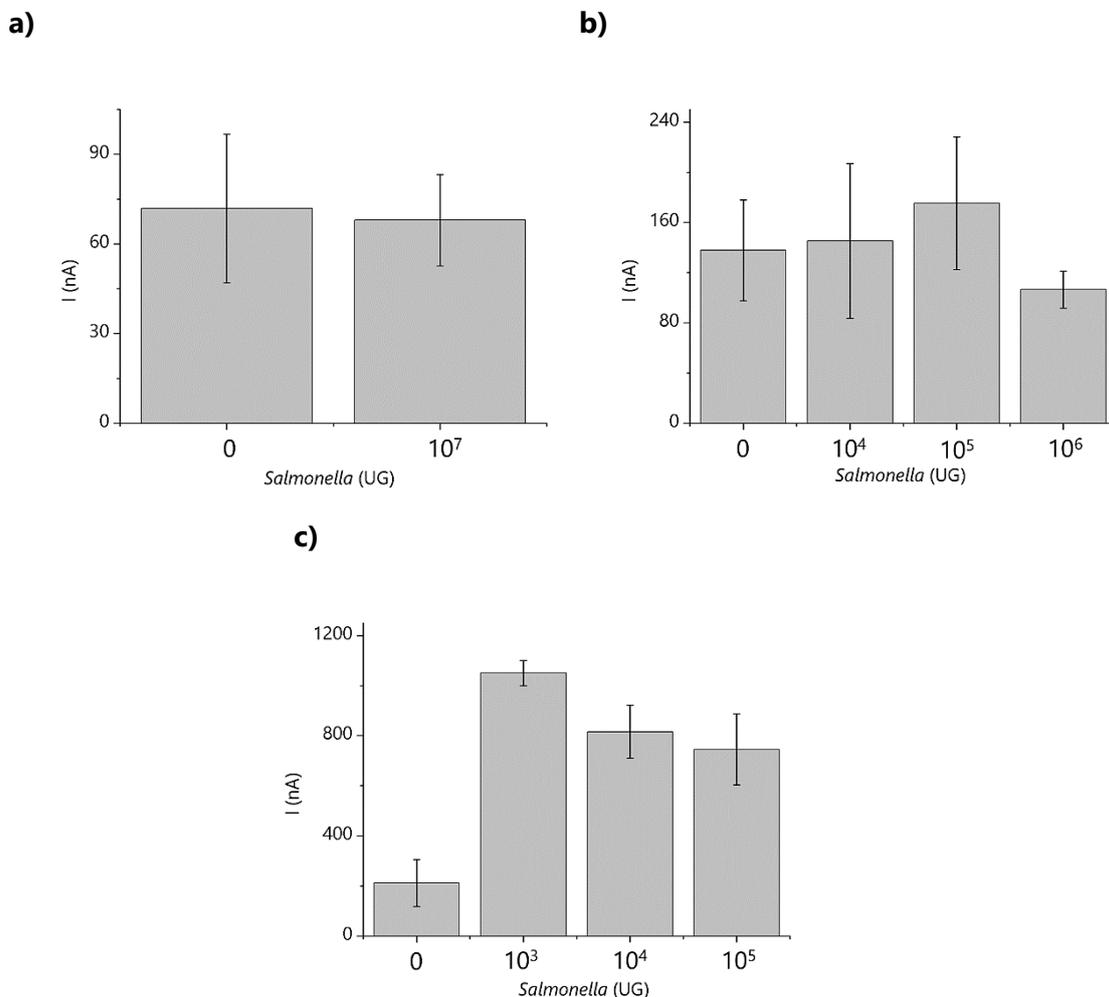


Figura 10. Efecto de la concentración de cebadores en la RPA en superficie. **a)** 480 nM del cebador directo en disolución, 6FAM-CD₂₄. **b)** Relación asimétrica 1:10 de cebadores (480 nM del directo, 6FAM-CD₂₄, y 48 nM del inverso, Cl₂₂). **c)** Relación simétrica de cebadores (480 nM 6FAM-CD₂₄ y 480 nM Cl₂₂).



En la figura 10c también se observa que la intensidad de corriente decae ligeramente (teniendo en cuenta la reproducibilidad de las medidas) para cantidades de genoma más altas. Esto podría apuntar a que alguna de las enzimas necesarias para llevar a cabo la amplificación RPA podría verse afectada negativamente en presencia de altas cantidades de ADN.

Por último, con el fin de mejorar los resultados obtenidos se proponen las siguientes líneas de actuación de cara a trabajos futuros:

a.- En este trabajo, la relación simétrica o 1:1 de cebadores en disolución fue la más favorable, resultado que coincide con el obtenido por Santiago-Felipe *et al.*³⁸ quienes evaluaron comparativamente distintas relaciones de cebadores en disolución para llevar a cabo RPA en superficie. Se propone mantener esta relación de cebadores en la mezcla de amplificación.

b.- Los experimentos de RPA en superficie aquí descritos han sido realizados en su totalidad a 37°C. Sin embargo, se plantea la posibilidad de modificar la temperatura entre 37°C (valor óptimo descrito en la patente) y 40°C (máximo valor tolerado por las enzimas) con el fin de disminuir la señal del blanco relacionada, muy probablemente, con interacciones inespecíficas entre cebadores o de éstos con el genoma fuera de la región específica de interés.

c.- Estudiar el efecto del tiempo de amplificación isotérmica en superficie tratando de maximizar la relación señal/blanco, al tiempo que se minimiza el tiempo total del ensayo.

5 CONCLUSIONES

En este proyecto se ha desarrollado una plataforma sensora para la detección electroquímica de una secuencia de ADN específica del patógeno *Salmonella* presente en el gen *bipA*, como alternativa a los métodos convencionales de cultivo microbiológico.

Mediante un ensayo de hibridación tipo sándwich con amplificación enzimática de la señal y detección electroquímica del producto generado enzimáticamente se han optimizado varios parámetros que afectan a la construcción de la fase sensora sobre *chips* de oro. Este ensayo permite detectar amplicones específicos de *Salmonella*, de



doble cadena y 86 pares de bases, en el intervalo entre 100 pM y 1 nM con un límite de detección de 123 pM y una reproducibilidad media del 13%.

La integración en la plataforma de detección anterior de un método de amplificación de ADN isotérmico por recombinasa-polimerasa (RPA), empleando cebadores propios de PCR y una relación 1:1 de los mismos en disolución, hace posible detectar en poco más de una hora (70 min) 10^3 unidades genómicas de *Salmonella*. El límite de detección evaluado experimentalmente es menor de 10^3 UG, pues esta cantidad de genoma bacteriano fue detectada con un alto margen de señal: una relación señal/blanco de 5.

Por ello, el método desarrollado estaría próximo a los umbrales de detección demandados por la legislación.

6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, Doyle J, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM (2008). Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7060-7067.
- 2 Wu W, Zeng L (2017). Current and Emerging Innovations for Detection of Food-Borne *Salmonella*. In *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*. InTech.
- 3 WHO: World Health Organization [Internet]. Ginebra: Food Safety Department [actualizado Dic 2016; consultado 17 abril 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
- 4 ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Ginebra.
- 5 FDA (2011). BAM *Salmonella* [consultado 20 abril 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>
- 6 Zhang G, Thau E, Brown EW, Hammack TS (2013). Comparison of a novel strategy for the detection and isolation of *Salmonella* in shell eggs with the Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual method1. *Poultry Science*, 92(12), 3266-3274.
- 7 Maciorowski KG, Herrera P, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC (2006). Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in animal feeds—a review. *Veterinary Research Communications*, 30(2), 127-137.
- 8 Ricke SC, Pillai SD, Norton RA, Maciorowski KG, Jones FT (1998). Applicability of rapid methods for detection of *Salmonella* spp. in poultry feeds: a review. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 6(4), 239-258.



- 9 Mikkelsen SR, Cortón E (2004). Biosensors. En Mikkelsen SR, Cortón E (Ed. 1) *Bioanalytical chemistry* (131-149). Hoboken, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- 10 Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal Of Food Technology*, 6(2), 87-102.
- 11 Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E, Stricker S (2000). Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis*, 12(5), 317-325.
- 12 Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), 232-254.
- 13 Leonard P, Hearty S, Brennan J, Dunne L, Quinn J, Chakraborty T, O'Kennedy R (2003). Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 3-13.
- 14 Li J, Macdonald J (2015). Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 196-211.
- 15 Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C (2015). Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev*, 115(22), 12491-12545.
- 16 Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 4(7), e204.
- 17 Song J, Liu C, Mauk MG, Rankin SC, Lok JB, Greenberg RM, Bau HH (2017). Two-Stage Isothermal Enzymatic Amplification for Concurrent Multiplex Molecular Detection. *Clinical chemistry*, 63(3), 714-722.
- 18 James A, Macdonald J (2015). Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(11), 1475-1489.
- 19 Piepenburg O, Williams CH, Armes NA, Stemple DL (2010). *U.S. Patent No. 7,666,598*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 20 Calvó L, Martínez-Planells A, Pardos-Bosch J, Garcia-Gil LJ (2008). A new real-time PCR assay for the specific detection of *Salmonella* spp. targeting the *bipA* gene. *Food Analytical Methods*, 1(4), 236-242.
- 21 Base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [consultado 23 junio 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 22 Josephy PD, Eling T, Mason RP (1982). The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3669-3675.
- 23 Volpe G, Draisci R, Palleschi G, Compagnone D (1998). 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst*, 123(6), 1303-1307.
- 24 Strobel HA, Heineman WR (1989). *Chemical instrumentation: a systematic approach* (Ed. 3). Nueva York, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- 25 Zuker M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.

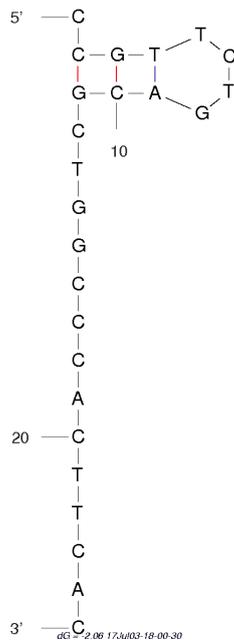


- 26 Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105(4), 1103-1170.
- 27 Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, 108(1), 109-139.
- 28 Herne TM, Tarlov MJ (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 119(38), 8916-8920.
- 29 Miranda-Castro R, Sánchez-Salcedo R, Suárez-Álvarez B, de-los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ (2017). Thioaromatic DNA monolayers for target-amplification-free electrochemical sensing of environmental pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 162-170.
- 30 Moura-Melo S, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Alvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Dos Santos Junior JR, da Silva Fonseca RA, Lobo-Castañón MJ (2015). Targeting helicase-dependent amplification products with an electrochemical genosensor for reliable and sensitive screening of genetically modified organisms. *Analytical chemistry*, 87(16), 8547-8554.
- 31 Georgiadis R, Peterlinz KP, Peterson AW (2000). Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 122(13), 3166-3173.
- 32 Shrivastava A, Gupta V (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21-21.
- 33 TwistDX. Using PCR primers with standard Recombinase Polymerase Amplification reagents [consultado 19 junio 2017]. Disponible en: <https://www.twistdx.co.uk/en/rpa/using-pcr-prime>
- 34 Hoffmann J, Hin S, von Stetten F, Zengerle R, Roth G (2012). Universal protocol for grafting PCR primers onto various lab-on-a-chip substrates for solid-phase PCR. *RSC Advances*, 2(9), 3885-3889.
- 35 del Río JS, Svobodova M, Bustos P, Conejeros P, O'Sullivan CK (2016). Electrochemical detection of *Piscirickettsia salmonis* genomic DNA from salmon samples using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(30), 8611-8620.
- 36 del Río JS, Adly NY, Acero-Sánchez JL, Henry OY, O'Sullivan CK (2014). Electrochemical detection of *Francisella tularensis* genomic DNA using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 674-678.
- 37 Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Roseneck M (2014). Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochimica Acta*, 181(13-14), 1715.
- 38 Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Morais S, Puchades R, Maquieira Á (2014). One-pot isothermal DNA amplification-Hybridisation and detection by a disc-based method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 273-281.



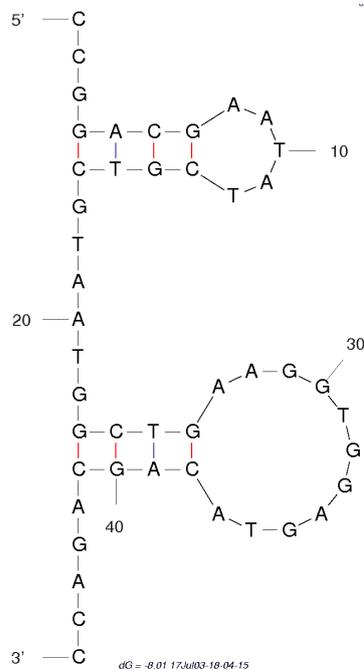
ANEXO I. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS SONDAS DE CAPTURA E INDICADORA.

Se muestran las estructuras secundarias de la sonda de captura y la indicadora a 25°C (supuesta temperatura ambiente) y fuerza iónica 0,3 M obtenidas con el programa mfold 25.



$$\Delta G = -2,06 \text{ kcal/mol}$$

Figura 1. Estructura secundaria de la sonda de captura.



$$\Delta G = -8,06 \text{ kcal/mol}$$

Figura 2. Estructura secundaria de la sonda indicadora.