

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA****SENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN
ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCIÓN DE
CONTAMINANTES MICROBIANOS EN ALIMENTOS****Autor/a: Alba Brasa Marqués****Tutor/a: Antonio Zapardiel Palenzuela****FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA****Junio de 2017**

AGRADECIMIENTOS

Hace ya casi un año que estaba graduándome como biotecnóloga sin tener muy claro qué futuro me esperaba por delante ni qué quería hacer yo con él. En alguno de esos momentos de indecisión, María Jesús Lobo Castañón se cruzó en mi camino y acabamos hablando sobre la posibilidad de realizar un proyecto de investigación en el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo. Imposible decir que no: la Química Analítica era una de las áreas de investigación que más me apasionaban y María Jesús había sido una de las profesoras que más me había marcado durante el Grado. En enero de 2017, llegué de nuevo a Oviedo con las pilas cargadas y llena de emoción para empezar a pelearme con un mundo que hasta entonces era desconocido para una biotecnóloga como yo: cables y más cables, potenciostatos, electrodos... Y la joya de la corona: mi querida amplificación isoterma que tantos quebraderos de cabeza provocó. Durante estos meses, he vivido momentos desafiantes (científicamente hablando), al darme cuenta de que la realidad no se parece ni por asomo a las prácticas de laboratorio a las que estaba acostumbrada y que, de una forma u otra, acaban siempre dando los resultados esperados.

A pesar de todo el tiempo invertido en el laboratorio, hoy no cambiaría ninguno (o casi ninguno) de mis resultados. ¿Cuánto habría aprendido todos estos meses de no ser por las trabas y retos que se me planteaban a diario? Además, me he dado cuenta del mérito que tienen los pequeños laboratorios de las universidades que, a pesar de la escasez y la humildad en la que se hallan inmersos, consiguen sacar adelante las investigaciones más punteras de nuestro país. Y por eso, valoro todavía más la labor de los científicos.

Quería agradecer expresamente a María Jesús la experiencia que me ha brindado, llena de consejos, paciencia y trabajo (mucho trabajo) siempre de la mano de su sincera sonrisa. A todo el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo: gracias por vuestra paciencia e ilusión. Susana, gracias por ser mis ojos en el laboratorio y mi mente cuando la mía decidía tomarse un respiro involuntario. Rebeca, gracias por tu empeño y perseverancia: la Ciencia necesita más personas como tú. Miranda, qué hubiera sido de mis medidas sin tu experiencia con los cables y los electrodos de fabricación casera.... Noemí, gracias también por tu ilusión y confianza a diario. Ana, gracias por hacer que todo pareciera más sencillo. Rossella, gracias por tu dulzura y tus ganas de trabajar. Noelia, menos mal que sólo tú y yo nos sentimos identificadas con la siguiente frase "*Theory is when you know everything but nothing works. Practice is when everything works but no one knows why. In our lab, theory and practice are combined: nothing works and no one knows why*", supongo que también tiene que ver con nuestra casa (y con nuestra vida). Y a todos los demás, gracias también por hacer del laboratorio (casi mi hogar durante unos meses)

un lugar agradable al que me apetece volver. Os deseo de corazón un sinfín de éxitos en todas las investigaciones que se os crucen por el camino y también en la vida personal.

Ya fuera del laboratorio sois también unos cuantos a los que tengo que dar las gracias por preocuparos continuamente por mis progresos con la investigación y por intentar entender qué hago exactamente durante tantas horas entre pipetas, enzimas y cables. Gracias a mis amigos de toda la vida, pero también a la familia de biotecnólogos que tanto tiempo juntos pasamos entre estas paredes; quién os iba a decir que la ponferradina que llegó a esta Universidad hace ya un lustro fuera a permanecer más tiempo que vosotros entre estas paredes. A Pablo, por recorrer miles de kilómetros durante estos meses para despejar la mente durante el fin de semana y cargarla de nuevas ideas para comenzar cada lunes.

Por último, y no menos importante, agradecer en especial a mis padres y a mi familia la oportunidad de vivir otra experiencia más (¡espero que no llevéis la cuenta!). Ojalá sea de las últimas bajo vuestra ala protectora.

Con cariño,

Alba

RESUMEN

El control de microorganismos patógenos en muestras alimentarias es una prueba rutinaria que las empresas de alimentación tienen que llevar a cabo para asegurar la salubridad de los alimentos. Cada vez resulta más apremiante la necesidad de desarrollar ensayos que permitan realizar estos controles de forma rápida, sencilla, fiable, con bajo coste y con un límite de detección lo más bajo posible, siendo deseable la detección de una única célula microbiana. Los biosensores son una buena herramienta para llegar a alcanzar esta meta, aunque, hasta la fecha, no se tiene constancia de biosensores que hayan conseguido tales propósitos.

En el presente trabajo, se revisa el papel de los genosensores con transducción electroquímica como una posibilidad para lograr el objetivo antes referido. Una correcta elección del gen diana para los genosensores resultará en las características de especificidad y selectividad requeridas en los ensayos, mientras que los bajos límites de detección se lograrán gracias al acoplamiento con técnicas de amplificación. La realización de la amplificación sobre una superficie permite reducir el tiempo y el coste del análisis. Si la amplificación utilizada transcurre en condiciones isotérmicas, puede realizarse con instrumentación sencilla y miniaturizable.

El genosensor de estudio se diseña para la detección de *Salmonella* spp. En los ensayos realizados, se estudian como plataformas sensoras el oro, el vidrio y óxidos de indio y estaño (ITO) para la amplificación y detección en superficie. La amplificación isotérmica elegida es amplificación por recombinasa polimerasa (RPA), cuyo diseño permite amplificar un fragmento del gen *bipA*, presente en todas las especies de *Salmonella*. La detección de los fragmentos de ADN genómico amplificados se lleva a cabo mediante una reacción enzimática en la que se obtiene un producto, medible óptica o electroquímicamente.

Los resultados obtenidos plantean la plataforma de vidrio con detección óptica como una buena alternativa para la creación de un genosensor que detecte las distintas especies de *Salmonella* mediante RPA. El diseño del sensor sobre vidrio constituye una base prometedora para el desarrollo de otros genosensores similares con transducción electroquímica, proponiéndose la plataforma de ITO para alcanzar dicho objetivo.

ABSTRACT

Detection of microbial pathogens in food samples is a daily routine analysis that the food industry concerns about to assure the health standards. It is urgent to develop fast, easy, reliable and cheap assays that allow the detection of low amounts of microorganisms, setting the limit of detection (LOD) in one single copy of the pathogen. Biosensors are a promising tool to accomplish these objectives. Nevertheless, nowadays there are no biosensors which fulfil this features, therefore showing the need to continue with the investigations.

In this study, the role of genosensors with electrochemical transduction is revised and proposed as a great alternative for accomplishing the goals previously defined. Choosing the proper DNA target will result in the specificity and selectivity required in the assays, meanwhile the LOD might be reached coupling the assay to amplification techniques. Solid-phase amplification allows to reduce the amount of time and cost invested in the analysis and, if an isothermal amplification is selected, the miniaturization and simplification of the steps in the assay will be feasible.

The genosensor created here is addressed towards the detection of *Salmonella* spp. Solid-phase sensing platforms as gold, glass and indium tin oxide (ITO) are used for the amplification and subsequent detection. The isothermal amplification elected is the recombinase polymerase amplification (RPA), which we designed to amplify a fragment of the *bipA* gene, present in all *Salmonella* species. The detection of the amplicons is performed using a coupled enzymatic reaction, which generates a product that can be measured by optical or electrochemical transduction.

The results of this work exhibit that the glass platform with optical transduction coupled to RPA is a good alternative for the detection of *Salmonella* species. Additionally, the features of this genosensor set the guidelines to develop a promising ITO platform with electrochemical transduction for the detection of *Salmonella*.

ÍNDICE

RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	2
3. PARTE TEÓRICA	4
3. 1. TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS	4
3. 2. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN	7
3. 3. SENSORES QUÍMICOS	15
3. 4. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	22
4. PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1. INSTRUMENTACIÓN	28
4.2. PROCEDIMIENTOS	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5. 1. ELECCIÓN DEL GEN QUE SE VA A AMPLIFICAR	36
5. 2. DISEÑO DE LOS CEBADORES	36
5. 3. RPA EN DISOLUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN	39
5. 4. RPA EN SUPERFICIE DE ORO Y MONITORIZACIÓN MEDIANTE SPR	40
5. 5. RPA EN SUPERFICIE DE ORO Y DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA	43
5. 6. RPA EN SUPERFICIE DE VIDRIO	48
6. CONCLUSIONES	53
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	54
8. BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tira API® para la identificación de bacterias.	4
Figura 2. Esquema de un ensayo ELISA directo.	5
Figura 3. Formación del enlace fosfodiéster entre un grupo fosfato y una desoxirribosa.	6
Figura 4. Publicaciones de RPA en PubMed entre 2010 y 2016.	10
Figura 5. Resumen del mecanismo de actuación de la RPA.	12
Figura 6. Clasificación de los distintos tipos de receptores de un sensor.	16
Figura 7. Señal de respuesta obtenida en SPR por cambios en la capa selectiva.	19
Figura 8. Forma de la señal de excitación y la señal respuesta en amperometría.	20
Figura 9. Señal de excitación frente al tiempo en voltametría diferencial de pulso.	20
Figura 10. Forma de la señal de respuesta en voltametría diferencial de pulso.	21
Figura 11. Clasificación de los biosensores desarrollados para patógenos alimentarios.	23
Figura 12. Partes de las que se compone la cubeta del Autolab ESPRIT y disco de oro.	28
Figura 13. Esquema que muestra los pasos en la modificación de la superficie de oro.	31
Figura 14. Sensores de oro del grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo.	31
Figura 15. Sensores de oro con pocillos delimitados por una lámina de policarbonato.	32
Figura 16. Esquema que muestra los pasos a seguir en la modificación de vidrio.	34
Figura 17. Inmovilización del cebador tiolado sobre la superficie de oro en el SPR.	41
Figura 18. Inmovilización del p-aminotiofenol sobre la superficie de oro en el SPR.	42
Figura 19. Voltagrama cíclico obtenido con un electrodo de oro en H ₂ SO ₄ 0,5 M.	44
Figura 20. Mecanismo de actuación de la RPA en superficie.	45
Figura 21. Mecanismo de detección del producto de amplificación.	46
Figura 22. Respuesta electroquímica para diferentes concentraciones de ADN.	47
Figura 23. Resultados de absorbancia tras las pruebas de RPA simétrica y asimétrica.	48
Figura 24. Representación de la señal óptica para diferentes concentraciones de ADN.	49
Figura 25. Voltametría diferencial de pulso para muestra control y muestra de ADN.	50
Figura 26. Estructura de hibridación de los cebadores a 37 °C.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las diferentes técnicas de amplificación isotérmica.	8
Tabla 2. Proteínas de unión a ssDNA con acción recombinasa.	11
Tabla 3. Diferentes kits de RPA comercializados por TwistDx.	13
Tabla 4. Reacciones enzimáticas más utilizadas en la operación con genosensores.	21
Tabla 5. Kits comerciales para la detección de Salmonella en muestras complejas.	24
Tabla 6. Biosensores comerciales desarrollados para la detección de Salmonella.	27
Tabla 7. Contenido en GC de los distintos cebadores utilizados.	38
Tabla 8. Resultados de la cuantificación de ADN antes y después de amplificar.	39

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

6-FAM: 6-carboxifluoresceína.

A: adenina.

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Ag: antígeno.

ALP: fosfatasa alcalina.

API: índice analítico de perfil.

Bsu: *Bacillus subtilis*.

C: citosina.

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

DPV: voltimetría diferencial de pulso.

dsDNA: ácido desoxirribonucleico de doble cadena.

DTT: ditioneitol.

DVD: Disco Versátil Digital.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EXPAR: reacción isotérmica de amplificación exponencial.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

G: guanina.

GTP: guanina trifosfato.

HCR: reacción de la hibridación en cadena.

HDA: amplificación dependiente de helicasa.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

ICAN: amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos.

ITO: óxidos de indio y estaño.

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle.

MDA: amplificación por desplazamiento múltiple.

NASBA: amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos.

PBS: tampón salino de fosfato.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

POD: peroxidasa.

RCA: amplificación en círculo rodante.

RecA: recombinasa A.

RPA: amplificación por recombinasa polimerasa.

RT: tiempo real.

Sau: *Staphylococcus aureus*.

SDA: amplificación por desplazamiento de hebra.

SPIA: amplificación isotérmica con cebador único.

SPR: resonancia de plasmones superficiales.

SSB: proteínas de unión a ssDNA.

ssDNA: ácido desoxirribonucleico de una cadena.

SSPE: tampón salino de fosfatos.

Sulfo-SMCC: sulfosuccinimidil-4(N-maleimido-metil).

T: timina.

T4 gp32: proteína del bacteriófago T4 necesaria para la unión a ADN de hebra simple.

T4 UvsX: recombinasa UvsX del bacteriófago T4.

T4 UvsY: recombinasa UvsY del bacteriófago T4

Tm: temperatura de fusión.

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

UA: unidades de absorbancia.

UFC: unidad formadora de colonia.

UG: unidades genómicas.

VIH – 1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

VLP: partículas virales.

1. INTRODUCCIÓN

La detección de patógenos microbianos ha preocupado a la sociedad desde sus inicios debido a la peligrosidad que los contaminantes víricos o bacterianos presentan en los organismos superiores. Estos contaminantes pueden encontrarse en diversas matrices como agua, alimentos o regiones medioambientales, provocando enfermedades que en algunos casos resultan letales.

Las intoxicaciones alimentarias por patógenos (entre los que destacan *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*) se encuentran a la orden del día y, en aras de aumentar el nivel de salubridad de la población, existen diversos métodos convencionales (cultivo, microscopía, pruebas bioquímicas) para detectar estos contaminantes microbianos en los alimentos.

Las técnicas de detección más convencionales se están sustituyendo paulatinamente por otras técnicas más específicas y modernas: las técnicas de amplificación de ADN. La amplificación de secuencias específicas del ADN de los patógenos permite su detección casi unívoca, razón por la que esta nueva identificación genotípica está desplazando a las técnicas de detección convencionales.

La amplificación de fragmentos específicos de ADN genómico generalmente se realiza mediante la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), que se ejecuta siguiendo diferentes cambios de temperatura. Sin embargo, en la actualidad se están desarrollando amplificaciones que tienen lugar a una temperatura constante durante el proceso (amplificaciones isotérmicas) y parece que en futuro desplazarán por completo a la más tradicional PCR.

El desarrollo de técnicas de amplificación isotérmica resulta especialmente útil para la elaboración de genosensores miniaturizados que permiten la detección de patógenos microbianos en muestras de alimentos. Estos genosensores pueden emplear distintos tipos de transducción, pero en este trabajo se hace especial hincapié en los sensores de transducción electroquímica.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

En el año 1996, tuvo origen en Roma la Cumbre Mundial de Alimentos organizada por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). En esa conferencia se describió el concepto de seguridad alimentaria tal y como lo conocemos hoy: “La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana” [1].

En esta definición se hace referencia a distintas dimensiones de la seguridad alimentaria: disponibilidad física, acceso económico y físico, utilización y estabilidad de los alimentos. Las políticas económicas y sociales han de velar por el cumplimiento de estas condiciones. No obstante, para garantizar otro aspecto que también queda resaltado en la definición de seguridad alimentaria (la inocuidad de los alimentos), es necesario invertir en ciencia para el desarrollo de métodos de detección de agentes que puedan afectar a la inocuidad de los alimentos.

Los agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos tienen diferentes orígenes. Puede tratarse de agentes intrínsecos (como alérgenos o factores no nutricionales), compuestos xenobióticos (aditivos, fitosanitarios, fármacos, dioxinas), agentes infecciosos (bacterias, virus, priones), biotoxinas o sustancias peligrosas que aparecen en el procesado del alimento como las nitrosaminas [2]. El estudio y detección de estos agentes es primordial para asegurar la seguridad alimentaria.

Es conocido que los alimentos no procesados que se consumen frescos, tienen mayor riesgo de contener agentes infecciosos bacterianos. Es por ello que la detección de bacterias en alimentos es uno de los grandes retos para preservar la inocuidad de los mismos. Las especies de *Salmonella* y *Campylobacter* son las que causan la mayor parte de patologías relacionadas con el sistema digestivo (en torno al 40 %) mientras que otras especies como *Cronobacter sakazakii*, aunque menos relevantes en adultos, pueden generar importantes problemas de mortalidad en lactantes [2].

Durante el siglo XXI, se han producido una docena de muertes debido a intoxicaciones causadas por bacterias presentes en los alimentos como *Listeria monocytogenes* o la cepa *Escherichia coli* O103:H25. Aunque es cierto que estas especies pueden llegar a generar importantes intoxicaciones e incluso la muerte, el mayor número de intoxicaciones ha sido producido por especies que pertenecen al género *Salmonella* spp. provocando desde 2002

un total de 2085 intoxicaciones conocidas, la más grave de las cuales se produjo en un festival en Cataluña en 2002 donde se tuvo que atender a 1435 afectados [3].

Sin duda, *Salmonella* spp. presenta una importante traba para la seguridad alimentaria y, actualmente en su detección, se emplean técnicas de cultivo que necesitan periodos de hasta 5 días para su identificación [4]. Es por ello que las investigaciones actuales se dirigen hacia el desarrollo de técnicas rápidas de identificación entre las que se incluyen los biosensores. Una buena alternativa dentro de los mismos son los genosensores (sensores basados en ADN). Los sensores de ADN han demostrado hasta el momento su utilidad en la detección de secuencias oligonucleotídicas con gran sensibilidad y selectividad. Sin embargo, cuando se enfrentan a la detección de ADN genómico, la complejidad de esta diana hace necesario su acoplamiento a una etapa previa de amplificación, que permite por una parte reducir el tamaño de la diana y, por otro lado, mejorar la sensibilidad de la detección. La introducción de una etapa previa de amplificación del ADN, que generalmente se realiza mediante PCR, complica la miniaturización de los sistemas y el diseño de plataformas sensoras. Con el objetivo de salvar esta traba, es más adecuado el empleo las estrategias de amplificación isotérmica, que permiten integrar más fácilmente los pasos de amplificación y detección en un único dispositivo. Dentro de las amplificaciones isotérmicas, la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) es una de las favoritas gracias a la rapidez, las moderadas temperaturas a las que opera y la sencillez a la hora de diseñar los cebadores.

Por todo lo comentado anteriormente, este trabajo persigue el desarrollo de un genosensor para la detección de todas las especies pertenecientes al género *Salmonella* utilizando como sistema de amplificación la RPA.

Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realizar un estudio sobre el estado del arte de los sensores químicos descritos hasta el momento para la detección de *Salmonella* en muestras alimentarias.
- Diseño y caracterización de un método para la amplificación específica del gen *bipA* en *Salmonella* mediante RPA.
- Adaptación del método anterior a un sistema de amplificación en superficie, que permita integrar las etapas de amplificación y detección de los productos obtenidos para el control de *Salmonella* en muestras de alimentos.

3. PARTE TEÓRICA

3.1. TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Los métodos clásicos para la detección e identificación de microorganismos incluyen el cultivo (que permite distinguir las especies en función del comportamiento en los diferentes medios de crecimiento) o la observación microscópica (que muestra diferencias en las especies basándose en la morfología).

No obstante, estas técnicas son tediosas y requieren varios días de incubación para obtener resultados fiables. Además, la identificación de los microorganismos recae sobre el analista, lo que implica una formación continua del mismo y un alto riesgo de subjetividad a la hora de identificar las especies [5].

Con el objetivo de reducir el tiempo y la incertidumbre, hace varias décadas se desarrollaron una serie de pruebas bioquímicas para identificar las especies de microorganismos más frecuentes. En estos ensayos, se evalúan las propiedades metabólicas de los patógenos añadiendo sustratos al medio de cultivo que pueden ser transformados por las enzimas microbianas. Si el microorganismo que presenta la enzima de interés se encuentra presente en el medio, el sustrato será transformado en producto y éste último se detectará fácilmente por cambios de pH, viraje de color, revelado con otros reactivos, etc. Estas pruebas tuvieron un gran éxito y se desarrollaron pequeñas plataformas automatizadas como es el caso de las tiras API®: una tira que contiene diferentes pocillos en los que se producen reacciones que darán lugar a cambios visibles dependiendo de las características metabólicas de los microorganismos (*Figura 1*). En cada pocillo se introduce una pequeña porción de la muestra a analizar y, en función de si la reacción resulta positiva o negativa, cada pocillo recibe un número. La combinación de todos los pocillos origina un código específico que corresponde con una bacteria o un grupo reducido de bacterias.



Figura 1. Tira API® para la identificación de bacterias. Imagen tomada de: www.biomerieux-usa.com

Además de la identificación tradicional basada en cultivo o en pruebas bioquímicas, existe otro gran grupo de técnicas que se utilizan para la identificación de microorganismos patógenos en el campo de la alimentación: los ensayos inmunoquímicos. Estos ensayos se basan en la reacción entre un antígeno (Ag) y un anticuerpo (Ac). El antígeno es una molécula de naturaleza proteica que pertenece al microorganismo patógeno y que es reconocida específicamente por una glicoproteína que recibe el nombre de anticuerpo. Las reacciones de unión entre antígeno y anticuerpo se caracterizan por la especificidad, rapidez, reversibilidad y espontaneidad, características que las hacen idóneas como técnicas de identificación. Los ensayos inmunoquímicos más frecuentes son los de tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), en los cuales se adsorbe el antígeno sobre una superficie y se añade un anticuerpo marcado que reconoce una región del mismo, produciéndose la unión Ag-Ac. Tras el reconocimiento, el marcaje del anticuerpo permitirá revelar la unión y así se determina la presencia o ausencia del antígeno (*Figura 2*). En la actualidad, los ensayos ELISA han desarrollado diversidad de variedades y, además del tradicional ensayo directo, también se pueden emplear ensayos competitivos, ensayos tipo sándwich, etc. A pesar de la versatilidad de ensayos, encontrar un anticuerpo que reconozca una proteína diana del microorganismo puede suponer un reto importante [6].

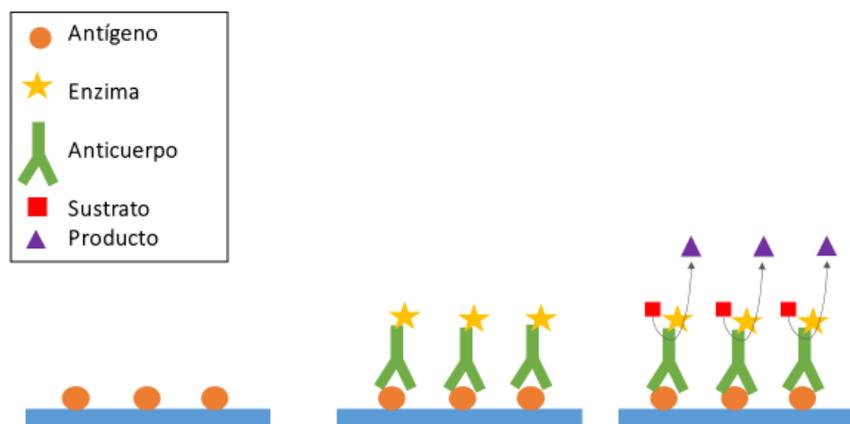


Figura 2. Esquema de un ensayo ELISA directo.

Para salvar este problema, se han desarrollado nuevos receptores de afinidad como es el caso de los aptámeros, que intentan imitar la reacción que se produce entre un antígeno y un anticuerpo. Los aptámeros son pequeñas moléculas de ácido nucleico que se diseñan específicamente para el reconocimiento de proteínas u otras moléculas de pequeño tamaño [7]. La tecnología de aptámeros ofrece una gran alternativa a los inmunoensayos, ya que permite diseñar a medida las moléculas que van a reconocer las proteínas de los microorganismos. No obstante, el reconocimiento de proteínas microbianas no siempre

permite distinguir especies de microorganismos dentro de un mismo género y, por ello, se han de buscar técnicas más específicas para la identificación.

Por todo ello, si bien es cierto que las técnicas fundamentadas en las características fenotípicas de los microorganismos dan buenos resultados, a medida que la ciencia avanza y se descubren nuevas especies potencialmente patógenas, es necesario incluir técnicas de identificación basadas en el genotipo. Así, desde comienzos del siglo XXI, la identificación de microorganismos ya se realiza rutinariamente por métodos basados en el perfil genotípico de las especies.

El genotipo es la información genética contenida en el ADN de las especies. El ADN es una molécula compleja conformada a partir de monómeros, que son los nucleótidos. Estos nucleótidos se componen a su vez de una molécula de monosacárido (desoxirribosa) en estructura cíclica que se une en el carbono 5' a un grupo fosfato (PO_4^{3-}) y en el carbono 1' a una base nitrogenada que puede ser de diferente naturaleza: timina (T), citosina (C), adenina (A) y guanina (G). El ADN se crea por la unión secuencial de nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster entre un grupo hidroxilo (-OH) del grupo fosfato situado en el carbono 5' y el OH del carbono 3' del siguiente nucleótido, en una reacción llevada a cabo por la enzima ADN polimerasa (*Figura 3*).

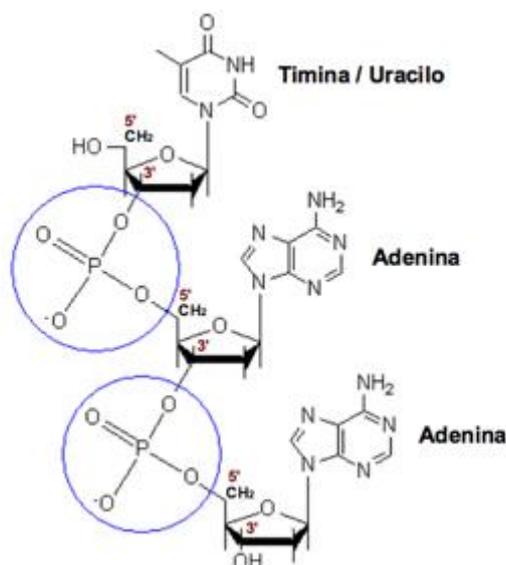


Figura 3. Formación del enlace fosfodiéster entre un grupo fosfato y una desoxirribosa. Imagen tomada de www.wikipedia.org

De esta forma, se establecen largas cadenas de ADN en las que las bases nitrogenadas quedan colgando lateralmente de un esqueleto en el que se alternan la desoxirribosa y el fosfato. La secuencia de bases nitrogenadas (T, C, A, G) determina la especificidad de la

cadena de nucleótidos y, en definitiva, la información genética que es diferente en cada especie.

En una visión tridimensional, se observa cómo las cadenas de ADN se enrollan en una estructura en la que dos cadenas de polinucleótidos se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno específicos entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas. Las bases nitrogenadas se aparean entre sí mediante puentes de hidrógeno con la siguiente complementariedad: A con T (dos puentes de hidrógeno) y C con G (tres puentes de hidrógeno). De esta forma se origina una doble hélice de ADN con cadenas de polinucleótidos complementarias que tienen un diámetro de 2 nm y una longitud variable en función de la especie. A modo orientativo, el genoma completo de *Escherichia coli* tiene una longitud equivalente a 4 millones de nucleótidos.

3.2. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN

Como se comentaba en el anterior apartado, la secuencia de bases nitrogenadas es una “huella genética” que permite distinguir las especies a través de su molécula de ADN. Sin embargo, para poder alcanzar los extraordinariamente bajos límites de detección que se exigen en seguridad alimentaria (en muchos casos un solo microorganismo es suficiente para desencadenar la enfermedad), es necesario utilizar técnicas que permitan amplificar una región específica del genoma, que caracterice de forma unívoca a la especie objeto de estudio. Es por ello que en las últimas décadas se han concentrado los esfuerzos en desarrollar y mejorar las técnicas de amplificación del ADN o en descubrir otras estrategias más rápidas y sencillas.

En la detección de microorganismos patógenos, una de las herramientas más utilizadas es la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la PCR. En 1990, Mullis *et al.*, descubrieron un mecanismo *in vitro* que no utiliza células vivas para la amplificación de ADN a partir de muestras complejas y, desde entonces, esta técnica de amplificación se utiliza rutinariamente y en investigación en laboratorios de todo el mundo.

Un experimento de PCR requiere el uso de la molécula de ADN que se va a amplificar, dos cebadores que delimitan el fragmento que se amplifica, nucleótidos de timina (T), citosina (C), adenina (A) y guanina (G) y una enzima ADN polimerasa. En su ejecución, es imprescindible realizar ciclos rápidos de temperatura variable y esto hace que sea necesario recurrir al uso de termocicladores, unos equipos capaces de establecer rampas de temperatura muy pronunciadas en cuestión de segundos. Como norma general, una PCR incluye unos 35 ciclos, cada uno de los cuales está compuesto por las siguientes etapas:

- **Desnaturalización.** El ADN de cadena doble se desnaturaliza para dar lugar a dos cadenas sencillas en un paso que requiere una temperatura de unos 95 °C.
- **Hibridación de los cebadores.** La hibridación de los cebadores con su hebra complementaria se realiza entre 40 y 70 °C en un periodo que varía entre 20 y 40 segundos.
- **Elongación de la cadena.** La elongación del ADN es llevada a cabo por enzimas polimerasas que actúan a temperaturas entre 72 °C y 80 °C.

Los termocicladores necesarios para llevar a cabo este proceso encarecen el proceso de amplificación y dificultan la implantación de procesos miniaturizados de amplificación.

Estas desventajas de la PCR han dado como resultado un giro en la investigación actual, que se dirige hacia estrategias de amplificación isotérmicas, que facilitan el diseño de dispositivos en miniatura para el análisis de microorganismos en diferentes tipos de muestras.

El mecanismo utilizado en estas reacciones de amplificación isotérmica imita a los procesos de amplificación que se emplean *in vivo* y sustituye las altas temperaturas por proteínas adicionales, que permiten separar la doble hélice de ADN y, junto con los cebadores, llevar a cabo una amplificación selectiva a temperatura constante. En la *Tabla 1*, aparece resumidas las características de las diferentes amplificaciones isotermas desarrolladas hasta el momento.

Tabla 1. Características de las diferentes técnicas de amplificación isotérmica [2,5,8].

Amplificación isotérmica	Temperatura	Tiempo	Descubrimiento
Amplificación por desplazamiento de hebra (SDA)	37 °C	2 h	Walker <i>et al.</i> , 1992
Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)	30 °C	2 – 5 h	Dean <i>et al.</i> , 2002
Amplificación en círculo rodante (RCA)	30 °C	1 h	Fire y Xu., 1995

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	60 - 65 °C	40 – 60 min	Notomi <i>et al.</i> , 2000
Amplificación dependiente de helicasa (HDA)	60 – 65 °C	1 -2 h	Vicent <i>et al.</i> , 2004
Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA)	37 – 42°C	1 - 2h	Compton, 1991
Amplificación por recombinasa polimerasa (RPA)	37 – 42 °C	20 - 60 min	Piepenburg <i>et al.</i> , 2006

Además de las mencionadas en la anterior tabla, también existen otras técnicas no tan utilizadas como la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos (ICAN), reacción de la hibridación en cadena (HCR), reacción isotérmica de amplificación exponencial (EXPAR) o amplificación isotérmica con cebador único (SPIA) [8].

Las técnicas isotérmicas de amplificación de ADN son objeto de intensa investigación en la actualidad y presentan las siguientes ventajas: se llevan a cabo en un breve periodo de tiempo, son muy específicas, no requieren instrumentación sofisticada, presentan mayor tolerancia frente a inhibidores que la propia PCR, las temperaturas de actuación son menores que en esta y, consiguientemente, son técnicas menos energéticas y más respetuosas con el medioambiente. Además, estas técnicas se realizan en un menor número de etapas con lo que el manejo se simplifica y la reproducibilidad de los experimentos aumenta [2,8].

Amplificación por recombinasa polimerasa (RPA)

La RPA es una de las estrategias de amplificación isotérmica más novedosa y rápida, que ha ido adquiriendo importancia desde su descubrimiento en 2006, tal y como se indica en la *Figura 4*. Además, esta tendencia de crecimiento positiva parece seguir viéndose en 2017 ya que, en el primer cuatrimestre del año se han publicado 23 artículos, más del doble que en el mismo periodo del año 2016.

Las razones de este gran crecimiento para la RPA se deben a que se trata de la amplificación isotérmica más rápida, solo requiere el empleo de un cebador directo y otro

reverso [9], trabaja a la temperatura del cuerpo humano [10], tiene un elevado rendimiento y permite el empleo del análisis a tiempo real [2].

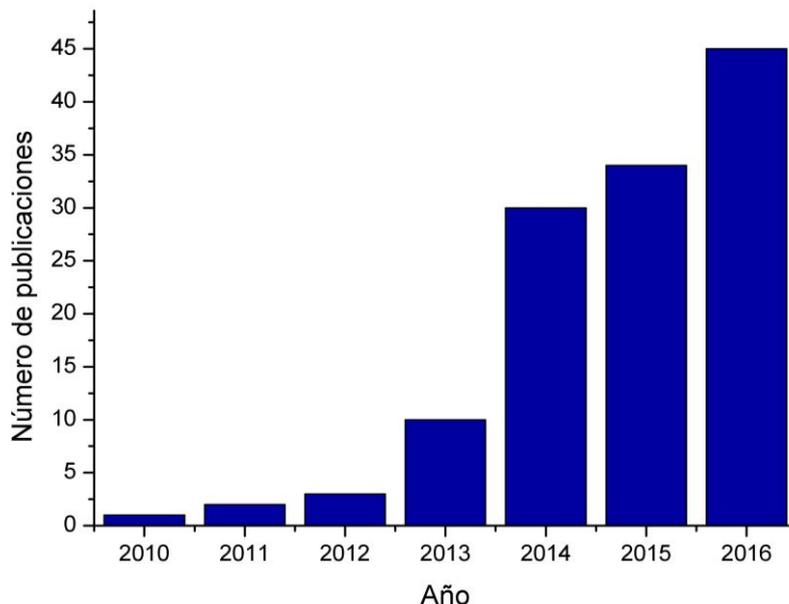


Figura 4. Publicaciones de RPA en PubMed entre 2010 y 2016.

El mecanismo que hay detrás de la RPA está inspirado en la recombinación homóloga que tiene lugar en las células para reparar apareamientos erróneos o roturas de doble hebra en la hélice de ADN.

La pieza clave de este mecanismo es la proteína RecA, una recombinasa de la familia de las ATPasas que se encarga de intercambiar dos cadenas de ADN que presentan la misma secuencia. El proceso tiene lugar del siguiente modo: la proteína RecA se une a una molécula de ADN de cadena simple (ssDNA) y forma un filamento nucleoproteico que escanea el ADN de doble hebra (dsDNA) en busca de homologías en la secuencia. En el caso de los organismos, la recombinasa ha de escanear todo el ADN genómico. Una vez que se encuentran homologías en la secuencia, el filamento nucleoproteico con ssDNA se une a la hebra complementaria de la doble hélice de ADN, desplazando a la otra cadena de ADN (con secuencia idéntica al ssDNA inicial) [11].

Este mecanismo, que acontece de forma natural en los organismos, fue el utilizado por los investigadores Piepenburg *et al.* [12], para desarrollar una amplificación isotérmica del ADN en condiciones *in vitro*. Desde el año 2010, este sistema de amplificación está patentado por estos mismos investigadores y lo comercializa la casa TwistDx en Reino Unido [13].

El sistema de amplificación comienza con la unión del cebador (ssDNA) a un complejo proteico que realiza la función de la recombinasa (*Tabla 2*). A continuación, el filamento nucleoproteico escanea la doble hélice de ADN en busca de sitios homólogos donde se produce la recombinación y, tras desplazar a la hebra complementaria, actúa la ADN polimerasa de *Bacillus subtilis* (Bsu) o de *Staphylococcus aureus* (Sau) para llevar a cabo la amplificación de la misma. La repetición de este ciclo lleva a un crecimiento exponencial del fragmento diana a amplificar [5]. Un esquema resumido de este proceso puede observarse en la *Figura 5*.

Tabla 2. Proteínas de unión a ssDNA con acción recombinasa.

Proteína	Función
T4 uvsX o RecA	<p>Proteína dependiente de ATP de unión a dsDNA y ssDNA. En conjunto con T4 gp32/SSB, Mg²⁺ y ATP lleva a cabo el desplazamiento sobre ssDNA en dirección 5' → 3'</p> <p>Se calcula que cada proteína RecA se une a tres nucleótidos del cebador</p>
T4 gp32 o SSB	Refuerza la acción de T4 uvsX/RecA, previniendo la unión del ADN desenrollado
T4 uvsY	Coopera con la T4 uvsX/RecA, uniéndose a ella y mejorando su afinidad por el ssDNA

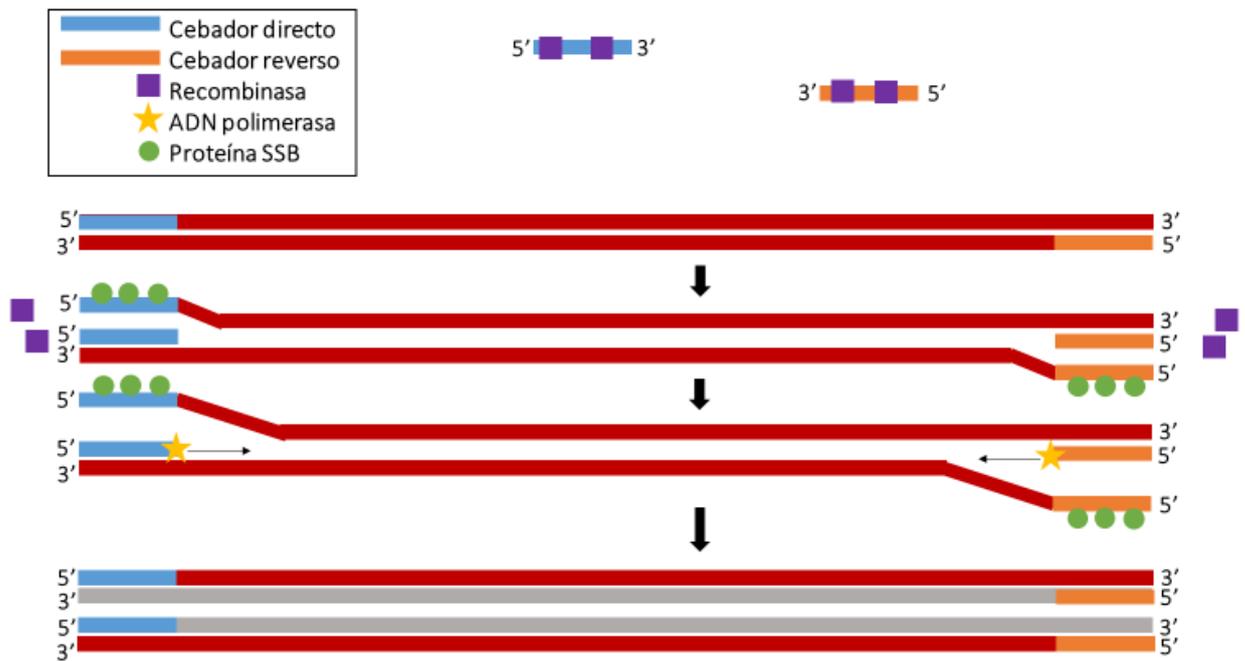


Figura 5. Resumen del mecanismo de actuación de la RPA. Los cebadores se unen a la recombinaasa y escanean el ADN en busca de homología. Una vez que se halla la homología, se produce el desplazamiento de hebra y las proteínas SSB estabilizan la hebra desplazada mientras la polimerasa realiza la copia y amplificación del ADN en ciclos exponenciales.

Actualmente, los kits comerciales de RPA son distribuidos por la casa TwistDx (UK), que cuenta con diferentes formulaciones (*Tabla 3*). El kit está compuesto por una batería de viales individuales de 0,1 mL en los cuales se encuentra un liofilizado que contiene la mezcla de enzimas y proteínas para llevar a cabo la reacción así como los nucleótidos (dNTPs) para la síntesis de la molécula a amplificar. Este liofilizado se disuelve en un tampón de hidratación que contiene la muestra y los cebadores y, para comenzar la reacción, es necesario añadir acetato de magnesio (MgAc), que actúa como cofactor de las enzimas.

Este empaquetamiento individualizado para cada reacción permite evitar contaminaciones y, al encontrarse liofilizado e inactivo, su transporte es sencillo y no requiere un cuidado especial. En cuanto a la activación de la reacción, que en el caso de otras amplificaciones depende de una activación por calor a una temperatura elevada, puede realizarse de forma sencilla añadiendo la sal de acetato de magnesio [14].

Tabla 3. Diferentes kits de RPA comercializados por TwistDx.

Kit TwistAmp®	Ensayo
Basic	Amplificación de ADN a partir de ADN. Detección mediante gel de electroforesis
Basic RT	Amplificación de ADN a partir de ARN. Detección a tiempo real
exo	Amplificación de ADN a partir de ADN con detección a tiempo real mediante exonucleasa III. Existen kits específicos para la detección de <i>Campylobacter</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>
exo RT	Amplificación de ADN a partir de ARN con detección a tiempo real mediante exonucleasa III
fpg	Amplificación de ADN a partir de ADN con detección a tiempo real mediante exonucleasa fpg
nfo	Amplificación de ADN a partir de ADN y posterior detección en tiras de flujo lateral o ensayos de tipo sándwich

Además, TwistDx también ha desarrollado dos kits para la detección de *Salmonella enterica* en 10 y 20 minutos, TwistGlow® y TwistFlow® respectivamente, basados en la amplificación del gen *invA* [14].

Como se observaba en la *Figura 4*, especialmente desde 2013, las investigaciones utilizando la RPA han crecido exponencialmente y se ha logrado desarrollar interesantes trabajos con aplicaciones prácticas para la detección de patógenos animales, alimentarios y ambientales. En el campo de la alimentación, uno de los patógenos más frecuentes son las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*. El kit desarrollado por la casa comercial ha permitido detectar muestras contaminadas con esta bacteria en leche y disoluciones salinas de fosfatos [14].

Por otro lado, el área de estudio de patógenos clínicos que afectan a la especie humana y otros animales es la de mayor auge. Mediante la RPA se han desarrollado métodos para

la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de orina, una bacteria de transmisión sexual que puede provocar riesgos severos a largo plazo: aumenta el riesgo de embarazo ectópico, de infertilidad y de dolor pélvico. El análisis desarrollado para la detección de la misma se realiza en tan solo 20 minutos a partir de muestras de orina que no requieren purificación previa, con límites de detección de 5 a 12 patógenos por muestra y con una especificidad del 100 % [15].

Además de la detección de bacterias, hay numerosos trabajos dirigidos a la identificación de virus causantes de importantes enfermedades mediante amplificación con RPA. Uno de los ejemplos es el del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que puede detectarse, en muestras que solo contienen 10 copias de genoma vírico, realizando la amplificación a 37°C en regiones del cuerpo humano como son la axila, la muñeca o el abdomen. Por otro lado, ha sido posible realizar la reacción de amplificación en el bolsillo de un pantalón, gracias al calor que transmite el cuerpo humano, a 37 °C, hacia la prenda [10]. Esta estrategia libre de incubadores y equipación abre una gran ventana hacia la detección del VIH-1 en países subdesarrollados con escasos medios económicos y que tienen una alta incidencia en esta enfermedad.

En esta misma línea, también se han desarrollado métodos para la detección de otros virus causantes de enfermedades mortales como el ébola [16], la fiebre del Zika [17] o la enfermedad hemorrágica del dengue [18].

En el caso del virus del ébola, el ensayo desarrollado para la detección en etapas tempranas sí requiere de una purificación previa de la muestra, que se obtiene a partir del suero de pacientes enfermos o bien con la ayuda de hisopos a partir de la lengua o las mejillas. El estudio se enfoca hacia la comparación de la amplificación mediante RPA con la PCR utilizada hasta el momento en los laboratorios móviles instalados en países subdesarrollados de África. Los resultados mostraron una vez más cómo la RPA tenía una especificidad del 100 % para la detección de este virus en detrimento de la PCR que sí generaba resultados positivos para otra serie de patógenos víricos frecuentes en regiones africanas como los virus de Sudán, Zika, dengue o fiebre amarilla [16]. Esto demuestra que la RPA no es solo una alternativa interesante por su rapidez (30 – 60 min en este caso) sino también porque mejora el diagnóstico de enfermedades, haciéndolo más fiable y seguro.

En cuanto a los estudios relativos al medioambiente, se ha desarrollado un protocolo mediante RPA para la detección de *Enterococcus faecalis*, una bacteria que puede entorpecer la salubridad e higiene del agua potable. La amplificación tiene lugar durante 40 minutos a 39 °C pero en un tiempo total de análisis de 48 minutos la bacteria puede ser

identificada mediante quimioluminiscencia. Además, la detección de esta bacteria se realiza en una RPA múltiple en la que también se detectan dos virus: adenovirus humano 41 y Phi X 174. Los resultados de sensibilidad que se observan en este estudio son comparables a los obtenidos anteriormente con PCR, por lo que se demuestra que la RPA múltiple es una alternativa a considerar para la detección simultánea de varios patógenos [9].

Como se ha visto, las aplicaciones de la RPA abarcan patógenos de numerosas áreas. No obstante, existen numerosas diferencias metodológicas en cada experimento en cuanto a la realización de la amplificación y su posterior detección. La amplificación puede realizarse en los viales que aportan los diferentes kits, en cuyo caso se trata de una amplificación con todos los componentes necesarios en disolución, o bien utilizar algún tipo de superficie en la que se ancla uno de los cebadores de la amplificación. En relación con esta segunda vía, se pueden realizar ensayos en sensores electroquímicos [19], objetos reciclables como DVDs [20,21] o desarrollar plataformas microfluídicas [22]. Por su mayor rapidez, ausencia de purificación y comodidad en el análisis, es más interesante recurrir a la amplificación en superficie en detrimento de la amplificación en disolución.

Los ensayos en sensores electroquímicos generalmente utilizan como superficie el oro, que se modifica con uno de los cebadores de la amplificación y constituye la fase sensora en la que se lleva a cabo el análisis [19]. Los chips de oro de los sensores electroquímicos pueden modificarse para desarrollar plataformas microfluídicas que permiten realizar un análisis automatizado y más reproducible. Así, marcando pegatinas con un láser de CO₂ para definir los canales microfluídicos, se puede conseguir un sistema microfluídico con fase sensora de oro [22].

Si bien el oro es uno de los elementos más utilizados en electroquímica, también es posible recurrir a otras plataformas como el DVD, que en este caso emplean detección óptica. Estos sensores se componen de dos láminas de policarbonato de 0,6 mm de grosor en cuyo interior hay una capa de material metálico reflectivo con grosor de 100 a 150 nm. Sobre la capa superior de policarbonato se colocan diez cámaras microfluídicas (5,5 mm x 5,5 mm x 0,2 mm) en las que posteriormente se lleva a cabo la medida [20,21].

3.3. SENSORES QUÍMICOS

En líneas generales, un sensor químico se define como un dispositivo en el que un receptor inmovilizado sobre la superficie de un transductor reconoce molecularmente una especie química. La interacción de reconocimiento molecular provoca un cambio de energía química que el transductor transforma en una señal. Esta señal, reversible e idealmente

generada mediante simple contacto de la muestra con el sensor, permite la detección y cuantificación de dicha especie química. Así pues, las partes fundamentales de un sensor incluyen la **fase sensora**, donde está el receptor inmovilizado en el que se lleva a cabo el reconocimiento molecular, un **transductor** que genera una señal a partir de la energía química del reconocimiento, y el **sistema de control y medida** que registra las señales obtenidas por el transductor.

En función del tipo de reconocimiento que se lleva a cabo, así como de la naturaleza de la fase sensora, pueden distinguirse varios tipos de receptores, tal y como se observa en la *Figura 6*.

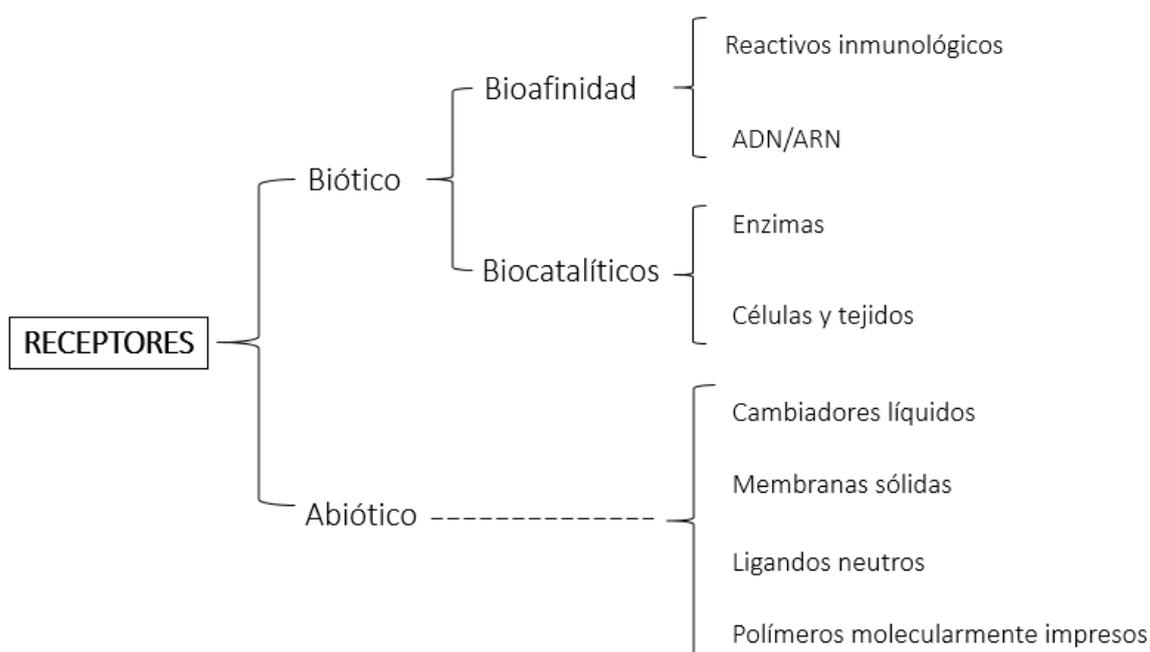


Figura 6. Esquema de los distintos tipos de receptores de un sensor en función del tipo de reconocimiento y de la naturaleza de la fase sensora.

De aquí en adelante, los sensores que nos ocupan en este trabajo son los que tienen receptores de tipo biótico¹, conocidos como biosensores. Los biosensores son sensores de naturaleza química en los que el reconocimiento molecular se basa en una reacción bioquímica o en un mecanismo biológico. De todos ellos, nos vamos a centrar en los sensores de bioafinidad de ADN, a los que también se refiere como **genosensores**. En este tipo de sensores químicos, un ácido nucleico de cadena corta se ancla en la superficie del transductor y actúa como oligonucleótido de captura, reconociendo mediante la reacción de hibridación un fragmento de ADN con una secuencia de bases complementarias al mismo. El oligonucleótido de captura ha de encontrarse en una

¹ Biótico: característico de los seres vivos (Real Academia Española). El término antónimo, abiótico, hace referencia a que no tiene que ver con los seres vivos ni con ninguna de sus partes.

posición perpendicular a la superficie para que pueda producirse la correcta hibridación entre los dos fragmentos de ADN. Así, se recomienda el uso de superficies cargadas negativamente ya que separan el ADN de captura de la superficie por medio de repulsión de cargas y mantiene el oligonucleótido en posición perpendicular, mientras que las superficies hidrofóbicas y/o con carga positiva atraen el oligonucleótido de captura hacia la superficie y se promueve la orientación paralela no deseada [7].

El oligonucleótido que constituye la capa selectiva debe incorporarse en contacto directo con un transductor, cuya función es transformar la energía química de la interacción de reconocimiento molecular en energía eléctrica. Cualquier propiedad químico física alterada por la energía puesta en juego en la reacción de reconocimiento molecular sirve como fundamento en el diseño y construcción del biosensor correspondiente. Así se han diseñado biosensores basados en la medida en las propiedades ópticas, eléctricas, piezoeléctricas o térmicas del sistema.

Los sensores piezoeléctricos detectan cambios de masa en la superficie de amplificación y los sensores térmicos miden los cambios de temperatura. No obstante, los más utilizados en los ensayos de amplificación e hibridación del ADN, son los biosensores de transducción óptica y electroquímica. En ambos casos se pueden utilizar esquemas de transducción directa o indirecta. En estos últimos, se utilizan moléculas marcadoras en el ensayo, que incorporan etiquetas con propiedades ópticas o electroquímicas adecuadas para facilitar su detección [7,23].

Sensores ópticos

Los biosensores ópticos son aquellos que utilizan la interacción entre la radiación electromagnética y la materia para obtener información analítica. El analito de interés puede tener propiedades ópticas *per se* o bien puede utilizarse una molécula que relacione la cantidad de analito de interés con una molécula que sí tiene propiedades ópticas.

Dependiendo del receptor que se seleccione, se pueden encontrar múltiples diseños de sensores ópticos que se basan en diferentes enfoques. Por un lado, puede recurrirse a la medida de propiedades ópticas del propio analito, a propiedades alteradas como consecuencia de la reacción de reconocimiento, a propiedades que presentan las especies indicadoras incluidas en la capa selectiva o incluso a las del propio elemento de reconocimiento, cuyas propiedades ópticas pueden verse afectadas como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular. Entre los diferentes diseños es especialmente interesante en el contexto de este trabajo el de los sensores basados en medidas de resonancia de plasmón de superficie (SPR).

Los sensores basados en SPR son capaces de detectar interacciones entre un ligando anclado en la superficie y una molécula que está en disolución y que se pueda unir al mismo. La ventaja de esta técnica reside en que no es necesario emplear moléculas marcadas para la detección, ya que ésta se realiza en tiempo real sobre la superficie [24].

En esta técnica de transducción se miden cambios en el índice de refracción (n) en la capa selectiva, asociados al evento de reconocimiento molecular. El instrumento SPR incorpora un prisma ópticamente denso (n elevado) sobre el que se coloca el sensor, formado por una fina lámina de oro sobre la que se construye la capa selectiva. Sobre el prisma se hace incidir la radiación procedente de un láser, con un ángulo de incidencia superior al ángulo crítico, de manera que se produce un proceso de reflexión total interna. En el punto de reflexión, la interacción entre los rayos incidente y reflejado da lugar a una onda estacionaria, con un campo eléctrico asociado que penetra en la capa metálica y que se denomina onda evanescente. Este nombre alude a una de las principales características de la misma, que es que la intensidad de esta onda disminuye exponencialmente a medida que nos adentramos en el medio de menor índice de refracción. La distancia de penetración de la onda evanescente depende de la longitud de onda de la radiación incidente y generalmente se encuentra en el intervalo entre 100 y 200 nm. La onda evanescente generada interacciona con los electrones de la banda de conducción del metal, que se comportan como un plasma, generando una onda de plasmón de superficie (onda de densidad electrónica que se propaga a lo largo de la interfase oro disolución longitudinalmente). Cuando la energía de la onda evanescente coincide con la de la onda de plasmón de superficie, se produce el fenómeno de resonancia, con una transferencia de energía de un campo al otro. Esto se traduce en un mínimo en la radiación reflejada, que se mide. Al cambiar el índice de refracción en la capa selectiva sobre la superficie del oro, cambia la velocidad de propagación de la onda de plasmón de superficie y en consecuencia se altera la condición de resonancia. Finalmente, se mide el ángulo de incidencia al que se obtiene el mínimo de la luz reflejada (ángulo crítico) con el tiempo. Este ángulo cambia cuando se altera la constante dieléctrica de la capa selectiva que se ancla sobre la superficie de oro. De este modo, es posible realizar una medida de los procesos de interacción en la capa selectiva en tiempo real, lo que permite llevar a cabo una investigación no solo de las interacciones y su afinidad, sino también de la cinética de los procesos [21,25].

Así, la señal analítica que se obtiene en este proceso es la variación del ángulo crítico en función del tiempo (expresado en miligrados). En la *Figura 7* se pueden observar los diferentes cambios que sufre la capa selectiva y la respuesta medible en el aparato.

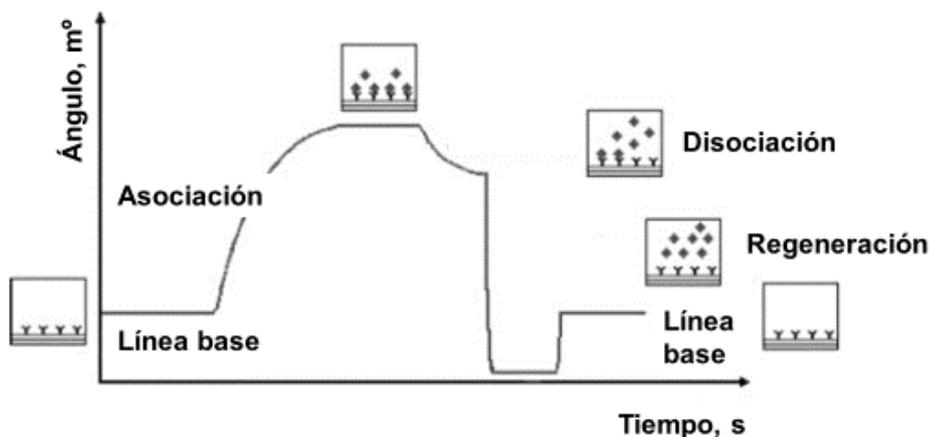


Figura 7. Señal de respuesta obtenida en SPR en función de los cambios que se producen en la capa selectiva. Imagen tomada de [26].

Los sensores SPR basados en la hibridación del ADN se construyen inmovilizando oligonucleótidos sobre la fina capa de oro, generalmente utilizando oligonucleótidos modificados con un grupo tiol en uno de los extremos. Éstos interactúan fuertemente con la superficie del oro mediante un proceso de quimisorción y, si se desea analizar secuencias de ADN complementarias a dichos oligonucleótidos, se puede registrar la hibridación con los oligonucleótidos anclados en tiempo real.

Sensores electroquímicos

En los sensores electroquímicos la energía química de la interacción de reconocimiento molecular se transforma directamente en una señal eléctrica, por lo que este tipo de sensores son fácilmente miniaturizables y requieren una instrumentación sencilla y asequible. Son el primer tipo de sensores químicos que se desarrollaron y es el tipo de transducción que prevalece, tanto desde el punto de vista de las publicaciones científicas como desde el punto de vista comercial.

Los sensores electroquímicos más desarrollados hasta el momento son los sensores potenciométricos y los amperométricos o voltamétricos. No obstante, los sensores conductimétricos e impedimétricos han comenzado a recibir una atención creciente en los últimos años.

Transducción amperométrica. Se caracteriza porque el potencial de excitación que se aplica durante esta técnica se mantiene constante. La señal respuesta que se mide es una

corriente límite que varía linealmente con la concentración de la especie electroactiva que interviene en la reacción. En la *Figura 8* puede verse un esquema de ambas señales.

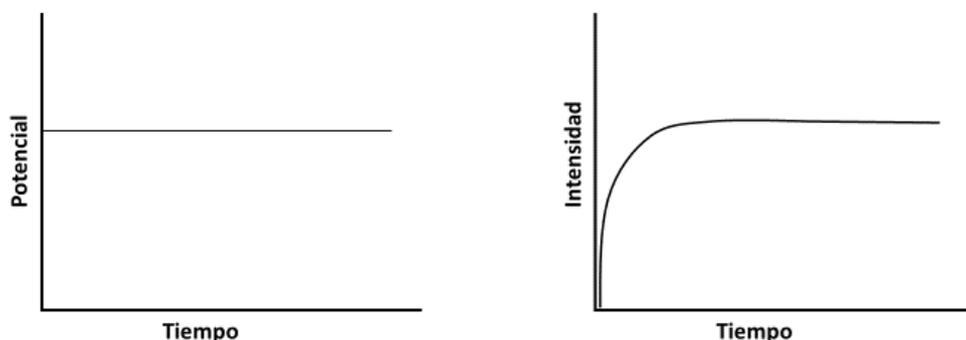


Figura 8. Forma de la señal de excitación (izquierda) y la señal respuesta (derecha) en amperometría.

Transducción mediante voltametría diferencial de pulso (DPV). Esta técnica emplea un pulso de potencial superpuesto a una rampa lineal de potenciales. Para este caso, es necesario definir la amplitud del pulso (ΔE_p), el tiempo de aplicación del mismo (t_p), el escalón de potencial (ΔE_s) y, por último, el tiempo de repetición del cada pulso (τ , tiempo que transcurre desde un pulso hasta el siguiente). La señal de excitación junto con estos parámetros aparece representada en la *Figura 9*.

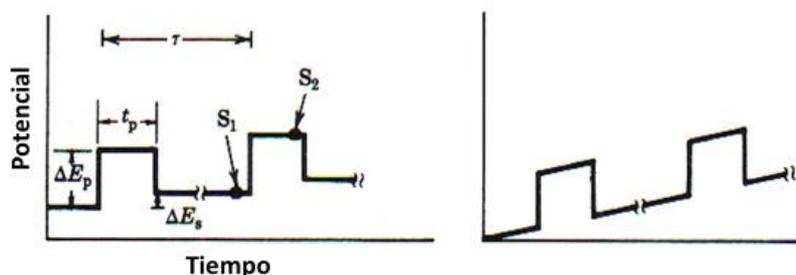


Figura 9. Forma de la señal de excitación (E) frente al tiempo en voltametría diferencial de pulso. Adaptada de [7].

La señal de respuesta que se obtiene tras los pulsos de potencial genera dos tipos de información; por un lado, el potencial de respuesta (E_p) es característico de cada sustancia y se obtiene la información cualitativa y, por otro lado, la medida de la altura del pico (i_p) da información cuantitativa. Un esquema de la señal respuesta puede observarse en la *Figura 10*.

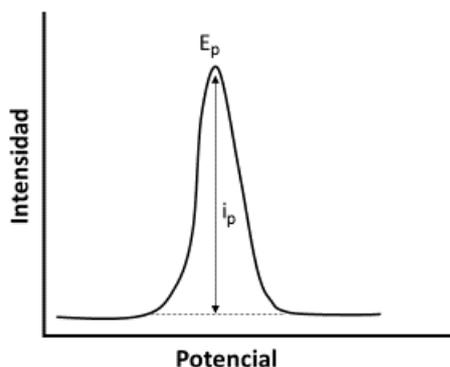


Figura 10. Forma de la señal de respuesta en voltametría diferencial de pulso.

Dado que la amplificación de ADN y sus productos no generan señales electroquímicas, es necesario añadir una molécula que revele los productos amplificados. Generalmente, estas moléculas son enzimas que se unen a los fragmentos de ADN amplificados y, tras la adición de un sustrato de la enzima, se mide voltamétricamente la cantidad del producto generado en la reacción enzimática al cabo de un tiempo de reacción.

En la *Tabla 4* aparece un resumen de las enzimas más utilizadas en los ensayos electroquímicos, que admiten un sustrato transformable en un producto activo electroquímicamente. Además, algunas de estas enzimas también son muy útiles en ensayos ópticos, en los que se pretende obtener un producto coloreado a partir del sustrato que transforma la enzima.

Estas enzimas son muy frecuentes y también se emplean en ensayos competitivos y no competitivos unidos a anticuerpos para la detección de otras moléculas (proteínas, péptidos, VLPs) diferentes del ADN.

Tabla 4. Descripción de las reacciones enzimáticas más utilizadas en la operación con biosensores.

Enzima	Características	Código ²	Sustrato	Detección
Peroxidasa (POD)	Oxidorreductasa	EC 1.11	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)	Óptica/ electroquímica

² El código EC hace referencia al número que asigna la Comisión de Enzimas a cada enzima en función de la reacción catalizada por las mismas. Cada número EC puede estar seguido de hasta 4 números, que resultan cada vez más específicos. El primer número clasifica las enzimas en: oxidorreductasas (1), transferasas (2), hidrolasas (3), liasas (4), isomerasas (5) y ligasas (6).

Fosfatasa alcalina (ALP)	Hidrolasa	EC 3.1.3.1	1-naftilfosfato	Electroquímica
			<i>p</i> -nitrofenilfosfato	Óptica

Estas enzimas que dan lugar al producto óptico o electroquímicamente activo, se unen a las moléculas diana y dan lugar a una amplificación de la señal. Esto se debe a que cada enzima transforma varias moléculas de sustrato, que finalmente generan la corriente de medida. La unión de las enzimas a las moléculas diana se realiza mediante uniones de afinidad, recomendándose especialmente el uso de la interacción entre biotina y avidina (y sus homólogos estreptavidina y neutravidina) o bien la interacción entre antígeno y anticuerpo [27].

En algunos trabajos se ha estudiado más a fondo esta unión de la enzima a la molécula diana a través de las diferentes etiquetas comentadas, y se ha visto que la mejor opción para aumentar la sensibilidad y disminuir el límite de detección es la unión a través de la interacción Ag-Ac de fragmentos Fab de anticuerpos conjugados con la enzima. Se cree que esta mejora en la sensibilidad se debe a la monovalencia del fragmento Fab, que únicamente puede unir una molécula de antígeno, mientras que la estreptavidina es tetravalente, lo que puede resultar en una disminución de la sensibilidad [28].

3.4. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El control de las enfermedades de transmisión alimentaria causadas por patógenos es uno de los desafíos que preocupan a las empresas en el campo de la alimentación. Entre todos los patógenos alimentarios, destacan las diferentes especies de *Salmonella*, uno de los géneros de patógenos alimentarios más estudiados debido al elevado número de intoxicaciones que han provocado en las últimas décadas [3].

En la actualidad, se está produciendo una búsqueda constante de métodos de detección de *Salmonella* que cumplan requisitos de sensibilidad (detección del patógeno en la muestra), especificidad (determinación de una muestra como negativa cuando el patógeno no está presente), precisión y bajos límites de detección (en algunos casos se exige detectar una única célula del patógeno) [29].

A lo largo de las últimas décadas se ha ido observando un cambio en las tendencias de análisis. Los primeros métodos para la detección de *Salmonella* en muestras alimentarias incluían los medios de cultivo, técnicas tediosas que podían tardar hasta 5 días en generar un resultado medianamente fiable. Seguidamente, se implementaron los ensayos

inmunoquímicos como el ELISA que redujeron el tiempo de análisis hasta 2 días. Los inmunoensayos son muy sensibles y más rápidos, pero necesitan realizar etapas de lavado a lo largo de todo el proceso y esto dificulta la automatización del mismo. Finalmente, tuvieron cabida los ensayos moleculares basados en ácidos nucleicos como la técnica de PCR que, a pesar de tener un coste elevado, es más sensible, específica y rápida (menos de 24 horas para obtener resultados) que los inmunoensayos [29, 30].

En base fundamentalmente a estos ensayos tipo ELISA y a las técnicas de PCR, se han comercializado diferentes kits para la detección de *Salmonella* (Tabla 5). No obstante, es importante destacar que el tiempo total de ensayo, el elevado coste de instrumentación y el gran tamaño de los aparatos necesarios para llevar a cabo el ensayo hacen que estos kits comerciales no se impongan en los laboratorios de pequeño y mediano tamaño. En este punto, sale a la luz otra de las necesidades en el campo de la identificación de patógenos: la miniaturización, cada vez más en tendencia.

Una posibilidad de mejora es el empleo de biosensores, ya que solucionan todos los retos que plantea la identificación de *Salmonella* y otros patógenos alimentarios: rapidez, bajo coste, especificidad, sensibilidad, bajo límite de detección y miniaturización.

La clasificación de los biosensores puede atender a la naturaleza del transductor (ópticos, basados en masa o electroquímicos) o al biorreceptor de estudio. En este apartado se van a comentar ejemplos de genosensores de transducción electroquímica, pero en la Figura 11 puede observarse una clasificación general de todos los biosensores que pueden desarrollarse para la detección de patógenos alimentarios.

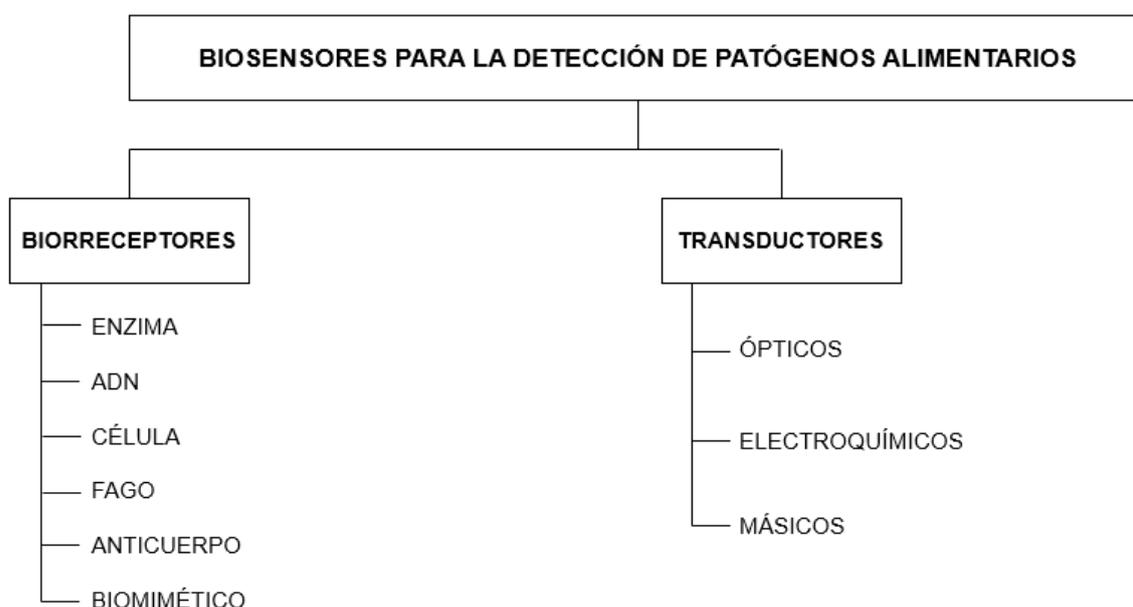


Figura 11. Clasificación de los biosensores desarrollados para patógenos alimentarios en función del biorreceptor o del transductor utilizado.

Tabla 5. Kits comerciales para la detección de *Salmonella* en muestras complejas. Adaptado de [29].

Kit comercial	Fundamento del ensayo	Tiempo total de ensayo	Límite de detección	Compañía comercial
Vidas® Easy SLM	Inmunoensayo tipo sándwich (fluorescencia)	45 h	1 – 5 UFC ³ por cada 25 g	BioMérieux
Vidas® UP <i>Salmonella</i>	Inmunoensayo tipo sándwich (fluorescencia)	25 h	1- 5 UFC por cada 25 g	BioMérieux
TRANSIA® Plate <i>Salmonella</i> Gold	Inmunoensayo ELISA tipo sándwich	24 h	1- 5 UFC por cada 25 g	Biocontrol
RIDASCREEN® <i>Salmonella</i> ELISA	Inmunoensayo ELISA tipo sándwich	<23 h	1- 5 UFC por cada 25 g	R-Biopharm
LOCATE® <i>Salmonella</i> ELISA	Inmunoensayo ELISA con Ab monoclonal	<48 h	1- 5 UFC por cada 25 g	R-Biopharm
TECRA®ULTIMA™ <i>Salmonella</i>	ELISA	42 h	1- 5 UFC por cada 25 g	3 M
3M™ Tecra™ <i>Salmonella</i> visual immunoassay	ELISA	42 h	1- 5 UFC por cada 25 g	3 M
LightCycler® foodproof <i>Salmonella</i> detection	PCR a tiempo real	18-22 h	1- 5 UFC por cada 25 g	Roche
Foodproof® <i>Salmonella</i> PCR	PCR a tiempo real	<24 h	1- 5 UFC por cada 25 g	Merck-Millipore
MicroSEQ® <i>Salmonella</i> spp. Detection kit	PCR a tiempo real	18-27 h	1- 5 UFC por cada 25 g	Applied Biosystems
HybriScan™ D <i>Salmonella</i>	Sándwich de RNA ligado a una detección óptica con enzima	44,5 h	1- 5 UFC por cada 25 g	Sigma-Aldrich
RapidChek® SELECT™ <i>Salmonella enteritidis</i>	Inmunoensayo tipo sándwich	32-48 h	1- 5 UFC por cada 25 g	SDIX

³ UFC son las siglas para hacer referencia a Unidad Formadora de Colonia. Este término se refiere a una única célula bacteriana capaz de originar una colonia en un medio de cultivo.

Inicialmente, en el desarrollo de genosensores para la detección de *Salmonella*, se utilizaban ensayos de hibridación con secuencias sintéticas de ADN que se correspondían con fragmentos de genes específicos para la detección de las especies patógenas [31-35]. Estos ensayos son sencillos y específicos ya que únicamente se amplifica el fragmento purificado y, por tanto, la detección depende únicamente de la hibridación con un oligonucleótido de captura, complementario con el fragmento amplificado.

Sin embargo, este planteamiento se aleja enormemente de la realidad ya que los fragmentos de genes contienen decenas o cientos de nucleótidos mientras que los patógenos a detectar contienen ADN genómico en el que hay miles de nucleótidos, correspondientes a todos los genes de dicho patógeno. Además, si no se realiza una purificación previa de ADN, la presencia de otras moléculas del patógeno también dificulta la tarea de amplificación llevada a cabo por las enzimas polimerasas.

Es por ello que la tendencia actual en el desarrollo de genosensores pasa por el uso de la bacteria completa o de su ADN genómico. Así, se consigue una situación más real que en un futuro permitirá implementar en el mercado los sensores que se desarrollen siguiendo esta estrategia, pudiendo utilizarse directamente en muestras reales de alimentos. Siguiendo esta línea, se han desarrollado con éxito genosensores electroquímicos para la detección de *Salmonella* en medios de cultivo [36-38], en leche y zumo de naranja [36] o bien en carne de cerdo [38].

Esos genosensores que utilizan el ADN genómico en última instancia requieren un acoplamiento con técnicas de amplificación que permitan obtener límites de detección realmente bajos (hasta una copia única de ADN genómico). No obstante, el acoplamiento a PCR como técnica de amplificación genera numerosos problemas: la complejidad de las muestras reales y de los componentes bacterianos inhibe el proceso de amplificación por PCR y, consiguientemente, el límite de detección de la técnica se ve afectado [39]. Además, las diferentes temperaturas de actuación de la amplificación mediante PCR hacen prácticamente imposible la miniaturización de los genosensores acoplados a esta técnica. Con todo esto, parece haber un punto de inflexión en las investigaciones que descartan el desarrollo de futuros genosensores acoplados a PCR.

Las nuevas investigaciones se inclinan hacia el desarrollo de genosensores en los que se lleve a cabo un pretratamiento de la muestra *in situ* previamente al acoplamiento con técnicas de amplificación. El pretratamiento de las muestras de alimentos puede realizarse mediante métodos no específicos como centrifugación, filtración, electroforesis, resinas intercambiadoras de iones o el empleo de hidróxidos metálicos. Sin embargo, estos

procesos dificultan la creación de sensores miniaturizados y, por ello, se recurre a técnicas específicas para la preparación de la muestra y la eliminación de la matriz alimentaria [39].

Dentro de estas técnicas destacan aquellas que se basan en el reconocimiento molecular y específico del patógeno mediante receptores como anticuerpos, aptámeros, carbohidratos, lectinas o bacteriófagos. Resulta especialmente interesante la unión de estas moléculas a partículas de naturaleza magnética, que permiten separar con un imán las células bacterianas de otros componentes de la muestra que no han sido reconocidos por los receptores. Tras la separación con el imán, se efectúa la lisis celular y se extrae el ADN genómico, que se somete a una amplificación para mejorar el límite de detección.

Para el desarrollo de genosensores miniaturizados (tras el pretratamiento y concentración de la muestra en ADN genómico), también hay que considerar la amplificación. Anteriormente, se había descartado la PCR por su dificultad para la miniaturización e inhibición por restos de la matriz alimentaria que puedan persistir tras el pretratamiento. Una alternativa que se postula en este punto son las amplificaciones isotérmicas de las que ya se ha hablado en el primer apartado de este trabajo. Por lo general, las amplificaciones isotérmicas tienen lugar en un tiempo inferior a una hora, son menos sensibles a la presencia de contaminantes y son fácilmente miniaturizables.

En definitiva, en la actualidad ya es posible desarrollar genosensores para la detección de contaminantes microbianos en muestras alimentarias con las características deseadas de coste, tamaño, rapidez, especificidad y sensibilidad, utilizando como muestra de partida el alimento a analizar. Prueba de ello son los genosensores desarrollados por Kim *et al.* [40], que emplea la RPA para detectar *Salmonella* en muestras de leche en tan solo 30 minutos o los de Santiago-Felipe *et al.* [41,42], que emplea esta misma amplificación para detectar *Salmonella* en muestras de pollo, en varios tipos de leche y también en diferentes leches fórmula para neonatos.

Biosensores comerciales

La intensiva labor investigadora para la detección de *Salmonella* en alimentos ha culminado en algunas ocasiones con la comercialización de algunos biosensores (*Tabla 6*). No obstante, la búsqueda constante de sensores más selectivos, más rápidos y más baratos empleando nuevas técnicas hace que los biosensores comercializados estén en el punto de mira de cara a un reemplazo próximo en el futuro.

Tabla 6. Biosensores comerciales desarrollados para la detección de Salmonella. Adaptado de [30]

Entidad	Biosensor
Universidad de Michigan	Detección electroquímica de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> en productos cárnicos
Instituto de Desarrollo Tecnológico de Georgia	Detección de <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> en muestras porcinas
Molecular Circuitry, Inc.	Detección de <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>Campylobacter</i>
Ambri Ltd	Detección de <i>Salmonella</i> y <i>Enterococcus</i>
ANP Tech, USA	Detección de agentes de riesgo biológico como <i>Salmonella</i>

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN

Medidas de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Las medidas de SPR se realizaron con un equipo SPR Autolab ESPRIT (EcoChemie, Holanda), formado por una cubeta de doble canal donde se producen las reacciones. Las medidas se llevaron a cabo sobre discos de oro BK7 (Gomensoro, España) que se sitúan sobre el prisma que compone la superficie de trabajo en la que se va a crear la capa selectiva. Esta superficie se introduce en una cubeta dentro del aparato de SPR y se conecta con dos canales diferentes y separados a los que se añade la muestra manualmente y no mediante un sistema en flujo típico en otros aparatos de SPR. Cada canal es independiente y permite registrar el fenómeno de resonancia de plasmones gracias a la variación del índice de refracción de la superficie, medida en cada canal. Los lavados de la capa selectiva sí se efectúan mediante un sistema en flujo con bombas peristálticas que permiten introducir en la cubeta los tampones de lavado y retirarlo hacia una salida de desecho [43]. La adquisición de las señales se realizó mediante el programa controlador de datos Data Acquisition Software (ESPRIT, versión 4.4) y la elaboración de las figuras se llevó a cabo con OriginPro 8.6 (Northampton, MA).

En la *Figura 12*, pueden observarse las distintas partes de las que se compone la cubeta del dispositivo empleado para el análisis mediante SPR.

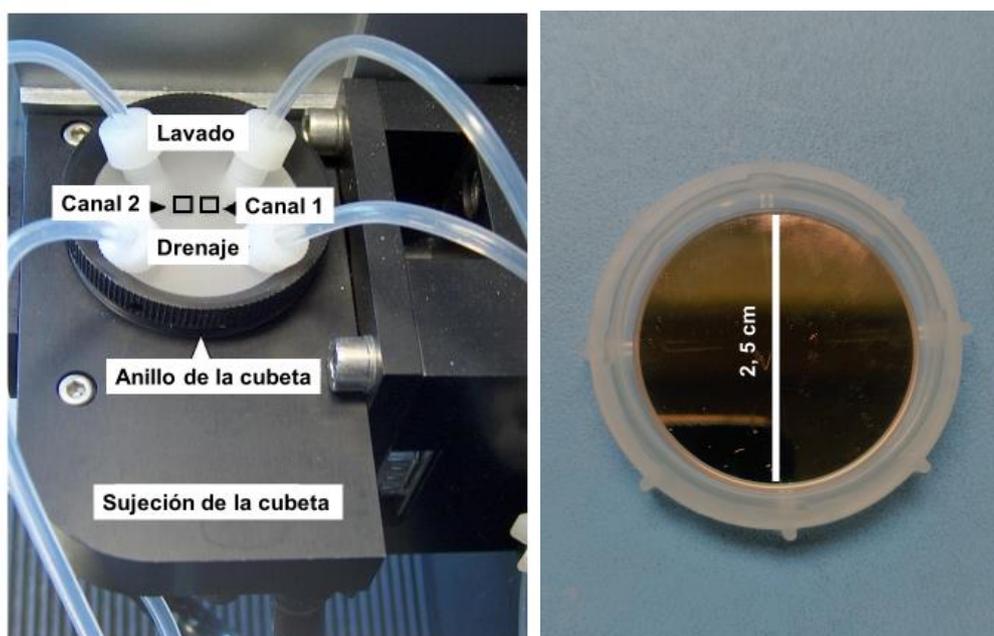


Figura 12. Diferentes partes de las que se compone la cubeta del dispositivo Autolab ESPRIT para el análisis mediante SPR (izquierda) y disco de oro con dimensiones (derecha).

Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas se realizaron con un sistema potencioestático de tres electrodos, controlado por un potencioestato μ Autolab-II (EcoChemie, Holanda) provisto del software NOVA 2.1. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo de Ag|AgCl|KCl 3 M.

Medidas espectrofotométricas

Las medidas espectrofotométricas de los ensayos se realizaron con un lector de placas ELISA Eon (Biotek). Los datos se procesaron con el software Gen5 2.01.

La cuantificación del ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro Genesys 10UV-Vis (Thermo Scientific).

4.2. PROCEDIMIENTOS

Acondicionamiento de los oligonucleótidos

Cebador inverso. El cebador inverso se adquirió de la compañía Metabion (Alemania) purificado por HPLC, en forma liofilizada y con un tiol terminal. En el proceso de síntesis el tiol terminal se protege con un grupo disulfuro, por lo que antes de su utilización se debe desproteger. Con este objetivo se utilizó como agente reductor el ditioneitol, DTT (Sigma Aldrich). El protocolo que se utilizó es el siguiente: se disolvió el oligonucleótido suministrado en 100 μ L de ditioneitol, DTT (Sigma Aldrich), en concentración 0,1 M durante 16 horas para que los grupos tiol quedaran accesibles. Tras ese tiempo, se completó la disolución con 900 μ L de agua ultrapura y se pasó la mezcla por una columna de Shepadex G-25 especial para ADN (Ge Healthcare, UK), previa hidratación de la misma. El primer mililitro se desechó y, seguidamente, se añadieron 1,5 mL de agua ultrapura que se recogieron a su salida por la columna. Esta fracción que contenía el ADN, se cuantificó en un espectrofotómetro y se dividió en alícuotas de las concentraciones deseadas que se conservaron a -20 °C.

Cebador directo. El cebador directo (Metabion, Alemania), con 6-carboxifluoresceína (6-FAM), se reconstituyó en 1 mL de agua ultrapura y se fraccionó en diferentes alícuotas de las concentraciones deseadas, que se conservaron a -20 °C.

Cuantificación de ADN

Espectrofotómetro. En una cubeta de cuarzo se efectuó una dilución (1:10 o 1:100) de ADN concentrado en agua ultrapura y se midió la absorbancia a 260 nm para cuantificarlo. La concentración de ADN se obtuvo siguiendo la ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon C l$, donde A es la absorbancia que se obtiene de la lectura del aparato, ϵ es el coeficiente de extinción

molar del ADN (calculado en función del contenido en bases nitrogenadas), C es la concentración y l la longitud de la cubeta (1 cm).

Fluorímetro. La cuantificación del ADN por fluorimetría se realizó mediante el ensayo High Sensitivity de Qubit (ThermoFischer). Para la preparación de las muestras, se siguieron las indicaciones dadas por la casa comercial y finalmente se midieron las muestras utilizando como longitud de onda de excitación 485 nm y midiendo la radiación emitida a 530 nm.

Modificación de la superficie de oro en SPR

Limpieza de la superficie del oro. El disco de oro puro BK7 se limpió con una disolución de H_2SO_4 al 98 % y H_2O_2 en una relación 3:1 durante 10 minutos. Seguidamente, se lavó con agua ultrapura y se colocó en el equipo de SPR con la ayuda de un aceite con un índice de refracción conocido. Una vez colocado, se cubrió con la disolución SSPE 2X (Sigma Aldrich) hasta el momento de comenzar el análisis. La disolución SSPE se comercializa en concentración 20X y se compone de: 0,02 M EDTA y 2,98 M de cloruro sódico en un tampón 0,2 M de fosfatos (pH 7,4).

Inmovilización del cebador inverso. Se añadieron 70 μL de una disolución del cebador tiolado en SSPE 2X en una concentración de 1 μM . La reacción transcurrió en los dos canales del disco de oro a temperatura ambiente (20 °C) un total de 16 horas. Transcurrido este tiempo, los canales se lavaron con SSPE 2X.

Bloqueo de la superficie libre. Como agente bloqueante de la superficie libre se utilizó una disolución de p-aminotiofenol (Sigma Aldrich). En primer lugar, se preparó una disolución 100 μM de p-aminotiofenol en etanol y, a continuación, se diluyó 1:100 en SSPE 2X. Se colocaron 50 μL de la disolución 1 μM sobre cada canal del disco de oro y se mantuvieron durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, los canales se lavaron con SSPE 2X. Durante la etapa de lavado se utilizó en las cubetas un flujo de entrada es de 125 $\mu L/s$ y un flujo de salida 255 $\mu L/s$.

La modificación completa de la superficie de oro (tanto para el disco de oro en SPR como para el genosensor de oro), puede observarse en la *Figura 13*.

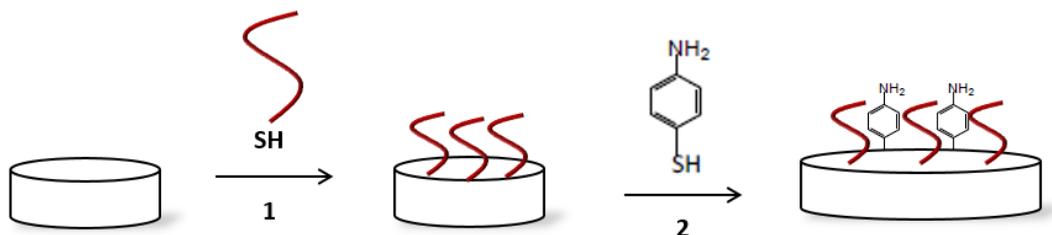


Figura 13. Esquema que muestra los distintos pasos a seguir en la modificación de la superficie de oro: inmovilización del cebador inverso (1) y bloqueo de la superficie libre con p-aminotiofenol.

Modificación de la superficie de oro en el sensor

Sensores de oro. Se utilizaron placas con 16 electrodos de oro, obtenidas depositando oro sobre una lámina de policarbonato, sobre un depósito previo de titanio, de acuerdo a un diseño realizado por M^a Jesús Lobo Castañón del grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo. Estos electrodos son circulares con un diámetro de 2 mm y están rodeados por una corona, también de oro, que actúa como contraelectrodo (*Figura 14*). Para completar la celda electroquímica se utilizó un electrodo de referencia de Ag|AgCl|KCl, que se construye en el interior de una jeringa con un puente salino de papel de filtro.



Figura 14. Sensores de oro diseñados por el grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo.

Limpieza de la superficie de oro. Los electrodos se limpiaron con agua ultrapura y etanol para eliminar posibles restos de fabricación. A continuación, se secaron bajo una corriente de N₂ y se colocó una placa de policarbonato, con un adhesivo en su base, que delimita una serie de pocillos (7 mm de diámetro) para que en ellos transcurran las reacciones independientemente (*Figura 15*).



Figura 15. Sensores de oro con pocillos delimitados por una lámina de policarbonato.

Caracterización de la superficie mediante voltametría cíclica. Cada pocillo se cubrió con 50 μL de una disolución de H_2SO_4 0,5 M y se realizó una voltametría cíclica con un potencial inicial de 0 V durante 5 segundos. A continuación, se efectuaron 5 ciclos consecutivos con una velocidad de 100 mV/s desde 0,2 V hasta 1,6 V. Los pocillos se lavaron con agua ultrapura y se secaron bajo una corriente de N_2 . En caso de que los voltagramas obtenidos no mostrasen una formación adecuada de los óxidos de oro, dichos electrodos no se utilizarían en el análisis posterior.

Inmovilización del cebador inverso. Se añadieron 3 μL de una disolución del cebador tiolado en SSPE 2X en una concentración de 1 μM , cubriendo la superficie circular del electrodo de trabajo. La reacción transcurrió durante un total de 16 horas a 4 $^\circ\text{C}$ en una atmósfera saturada de agua, que se consigue colocando la placa de electrodos en una pequeña caja que contiene tapones con agua. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron con SSPE 2X.

Bloqueo de la superficie libre. Como agente bloqueante de la superficie libre se utilizó una disolución de p-aminotiofenol. En primer lugar, se realizó una disolución 100 μM de p-aminotiofenol en etanol y, a continuación, se diluyó 1:100 en SSPE 2X. Se colocaron 50 μL de la disolución 1 μM sobre cada canal del disco de oro y se mantuvo durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con 100 μL de SSPE 2X.

Modificación de la superficie de vidrio

Preparación del vidrio. Fragmentos cuadrados de vidrio de 2,5 cm x 2,5 cm se lavaron secuencialmente con acetona, etanol y agua ultrapura Mili-Q. Seguidamente, se introdujeron en una disolución HCl 1M durante 10 minutos.

Oxidación del vidrio. La superficie de vidrio se oxidó durante 1 hora utilizando una disolución 1:1:5 de H_2O_2 , NH_3 al 32 % y agua. A continuación, los cristales se lavaron con agua ultrapura y se secaron exhaustivamente con una corriente de N_2 . Este proceso puede observarse en la etapa 1 de la *Figura 16*.

Silanización del vidrio. En un recipiente seco, se preparó una disolución de etanol con un 1 % de (3-aminopropil)trietoxisilano, en la que introdujeron los cristales. Este reactivo interacciona con los grupos hidroxilo en la superficie de vidrio y genera una capa de polisiloxano con grupos amino terminales (*Figura 16*; etapa 2). Esta reacción permaneció durante 18 horas y se aseguró que la atmósfera estuviera libre de agua, ayudándose para ello del parafilm. Por último, se lavaron los cristales con etanol, agua y finalmente se secaron exhaustivamente con nitrógeno. Se colocó una máscara de policarbonato que delimita una serie de pocillos de 7 mm de diámetro.

Unión del reactivo entrecruzante. El reactivo entrecruzante sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil-4(N-maleimido-metil) ciclohexano-1-carboxilato) (Thermofisher) se preparó en una concentración de 2 mg/mL en un tampón de acoplamiento que contiene 50 mM de Na_2HPO_4 , 50 mM de NaH_2PO_4 , 0,15 M de NaCl y 10 mM de EDTA (pH 7,2). En cada pocillo se añadieron 50 μL de la mezcla de disolución de reactivo entrecruzante y se dejó actuar durante 1 hora protegido de la luz. El reactivo entrecruzante interacciona con los grupos amino de la superficie a través del grupo sulfosuccinimidil, dando lugar a una capa con grupos maleimido terminales (etapa 3; *Figura 16*). Transcurrida esa hora, se procedió a realizar tres lavados de 50 μL con el tampón de acoplamiento y, finalmente, se secó exhaustivamente con una corriente de N_2 . En estas condiciones, los electrodos pueden guardarse protegidos de la luz, a 4 °C, en atmósfera seca durante al menos 9 meses.

Inmovilización del cebador inverso. En cada uno de los pocillos, se añadieron 50 μL de una disolución del cebador tiolado en el tampón de acoplamiento en concentración 4 μM . El grupo tiol reacciona con la maleimida anclada a la superficie, dando como resultado una capa de oligonucleótido unida covalentemente a la superficie de vidrio (etapa 4; *Figura 16*). Esta reacción transcurrió durante un total de 16 horas a 4 °C.

La modificación completa de la superficie de vidrio se resume en la *Figura 16*.

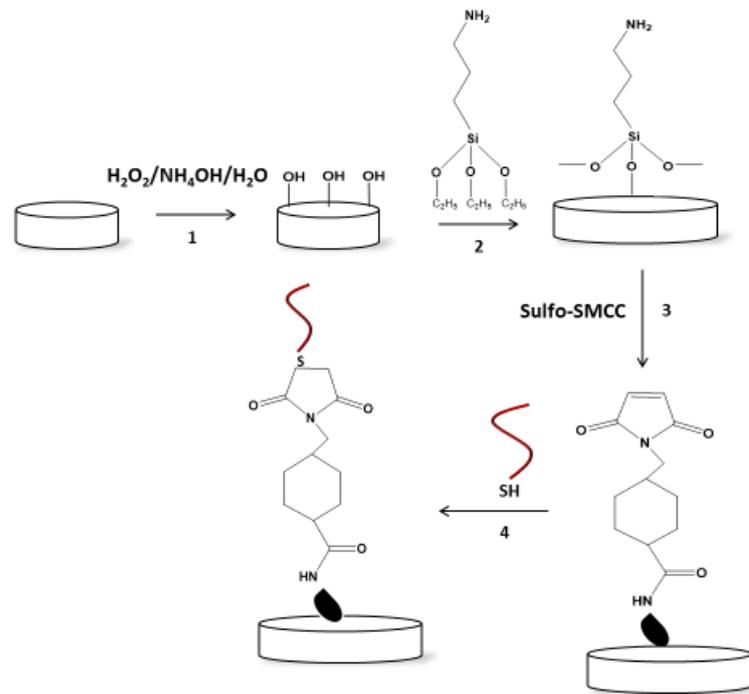


Figura 16. Esquema que muestra los distintos pasos a seguir en la modificación de la superficie de vidrio: oxidación del vidrio (1), silanización (2), unión del reactivo entrecruzante (3) e inmovilización del cebador inverso (4).

RPA en disolución

Se utilizó el kit comercial TwistAmp® Basic (TwistDx, UK). La reacción de amplificación se llevó a un volumen final de 50 μ L en tubos individuales que contienen el liofilizado de enzimas, los nucleótidos y otros agentes que aporta la casa comercial para que transcurra la reacción. En cada tubo se añadieron 300 nM de los cebadores directo e inverso sin marcaje, 2,5 μ L de 10^5 CFU de ADN genómico de *Salmonella enterica* CECT 878 lote 07.02.1995 (Colección Española de Cultivos Tipo, Universitat de Valencia) y 14 mM de acetato de magnesio para iniciar la reacción. Como control negativo se utilizó una reacción con los mismos componentes en ausencia de genoma de *Salmonella*. La reacción tuvo lugar durante 40 minutos a 37 °C en un termociclador (Biocompare).

RPA en superficie

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en tubos individuales que contienen el liofilizado de enzimas y nucleótidos necesarios en un volumen final de 50 μ L. A cada tubo se añadieron 120 nM del cebador directo modificado con fluoresceína, 2,5 μ L de 10^5 CFU de ADN genómico de *Salmonella* en el caso de las muestras y 2,5 μ L de agua ultrapura en los controles. Para iniciar la reacción, se añadieron 2,5 μ L de acetato de magnesio 280 mM y se añadió la mezcla completa a la superficie de los pocillos que había sido modificada con el cebador inverso. En las reacciones asimétricas, se añadió a la disolución el cebador

inverso en concentración 15 nM. La reacción tuvo lugar durante 20 minutos a 37 °C en una estufa. Para finalizar la reacción, se lavaron los pocillos a los 20 minutos con SSPE 2X.

Revelado enzimático

Una vez finalizada la amplificación, se realizó un paso de bloqueo de la superficie libre con 0,5 % caseína en PBS 1X con un volumen de 100 µL/pocillo durante 5 minutos. Tras este tiempo, se añadieron 50 µL de una mezcla que contiene 0,5 U/mL de un fragmento de anticuerpo Fab anti fluoroescéina con la enzima POD (Roche, Alemania). En los ensayos sobre ITO, la enzima utilizada es la ALP con sustrato 1-naftilfosfato en concentración 4 mM disuelto en 125 mL de TrisHCl y 250 µL de MgCl₂ (pH 9,8). La reacción con la enzima se mantuvo durante 30 minutos. A los 30 minutos se lavaron los pocillos 3 veces con 100 µL de PBS 1X y se prepararon para la detección.

Detección óptica del producto amplificado

La detección óptica se llevó a cabo en un lector de placas Eon (Biotek) a una temperatura de 37 °C. Se añadieron 50 µL de TMB a cada pocillo y se mantuvieron en agitación durante 5 minutos; seguidamente, se realizaron las medidas a 650 nm y 630 nm. A continuación, para parar la reacción enzimática, se añadieron 50 µL de H₂SO₄ y se mantuvo en agitación durante 30 segundos. Transcurrido ese tiempo, se midió nuevamente la absorbancia a 450 nm.

Detección electroquímica del producto amplificado

La detección electroquímica se llevó a cabo en el potenciostato con multiplexor añadiendo a cada pocillo 50 µL de TMB. Después de 30 segundos de reacción enzimática, se efectuó una medida amperométrica del producto de oxidación generado enzimáticamente con los siguientes parámetros: se aplicó un potencial inicial de 0 V y, a continuación, se efectuaron medidas de corriente cada 0,01 segundos durante un total de 60 segundos. La señal analítica que se utilizó fue la corriente límite, obtenida como el promedio de corriente durante los últimos 10 segundos de la medida.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ELECCIÓN DEL GEN QUE SE VA A AMPLIFICAR

El objetivo último que persigue este trabajo es desarrollar un método que permita detectar la presencia de *Salmonella* en alimentos. Por esta razón, los ensayos que se efectúan en todo momento se realizan con ADN genómico procedente de *Salmonella*, en vistas a una aproximación más real a las muestras complejas de alimentos. Como se ha indicado, la hibridación del genoma completo con secuencias oligonucleotídicas cortas, ancladas en una superficie es un proceso estéricamente desfavorecido. Por ello, es necesario un tratamiento previo de la muestra que permita acortar la secuencia diana y al mismo tiempo amplificarla. El primer paso del trabajo es la elección del fragmento del genoma que se va a amplificar.

La mayoría de los genosensores que existen para la detección de *Salmonella* (y también el kit para la detección de *Salmonella* mediante RPA desarrollado por la casa comercial TwistDx) utilizan como secuencia de ADN diana un fragmento del gen *invA*. Este gen codifica un componente fundamental involucrado en la invasión de las células en el epitelio intestinal. Sin embargo, no resulta ser el más adecuado ya que falla en la identificación y detección de algunas serovariedades de *Salmonella*, como es el caso de la serovariedad Saint Paul [4]. Para salvar este problema, se seleccionó el gen *bipA* (o *typA*), que codifica para una proteína de unión a GTP que está involucrada en numerosos procesos metabólicos relacionados con el ADN o con la secreción de tipo III. El gen *bipA* está presente en todas las especies de *Salmonella* y apenas presenta variabilidad entre ellas, tratándose de un gen altamente conservado. En definitiva, el gen *bipA* es un gen selectivo y adecuado en la elaboración de un genosensor para la detección *Salmonella* [4].

La secuencia que se selecciona para amplificar tiene una longitud de 86 pares de bases y es una zona altamente conservada en las especies de *Salmonella*. Las bases seleccionadas se corresponden con las bases 4218770-4218855 del genoma secuenciado de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 con referencia GenBank AE006468.1:

5' GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AGC CAT TAC GAC GAT ATT CGT CCG GGT
GAA GTG GGC CAG CGT CAG AAC GGC GTA CTG ATC TCC AA 3'

5.2. DISEÑO DE LOS CEBADORES

El diseño de los cebadores se basa en los trabajos realizados por los autores que describen este gen para la identificación de *Salmonella*. Estos cebadores se seleccionan en regiones

de variabilidad interna muy escasos, que permiten una hibridación perfecta con el ADN genómico [4]. Los cebadores que se diseñan para RPA no tienen un requerimiento específico de temperatura de fusión (T_m) pero sí se recomienda que el contenido en bases de G y C esté entre un 30 % y un 70 % (*Tabla 8*). Asimismo, es conveniente que los cebadores contengan un par de GC en el extremo 3' para hacer la unión con el ADN más estable y han de evitarse repeticiones largas de G en los extremos 5'. Por otro lado, se recomienda que no existan estructuras secundarias de hibridación entre cebadores y de cada cebador consigo mismo [5].

Es importante destacar que el diseño de los cebadores se efectuó con vistas a realizar una amplificación mediante helicasa (HDA) y, se decidió conservarlo en los experimentos con RPA para así poder comparar ambos sistemas de amplificación en un futuro. Los requerimientos para la HDA son los siguientes: tamaño comprendido entre 20 y 35 bases, T_m entre 60 °C y 80 °C, % GC entre 30 y 60 y tamaño del fragmento a amplificar entre 70 y 120 pares de bases [44].

Con estos últimos criterios, se seleccionaron los siguientes cebadores:

Cebador directo: 5' GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AGC 3'

Cebador inverso: 5' TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T 3'

En la *Tabla 7*, se resumen las características de los cebadores seleccionados.

Para la amplificación por RPA, en lo que respecta a la longitud de los cebadores, se recomienda utilizar tanto el cebador directo como el inverso en un rango de 30 a 35 bases, ya que de lo contrario la recombinasa UvsX tiene impedimentos físicos para incorporar los cebadores en la doble hélice de ADN [1]. No obstante, el 9 % de los cebadores utilizados en trabajos de RPA ya publicados presentan menos de 30 bases (alguno de ellos de incluso 20 bases), viéndose que un cebador de 30 a 35 bases puede complementarse fácilmente con un cebador más corto (probablemente de PCR) y dar resultados satisfactorios [45].

Considerando todo lo anterior, en la *Tabla 7* puede observarse que el contenido en GC de los cebadores se encuentra dentro de los límites establecidos y también se cumplen el resto de indicaciones. Aunque el cebador directo (24 bases) y el cebador inverso en disolución (22 bases) son más cortos de lo recomendado, se decide continuar con el experimento ya que la utilización de estos cebadores va a permitir comparar la RPA con un experimento de HDA que se está realizando de forma paralela y que utiliza estos mismos cebadores.

Este primer diseño de cebadores se utilizó en una primera amplificación en disolución, pero con vistas a una amplificación en superficie se efectúan algunas modificaciones. El cebador directo y el cebador inverso se alargan en un cierto número de bases y, se realizan algunas modificaciones en los extremos de ambos oligonucleótidos para facilitar su inmovilización o detección.

El cebador directo va a modificarse en el extremo 5' con una molécula de fluoresceína 6-FAM para la detección posterior, que emplea el fragmento Fab de un anticuerpo anti6-FAM conjugado con una enzima (POD o ALP).

El cebador inverso (de 28 bases), anclado sobre la superficie, se va a modificar añadiendo 10 nucleótidos de T para alargarlo y un grupo tiol (HS-C₆) que permita el anclaje sobre superficies. El alargamiento del cebador anclado permite alejarlo de la superficie y hacer más sencillo el proceso de amplificación en superficie, que está estéricamente impedido con respecto a su proceso homólogo en disolución. Así, este oligonucleótido anclado suma 38 bases en total, de las que utiliza 28 como cebador.

De este modo, se sintetizan los siguientes cebadores:

Cebador directo: [6FAM] 5' GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AGC 3'

Cebador inverso: [HS-C₆] 5' (TTT TTT TTT T) TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC TGA CGC T 3'

Asimismo, se dispone de un cebador inverso sin modificaciones en los extremos para iniciar la reacción en disolución en caso de llevar a cabo la RPA de forma asimétrica:

Cebador inverso para disolución: 5' TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T 3'

Tabla 7. Contenido en GC de los distintos cebadores utilizados.

Molécula a analizar	Longitud	Contenido en GC (%)	Tm (°C)
Cebador directo [6FAM] 5' GGT CTG CTG TAC TCC ACC TTC AGC 3'	24	58	68,5
Cebador inverso [HS-C ₆] 5' (TTT TTT TTT T) TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC TGA CGC T 3'	28	39	71,8

Cebador inverso en disolución 5' TTG GAG ATC AGT ACG CCG TTC T 3'	22	50	65,2
--	----	----	------

El primer paso para la creación del biosensor de *Salmonella* es la optimización de las condiciones de la amplificación para este ensayo en particular. En el kit básico de RPA desarrollado por la casa comercial, se indica que es necesario purificar las muestras tras la amplificación, lo cual ralentiza el procedimiento de ensayo y dificulta el uso en los genosensores. Es por ello que se decide utilizar directamente la amplificación en superficie ya que, tras el tiempo de incubación necesario para realizar la amplificación, se puede eliminar la mezcla de reacción sobrante con un simple lavado.

Sin embargo, se va a realizar una prueba inicial de amplificación en disolución para determinar si las condiciones de tiempo, temperatura y concentración de cebadores son adecuadas para comenzar con los experimentos en superficie.

5. 3. RPA EN DISOLUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La idea de este ensayo es llevar a cabo una cuantificación por fluorescencia del blanco y de la muestra en el momento anterior y en el momento posterior de la amplificación con el objetivo de determinar si la amplificación tiene lugar. Puesto que el Mg^{2+} es el encargado de iniciar la reacción y sin adicionarlo la recombinasa no actúa [46], se van a preparar las mezclas de reacción con todos los componentes (incluidos los cebadores en concentración 300 mM y 10^5 unidades de genoma, UG, en el caso de la muestra) en dos tubos de reacción para blanco y para muestra. En este punto, se cuantifica el ADN mediante fluorescencia y, seguidamente, se añaden 2,5 μ L de MgAc 280 mM para iniciar la reacción. La amplificación tiene lugar en un termociclador a 37 °C durante 40 minutos, tiempo tras el cual se cuantifica nuevamente el ADN.

Los resultados que se obtienen se indican en la *Tabla 8*:

Tabla 8. Resultados de la cuantificación del ADN antes y después de amplificar mediante RPA.

	BLANCO	MUESTRA
Antes de la amplificación	734 ng/mL	689 ng/mL
Después de la amplificación	914 ng/mL	5,61 μ g/mL

Como se puede observar, la relación entre las señales obtenidas antes y después de amplificar es 1,25 para el blanco y más de 8 para la muestra. Los anteriores resultados muestran que la amplificación tiene lugar en las condiciones elegidas y, consiguientemente, se va a proceder a realizar pruebas con la amplificación en superficie.

En algunos experimentos realizados (cuyos datos no se muestran), se trató de medir estos productos de amplificación en disolución mediante un ensayo de hibridación en superficie, pero los resultados obtenidos no resultaron satisfactorios. La razón más probable de esto es que los productos de amplificación en disolución no habían sido purificados, tal y como indicaba la casa comercial. Dado que un paso de purificación en la elaboración de un sensor carece de sentido (por el encarecimiento del proceso y el alargamiento del tiempo de análisis), se continúa a partir de este punto con la amplificación en superficie. Durante la amplificación de la muestra en superficie, la reacción puede pararse sencillamente con un paso de lavado, salvándose así los problemas que plantean los ensayos de hibridación acoplados a una amplificación en disolución.

Como se ha indicado anteriormente, se van a probar dos superficies diferentes: oro (en primer lugar, mediante SPR y después en un chip) y vidrio, con el objetivo final de realizar ensayos electroquímicos similares en ITO.

5. 4. RPA EN SUPERFICIE DE ORO Y MONITORIZACIÓN MEDIANTE SPR

En primer lugar, se optó por inmovilizar el cebador inverso sobre la superficie de oro de discos para realizar medidas en SPR. De esta forma, sería posible monitorizar en tiempo real el proceso de elongación de este cebador mediante amplificación RPA, al añadir a la disolución el genoma de *Salmonella*, el cebador inverso y las enzimas necesarias para la amplificación, junto con sus cofactores. Los cambios del índice de refracción de la superficie con el tiempo, permitirían determinar si se está produciendo la modificación de la superficie de forma idónea e incluso caracterizar la cinética del proceso.

Inmovilización del cebador inverso

La inmovilización del cebador inverso tiene lugar durante 17 horas a temperatura ambiente sobre el disco de oro del SPR. Durante este tiempo, el cebador tiolado se une al oro mediante quimisorción, resultando en un enlace estable entre el oro y el grupo -SH en un proceso que todavía no es conocido en detalle actualmente [47].

Este proceso de unión es registrado por el aparato de SPR (Autolab ESPRIT) que mediante un láser con longitud de onda de 670 nm excita la muestra variando el ángulo de incidencia en un ángulo superior al ángulo crítico y después registra la intensidad de la luz reflejada. La representación de la radiación reflejada frente al ángulo de incidencia permite obtener

el ángulo de resonancia (cuando se alcanza el mínimo en la reflectividad). Este ángulo de resonancia que detecta el aparato se mide en miligrados (m°) y permite observar los cambios que se producen en la superficie como consecuencia de la unión de moléculas sobre el disco de oro. Es importante destacar que el aparato de Autolab efectúa medidas únicamente en un rango de $4000 m^{\circ}$ y que cuenta con dos canales diferentes, uno para el blanco y otro para la muestra.

En la *Figura 17* se observa la inmovilización del cebador tiolado ($1 \mu M$) en los dos canales durante 17 horas. El cambio en el ángulo de resonancia de la superficie indica cómo el grupo tiol se está uniendo por quimisorción al disco de oro.

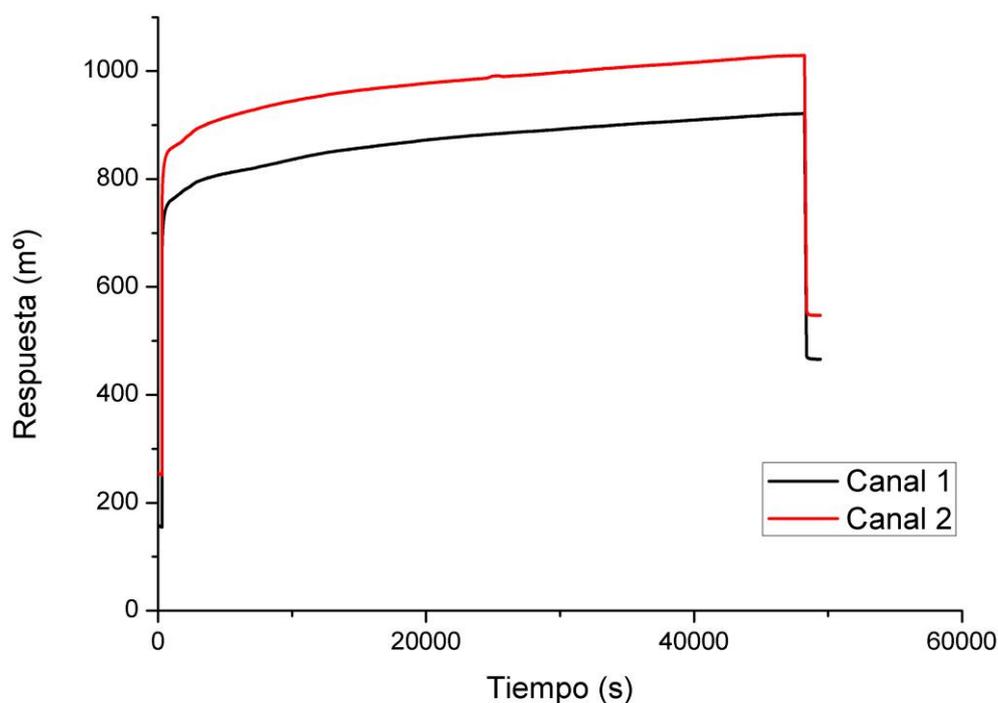


Figura 17. Representación gráfica de la inmovilización del cebador inverso modificado con un grupo tiol sobre la superficie de oro en el SPR.

El proceso de modificación se completa tras las 17 horas de interacción. La cantidad de oligonucleótido anclado, obtenida a partir del cambio en el ángulo de resonancia medido antes y después de la modificación, fue de $1,06 \times 10^{13}$ moléculas/cm² en el canal 1 y de 1×10^{13} moléculas/cm² en el canal 2. Este cálculo se realiza teniendo en cuenta que una variación de $122 m^{\circ}$ en el ángulo de resonancia se corresponde con un recubrimiento de $0,8 ng/cm^2$.

Bloqueo de la superficie libre

La inmovilización del grupo tiol resulta satisfactoria durante las 17 horas y los resultados son reproducibles. Sin embargo, la monocapa generada con el tiol deja libre parte de la superficie del oro que es necesario bloquear para evitar adsorciones inespecíficas en pasos posteriores. Es por ello que el siguiente paso es la adición de un agente bloqueante que, además, contribuye al mantenimiento del oligonucleótido tiolado en una posición vertical a la superficie, necesaria para la amplificación posterior.

Desde hace ya dos décadas, el agente bloqueante que se emplea es el 6-mercaptohexan-1-ol, una molécula lineal que se une al oro mediante el grupo -SH en los huecos libres que no han sido ocupados por el cebador. Sin embargo, hay varios estudios realizados con técnicas de imagen [48, 49] que consideran que la monocapa que se crea empleando este agente bloqueante no es favorable para la estabilidad de la misma y para la hibridación del ADN. Es por ello que se planteó la utilización de otros agentes, como el p-aminotiofenol, que han mejorado la estabilidad para el almacenaje de las monocapas y la ejecución de los posteriores experimentos. La concentración optimizada para este propósito en las monocapas de oligonucleótidos de ADN en oro es de 1 mM [50]. En la *Figura 18* puede observarse la formación de la monocapa de p-aminotiofenol.

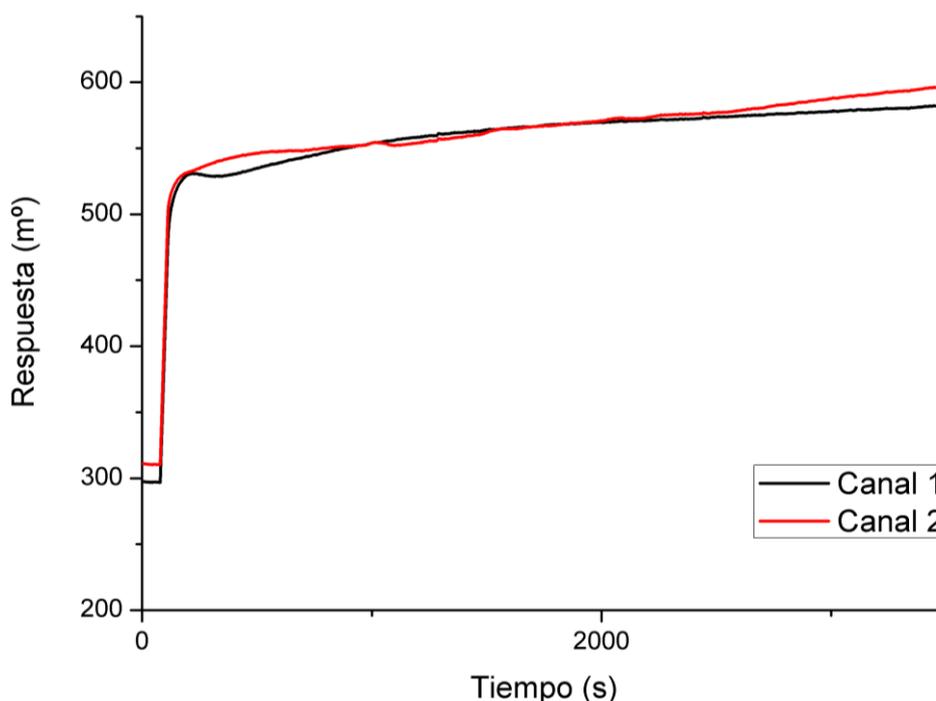


Figura 18. Representación gráfica de la inmovilización del p-aminotiofenol sobre la superficie de oro en el SPR.

Amplificación con el sistema de RPA

La técnica de SPR permite observar cómo la modificación de la superficie del oro con el cebador tiolado y el posterior bloqueo con p-aminotiofenol resultan satisfactorios. A continuación, va a estudiarse la amplificación del ADN genómico mediante el sistema de RPA. Para ello es importante tener en cuenta que el SPR AUTOLAB únicamente puede detectar moléculas ancladas en la zona de la distancia de penetración de la onda evanescente, que con el sistema instrumental utilizado es del orden de 400 nm, por lo que se va a calcular el tamaño del producto amplificado.

La secuencia a amplificar es un ADN de cadena doble de 86 pares de bases y, teniendo en cuenta que una vuelta completa de ADN de doble hebra contiene 8 pares de bases y tiene una longitud de 3,4 nm:

$$\text{Longitud} = 86 \text{ bases} \cdot \frac{3,4 \text{ nm}}{8 \text{ bases}} = 36 \text{ nm}$$

A los 36 nm obtenidos ha de sumarse también la medida correspondiente a las 10 moléculas de timina del cebador anclado y a la fluoresceína del cebador en disolución, pero en ningún caso se llega al límite establecido de 400 nm. En relación a la fluoresceína, es importante destacar que el láser del SPR no afecta a la medida en presencia de esta molécula ya que el láser emite a una longitud de onda de 670 nm y el rango de absorción y emisión de esta molécula se encuentra por debajo de los 670 nm.

A pesar de que no existen dificultades en relación con lo comentado, tras añadir la mezcla de todos los componentes necesarios para la amplificación por RPA, el aparato deja de registrar porque observa una variación en el índice de refracción superior a 4000 m^o (que son los miligrados máximos que AUTOLAB ESPRIT puede detectar) y, consiguientemente, no permite observar la cinética de la reacción. Esta variación tan pronunciada en el índice de refracción del medio puede deberse a componentes muy viscosos que se encuentran en la mezcla de reacción como el polietilenglicol o Carbowax 20M y la presencia de numerosas enzimas [13].

5. 5. RPA EN SUPERFICIE DE ORO Y DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

La caracterización de la mezcla de enzimas empleada en la amplificación, así como las restricciones instrumentales del equipo de SPR con el que se cuenta, no permitieron realizar un seguimiento del proceso de amplificación en la superficie de oro, aunque esto no demuestra que no tenga lugar. Por esta razón, se trató de comprobar si este proceso tiene realmente lugar utilizando la detección amperométrica de los productos de amplificación en superficie.

Para asegurar la reproducibilidad de las medidas en las distintas superficies de oro, es necesario comprobar el estado de la superficie de la que se parte. Esta etapa se puede realizar mediante un experimento de voltametría cíclica, que al mismo tiempo sirve como etapa de acondicionamiento, garantizando una superficie inicial sin impurezas y reproducible.

En la *Figura 19* puede observarse un voltagrama cíclico correspondiente a uno de los electrodos de oro que se emplean en el experimento, obtenido con una disolución de H_2SO_4 0,5 M. En esta imagen puede observarse que la formación de los óxidos de oro se produce entre 1,3 y 1,6 V y su reducción tiene lugar durante el proceso de variación del potencial inverso y aparece en forma de pico estrecho, con un potencial de pico de 0,9 V. Estas medidas fueron realizadas con el electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$ con un puente salino externo de KNO_3 y se corresponden con el comportamiento voltamétrico que se espera para un electrodo de oro policristalino en el medio de H_2SO_4 [51].

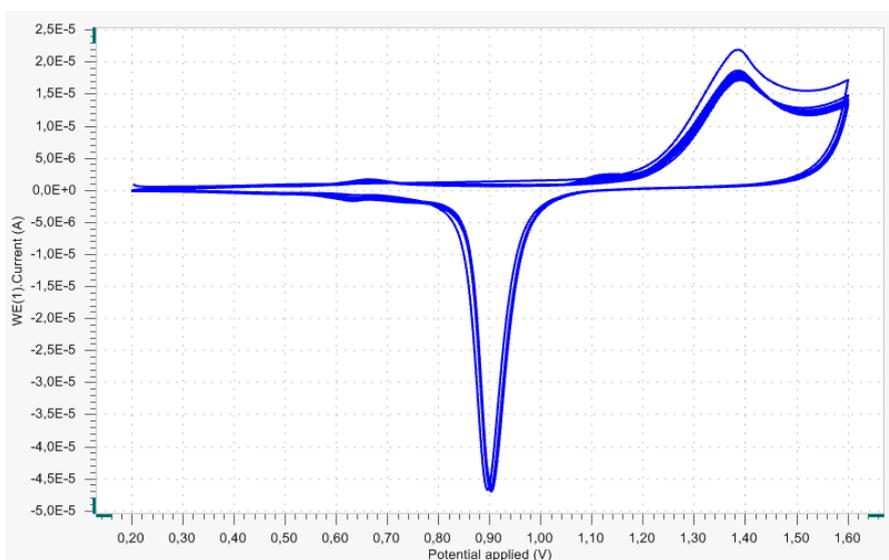


Figura 19. Voltagrama cíclico obtenido con un electrodo de oro en H_2SO_4 0,5 M.

RPA en superficie

La *Figura 20* ejemplifica una amplificación en superficie mediante RPA en la que el cebador inverso es el que permanece anclado en la superficie y equivale al oligonucleótido de captura. El proceso de amplificación en superficie requiere, por tanto, añadir la muestra que contiene ADN, las enzimas necesarias para la amplificación (recombinasa, ADN polimerasa y proteínas SSB), nucleótidos de A, T, C y G y el otro cebador que delimita el fragmento a amplificar (en el caso de la *Figura 20* el cebador inverso).

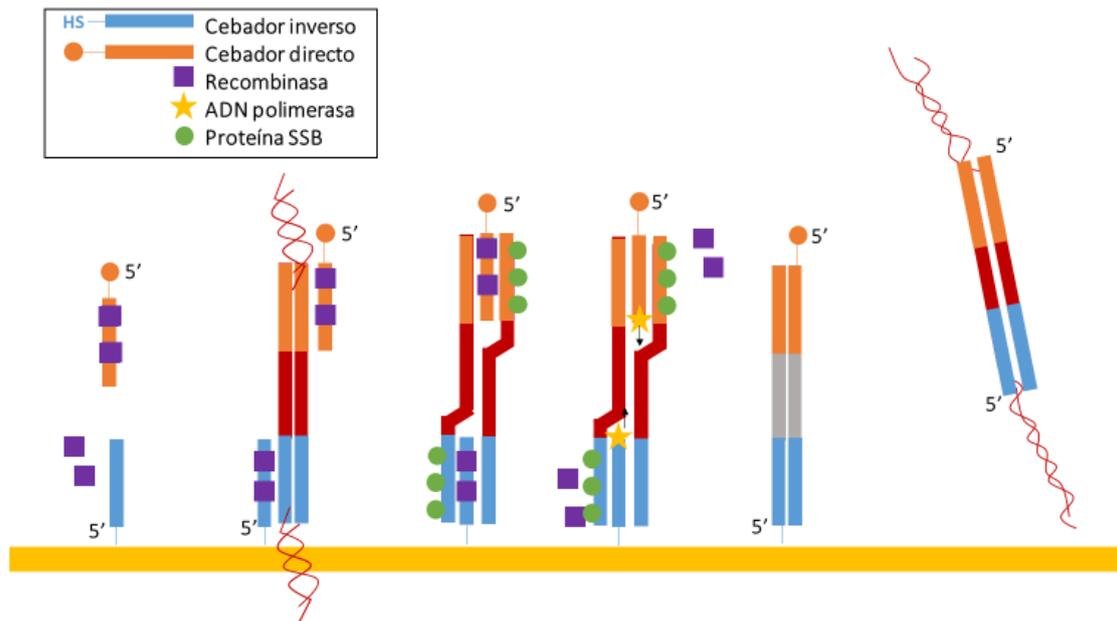


Figura 20. Mecanismo de actuación de la RPA en superficie. El cebador directo permanece anclado en la superficie y, junto con el cebador reverso, forman filamentos nucleoproteicos con la recombinaasa. Este complejo busca homología en el ADN genómico, las proteínas SSB estabilizan la hebra desplazada y la polimerasa de ADN realiza copias del fragmento de ADN en ciclos exponenciales.

En el proceso de amplificación del ADN, algunos autores prefieren añadir en la disolución sobre la superficie modificada con captura los dos cebadores, con el objetivo de aumentar la sensibilidad del sensor. Esto se consigue porque la reacción de amplificación comienza de forma más sencilla y favorable en la disolución, pues el ADN genómico tiene un tamaño considerable y es posible que el acceso a la superficie para contactar con el cebador anclado presente dificultades estéricas. Una estrategia consiste en añadir en disolución el cebador no anclado más el cebador anclado (en una concentración varias veces inferior al primero) sobre la superficie modificada. Así, la reacción se iniciará en disolución y se facilita la apertura del ADN genómico, pero una vez que el cebador limitante se agote, la amplificación continuará en superficie. Los fragmentos amplificados en disolución hibridarán sobre oligonucleótidos de captura, a la vez que estos sirven como cebadores para continuar la amplificación. Esta amplificación en superficie que se inicia con los dos cebadores en disolución recibe el nombre de amplificación asimétrica. Por su parte, la amplificación en superficie con un único cebador en disolución es la amplificación simétrica [9].

En el caso de realizar parte de la amplificación en disolución, la hibridación entre el oligonucleótido de captura y el fragmento amplificado ha de ser perfecta para que se forme un dúplex muy estable. Si, por el contrario, no se da una hibridación perfecta (hay

apareamientos erróneos de algunas bases), el dúplex será menos estable. Además, es conveniente que no exista hibridación inespecífica de los cebadores en disolución con la captura ya que ello llevaría a la obtención de señales sin la presencia del ADN genómico que se analiza. Se ha establecido que hibridaciones en las que hay apareamientos erróneos de más de 4 o 6 bases, no generan señales electroquímicas y, por tanto, no dan lugar a la aparición de señales. Además, en la hibridación con la captura, hay que tener en cuenta diferentes situaciones para optimizar la longitud de los oligonucleótidos de captura. Por un lado, las capturas de menor tamaño se unirán más rápidamente al fragmento amplificado y, además, previenen dobleces sobre sí mismas que puedan afectar negativamente el proceso de hibridación. Por otra parte, las capturas de más nucleótidos tienen una mayor selectividad por unirse a una región mayor en el ADN amplificado [7].

La amplificación en superficie permite condensar los procesos de amplificación y reconocimiento en único paso, aportando ventajas importantes de rapidez y economía a estos biosensores. El objetivo final de los biosensores de ADN es detectar la hibridación del fragmento amplificado con el oligonucleótido de captura o bien la elongación del cebador anclado (*Figura 21*).

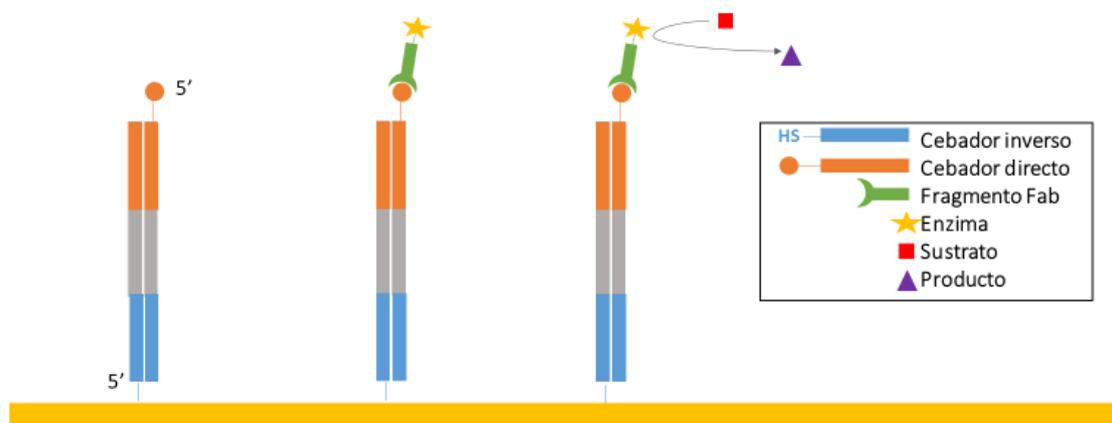


Figura 21. Mecanismo de detección del producto de amplificación. El cebador inverso permanece anclado en la superficie y el cebador directo tiene una marca con 6-FAM. El fragmento Fab del anticuerpo con la enzima reconoce el marcaje 6-FAM y permite la reacción de transformación enzimática desde sustrato a producto, con detección óptica o electroquímica.

La amplificación en superficie se realiza bajo unas condiciones iniciales de 37°C y 20 minutos con una concentración del cebador directo 120 nM y del cebador inverso en disolución 15 nM. Se realizan diversas pruebas de amplificación en condiciones asimétricas para favorecer el comienzo de la reacción en disolución, pero las señales del blanco dan lugar a una señal amperométrica irreproducible y, en algunos casos, superior a la propia

señal de la muestra (desde 100 nA hasta 1,7 μ A). En el caso de los ensayos en condiciones de simetría sin el cebador inverso en disolución, los resultados también son poco reproducibles, pero las señales del blanco se reducen con respecto a la amplificación asimétrica (entre 70 nA y 970 nA). El mejor de los ejemplos obtenidos se muestra en la *Figura 22*, donde se nota cómo únicamente con una gran cantidad de copias de ADN genómico (10^5 UG), se pueden distinguir la señal del blanco de la señal de la muestra, con una desviación estándar relativa entre medidas repetidas muy elevada.

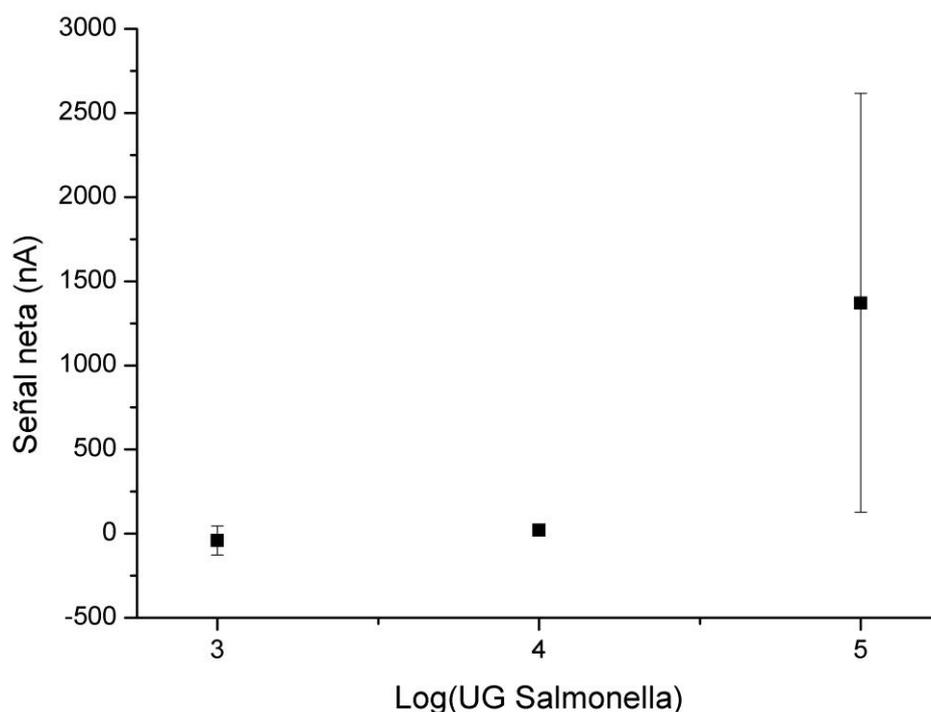


Figura 22. Respuesta electroquímica obtenida para diferentes concentraciones de ADN genómico.

A pesar de que se observa una respuesta que es mayor conforme aumenta la concentración de ADN genómico, la irreproducibilidad de los datos en esta superficie es muy alta. Estos resultados poco reproducibles pueden explicarse teniendo en cuenta dos factores: la plataforma del sensor de oro o bien el diseño del experimento. Los sensores de oro que se emplean en este experimento son de diseño propio y se habían utilizado previamente, con lo que la ausencia de datos acerca de la homogeneidad de la superficie puede tratarse de una fuente de error a considerar. Otra posible explicación recae sobre la distribución heterogénea e irreproducible del cebador sobre la superficie de oro, ya descrita en la literatura.

5.6. RPA EN SUPERFICIE DE VIDRIO

La superficie de vidrio se modifica paso por paso como se ha explicado anteriormente hasta conseguir que el cebador inverso quede anclado en la superficie del pocillo. Si además de reconocer el ácido nucleico se quiere amplificar el mismo, es posible utilizar el oligonucleótido de captura como cebador para llevar a cabo la amplificación.

Con todo esto, se decide realizar ensayos simultáneos de amplificación simétrica y asimétrica y fijar los parámetros de temperatura y tiempo en 37 °C y 30 minutos respectivamente. En cuanto a la concentración de los cebadores, se elige una concentración 120 nM para el cebador directo marcado con la fluoresceína y una concentración 15 nM para el cebador inverso en la amplificación asimétrica. Los resultados de absorbancia, a 450 nm, tras el revelado enzimático se detallan en la *Figura 23*.

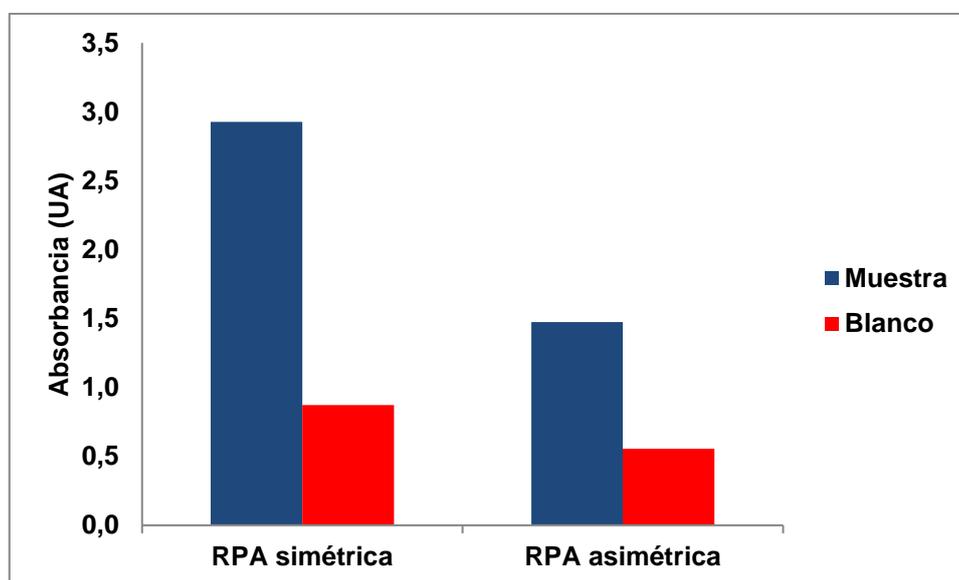


Figura 23. Resultados de la absorbancia a 450 nm de blancos y muestras tras las pruebas de RPA simétrica y asimétrica.

En ambos casos, se puede distinguir perfectamente el blanco de la muestra. Sin embargo, la relación señal/blanco en la amplificación simétrica (3,35) es algo superior a la amplificación asimétrica que comienza en disolución (2,66) y, por ello, se va a intentar optimizar la primera de las condiciones. A pesar de haber seleccionado la amplificación simétrica, el blanco genera una señal considerable por lo que los siguientes ensayos se dirigen a estabilizarlo en una señal menor.

La concentración del cebador directo utilizada (120 nM) ya es bastante baja y, para la temperatura, la casa comercial no recomienda bajar de 37 °C. Por tanto, se va a estudiar una reducción en el tiempo de amplificación a 20 minutos, realizando un calibrado con

amplificación simétrica del ADN genómico con concentraciones desde 10^2 UG hasta 10^5 UG (Figura 24).

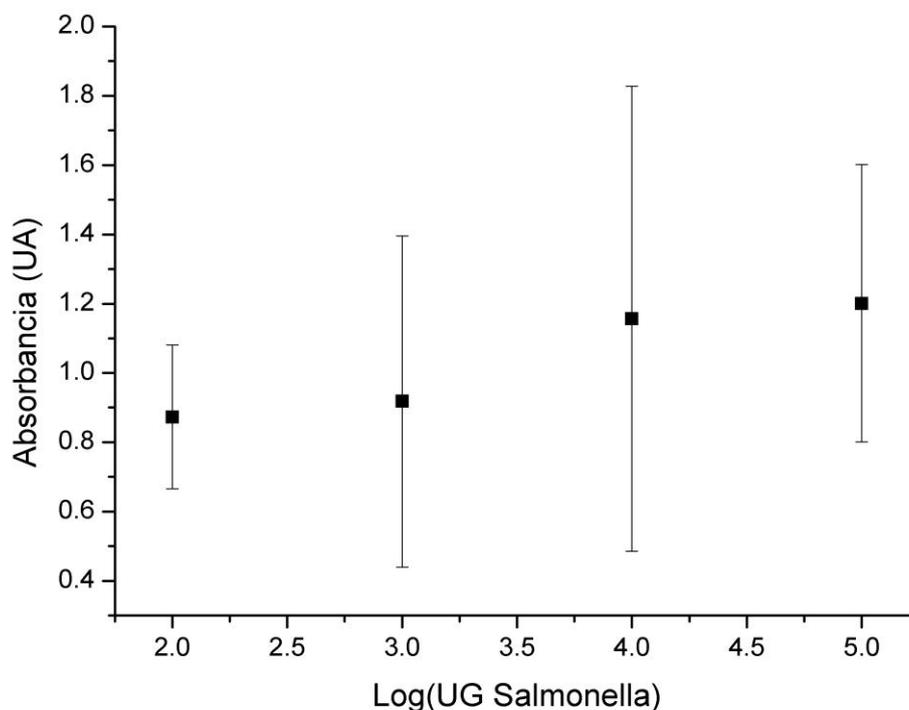


Figura 24. Representación de la señal óptica obtenida en absorbancia a 450 nm para las diferentes concentraciones frente al logaritmo de la concentración.

Aunque los resultados para las muestras control no se muestran en la gráfica, es importante destacar que los valores se reducen a la mitad con respecto al experimento anterior ($0,402 \pm 0,09$ UA). Estos resultados muestran que la amplificación en superficie transcurre favorablemente y permite distinguir las distintas concentraciones de ADN genómico que se añaden del control negativo o blanco. De nuevo, la irreproducibilidad de las medidas es elevada, especialmente al emplear cantidades muy altas de ADN genómico. El sistema diseñado permite distinguir 10^2 UG de Salmonella del control negativo, con una desviación estándar relativa del 23,8 %. Si bien es cierto que las desviaciones son elevadas, se pueden distinguir las muestras de los controles y estimar la concentración del patógeno en este caso no es crucial, pues únicamente se trata de certificar la presencia o ausencia del mismo en una muestra. Así pues, bajo estas mismas condiciones se propone una modificación del ITO (un cristal conductor que permite la detección electroquímica) igual a la realizada para el vidrio.

El protocolo a seguir para el ensayo sobre ITO sería idéntico salvo en el paso de revelado enzimático que, como se ha explicado anteriormente, requiere el empleo de una enzima

diferente como puede ser la fosfatasa alcalina y un sustrato convertible por la misma como el 1-naftilfosfato. En una aproximación para desarrollar un sensor en superficie de ITO se comprobó la idoneidad de la modificación realizada para el vidrio también en este cristal. A continuación, se añadió el resultado de amplificación en disolución del fragmento de ADN diana amplificado mediante RPA y los resultados se muestran en la *Figura 25*.

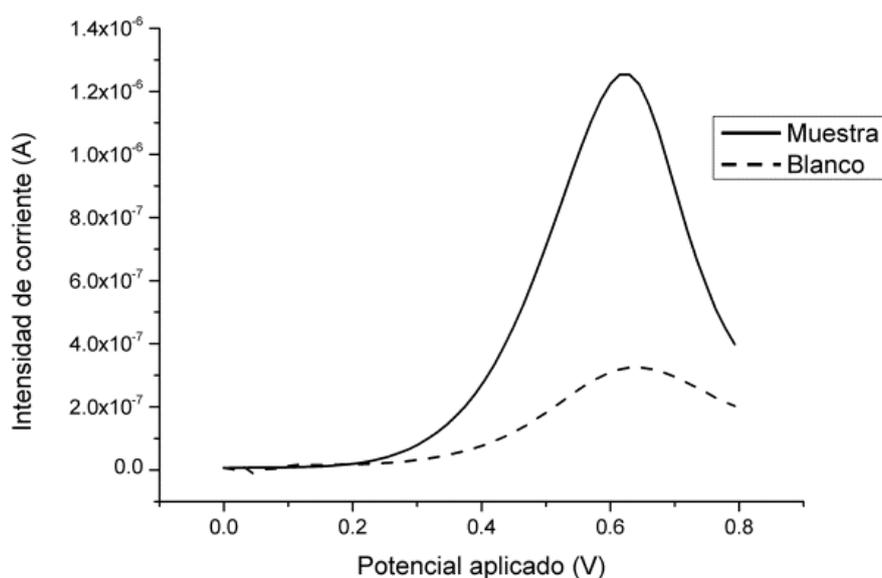


Figura 25. Voltograma correspondiente a un proceso de voltametría diferencial de pulso para una muestra control y una muestra de ADN de *Salmonella* amplificado.

Estos resultados muestran que es factible continuar con el desarrollo del genosensor en ITO, cuyo siguiente paso sería la amplificación en superficie.

Sin embargo, en ambas superficies estudiadas, se ha observado que la reproducibilidad de las señales no es la adecuada. Como explicación a este fenómeno se postula la posible hibridación que existe entre los cebadores a 37 °C.

Se había comentado que los cebadores empleados para la amplificación del fragmento de ADN genómico fueron inicialmente desarrollados para un sistema de amplificación mediante helicasa (HDA), que permitieron desarrollar satisfactoriamente un genosensor para la detección de *Salmonella* sobre superficie de ITO (trabajo que se publicará próximamente). Su prueba en este sistema para amplificación por RPA pretendía comparar ambos sistemas de amplificación isotérmica. No obstante, es importante tener en cuenta que la longitud recomendada para los cebadores de RPA es de 30 a 35 bases y dos de los cebadores que se emplean cuentan con 24 bases. A pesar de ello, ya se había comentado previamente que esto no ha supuesto un problema para otros autores que utilizan

cebadores diseñados para PCR u otras ampliaciones también en el sistema de amplificación mediante recombinasa [45].

Sin embargo, los cebadores diseñados para RPA cuentan con otro reto a superar: la temperatura de amplificación. En el caso de la HDA, realizada a 65 °C, la temperatura es considerablemente más elevada y ello dificulta la hibridación entre cebadores. Sin embargo, la RPA tiene una temperatura de actuación recomendada entre 37 °C y 40 °C, lo que hace que la hibridación entre cebadores o de un cebador consigo mismo sea más sencilla. En este caso, se ha recurrido al servidor Mfold (*online*) para llevar a cabo un estudio de las posibles estructuras secundarias de los cebadores.

En nuestro experimento, la posible estructura de hibridación que se forma tiene una energía libre de Gibbs de -5,6 kJ/mol en las condiciones en las que se lleva a cabo la amplificación en disolución. La estructura puede observarse en la *Figura 26*.

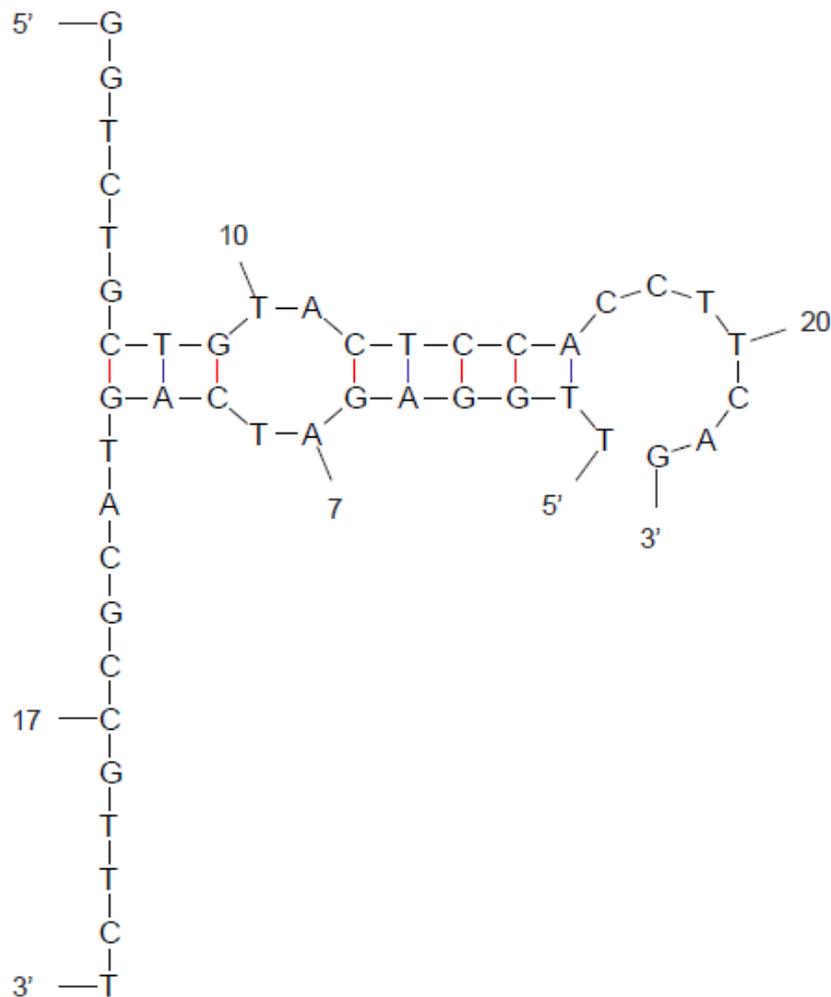


Figura 26. Estructura de hibridación de los cebadores a 37 °C.

Otra de las observaciones que se han hecho en este trabajo y que confrontan con lo explicado por otros autores es que la amplificación en condiciones simétricas, sin cebador inverso en disolución, genera señales más fiables y reproducibles. Se comentaba anteriormente que añadir parte del cebador anclado a la disolución facilita la apertura del genoma y hace que la reacción comience sin impedimentos estéricos en disolución.

En nuestro caso, la hibridación entre cebadores en superficie se encuentra considerablemente impedida (la principal estructura formada entre ambos cebadores coincide con las bases más próximas a la superficie de anclaje). Este impedimento estérico hace que, en condiciones simétricas, se obtengan resultados más reproducibles pues se evitan las amplificaciones erróneas del producto de cebadores que se pueda generar en disolución.

6. CONCLUSIONES

Seguidamente, aparecen enumeradas las conclusiones a las que se ha llegado en el presente trabajo:

1. Se ha revisado la importancia del desarrollo de biosensores rápidos, miniaturizables y fiables en la detección de patógenos alimentarios. En este campo, se ha demostrado el importante papel que ya tienen y pueden aumentar en el futuro los biosensores con transducción electroquímica.
2. Se ha estudiado el creciente aumento de las técnicas de amplificación isotérmica, así como sus ventajas en detrimento de otras técnicas de amplificación tradicionales como la PCR. Dentro de las amplificaciones isotérmicas, se postula la RPA como una gran competidora por su bajo tiempo de análisis y alta eficacia.
3. Se ha comprobado experimentalmente el proceso de amplificación en superficie mediante RPA para la creación de biosensores. Se ha demostrado que los requerimientos más importantes para el diseño de cebadores adecuados tienen que ver con la hibridación y no tanto con la longitud de los mismos.
4. Se ha ensayado con buenos resultados la amplificación de RPA sobre superficie de vidrio, acoplado a una detección óptica.
5. Se postula el ITO como una plataforma interesante para llevar a cabo las amplificaciones de RPA en superficie y la futura creación de biosensores con transducción electroquímica.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante todas estas páginas se ha demostrado como la creación de biosensores para detectar patógenos alimentarios como la *Salmonella* puede mejorar nuestras vidas.

Los genosensores con transducción electroquímica son sensibles y eficaces para la detección de pequeñas cantidades de ADN genómico de las especies de *Salmonella* y la implantación como método rutinario de análisis en los laboratorios de alimentos está cada vez más cerca.

La creación de estos genosensores en miniatura no sería posible sin las técnicas de amplificación isotérmica y, es por ello, que los experimentos realizados en este trabajo deberían seguir con el objetivo de optimizar el proceso en la superficie de ITO.

Se comentaba al principio de este trabajo que, paralelamente, se estaba estudiando la amplificación mediante HDA con los mismos cebadores utilizados en este trabajo de RPA. En un futuro, sería interesante comparar la eficacia de estas dos amplificaciones, así como sus ventajas e inconvenientes de cara a desarrollar un proceso automatizado que permita detectar *Salmonella* en alimentos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cumbre Mundial sobre la Alimentación: Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, Roma, 13-17 de noviembre, 1996; FAO.
2. Santiago, S. Integración de técnicas basadas en ADN para el desarrollo de biosensores aplicados en seguridad alimentaria. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, octubre, 2015.
3. Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C. An Overview of Foodborne Pathogen Detection: In the Perspective of Biosensors. *Biotechnology Adv* **2010**, *28* (2), 232–254.
4. Calvó, L.; Martínez-Planells, LA.; Pardos-Bosch, J.; Garcia-Gil, LJ. A New Real-Time PCR Assay For The Specific Detection Of Salmonella spp. Targeting The bipA gene. *Food Anal. Methods* **2008**, *1*, 236–242.
5. James, A.; Macdonald, J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* **2015**, *1*, 1-15.
6. Manzanares, C. L.; Martín, B.; Sánchez, M.; López, B. Electrochemical Genosensors as Innovative Tools for Detection of Genetically Modified Organisms. *Trends Analyt Chem.* **2015**, *66*, 19–31.
7. Banica F-G. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications, 1st ed.; John Wiley & Sons: Chicester, U.K., 2012.
8. Deng, H.; Gao, Z. Bioanalytical Applications of Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques. *Anal Chim Acta* **2015**, *853* (1), 30–45.
9. Kunze, A.; Dilcher, M.; Wahed, A.; Hufert, F.; Niessner, R.; Seidel, R. On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria. *Anal Chem* **2016**, *88* (1), 898–905.
10. Crannell, Z. A.; Rohrman, B.; Richards-Kortum, R. Equipment-Free Incubation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions Using Body Heat. *PLoS ONE* **2014**, *9* (11), 1–7.
11. Chen, Z.; Yang, H.; Pavletich, N. P. Mechanism of Homologous Recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA Structures. *Nature* **2008**, *453* (7194), 489–4.
12. Piepenburg, O.; Williams, C. H.; Stemple, D. L.; Armes, N. A. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* **2006**, *4* (7), 1115–1121.
13. Piepenburg, O.; Williams, C. H.; Armes, N.A.; Stemple, D.K. Recombinase Polymerase Amplification. US 7666598 B2, 23 de febrero, 2010.
14. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) - the isothermal DNA/RNA amplification that really works. <https://www.twistdx.co.uk/> (acceso 17 abril de 2017).

15. Krölov, K.; Frolova, J.; Tudoran, O.; Suhorutsenko, J.; Lehto, T.; Sibul, H.; Mäger, I.; Laanpere, M.; Tulp, I.; Langel, U. Sensitive and Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* by Recombinase Polymerase Amplification Directly from Urine Samples. *J Mol Diagn* **2014**, *16* (1), 127-135.
16. Faye, O.; Faye, O.; Soropogui, B.; Patel, P.; El Wahed, A. A. bd; Loucoubar, C.; Fall, G.; Kiory, D.; Magassouba, N.; Keita, S.; et al. Development and Deployment of a Rapid Recombinase Polymerase Amplification Ebola Virus Detection Assay in Guinea in 2015. *Euro Surveill.* **2015**, *20* (44).
17. Abd El Wahed, A.; Sanabani, SS.; Faye, O.; Pessôa, R.; Patriota, JV.; Giorgi, RR.; Patel, P.; BöhlkenFascher, S.; Landt, O.; Niedrig, M.; et al. Rapid Molecular Detection of Zika Virus in AcutePhase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. *PLOS Currents Outbreaks* **2017**, *1*.
18. Abd El Wahed, A.; Patel, P.; Faye, O.; Thaloengsok, S.; Heidenreich, D.; Matangkasombut, P.; Manopwisedjaroen, K.; Sakuntabhai, A.; Sall, A. A.; Hufert, F. T.; et al. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. *PLoS ONE* **2015**, *10* (6).
19. Sabaté, K.; Magriñà, I.; Mayboroda, O.; Katakis, I.; O'Sullivan, C. Enhanced Solid-phase Recombinase Polymerase Amplification and Electrochemical Detection. *Anal Bioanal Chem* **2017**, 1-9.
20. Tortajada-Genaro, LA.; Santiago-Felipe, S.; Amasia, M.; Russom, A.; Maquieira A. Isothermal Solid-Phase Recombinase Polymerase Amplification on Microfluidic Digital Versatile Discs (DVDs). *RSC Adv* **2015**, *8*.
21. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Isothermal DNA Amplification Strategies for Duplex Microorganism Detection. *Food Chem.* **2015**, *174*, 509–515.
22. del Río, J. S.; Svobodova, M.; Bustos, P.; Conejeros, P.; O'Sullivan, C. K. Electrochemical Detection of *Piscirickettsia Salmonis* Genomic DNA from Salmon Samples Using Solid-Phase Recombinase Polymerase Amplification. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408* (30), 8611–8620.
23. Goda, T.; Tabata, M.; Miyahara, Y. Electrical and Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Amplification. *Front Bioeng Biotechnol* **2015**, *3*, 1–7.
24. Nawattanapaiboon, K.; Kiatpathomchai, W.; Santanirand, P.; Vongsakulyanon, A.; Amarit, R.; Somboonkaew, A.; Sutapun, B.; Srikhirin, T. SPR-DNA Array for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Combination with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Biosens Bioelectron* **2015**, *74*, 335–340.

25. Matsishin, M.; Rachkov, A.; Lopatynskiy, A.; Chegel, V.; Soldatkin, A.; El'skaya, A. Selective Amplification of SPR Biosensor Signal for Recognition of rpoB Gene Fragments by Use of Gold Nanoparticles Modified by Thiolated DNA. *Nanoscale Res Lett* **2017**, *12*, 252-258.
26. Kausaite, A.; Van Dijk, M.; Castrop, J.; Ramanaviciene, A.; Baltrus, J. P.; Acaite, J.; Ramanavicius, A. Surface Plasmon Resonance Label-Free Monitoring of Antibody Antigen Interactions in Real Time. *Biochem Mol Biol Educ*. **2007**, *35* (1), 57–63.
27. Miranda-Castro, R.; Lobo-Castan n, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tu n-Blanco, P. Comparative Study of Hrp, a Peroxidase-Mimicking Dnazyme, and Alp as Enzyme Labels in Developing Electrochemical Genosensors for Pathogenic Bacteria. *Electroanalysis* **2010**, *22* (12), 1297–1305.
28. González-Álvarez, M. J.; Pérez-Ruiz, E.; Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Miranda-Ordieres, A. J.; Lobo-Casta n, M. J. Effect of Tags and Labels on the Performance of Enzyme-Amplified Electrochemical Genomagnetic Assays. *Electroanalysis* **2013** *25* (1), 147-153.
29. Li bana, S.; Brand o, D.; Alegret, S.; Pividori, M. I. Electrochemical Immunosensors, Genosensors and Phagosensors for Salmonella Detection. *Anal Methods* **2014**, *6* (22), 8858–8873.
30. Pashazadeh, P.; Mokhtarzadeh, A.; Hasanzadeh, M.; Hejazi, M. Biosensors and Bioelectronics Nano-Materials for Use in Sensing of Salmonella Infections: Recent Advances. *Biosens Bioelectron* **2017**, *87*, 1050–1064.
31. García, T.; Revenga-Parra, M.; A norga, L.; Arana, S.; Pariente, F.; Lorenzo, E. Disposable DNA Biosensor Based on Thin-Film Gold Electrodes for Selective Salmonella Detection. *Sensors Actuators B Chem*. **2012**, *161* (1), 1030–1037.
32. Díaz-Serrano, M.; Rosado, A.; del Pilar, J.; Arias, M.; Guadalupe, A. R. A Polymer-Based Electrochemical DNA Biosensor for Salmonella: Preparation, Characterization and Calibration. *Electroanalysis* **2011**, *23* (8), 1830–1841.
33. Weber, J. E.; Pillai, S.; Ram, M. K.; Kumar, A.; Singh, S. R. Electrochemical Impedance-Based DNA Sensor Using a Modified Single Walled Carbon Nanotube Electrode. *Mater Sci Eng C* **2011**, *31* (5), 821–825.
34. Farabullini, F.; Lucarelli, F.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; Mascini, M. Disposable Electrochemical Genosensor for the Simultaneous Analysis of Different Bacterial Food Contaminants. *Biosens Bioelectron*. **2007**, *22* (7), 1544–1549.
35. Giallo, M. L. Del; Ariksoysal, D. O.; Marrazza, G.; Mascini, M.; Ozsoz, M. Disposable Electrochemical Enzyme-Amplified Genosensor for Salmonella Bacteria Detection. *Anal Lett* **2005**, *38* (15), 2509–2523.

36. Vetrone, S. A.; Huarng, M. C.; Alocilja, E. C. Detection of Non-PCR Amplified *S. Enteritidis* Genomic DNA from Food Matrices Using a Gold-Nanoparticle DNA Biosensor: a proof-of-concept study. *Sensors*, **2012**, *12*(8), 10487-10499.
37. Zhang, D.; Yan, Y.; Li, Q.; Yu, T.; Cheng, W.; Wang, L.; Ding, S. Label-Free and High-Sensitive Detection of Salmonella Using a Surface Plasmon Resonance DNA-Based Biosensor. *Journal of biotechnology*, **2012** *160*(3), 123-128.
38. Bai, S.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Huang, W.; Xu, S.; Chen, H.; Fan, L. M.; Chen, Y.; Deng, X. W. Rapid and Reliable Detection of 11 Food-Borne Pathogens Using Thin-Film Biosensor Chips. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *86* (3), 983–990.
39. Dwivedi, H. P.; Jaykus, L. Detection of Pathogens in Foods: The Current State-of-the-Art and Future Directions. *Crit Rev Microbiol* **2011**, *37* (1), 40–63.
40. Kim, T.-H.; Park, J.; Kim, C.-J.; Cho, Y.-K. Fully Integrated Lab-on-a-Disc for Nucleic Acid Analysis of Food-Borne Pathogens. *Anal Chem* **2014**, *86* (8), 3841–3848.
41. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. Recombinase Polymerase and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a DNA Amplification-Detection Strategy for Food Analysis. *Anal Chim Acta* **2014**, *811*, 81–87.
42. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. One-Pot Isothermal DNA Amplification - Hybridisation and Detection by a Disc-Based Method. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *204*, 273–281.
43. Autolab ESPRIT Data Acquisition 4.4. User Manual SPR. Methrom Autolab.
44. NEW ENGLAND BioLabs® Inc. <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr/isothermal-amplification> (acceso 27 abril de 2017).
45. Daher, R. K.; Stewart, G.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry*. **2016**, pp 947–958.
46. Lavery, P. E.; Kowalczykowski, S. C. Enhancement of recA Protein-Promoted DNA Strand Exchange Activity by Volume-Occupying Agents. *J Biol Chem* **1992**, *267* (13), 9307–9314.
47. Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C. The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc Chem Res* **2012**, *45* (8), 1183–1192.
48. Josephs, E. A.; Ye, T. Nanoscale Spatial Distribution of Thiolated DNA on Model Nucleic Acid Sensor Surfaces. *ACS Nano* **2013**, *7* (4), 3653–3660.
49. Murphy, J. N.; Cheng, A. K. H.; Yu, H. Z.; Bizzotto, D. On the Nature of DNA Self-Assembled Monolayers on Au: Measuring Surface Heterogeneity with Electrochemical in situ Fluorescence Microscopy. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 4042–4050.

50. Miranda, R.; Sánchez, R.; Suárez, B.; de los Santos, N.; Miranda, J. A.; Lobo, M.J. Thioaromatic DNA Monolayers for Target-Amplification-Free Electrochemical Sensing of Environmental Pathogenic Bacteria. *Biosens Bioelectron* **2017**, *92*, 162-170.
51. Ma, W.; Ying, Y. L.; Qin, L. X.; Gu, Z.; Zhou, H.; Li, D. W.; Sutherland, T. C.; Chen, H.-Y.; Long, Y.-T. Investigating Electron-Transfer Processes Using a Biomimetic Hybrid Bilayer Membrane System. *Nat Protoc.* **2013**, *8* (3), 439–450.