

Título: DISPOSITIVOS ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS BASADOS EN AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ADN DEPENDIENTE DE HELICASA

Nombre: Barreda García, Susana

Universidad: Universidad de Oviedo

Departamento: Química física y analítica

Fecha de lectura: 24/07/2017

Programa de doctorado: Programa Oficial de Doctorado en Química Física y Analítica

Dirección:

> **Director:** MARIA JESUS LOBO CASTAÑÓN

> **Codirector:** NOEMÍ DE LOS SANTOS ÁLVAREZ

Tribunal:

> **presidente:** Arturo José Miranda Ordieres

> **secretario:** SUSANA CAMPUZANO RUIZ

> **vocal:** JESUS ALBERTO ESCARPA MIGUEL

Descriptores:

> QUIMICA ANALITICA

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Localización: BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Resumen: Los métodos para la detección rápida y sensible de bacterias patógenas adecuados a entornos con pocos recursos son esenciales para mejorar el diagnóstico y el control de enfermedades que representan una amenaza de salud pública en todo el mundo. Los ensayos de detección de ácidos nucleicos actualmente disponibles se basan principalmente en la PCR, por lo que su utilidad en el punto de necesidad es limitada. En consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de plataformas rentables, robustas y portátiles para la detección temprana de estos microorganismos dañinos. Desde su descripción en 2004, la amplificación isotérmica dependiente de helicasa (HDA) se ha aplicado con éxito en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección rápida, sensible y selectiva de virus y bacterias, aunque su combinación con sistemas de detección electroquímica está poco explorada.

En esta Tesis Doctoral se combina e integra la HDA con genoensayos y genosensores electroquímicos para la detección de dos importantes patógenos, *Mycobacterium tuberculosis* y *Salmonella*. En primer lugar, se describe un método sencillo para la cuantificación de secuencias de ADN específicas de *Mycobacterium tuberculosis* basado en el acoplamiento de HDA asimétrica con detección electroquímica. Para ello, las secuencias de ADN de hebra simple amplificadas a 65 °C se atrapan sobre partículas magnéticas y se detectan mediante un ensayo de hibridación que proporciona un grado añadido de selectividad. Tras 90 minutos de amplificación, se consigue un factor de amplificación de 3×10^6 . Además, con este sistema se puede detectar, en condiciones isotérmicas y en menos de 4 horas, una concentración de 0,5 aM de la secuencia de ADN diana,

correspondiente a 15 copias del gen específico de *M. tuberculosis* en 50 μ L de muestra.

La implantación de este enfoque en los laboratorios clínicos exige demostrar que sus características analíticas son comparables a las del método estándar actual, la PCR. En este trabajo, se compara por tanto la amplificación asimétrica de la secuencia de ADN de 84 bases específica para *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR y HDA, utilizando el mismo ensayo genomagnético electroquímico para la detección. Los resultados indican que la plataforma que se propone puede utilizarse de manera general para cuantificar productos de amplificación sin purificación previa. Además, se demuestra que en condiciones óptimas es posible amplificar el mismo gen por PCR o HDA obteniendo un límite de detección de 11 copias para PCR, comparable al estimado para HDA. Ambos ensayos se han aplicado a la detección de *M. tuberculosis* en muestras de esputo, orina y líquido pleural con distinta carga bacteriana obteniéndose resultados comparables y concordantes con los ensayos de control habitualmente utilizados en los laboratorios de análisis clínicos. Por otro lado, la tecnología de sensores de ácidos nucleicos requiere superficies modificadas con oligonucleótidos con una estabilidad térmica y de almacenamiento lo suficientemente alta como para facilitar su comercialización. En este trabajo se desarrolla un método fácilmente accesible para anclar el ADN a superficies de óxido de indio y estaño (ITO) que muestran una estabilidad sorprendentemente alta. Estas superficies se procesan en aire proporcionando una alternativa atractiva a las monocapas tioladas de oro usadas más frecuentemente. La detección electroquímica sobre esta superficie se combinó con los sistemas de amplificación PCR y HDA para la cuantificación de una secuencia específica del gen *bipA* de *Salmonella*, mejorándose el límite de detección de 100 genomas alcanzado con el método estándar, la PCR en tiempo real, en dos órdenes y medio orden de magnitud respectivamente.

Por último, se demuestra la utilidad de esta plataforma con estabilidad térmica y de almacenamiento para la amplificación HDA del genoma de *Salmonella* en su superficie. La amplificación se desarrolla a 65 μ C directamente sobre la plataforma de ITO modificada con el cebador inverso tiolado. La adición del cebador directo marcado con fluoresceína y una cantidad menor del cebador inverso en disolución, además de las enzimas necesarias en el proceso de amplificación, da lugar a la formación de un dúplex de ADN anclado a la superficie que se detecta posteriormente por voltametría diferencial de pulso y espectrofotometría. El dispositivo con detección electroquímica permite obtener señales significativamente diferentes de las obtenidas para un control negativo para sólo 10 genomas de *Salmonella*, con una reproducibilidad del 20%, frente a los 100 genomas y una reproducibilidad del 30% que se obtienen con el sistema de detección óptica. Se demuestra así que el dispositivo propuesto puede ser utilizado para el análisis descentralizado, con instrumentación sencilla, de diferentes tipos de patógenos.