



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un genoensayo electroquímico

Susana Barreda García

Julio 2013, Oviedo

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado “**Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un genoensayo electroquímico**” ha sido realizado en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo por la licenciada **Susana Barreda García** bajo su dirección, constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 15 de Julio de 2013

Fdo. María Jesús Lobo Castañón

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Tuberculosis, una enfermedad emergente	2
1.2. Métodos de diagnóstico convencionales de esta enfermedad	4
1.3. Métodos de diagnóstico rápidos	6
1.4. Técnicas de detección del ADN amplificado	15
1.4.1. Sistemas de amplificación en tiempo real	15
1.4.2. Ensayos de hibridación	16
1.4.2.1. Soportes	17
2. Objetivos	19
3. Experimental	21
3.1. Reactivos	22
3.2. Instrumentación	24
3.3. Procedimiento experimental	25
3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos serigrafados	25
3.3.2. Protocolo de amplificación isotérmica mediante tHDA	25
3.3.3. Protocolo de captura del producto de amplificación	26
3.3.4. Protocolo de hibridación	27
3.3.5. Protocolo de marcaje enzimático	27
3.3.6. Protocolo de detección	27

4. Resultados y discusión	29
4.1. Diseño de los cebadores y de la sonda indicadora	30
4.1.1. Selección de la secuencia de analito	30
4.1.2. Selección de los cebadores	31
4.1.3. Selección de la secuencia indicadora	33
4.2. Diseño y caracterización del ensayo genomagnético	35
4.2.1. Selección de la concentración de sonda indicadora	36
4.2.2. Evaluación de las características de respuesta del Genoensayo	39
4.3. Acoplamiento de un proceso de amplificación isotérmica al genoensayo	40
4.3.1. Selección de la concentración de cebadores	42
4.3.2. Evaluación de las características de respuesta del ensayo acoplado a HDA	44
4.4. Evaluación del método de amplificación HDA-genoensayo en muestras	45
5. Conclusiones	49
6. Referencias bibliográficas	51
ANEXO I: LISTADO DE ABREVIATURAS	57
ANEXO II: TABLAS DE DATOS	60

1. Introducción

1.1. Tuberculosis, una enfermedad emergente

La tuberculosis es una enfermedad causada por un grupo de bacterias estrechamente relacionadas que se conoce como complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y que está compuesto por siete miembros reconocidos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canetti*. Todos ellos presentan secuencias del fragmento 16S del ARN ribosomal (16S ARNr) idénticas y se caracterizan por una gran homogeneidad genética. Sin embargo, muestran fenotipos divergentes y originan diferentes patologías, ya que algunos afectan exclusivamente a humanos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*), otros son patógenos en roedores (*Mycobacterium microti*) y los hay que presentan un amplio espectro de organismos de acogida (*Mycobacterium bovis*) [1-2].

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* ataca normalmente a los pulmones, aunque también puede desarrollarse como tuberculosis extrapulmonar afectando a cualquier órgano. Es una enfermedad transmisible por vía aérea, lo que la cataloga dentro del nivel de contención 3 [3-4]. Basta con inhalar unos pocos bacilos para ser infectado. Aun así, no todas las personas infectadas con bacilos desarrollan la enfermedad. La tuberculosis suele ser asintomática en personas sanas debido a que la respuesta inmunitaria que se desencadena es suficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad clínica; este fenómeno se conoce como tuberculosis latente. Si el sistema inmunitario no logra controlar la infección por los bacilos de la tuberculosis, éstos se multiplican, produciendo la forma activa de la enfermedad y dañando al organismo [5].

La tuberculosis activa se desarrolla aproximadamente en el 10 por ciento de las personas infectadas [5]. Los síntomas clásicos que se encuentran en la enfermedad pulmonar son tos, en un principio seca y posteriormente productiva con secreción purulenta y sangre que varía desde esputo hemático hasta hemoptisis, fiebre, diaforesis, sudoración nocturna, astenia, anorexia, pérdida de peso, dolor torácico. Factores predisponentes como: antecedentes de tuberculosis (TB), bronquitis crónica, neoplasias, diabetes, VIH, alcoholismo, y drogadicción son igualmente importantes

de considerar en pacientes sospechosos de padecer TB [6]. Si la tuberculosis activa no es tratada adecuadamente tiene una tasa de mortalidad aproximadamente del 50% [2]. Cada año aparecen en todo el mundo nueve millones de nuevos casos de tuberculosis y se producen cerca de un millón y medio de muertes por esta enfermedad, la inmensa mayoría en países en desarrollo. Si bien es cierto, los nuevos casos de tuberculosis han disminuido un 2.2% entre 2010 y 2011, y la mortalidad un 41% desde 1990 gracias al tratamiento y control de esta enfermedad [6]. En Asturias se detectan aproximadamente 280 casos anuales. Se considera, históricamente, una de las comunidades autónomas con mayor incidencia de tuberculosis en España [5].

Existen dos factores que, junto con el precario sistema de salud público del que se dispone en los países en desarrollo, son los principales responsables de la prevalencia de la tuberculosis.

1. Tuberculosis farmacorresistente

La tuberculosis resistente es un tipo de tuberculosis que no responde al tratamiento con fármacos antituberculosos de primera línea (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina o Etambutol) debido a la evolución genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a los medicamentos. Se denomina tuberculosis multirresistente (MDR-TB) cuando las cepas de *M. tuberculosis* son resistentes al menos a Isoniazida y Rifampicina [5]. Se calcula que en 2008 se produjeron unos 440,000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente en todo el mundo y más del 50% de ellos afectaron principalmente a tres países: China, Rusia e India [7].

La tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB) aparece cuando surge resistencia a alguna fluoroquinolona, y a uno o más de los fármacos de segunda línea inyectables (Amikacina, Capreomicina o Kanamicina) [5].

2. Tuberculosis asociada al VIH

Se estima que un tercio de los pacientes infectados con SIDA están también infectados con tuberculosis. Esta asociación forma una combinación letal. Por un lado el VIH incrementa el riesgo de reactivación de la tuberculosis latente y acelera la

progresión de la enfermedad tras la infección, lo que supone complicaciones en el adecuado control de la misma [8].

En cualquier caso, el pronóstico de los pacientes de tuberculosis viene determinado en gran medida por la rapidez de identificación del agente responsable de la infección. El tratamiento consiste en la administración de antibióticos durante varios meses y, en algunos casos, el aislamiento en cuarentena de los individuos afectados. Pero el diagnóstico puede resultar complicado debido a que sus síntomas no son específicos y, por tanto, es difícil distinguirla de otras enfermedades causadas por agentes infecciosos diversos.

1.2. Métodos de diagnóstico convencionales

Desde el descubrimiento por Robert Koch del bacilo tuberculoso se ha llevado a cabo una gran investigación en técnicas de detección de la tuberculosis. Los métodos convencionales desarrollados desde entonces han sido y aún son de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad, si bien es cierto que presentan ciertas limitaciones en cuanto a sensibilidad, selectividad y tiempo de análisis [9]. Entre este tipo de técnicas destacan las siguientes [4-5 ,9]:

1. Prueba de Tuberculina (PT) en la piel

La Prueba de la Tuberculina, también llamada prueba de Mantoux, es la primera de las pruebas a realizar en un paciente del que se sospecha tenga TB. Sirve como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa, pero es necesario tener presente que su positividad o negatividad en ningún momento confirma o excluye la enfermedad tuberculosa [5]. Actualmente es la principal técnica para detectar tuberculosis latente, pues sirve para determinar si hay o no bacterias tuberculosas en el cuerpo [9]. Está basada en la respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células frente a antígenos específicos del bacilo. En este caso, se utiliza un derivado proteico purificado (PPD-S) del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* [10]. Este test es barato y no invasivo, pero presenta con frecuencia falsos positivos en pacientes vacunados con BCG (vacuna contra la tuberculosis que se fabrica con bacilos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis*) y falsos negativos en pacientes

coinfectados con VIH [4]. Normalmente no se obtienen resultados concluyentes con un solo test, y es necesario repetir la prueba después de unas semanas.

2. Radiología pectoral

La Prueba de la Tuberculina se acompaña siempre de una radiología pectoral. Es el primer método de aproximación diagnóstica [5] y consiste en realizar una radiografía del tórax. Sólo sirve para diagnosticar la tuberculosis activa [4]. Es una técnica poco sensible y no es específica para tuberculosis, por lo que los resultados son ambiguos [9]. Además, se requiere personal cualificado tanto para realizar las radiografías como para interpretar los resultados.

3. Estudio microbiológico

Siempre y cuando la radiología sea patológica, se pasará a realizar un estudio microbiológico. El diagnóstico microbiológico constituye el **diagnóstico de certeza** y se sustenta en las siguientes técnicas convencionales: baciloscopia y cultivo [5].

3.1. Baciloscopia de esputo

La observación de *M. tuberculosis* es uno de los métodos más usados en bacteriología debido a su rapidez, sencillez y accesibilidad para realizar el diagnóstico de TB. Consiste en demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) en muestras clínicas mediante tinciones específicas. La coloración de Ziehl Neelsen es la más usada a los fines de observar los bacilos ácido-alcohol-resistentes [5], los cuales se tiñen de color rojo. El bacilo se dispone de forma aislada o formando agregados que adoptan las formas de letras L, V, X o Y. Así mismo, las *Micobacterias* tienen la capacidad de unirse a colorantes fluorescentes como la auramina y rodamina, lo cual permite visualizarlas de color amarillo [11].

El inconveniente que presenta esta prueba es que una muestra de carga bacteriana baja daría negativo. Por tanto, se necesita llevar a cabo de forma paralela un cultivo que confirme o no los resultados [5].

3.2. Aislamiento de *Micobacterias* en medios de cultivo

Los métodos basados en cultivos celulares fueron los primeros en utilizarse y aún se consideran la **prueba de referencia** a partir de la cual validar los nuevos métodos [5,9].

Tras observar al microscopio la morfología del organismo y su pigmentación se pasa a estudiar su habilidad para crecer en medios selectivos. Estos métodos son muy específicos pero moderadamente sensibles, pues son necesarias de 6 a 8 semanas de incubación para que el crecimiento bacteriano sea suficiente como para tener un diagnóstico fiable [4-5,9]. Además, han de ser llevados a cabo en laboratorios con altos niveles de bioseguridad [3,4].

1.3. Métodos de diagnóstico rápido

Con el fin de acelerar la identificación del patógeno, en los últimos tiempos se han desarrollado inmunoensayos y métodos genéticos basados en el empleo de sistemas de amplificación con detección en tiempo real o acoplados a ensayos de hibridación [12].

1. Inmunoensayos

Aunque los inmunoensayos son ampliamente usados con éxito en el diagnóstico de patógenos, en el caso de la tuberculosis los ensayos convencionales basados en anticuerpos no son suficientes para diagnosticar la enfermedad, ya que frecuentemente fallan a la hora de diferenciar los individuos realmente infectados de los que sólo han estado expuestos [9,13]. En la actualidad, se están desarrollando nuevos reactivos como son antígenos purificados y anticuerpos monoclonales que permitan obtener una mayor sensibilidad y especificidad en los análisis [9].

Los inmunoensayos más empleados en el diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis* son los IGRAS (Ensayos de Liberación del Interferón Gamma). Estos ensayos se realizan en muestras de sangre y miden la respuesta inmune celular a una mezcla de péptidos que incluyen antígenos recombinantes de la tuberculosis como el ESAT-6 (principios de antígeno secretor) o el CFP-10 (filtrado de

cultivo de proteínas). La respuesta inmune consiste en la liberación de interferón-gamma (INF- γ) por las células T. Se mide, por tanto, la concentración de interferón-gamma (INF- γ) presente. Existen kits comerciales disponibles para realizar estos ensayos: QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT, T-SPOT[®] y TB test (T-Spot), que son sencillos de llevar a cabo y presentan resultados en menos de 24 horas. El principal problema que presenta el diagnóstico de la tuberculosis a partir de estos ensayos es que los pacientes con sistemas inmunes débiles, como el caso de las personas afectadas por SIDA, presentan bajos recuentos de células T y pueden ser diagnosticados como falsos negativos [4-5, 14-17].

2. Técnicas basadas en ADN

Exceptuando algunos virus, cuyo material genético es ARN, el ADN es el material genético de todos los seres vivos conocidos en la actualidad. La estructura del ADN proporciona las bases químicas para almacenar y expresar la información genética en las células, así como para transmitirla a generaciones posteriores.

Además de la indudable importancia que tienen en los procesos genéticos, los ácidos nucleicos también juegan un papel cada vez más relevante como molécula diana en el desarrollo de métodos de análisis [12]. La detección de una secuencia específica de bases de ácidos nucleicos en humanos, virus y bacterias ha generado mucho interés en campos tan diversos como la determinación de causas de enfermedades genéticas, el análisis de la contaminación de alimentos por organismos patógenos y la investigación forense, entre otros.

Como alternativa a los métodos clásicos de detección, basados en el cultivo y que en general son lentos y de baja sensibilidad [5,9], se imponen los métodos moleculares basados en la detección de secuencias específicas de ADN características de la especie patógena. Las técnicas de análisis de una secuencia genética específica incluida en el genoma completo de una especie se basan fundamentalmente en metodologías de amplificación, pues las necesidades de sensibilidad requerida son extremas.

2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Desde el descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN, ningún otro evento tuvo tanto impacto en la biología molecular como el redescubrimiento por Kary Mullis en los años 80 de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR [18-20].

La PCR consiste en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN diana. Cada ciclo de amplificación consta de tres reacciones sucesivas. En la primera, denominada etapa de desnaturalización, el ADN se calienta hasta lograr la separación de las dos cadenas de las cuales está constituido, o dúplex. Después, en la etapa de emparejamiento, se baja la temperatura y se lleva a cabo la hibridación de cada una de las hebras separadas del ADN molde con dos oligonucleótidos específicos, llamados cebadores, que definen los límites del segmento de ADN que se quiere amplificar. Por último, en la elongación, una enzima, la ADN polimerasa, extiende los cebadores en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias al ADN molde mediante el empleo de desoxinucleótidos (dNTPs). Tras finalizar el primer ciclo de tres etapas, el segmento de ADN diana se ha duplicado y se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. Con la aplicación de varios ciclos sucesivos, normalmente entre 30 y 40, se logra amplificar la secuencia diana varios cientos de millones de veces.

La PCR se utiliza para detectar *Mycobacterium tuberculosis* directamente en muestras clínicas. Sin embargo, su complejidad, junto con el coste de los equipos necesarios, dificulta su implantación en los laboratorios y hace muy difícil su miniaturización para análisis *in situ* [21].

2.2. Amplificación isotérmica de ADN

La amplificación isotérmica de ADN supone una prometedora herramienta en la detección rápida y sensible de patógenos. Se trata de procesos biomiméticos en los que se emplean enzimas implicadas en los mecanismos de síntesis *in vivo* de ADN /ARN para sustituir los ciclos de temperatura de la PCR. Por tanto, y a diferencia de la PCR en la que se realizan ciclos de temperatura, en estos sistemas de amplificación no se

necesitan dispositivos de control de la temperatura tan sofisticados, pues la amplificación tiene lugar a temperatura constante.

Existe una gran variedad de sistemas de amplificación isotérmicos. Por ejemplo, SDA (*strand displacement amplification* o *amplificación por desplazamiento de cadena*) es un método con elevada selectividad y sensibilidad. Sin embargo, requiere de un caro analizador para la detección del producto de amplificación [22]. LAMP (*loop-mediated amplification* o *amplificación mediada por bucle*) tiene una sensibilidad de 1 copia genómica por ensayo, sin necesidad de instrumentación costosa. Pero la sensibilidad depende de la temperatura inicial de desnaturalización del ADN, que son 95 °C [22]. Aunque en este proyecto se propone como sistema de amplificación isotérmico HDA (*Helicase-dependent amplification* o *amplificación dependiente de Helicasa*) [21-25], se hace una breve descripción de otros sistemas isotérmicos.

2.2.1. NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*)

NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification* o *amplificación isotérmica de ácidos nucleicos*) es una técnica que permite la amplificación exponencial de una determinada muestra de ARN mediante la imitación del proceso in vivo de la replicación retroviral. Esta técnica es más rápida que la PCR y no requiere del uso de termociclador, pues todo el proceso tiene lugar a 41°C. Para llevar a cabo la amplificación se necesitan dos cebadores y tres enzimas (transcriptasa reversa, RNasa H, RNA polimerasa).

El procedimiento se basa en ciclos de la transcripción inversa de ARN y la replicación mediada por polimerasa para generar solo productos de hebra simple de ARN. Las diversas etapas de la reacción de NASBA se muestran en la figura 1:

1. El proceso es iniciado por hibridación del cebador 1 con promotor T7 a la diana de ARN. Este cebador contiene una región complementaria a una secuencia presente en el ácido nucleico, así como una región que define una secuencia de reconocimiento para la enzima ARN polimerasa. En su forma funcional, esta secuencia

de reconocimiento forma parte de una molécula de ADN de doble cadena. Los pasos iniciales de la reacción NASBA se centran en la creación del sustrato. El cebador se extiende gracias a la transcriptasa inversa creando ADN complementario (ADNc) al ARN diana original (etapas 1 y 2, figura 1)

2. La doble cadena resultante del paso 1 es un híbrido que contiene una hebra de ADN y una hebra de ARN, y por lo tanto, es un sustrato para la enzima ribonucleasa (RNasa) H, que degrada la parte de ARN del dúplex ARN-ADN. Como resultado de la reacción de la RNasa H se obtiene una sola hebra de ADN. En esencia, el paso RNasa H logra la desnaturalización del dúplex ARN-ADN eliminando la necesidad de ciclos de temperatura y enzimas termoestables (etapa 3, figura 1).

3. Un segundo cebador de ADN incluido en la reacción se hibrida a una secuencia presente en el ADN recién creado. Este cebador se extiende gracias a la transcriptasa inversa (que es capaz de utilizar ya sea ARN o ADN como una plantilla) para generar una molécula de ADN de doble cadena que contiene una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa (etapa 4, figura 1).

4. La ARN polimerasa sintetiza múltiples copias de cadena sencilla de ARN a partir de la molécula de ADN.

5. Como se muestra en la fase cíclica B, cada uno de los transcritos de ARN producidos es complementario al ARN diana original, y pueden servir como molde de la transcriptasa inversa después de la hibridación con el cebador 2. Tras una etapa de desnaturalización con la RNasa H, las moléculas de ADNc producidas pueden funcionar de nuevo como plantillas para la hibridación y la extensión por la transcriptasa inversa [24-25].

4. Las cadenas desplazadas forman un bucle en un extremo por la hibridación de F1c con F1. En el otro extremo, el cebador interno R1c-R2 se extiende y luego es desplazado por extensión del cebador R3.

5. La estructura resultante con bucles en ambos extremos comienza la etapa cíclica y se produce una estructura de tallo bucle con varias repeticiones invertidas del ADN diana por repetición de las etapas de alargamiento y de desplazamiento de cadena.

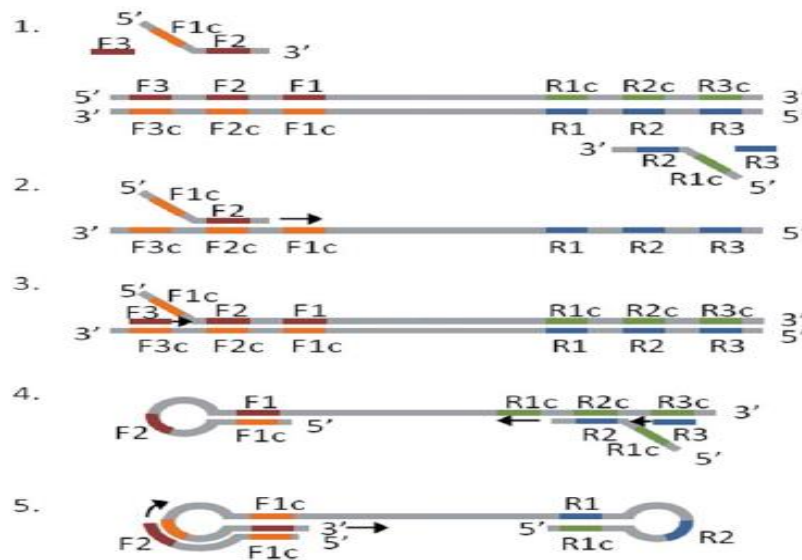


Figura 2. Esquema del sistema de amplificación isotérmico LAMP.

2.2.3. SDS (*Strand displacement amplification*)

SDS (*Strand displacement amplification* o *amplificación desplazada por cadena*) es un sistema de amplificación isotérmico que precisa de una endonucleasa de restricción ADN polimerasa (con capacidad de desplazamiento de hebra), dos cebadores (directo e inverso) que contienen una secuencia reconocida por la enzima de restricción y dos cebadores externos [24-25].

El proceso se describe en el siguiente esquema (figura 3):

1. El cebador directo (rojo) con sitios de restricción en su secuencia (región en ángulo) y el otro cebador directo (verde) hibridan con la hebra simple de ADN.

2. Se obtiene el producto de la amplificación como consecuencia de la extensión del cebador directo verde.

3. Ahora, los cebadores inversos se unen al producto de la extensión.

4. La extensión de los cebadores da lugar a una hebra simple de ADN.

5. El cebador directo con sitios de restricción en su secuencia hibrida con la hebra simple de ADN para dar lugar a una hebra doble con zonas de restricción en los extremos.

6. La extensión de la polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra desde los sitios de restricción (marcados con flechas) libera ADN de hebra simple que entra en una fase exponencial mientras el ADN de doble hebra repite las rondas de restricción, extensión y desplazamiento.

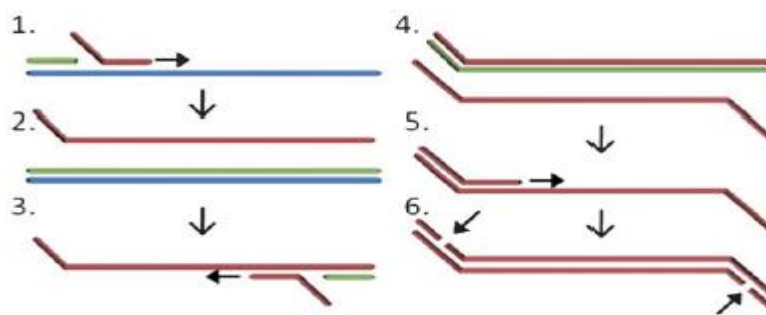


Figura 3. Esquema del sistema de amplificación isotérmico SDS.

2.2.4. HDA (*Helicase-dependent amplification*)

La amplificación dependiente de Helicasa (HDA) es el sistema de amplificación isotérmico más sencillo de todos los comentados. En él, una enzima helicasa termoestable se vale del cofactor dATP para desenrollar el dúplex de ADN (etapa 1, figura 4). Como en el caso de la PCR, sólo son necesarios dos cebadores, uno directo y otro inverso, que se unen al extremo 3' de la secuencia que se desea amplificar (etapa 2, figura 4). Por último, una enzima polimerasa se encarga de elongar la secuencia de nucleótidos de forma complementaria a la secuencia molde con los dNTPs que se añaden al medio en exceso (etapa 3, figura 4). Todo el proceso se lleva a cabo a 65 °C.

La sencillez que presenta este tipo de amplificación isotérmica, pues trabaja de forma análoga a la PCR, necesitándose un bajo número de reactivos, y el hecho de que el sistema se termostate a 65 °C, favorece su inclusión en sistemas integrados. Por ello, se selecciona como sistema de amplificación para el desarrollo de un genoensayo electroquímico para la detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* [21, 26-27].

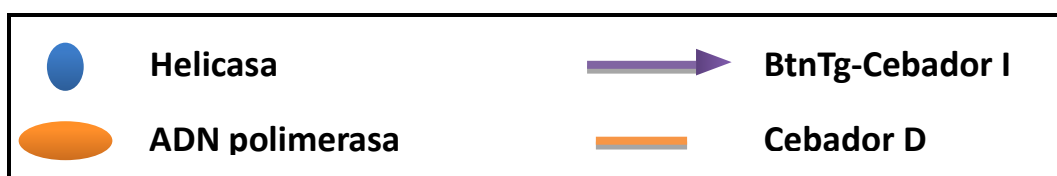
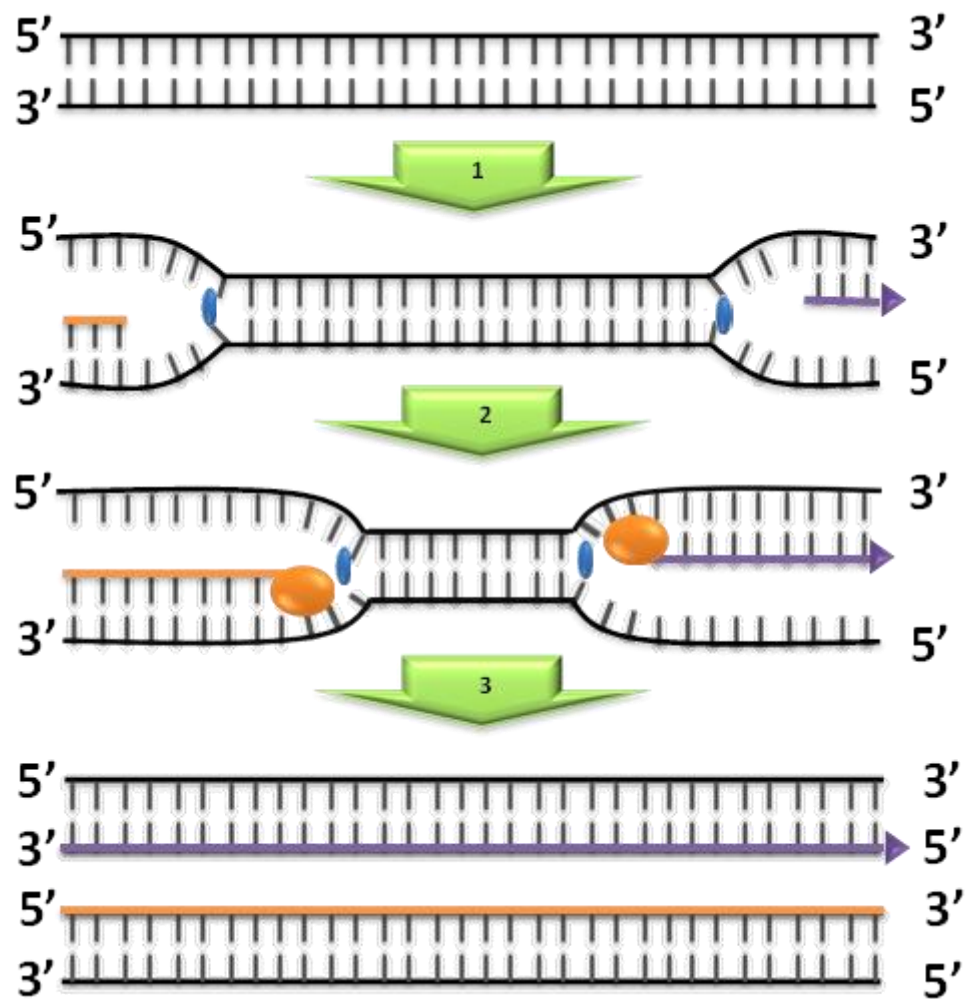


Figura 4. Esquema del sistema de amplificación isotérmico tHDA.

1.4. Técnicas de detección del ADN amplificado

1.4.1. Sistemas de amplificación basados en detección mediante tintes fluorescentes

1. Sistemas de amplificación con detección mediante electroforesis en gel de agarosa

El producto resultante de amplificar una muestra de ADN se detecta mediante electroforesis en gel de agarosa. Para visualizar las hebras en el mismo se emplean colorantes intercalantes como el bromuro de etidio o el SYBR Green [28].

2. Sistemas de amplificación en tiempo real

La principal característica de este sistema de detección es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o identificar con una muy alta probabilidad muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (T_m , del inglés melting temperature). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas [28, 29].

En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN, que se multiplica su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia, la cual es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real [29]. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización. Por tanto, es mucho más económica que la que usa sondas específicas.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso; cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen [28].

Este sistema de detección presenta la ventaja de que elimina cualquier proceso post-PCR, pues se monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. Como desventaja, el proceso requiere automatización mediante un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Este tipo de equipos son de elevado coste, lo que dificulta su implantación en los laboratorios y hace muy difícil su miniaturización para análisis *in situ* [12]

1.4.2. Ensayos de hibridación

Debido a su simplicidad, las técnicas de hibridación son habitualmente muy empleadas en los laboratorios de análisis. En estas técnicas, la secuencia de interés o analito es reconocida por una sonda de ADN cuya secuencia es complementaria y ambas forman la estructura de doble hélice o dúplex. Esta reacción de hibridación ocurre con gran afinidad y especificidad, al igual que ocurre *in vivo*.

Dado que el elemento de reconocimiento molecular es el propio material genético, estos ensayos de hibridación son conocidos también como genoensayos.

En cuanto al origen del ácido nucleico de la sonda puede ser muy diverso, pero hoy en día la tecnología del ácido recombinante o la síntesis química permite disponer de secuencias sintéticas de oligonucleótidos de elevada pureza.

En general en los ensayos de hibridación, una de las hebras suele llevar una marca que facilite la detección. La detección de los eventos de hibridación puede ser: electroquímica (amperométrica, voltamétrica, potenciométrica, impedimétrica y conductimétrica), óptica, térmica o piezoeléctrica.

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

En la actualidad se están desarrollando gran variedad de sistemas que acoplan un proceso de amplificación isotérmico con un genoensayo para la detección de patógenos [30-31].

1.4.2.1. Soportes

La necesidad de analizar ADN en áreas cada vez más diversas, hace que la investigación avance hacia el desarrollo de técnicas de análisis sencillas, que presenten respuesta rápida y que permitan el análisis *in situ* a un coste razonable. En esta línea surgen y se desarrollan los genoensayos y los biosensores de ADN o genosensores.

La diferencia entre ambos es que, mientras que en los genosensores la sonda de ADN está directamente inmovilizada sobre el elemento de transducción, en el caso de un sistema de transducción electroquímica, sobre la superficie electródica, en los genoensayos no se cumple esta condición. En los genoensayos, la sonda de ADN puede estar en disolución, o bien inmovilizada sobre un soporte que no constituya el elemento de transducción, como pueden ser membranas, geles o, como es el caso de este trabajo, partículas magnéticas. Sobre el transductor solo tendría lugar la etapa de detección. Por tanto, en función de que todas las etapas del ensayo se realicen sobre el transductor, o sólo la etapa de detección, se puede hablar de genosensor o de genoensayo.

Por su relación con el presente trabajo, a continuación se va a explicar un tipo de soporte concreto:

Partículas magnéticas

Las partículas magnéticas están constituidas por un material magnéticamente susceptible, lo más habitual es que sean de óxido de hierro, recubierto de una matriz polimérica. Son superparamagnéticas, lo cual implica que adquieren propiedades magnéticas cuando se encuentran bajo la acción de un campo magnético fuerte, pero no presentan magnetismo residual una vez que se elimina la acción de ese campo. Su diámetro está normalmente comprendido entre 0.5 y 10 μm , son por tanto micropartículas, aunque recientemente también se está empezando a trabajar con nanopartículas.

Las partículas magnéticas constituyen una importante herramienta en el desarrollo de bioensayos y se han descrito numerosas aplicaciones durante los últimos

años que permiten, tanto purificar y separar, como inmovilizar o transportar biomoléculas [32].

Una de sus principales aplicaciones es su uso como plataforma de inmovilización de biomoléculas. Esta aplicación ofrece interesantes ventajas. Dado que las partículas magnéticas están en suspensión, la cinética de la interacción entre el ligando y el receptor se acelera considerablemente y, debido a que las partículas presentan una gran área superficial, el número de biomoléculas de captura inmovilizadas en la superficie es muy elevado. Esto es especialmente importante cuando se trabaja con sistemas de transducción electroquímicos ya que se consigue tener muchas más biomoléculas ancladas en la superficie que cuando se trabaja con superficies de electrodos convencionales. Además, trabajar con partículas magnéticas facilita las etapas de separación y lavado y evita procesos de filtración o centrifugación para separar las especies no enlazadas y su facilidad de manejo permite realizar varios experimentos simultáneamente proporcionando un análisis de alto rendimiento [33].

Las partículas magnéticas se comercializan con una gran variedad de grupos funcionales anclados en su superficie, como por ejemplo estreptavidina, grupos carboxilo, anticuerpos e incluso sondas de ADN, de tal manera que sobre las mismas se pueden inmovilizar moléculas de distinta naturaleza, las cuales pueden actuar como elemento de reconocimiento de otras moléculas.

2. Objetivos

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de este trabajo, la tuberculosis es una enfermedad infecciosa emergente. Afecta especialmente a países subdesarrollados, aunque también a los industrializados, pues en muchas ocasiones se asocia a situaciones de inmunodepresión, como la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Su diagnóstico fiable y rápido resulta de vital importancia para atajar su expansión e iniciar su tratamiento, siendo necesario el desarrollo de métodos de fácil manejo que puedan ser utilizados en laboratorios no especializados y tengan capacidad de respuesta rápida.

Por esta razón se ha planteado como objetivo general de este trabajo el desarrollo de un método rápido, robusto y de fácil manejo, con sensibilidad suficiente para la detección en muestras clínicas de secuencias de ADN específicas de *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo patógeno causante de esta enfermedad.

La estrategia general que se siguió para alcanzar este objetivo viene definida por los siguientes objetivos concretos:

1. Selección de una secuencia de ADN específica de *Mycobacterium tuberculosis* (MBT), que determinará el diseño de los diferentes oligonucleótidos empleados como reactivos en el transcurso del método de detección a desarrollar.
2. Desarrollo y caracterización de un ensayo de hibridación sobre partículas magnéticas para la detección de la secuencia de ADN seleccionada.
3. Desarrollo de un proceso de amplificación isotérmico de las secuencias específicas de MBT y acoplamiento al genoensayo sobre partículas magnéticas anteriormente caracterizado.
4. Evaluación del método que resulte de dicho acoplamiento en muestras de ADN obtenidas a partir de cultivos de aislados clínicos del microorganismo.

3. Experimental

3.1. Reactivos

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación isotérmica por HDA se incluyen en el Kit IsoAmp® Universal tHDA, Biohelix Corp., y se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos incluidos en el Kit IsoAmp® Universal tHDA.

Reactivo	Descripción
10× Annelaing buffer II	Disolución reguladora
MgSO₄	Disolución de esta sal 100 mM
NaCl	Disolución de la sal 500 mM
IsoAmp® dNTP Solution	Mezcla de los cuatro desoxinucleótidos
IsoAmp® II EnzymeMix	Mezcla de polimerasa y helicasa

El cebador inverso biotinilado, la secuencia de analito y la sonda indicadora empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y suministrados liofilizados en su forma libre de sales. El cebador directo y la secuencia complementaria a la de analito fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Ambos fueron suministrados liofilizados, el cebador en su forma libre de sales y la secuencia complementaria a la de analito purificada por HPLC. Sus secuencias de bases se especifican en la Tabla 2.

Las partículas magnéticas de 1.0 µm de diámetro funcionalizadas con estreptavidina, DynabeadsMyOneStreptavidin C1, son de Invitrogen (Barcelona, España). Las partículas se suministran en forma de una suspensión de concentración

10 mg/mL (7–12 x10⁹micropartículas/mL) en disolución reguladora de fosfato (PBS) de pH 7.4 que contiene 0.01% Tween-20 y 0.09% NaN₃ como conservante.

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

Nombre	Función	Secuencia de bases 5' → 3'
Cebador D	Cebador directo	CAA CAA GAA GGC GTA CTC GAC CTG A
BtnTg-Cebador I	Cebador inverso	Biotina TEG- CTC GCT GAA CCG GAT CGA TGT GTACT
MBT	Analito	CAA CAA GAA GGC GTA CTC GAC CTG AAA GAC GTT ATC CAC CAT ACG GAT AGG GGA TCT CAG TAC ACA TCG ATC CGG TTC AGC GAG
BtnTg-MBTc	Secuencia complementaria a la de analito	Biotina TEG- CTC GCT GAA CCG GAT CGA TGT GTA CTG AGA TCC CCT ATC CGT ATG GTG GAT AAC GTC TTT CAG GTC GAG TAC GCC TTC TTG TTG
Fic-IND	Sonda indicadora	Fluoresceína- CGT TAT CCA CCA TAC GGA TA

En el proceso de acondicionamiento de los electrodos se secó su superficie con una corriente de nitrógeno (N45, Air Liquide).

El resto de reactivos empleados, incluyendo las sales necesarias para la preparación de las disoluciones reguladoras, se detallan en la Tabla 3.

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

La composición de las disoluciones empleadas en las diferentes etapas del ensayo es la siguiente:

Disolución 1: 5 mM Tris-HCl + 1 M NaCl + 0.005 % Tween

Disolución 2: 5 mM Tris-HCl + 1 M NaCl

Disolución 3: 1× PBS + 1 % Caseína

Disolución 4: 1× PBS

Tabla 3. Reactivos empleados.

Reactivo	Casa Comercial
NaCl ($\geq 98\%$)	SIGMA
Tris-HCl 1 M	SIGMA
Tween-20 (70 %)	SIGMA
10× PBS*	SIGMA
1× PBS + 1 % Caseína	ThermoScientific
Anti-Fluoresceina-POD, Fab	ROCHE
TMB	SIGMA
Etanol (96%)	Prolabo

*El PBS (tampón fosfato salino) es una disolución reguladora de fosfato 0.01 M de pH 7.4 que contiene 0.154 M de NaCl.

3.2. Instrumentación

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato μ Autolab Type II (Ecochemie, Holanda) controlado por un equipo informático provisto del software GPES 4.9.

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

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

En la etapa de detección, para asegurar que las partículas magnéticas modificadas se depositan exclusivamente sobre el electrodo de trabajo, se empleó un imán de 4 mm de diámetro adquirido en la Boutique del Imán (Barcelona, España).

La etapa de amplificación se llevó a cabo en un termostato para tubos eppendorf de 1.5 mL (Thermomixer Comfort, Eppendorf).

Las etapas de incubación se llevaron a cabo bajo agitación en un agitador orbital con capacidad para 12 viales (DynaL MX1). La separación se realizó en un imán (DynaMag-2). Ambos son de Invitrogen (Barcelona, España).

Las disoluciones de oligonucleótidos y partículas magnéticas contenidas en los viales se homogeneizaron mediante agitación con un vortex IKA y también se empleó una centrífuga HereausMultifuge 1L-R, ThermoScientific.

3.3. Procedimiento experimental

3.3.1. Acondicionamiento de los electrodos serigrafiados

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

3.3.2. Protocolo de amplificación isotérmica mediante tHDA.

El proceso de amplificación isotérmica mediante tHDA se lleva a cabo siguiendo el protocolo en una etapa del Kit. Para ello, se mezclan en un eppendorf de 0.5 mL los reactivos de la tabla 4, que se muestra a continuación, en la proporción citada.

Tabla 4. Reactivos y volumen (μL / eppendorf) requeridos en la HDA.

Reactivo	Volumen (μL)
10x Anneling buffer II	5
MgSO₄	2
NaCl	4
IsoAmpdNTP	3.5
IsoAmpEnzymeMix	2 / 3.5*

*Para los ensayos realizados con ADN sintético basta con adicionar 2 μL de la mezcla de enzimas por eppendorf que se vaya a amplificar. En cambio, para las muestras clínicas, más complejas, se necesitan 3.5 μL .

A continuación se homogeneiza la mezcla en vortex y se pipetea 16.5 μL (o 18.0 μL si se trata de muestras clínicas) en eppendorf de 0.2 mL. En cada uno de los mismos se incorporan 75 nM de cebador inverso biotinilado, 5 nM de cebador directo y agua Milli-Q hasta un volumen final de 50 μL en el caso del blanco, o analito más agua Milli-Q hasta un volumen final de 50 μL en el caso de las muestras.

Por último, se agitan los eppendorf en vortex y se amplifican durante 60 minutos para ADN sintético o 90 minutos para muestras clínicas a 65 °C.

Una vez finalizado el proceso se introducen los eppendorf en hielo para frenar así la amplificación.

3.3.3. Protocolo de captura del producto de amplificación (modificación de las partículas magnéticas)

Para su utilización en el ensayo, se necesita un lavado previo de las partículas que elimine la disolución con conservantes en la que se suministran. Un volumen de 5 μL (50 mg) de la suspensión comercial se trasfiere a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se adicionan 500 μL de disolución 1, se agitan en vortex y se colocan sobre un separador magnético que permite acumular las partículas en la pared del tubo y así eliminar el sobrenadante transcurridos 2 minutos. La disolución 1 contiene un tensoactivo que favorece la separación magnética. Todos los lavados se realizan por duplicado.

A continuación, una vez extraída la disolución del segundo lavado, se procede a la funcionalización de las micropartículas con el producto de amplificación biotinilado. Para ello, se incorporan 450 μL de disolución 2 junto con los 50 μL procedentes del proceso de amplificación y se llevan a un agitador orbital durante 15 minutos.

Una vez pasado ese tiempo, se les da un pulso en la centrífuga para evitar pérdida de partículas en la tapa de los tubos y se sitúan de nuevo en el separador magnético para realizar dos lavados con disolución 1, de modo que se elimine el exceso de reactivos procedentes del Kit.

3.3.4. Protocolo de hibridación

A continuación se realiza una etapa de hibridación heterogénea entre el producto de amplificación biotinilado inmovilizado sobre las partículas magnéticas y la sonda indicadora marcada con fluoresceína. Para ello se añaden sobre las partículas magnéticas 500 μ L de disolución 75 nM de sonda indicadora. La reacción se lleva a cabo durante 30 minutos en el agitador orbital. Debido a que la fluoresceína es sensible a la luz, el proceso se realiza protegiendo todo el sistema con papel de aluminio.

Finalizada la hibridación, se da de nuevo un pulso a los tubos en la centrífuga y se lavan dos veces las partículas con disolución 1.

3.3.5. Protocolo de marcaje enzimático

Debido a que el marcaje enzimático se va a realizar en disolución 3, se realizan dos lavados de las partículas magnéticas con 500 μ L de esta disolución.

Seguidamente, se añaden 500 μ L de disolución del fragmento Fab de anticuerpo anti-fluoresceína-POD, 0.5 U/ mL en disolución 3.

La reacción se lleva a cabo en agitador orbital durante 10 minutos.

Finalizado el proceso, se realiza el protocolo habitual en partículas magnéticas. Se da un pulso de centrífuga a los tubos para a continuación lavarlos dos veces con disolución 4.

Como paso final se reconstituyen las partículas en 500 μ L de disolución 4.

3.3.6. Protocolo de detección

Para realizar la detección electroquímica, en primer lugar se debe depositar la disolución de partículas magnéticas completamente modificadas sobre el electrodo serigrafiado.

Para obtener medidas reproducibles las micropartículas tienen que depositarse sólo sobre el electrodo de trabajo de la celda serigrafiada. Para conseguirlo, se fija un imán con el mismo diámetro del electrodo (4 mm) bajo la superficie del mismo

empleando cinta adhesiva de doble cara, de tal manera que las micropartículas magnéticas son atraídas por la acción de su campo magnético. Se evita así que las partículas se distribuyan de forma heterogénea por la celda.

Tras colocar el imán, se depositan 15 μL de la disolución anterior sobre el electrodo de trabajo y se espera 1 minuto para asegurar que el imán atrapa todas las partículas sobre su superficie. A continuación se añaden 25 μL de tetrametilbencidina (TMB) sobre la disolución de detección de modo que se cubra toda la celda electroquímica. Se deja que la reacción enzimática transcurra durante 30 segundos y se realiza la medida.

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

Los parámetros instrumentales empleados son los siguientes:

Potencial: 0 V

Tiempo: 60 s

4. Resultados y discusión

4.1. Diseño de los cebadores y de la sonda indicadora

4.1.1. Selección de la secuencia de analito

El proceso del diseño de un genoensayo para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* comienza con la selección de la secuencia de ácido nucleico o analito.

Como ocurre para la mayoría de las bacterias, en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* se detectaron varios elementos genéticos móviles (MGEs) o “genes saltadores”. Estos elementos son capaces de moverse de un sitio a otro del cromosoma en un proceso denominado transposición y su naturaleza dinámica determina las características fenotípicas de las bacterias patógenas a cuyo genoma pertenecen.

Entre los elementos genéticos móviles presentes en el genoma de las especies del complejo MBT destaca el conocido como elemento de inserción 6110 (IS6110).

Debido a que está presente en gran número, el IS6110 ha sido ampliamente empleado como marcador genotípico en estudios epidemiológicos, y dado que se encuentra exclusivamente presente en los miembros que forman este complejo, se usa como herramienta de diagnóstico para identificar las especies pertenecientes al mismo [2].

Por tanto, la secuencia diana seleccionada forma parte de las 1360 bases del elemento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* recogidas en la base de datos del GenBank [34] y cuyo número de acceso es M29899. La secuencia se muestra a continuación.

```

1      CGATGAACCGCCCCGGCA TGTCGGAGA CTCCAG TTCTTG GAAAGGAT GGGGTCATGTCA
61     GGTGGTTCATCGAGGAGGTACCCGCCGAGCTGCGTGAGCGG GCGGTGCGGATGGTCGCA
121    GAGATCCGCGGTCTAG CACGATTCGGAGT GGGCAGCGA TCAGTGAGG TCGCCCGTCTACTT
181    GGTGTTGGCTGCGCGGAGACGGTGCCTAAGTGGGTGCGCCAGGCGCAGGTCGATGCCGGC
241    GCACGGCCCGGGACCACGAC CGAAGAAT CCGCTGAGC TGAAGCGCTTAGCGGCGGGACAA
301    CGCCGAATTGC GAAGGG CGAACGCGAT TTAAAG ACCGCGTCGGCTTTCT TCGCGGCCGA
361    GCTCGACCGGCCAG CACGCTAA TTAAC GGTTCA TCGCCG ATCATCAGG GCCACCGCGAGG
421    GCCCCGA TGGTTTTCGGTGGGG TGTCGAGT CGATCTGCACACAGCTGACCGAGCTGGGTG
481    TGCCGA TCGCCC ATCGACCT ACTACGAC CACA TCAACCG GGAGC CCAG CCGCCGCGAGC
541    TCGCGGAT GGCGAACTCAA GGAG CACATCAG CCGCGTC CA CGCCGCAACTACGGTGTTT

```

601 ACGGTGCCCGCAAAGTGTGGCTAACCTG AACCGTGAGGGC ATCGAGGTGGCCAGATGCA
 661 CCGTCGAA CGGCTGATGACC AAACCTCGGCCTGT CCGGGACCAC CCGCGGCA AAGCCCGCA
 721 GGACCACGATCG CTGATCCGGCC ACAGCCC GTCCCG CCGATCTCG TCCA GCGCCG CTTCG
 781 GACCACCAGCACCTA ACCGGCTGTG GG TAGCAGAC CTC ACT ATGT GTCGACCTGGGCAG
 841 GGTTCGCCTACGTGGCCTT TGTCACCG ACGCCT ACGTCG CAGGATCCT GGGCTGGCGGGT
 901 CGCTTCCACG ATGGCCACCTC CATGGTCC TCGACGCGAT CGAGC AAGCCATC TGGACCCG
 961 CCAACAAGAAGGCGTACTCGACCTGAAAG ACGTTATCC ACCATACG GATA GGGGA TCTCA
 1021 GTACACATCGATCCGGTTCAGCGAGC GGCTCGCCGAGG CAGGCATCC AACCGTCGG TCGG
 1081 AGCGGTCGGAAGCTCCTATGACAATGCACTAGCCGA GACGAT CAACGGCC TATA CAAGAC
 1141 CGAGCTGATCAAACCCGGCAAGCCC TGGCG GTCCATCGA GGATGTCGAGT TGGCCACCGC
 1201 GCGCTGGGTGCGACTG GTTCAACC.ATCGCCGCTCTA.CCAGTACT GCGGCGAC GTCC.CGCC
 1261 GGTGGAACCTCGAG GCTGCCTACTAC.GCTCAACGCCAGAGACCA GCCGCC GGCTGAGGTCT
 1321 CAGATCAGAGAGTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTACGA

Para seleccionar de entre todas las bases del IS6110 la secuencia diana se tiene en cuenta que los requerimientos de sensibilidad son extremos cuando se trata de detectar un segmento específico de ADN en el genoma completo del patógeno, y que por tanto el ensayo necesita recurrir a una amplificación previa que además restrinja el tamaño de la secuencia a detectar.

En este caso concreto se va a llevar a cabo una amplificación isotérmica mediante HDA. En el Kit de la casa Biohelix se recomiendan las condiciones para la selección del analito (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones empleadas para la selección del analito (Biohelix).

Tamaño del Producto	T _m del Producto
80-120 pb	Mín. 68 Opt. 71 Máx. 75

Buscando en la bibliografía se selecciona un fragmento de 84 nucleótidos cuyas bases se repiten 16 veces a lo largo del genoma de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* [17].

**5' CAA CAA GAA GGC GTA CTC GAC CTG AAA GAC GTT ATC CAC CAT ACG GAT AGG
 GGA TCT CAG TAC ACA TCG ATC CGG TTC AGC GAG 3'**

A continuación se evalúa mediante el programa BLAST [34] las homologías de esa secuencia con otras posibles cepas, y se comprueba que, con el 100% de coincidencia, la secuencia pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Una vez seleccionada la secuencia de analito se comprueba, bajo las condiciones de temperatura y concentración salina empleadas durante el proceso de amplificación, la estructura del fragmento de ADN y sus parámetros termodinámicos (ΔG , ΔH , ΔS y T_m). Para ello puede emplearse el programa de ordenador de acceso libre a través de Internet Mfold Web Server [35], así como la página web de IDT [36].

Dado que las energías libres de Gibbs obtenidas para las posibles estructuras secundarias de la secuencia de analito a 65 °C, 40 mM de Na⁺ y 4 mM de Mg²⁺ son mayores de cero Kcal/mol, se saca en conclusión que no son estables y, por tanto, no van tener peso en el proceso de amplificación.

4.1.2. Selección de la secuencia de cebadores

Una vez seleccionada, de entre todo el genoma bacteriano de la *Mycobacterium tuberculosis*, la secuencia que actuará como analito, el siguiente paso es la elección de la secuencia oligonucleotídica de los cebadores directo e inverso para el proceso de amplificación.

Al igual que para la selección de la secuencia de analito, la casa Biohelix recomienda las condiciones de los cebadores para la amplificación isotérmica dependiente de helicasa termoestable (tHDA) Se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones recomendadas por la casa Biohelix en su Kit IsoAmp® para la selección de los cebadores.

Tamaño del Cebador	T _m del Cebador	GC% del Cebador
Mín. 24	Mín. 60	Mín. 35
Opt. 27	Opt. 68	Opt. 44
Máx. 33	Máx. 74	Máx. 60

Conocidas dichas condiciones, puede llevarse a cabo el proceso de selección de los cebadores directo e inverso por dos vías:

1. Diseño de los cebadores mediante el empleo de programas web de acceso gratuito como el Primer3 [37].
2. Selección de los mismos basándose en referencias bibliográficas que aborden ensayos de amplificación de la misma secuencia del genoma de la *Mycobacterium tuberculosis* escogida.

En este caso concreto, y puesto que la molécula diana se ha elegido de una publicación científica en la que se amplifica la misma mediante el Kit de Biohelix de tHDA [17], la vía más sencilla para la selección de los cebadores, y que además cumple con las condiciones propuestas, es la segunda.

A continuación se muestra la secuencia de los cebadores, así como su temperatura de fusión (T_m) (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencia (5' → 3'), tamaño, temperatura de fusión (T_m / °C) y %GC de los cebadores.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño	T_m (°C)	GC%
Directo	CAA CAA GAA GGC GTA CTC GAC CTG A	25 pb	71.0	52.0
Inverso	CTC GCT GAA CCG GAT CGA TGT GTA CT	26 pb	73.4	53.9

Una vez seleccionados los cebadores se comprueba la estructura y los parámetros termodinámicos (ΔG , ΔH , ΔS y T_m) de los mismos bajo las condiciones del proceso de amplificación [35].

Las posibles estructuras secundarias de los cebadores, en condiciones de amplificación, tienen energías libres de Gibbs mayores de cero Kcal/mol. Por tanto, no son estables y no van a ser determinantes durante el proceso de amplificación.

Otro punto a tener en cuenta a la hora del diseño de cebadores es que la amplificación va a acoplarse a un ensayo de hibridación para la detección del ADN amplificado. Se propone emplear partículas magnéticas funcionalizadas con

2. El extremo 5' de la secuencia de analito interacciona con la estreptavidina de las partículas magnéticas. Si se conjugase la sonda en 3' la fluoresceína quedaría próxima a la superficie de las partículas magnéticas y podrían existir impedimentos estéricos a la hora de realizar el marcaje con el fragmento Fab del anticuerpo anti-fluoresceína.

4.2. Diseño y caracterización del ensayo genomagnético

En primer lugar se evaluaron las características del ensayo genomagnético para la detección de secuencias sintéticas idénticas al amplicón biotinilado.

**5' [BtnTg]CTC GCT GAA CCG GAT CGA TGT GTA CTG AGA TCC CCT ATC CGT
ATG GTG GAT AAC GTC TTT CAG GTC GAG TAC GCC TTC TTG TTG 3'**

Diferentes concentraciones de estas secuencias se hacen interaccionar con una cantidad fija de partículas magnéticas (50 µg), siguiendo el esquema de ensayo que se describe en la Figura 6.

En primer lugar, se atrapan las secuencias biotiniladas sobre la superficie de las micropartículas magnéticas (etapa 1, Figura 6). A continuación se efectúa la reacción de hibridación con la sonda indicadora, que incorpora una etiqueta de fluoresceína (etapa 2, Figura 6) y facilita el marcaje enzimático tras la interacción con fragmento Fab de un anticuerpo anti-fluoresceína unido a peroxidasa (etapa 3, Figura 6).

Finalmente se lleva a cabo la medida de la actividad enzimática inmovilizada colocando una alícuota de las micropartículas magnéticas modificadas sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono y midiendo por cronoamperometría la cantidad del producto de oxidación de tetrametilbencidina generado enzimáticamente al cabo de 60 segundos. La señal obtenida se correlaciona con la cantidad de amplicón de partida.

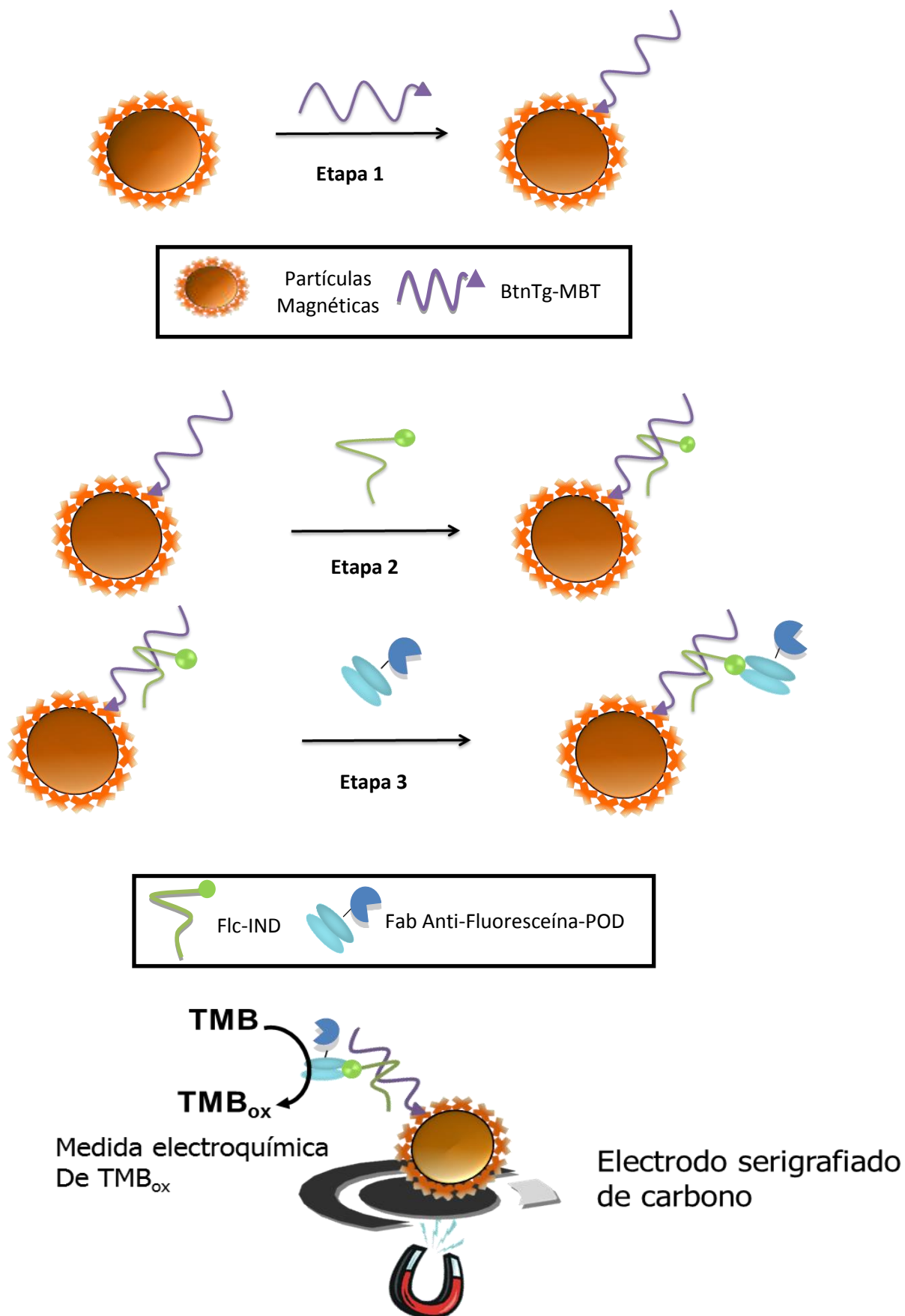


Figura 6. Esquema del ensayo genomagnético.

Pero para evaluar el ensayo genomagnético se necesita primero seleccionar la concentración de sonda indicadora.

4.2.1. Selección de la concentración de sonda indicadora

Para seleccionar la concentración de sonda indicadora se tiene en cuenta que se pretende acoplar a dicho ensayo de hibridación una amplificación isotérmica dependiente de helicasa termoestable (tHDA).

Las únicas secuencias de ADN que pueden participar como analito en el ensayo genomagnético son aquellas que lleven en su extremo 5' una biotina, de modo que interactúen con la estreptavidina de las partículas magnéticas. Esas secuencias se sintetizan a partir del cebador inverso biotinilado. Por tanto, el proceso de amplificación y posterior detección está limitado por dicho cebador. En el protocolo de amplificación HDA se recomienda utilizar una concentración de cebadores 75 nM. Si se adiciona al medio de amplificación el cebador inverso a ese nivel de concentración, la concentración límite de síntesis de secuencias biotiniladas durante el proceso será también 75 nM. Conocido este dato se puede valorar qué concentraciones de secuencia indicadora deben incluirse en el estudio:

1. Puede obtenerse como máximo una concentración de secuencia biotinilada de 75 nM, que será atrapada sobre las partículas magnéticas; por tanto, se necesita como mínimo la misma concentración de sonda indicadora para su detección.

2. La etapa de hibridación tiene lugar sobre las partículas magnéticas. Se trata, por tanto, de un proceso de hibridación heterogénea, cinéticamente más lento que la reacción de hibridación.

Con el objetivo de facilitar la interacción de complementariedad sin necesidad de alargar esta etapa del procedimiento experimental, se decide valorar el efecto que tiene un exceso de sonda indicadora sobre el ensayo, en concreto, una concentración de 150 nM.

3. Debido a que la máxima concentración de producto que puede obtenerse durante la amplificación también depende del tiempo que se dedique a la misma, se

decide valorar el efecto de adicionar al medio de reacción una cantidad inferior a 75 nM de sonda indicadora. En este caso, 20 nM.

Se comienza evaluando cómo cambia la señal del ensayo con la concentración de secuencia biotinilada en el intervalo 0.02-75 nM, manteniendo constante la concentración de secuencia indicadora en 20 nM.

En la figura 7 se resumen los resultados obtenidos. Como puede observarse, el ensayo alcanza la saturación a una concentración aproximada de secuencias específicas de MBT de 10 nM.

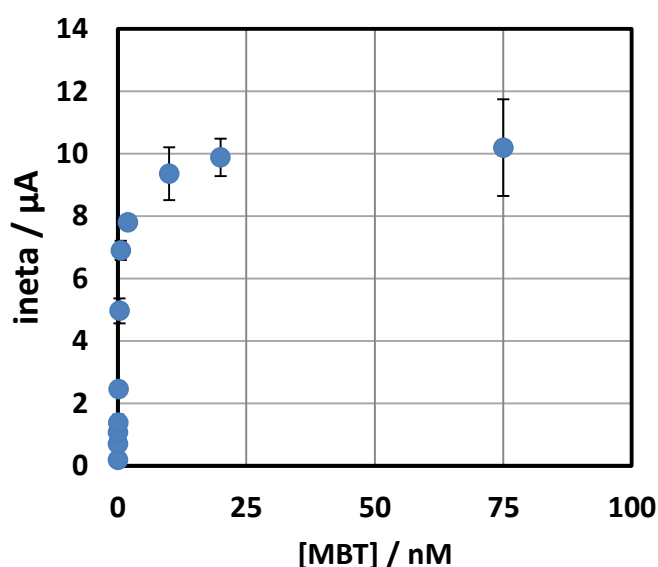


Figura 7. Representación de la señal obtenida en el ensayo frente a la concentración de MBT para una concentración de secuencia indicadora de 20 nM.

Se podría pensar, por tanto, que una concentración de sonda indicadora igual a 20 nM es suficiente para llevar a cabo el experimento. Sin embargo, y como se ha citado anteriormente, las interacciones heterogéneas presentan una cinética lenta, que podría verse favorecida por un aumento de la concentración de sonda indicadora. Para comprobar este hecho, basta con analizar las concentraciones más bajas de secuencia amplicón estudiadas hasta el momento (20-100 pM), aumentando la de sonda indicadora a 75 nM como se tenía previsto.

En este intervalo se observa que la señal aumenta de forma proporcional a la concentración de sonda indicadora (figura 8). Si se toma como referencia la intensidad (μA) para una concentración de 20 μM (0.02 nM), al incrementar 3,75 veces la concentración de sonda, de 20 nM a 75 nM, la señal aumenta de forma análoga de 0.21 μA a 0.67 μA .

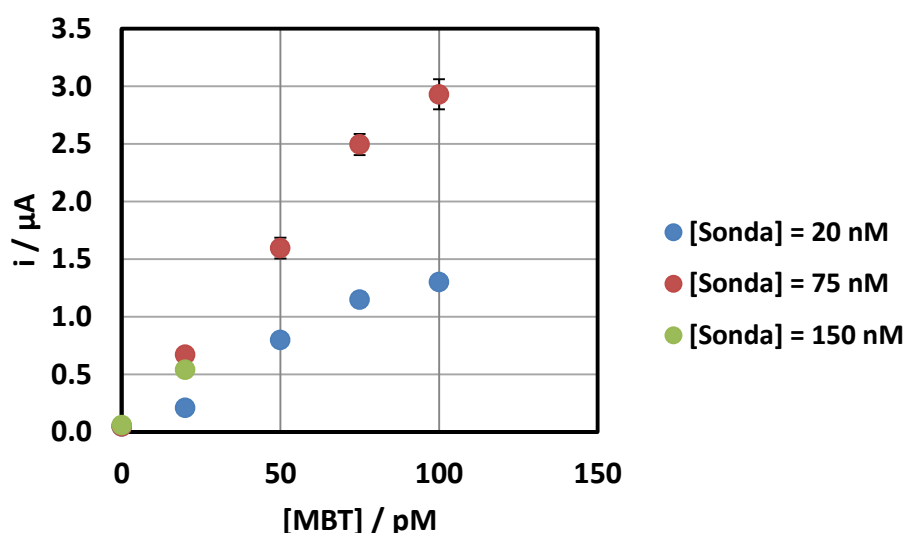


Figura 8. Representación de la intensidad de señal obtenida en el intervalo de $[\text{MBT}] = 0.0\text{-}100 \mu\text{M}$ para tres concentraciones de sonda indicadora diferentes (20 nM, 75 nM, 150 nM).

Además, es importante resaltar que la señal del blanco no se ve afectada por tal aumento de concentración, lo que indica que no existen interacciones inespecíficas entre el exceso de cebador biotinilado (proporción del cebador inverso que no se consume durante la amplificación pero que, al llevar biotina, se une a las partículas magnéticas) y la sonda indicadora. Esto significa que la señal obtenida proviene exclusivamente del dúplex formado durante la hibridación.

Por tanto, se concluye que un aumento de la concentración de sonda en el medio de reacción favorece la interacción de hibridación con el analito inmovilizado sobre las partículas magnéticas.

Para asegurarse de que la concentración de sonda indicadora seleccionada es la adecuada, aún queda estudiar el efecto que tiene sobre la señal un exceso grande de la misma. Se selecciona para este estudio una concentración de 150 nM.

Como se aprecia en la figura 8, al aumentar al doble la concentración de sonda indicadora no se aprecia ningún efecto sobre la señal para una concentración de 0.02 nM.

Por tanto, se selecciona como concentración de sonda indicadora para llevar a cabo el resto de ensayos 75 nM.

4.2.2. Evaluación de las características de respuesta del genoensayo

AL representar la intensidad de señal frente al logaritmo de la concentración de MBT se obtiene una curva sigmoide, habitual en este tipo de ensayos (figura 9).

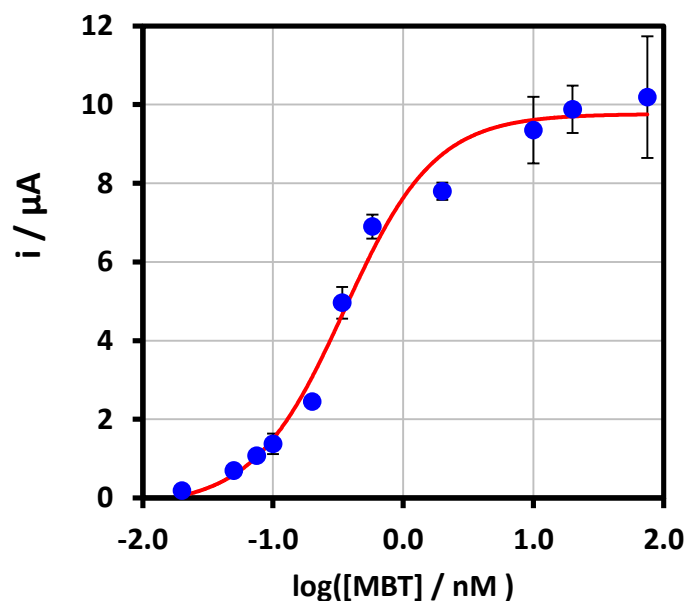


Figura 9. Representación de la intensidad de señal frente al log[MBT].

El intervalo lineal del genoensayo es 5-50 pM, con un límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco entre la pendiente de la recta de calibrado (figura 10) de 2 pM.

La reproducibilidad, expresada como coeficiente de variación, es del 9% para 5 pM y del 5% para 50 pM.

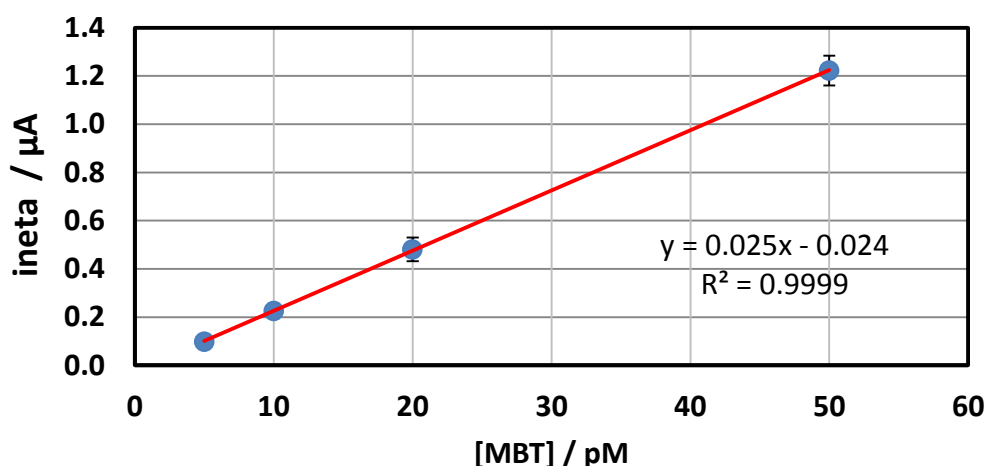


Figura 10. Representación de la intensidad de señal frente a la concentración de MBT en el intervalo lineal de la respuesta.

4.3. Acoplamiento de un proceso de amplificación isotérmica al ensayo genomagnético

Debido a la elevada sensibilidad que se requiere en muestras clínicas, se hace necesario acoplar el ensayo de hibridación a una etapa previa de amplificación. Como ya se explicó en la introducción del proyecto, se selecciona un sistema isotérmico por su capacidad para la inclusión en sistemas integrados. Además, la tHDA presenta como ventaja añadida su simplicidad.

Cuando se pretende acoplar un sistema de amplificación a un ensayo de hibridación, conviene que el proceso no sea simétrico total [38], de modo que se obtengan directamente secuencias de hebra simple que participarán como analito de la etapa de hibridación. De este modo se evita realizar una etapa de desnaturalización del dúplex previa al proceso de hibridación analito-sonda indicadora.

Por tanto, se planteó realizar un proceso de amplificación asimétrica HDA seguido del atrapamiento de los amplicones biotinilados obtenidos sobre la superficie de micropartículas magnéticas tal como se esquematiza en la Figura 11.

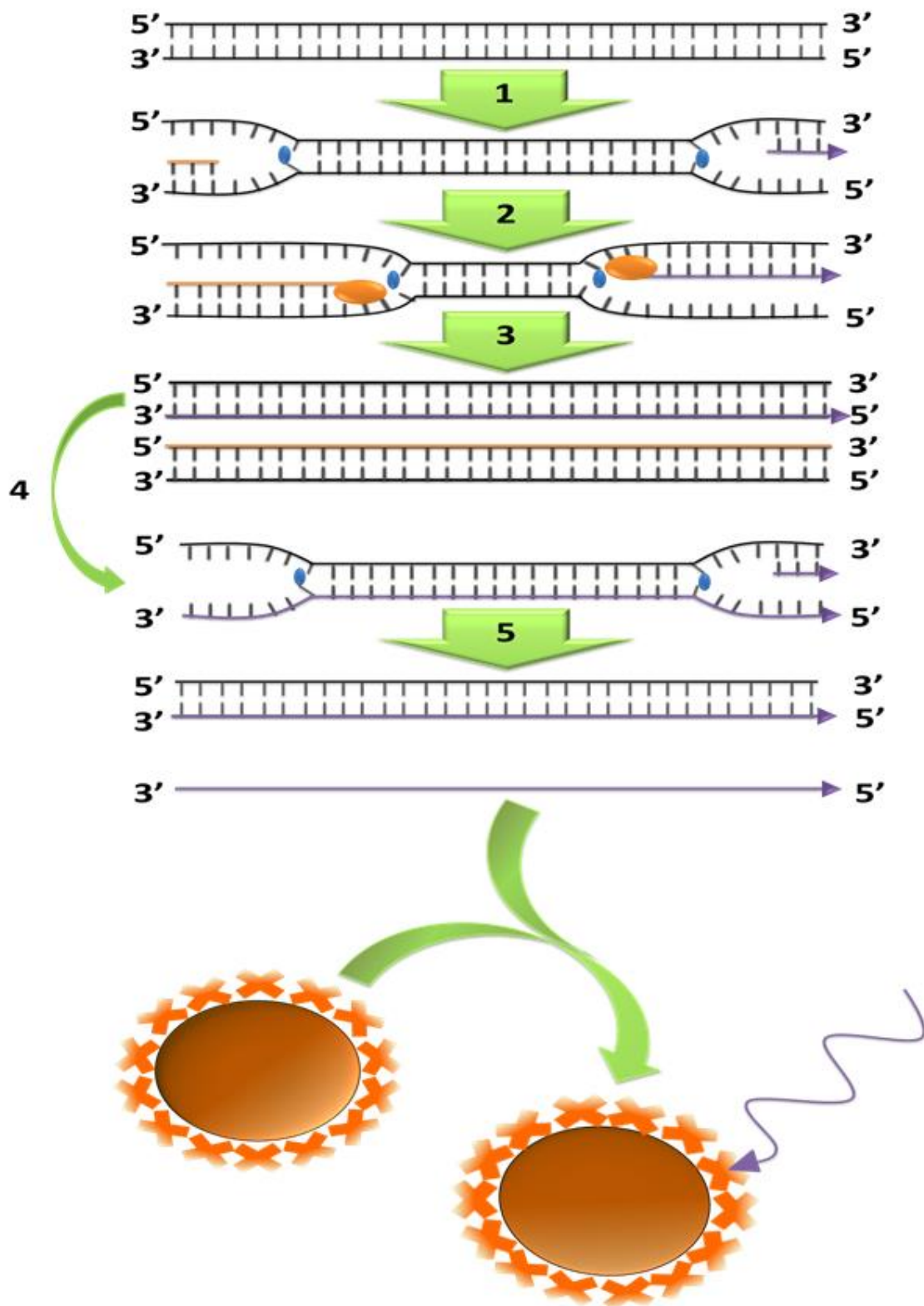


Figura 11. Esquema del sistema de amplificación asimétrica acoplado al genoensayo.

Para poder evaluar el ensayo de determinación de *Mycobacterium tuberculosis* al completo, así como comparar los resultados que ofrece el mismo frente al protocolo sin etapa de amplificación, se necesita seleccionar la concentración de cebadores.

4.3.1. Selección de la concentración de cebadores

A mayor asimetría en la relación de cebadores utilizada durante la amplificación, más lenta será la cinética de la reacción, pues mientras la amplificación simétrica es exponencial, la asimétrica total es lineal.

La clave por tanto está en buscar la relación de asimetría que satisfaga los requisitos de cinética y concentración de copias de ADN monocatenario obtenidas, lo que se traducirá en mayor señal de respuesta del ensayo. De este modo, el presente estudio se realiza midiendo la relación señal/blanco para una concentración de oligonucleótido de partida fija (1 pM), utilizando diferentes proporciones de cebadores durante el proceso de amplificación.

Debido a que se pretende obtener como resultado de la amplificación asimétrica parcial hebra simple biotinilada, que servirá de analito del ensayo de hibridación, el cebador inverso se añade siempre en mayor proporción. En este caso concreto, y siguiendo las indicaciones del Kit para tHDA de Biohelix, el cebador inverso se añade en concentración 75 nM. La concentración de cebador directo se calcula a partir de ésta.

Si se presta atención a la figura 12, se comprueba como en un principio, al disminuir la relación de asimetría (aumentar la concentración de cebador directo) también aumenta la señal medida cuando el ensayo se realiza en presencia de oligonucleótido diana, mientras que el blanco no se ve afectado, lo que se traduce en una mayor relación señal/blanco (figura 8). Este hecho está de acuerdo con una cinética más rápida del proceso de amplificación tal y como se había predicho. Si bien es cierto, llega un punto en el que, aunque la cinética sea más rápida, el número de hebras simples obtenidas debido al proceso de amplificación no es suficiente, y comienza a decaer la señal.

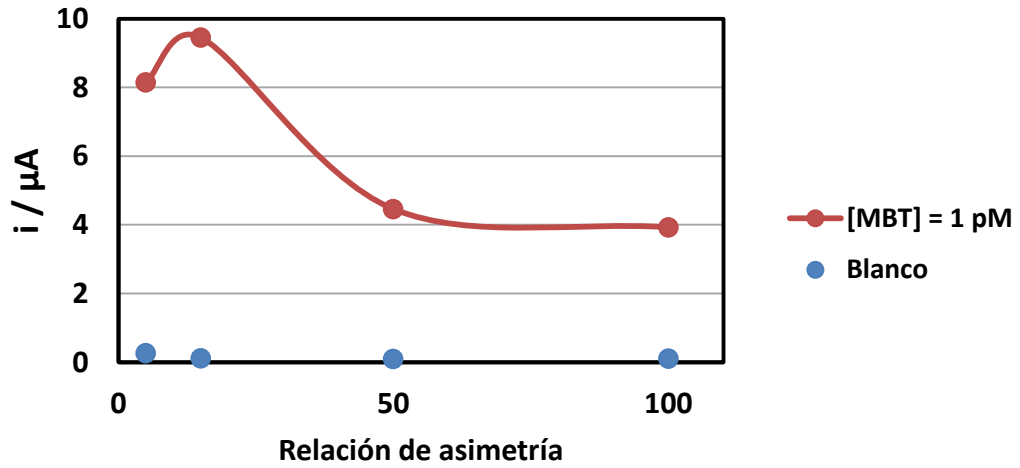


Figura 12. Representación de señal medida para el blanco y para una concentración de MBT 1pM en función de la relación de cebadores inverso/directo.

En conclusión, la proporción de cebadores que se selecciona para realizar el resto de ensayos es 15/1 de cebador inverso/cebador directo por ser la que proporciona mayor relación señal/blanco (figura 13).

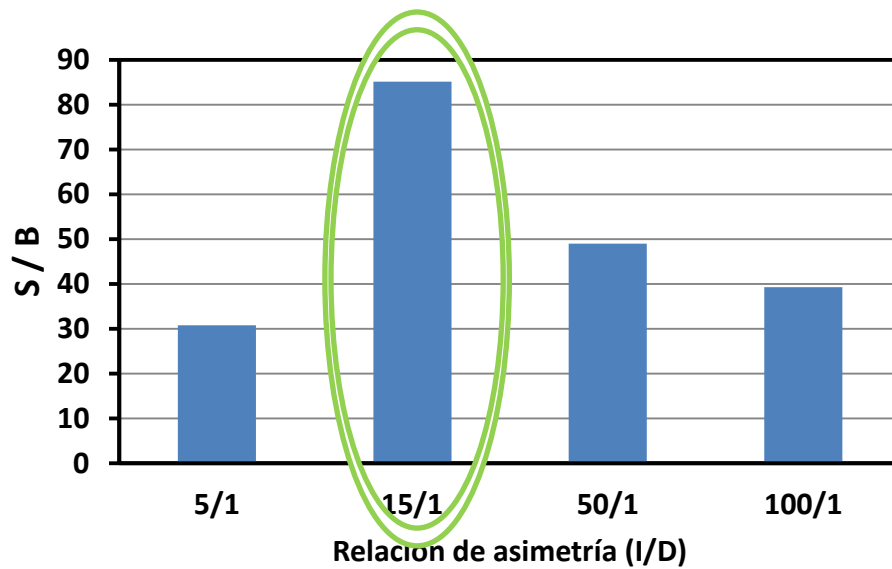


Figura 13. Representación de la relación señal/blanco en función de la relación de asimetría.

4.3.2. Evaluación de las características de respuesta del genoensayo acoplado a HDA

En las condiciones seleccionadas se evaluó la sensibilidad del ensayo realizando la amplificación y la detección de diferentes cantidades de oligonucleótidos sintéticos entre 1 aM y 2 nM.

Como se muestra en la figura 14, incluso concentraciones tan bajas como 1 aM dan señales significativamente diferentes del blanco, es decir, un ensayo positivo. Esto significa que el protocolo desarrollado es capaz de detectar hasta 30 copias de oligonucleótido sintético, que equivaldría a 2 organismos de *Mycobacterium tuberculosis*, en 3 horas de ensayo, frente a las 6-8 semanas de cultivo.

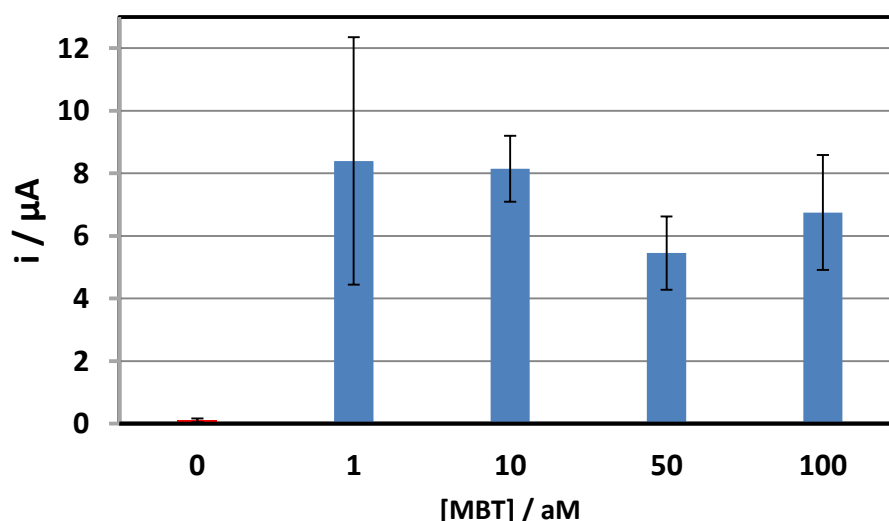


Figura 14. Representación de la intensidad de señal medida para diferentes concentraciones de MBT en el ensayo acoplado.

La reproducibilidad es del 40% para 1 aM. Aunque parezca un dato elevado, el sistema HDA-genoensayo es muy complejo, y la concentración citada mínima.

Por tanto, la evaluación de las muestras clínicas se lleva a cabo acoplando la tHDA al ensayo genomagnético

4.5. Evaluación del genoensayo en muestras clínicas

Las muestras clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* de las que se dispone proceden del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias. Son muestras procedentes de cultivo, por lo que la carga bacteriana es muy alta. Debido a los elevados requisitos de seguridad necesarios para manipular las muestras, pues la tuberculosis pertenece al nivel de contención 3 [3-4], la extracción del ADN bacteriano se realiza en el propio hospital por personal cualificado.

El protocolo a seguir para realizar la extracción del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* procedente de un cultivo [39] consiste en:

1. “Raspar” todo el crecimiento micobacteriano de la placa de Middlebrook 7H11.
2. Inactivar las *Micobacterias* mediante temperatura.
3. Lisar la pared bacteriana con Lisozima.

Con los extractos de ADN bacteriano obtenidos se comenzó realizando un proceso de amplificación HDA simétrica con el objetivo de confirmar la longitud de la secuencia amplificada mediante electroforesis en gel, y posteriormente se aplicó sobre las mismas el método completo del ensayo desarrollado.

1. Evaluación del sistema de amplificación

Para poder emplear como técnica de detección el gel se requiere que la amplificación sea simétrica, pues como ya se explicó en la introducción del proyecto, para la visualización del ADN se emplean colorantes fluorescentes que actúan insertándose entre los pares de bases del mismo. Además, para no modificar el peso molecular de los fragmentos de ADN, los cebadores empleados serán los mismos del ensayo, pero sin ninguna marca.

Las muestras se introducen en un gel de agarosa al 3%, efectuándose la electroforesis a 80 V durante 70 minutos. La tinción posterior se efectúa con bromuro de etidio.

A continuación se muestra el resultado obtenido (figura 15):

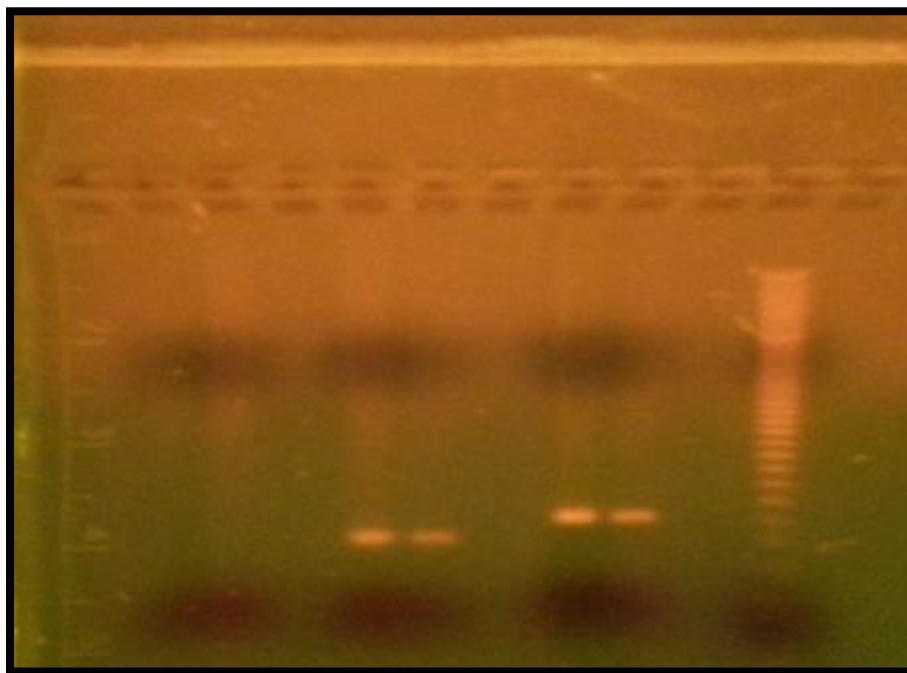


Figura 15. Electroforesis en gel de (de izquierda a derecha): dos blanco, dos muestras de *Mycobacterium tuberculosis* y dos secuencias control, así como un marcador de tamaños de 20 en 20 pares de bases.

En las dos primeras calles del gel se introdujeron las disoluciones obtenidas tras efectuar el proceso de amplificación en ausencia de secuencia diana (blancos). Como puede comprobarse no existió amplificación en los mismos ya que no se detecta banda alguna. En las dos siguientes calles se colocaron las muestras de extractos de ADN procedentes de *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales dieron lugar a una secuencia amplificada de unas 80 pares de bases. En las dos últimas calles se pinchó ADN control, cuya secuencia y cebadores incluye Biohelix en su Kit., junto con extractos de ADN de *M. tuberculosis*. La secuencia control se emplea para asegurar que en la matriz de la muestra no existen inhibidores de la amplificación.

De este experimento puede concluirse que el sistema de amplificación HDA funciona correctamente en muestras clínicas procedentes de cultivo.

2. Evaluación del método resultante del acoplamiento HDA-genoensayo

En un principio se aplicaron las condiciones de amplificación empleadas para ADN sintético. Sin embargo, una hora de amplificación resultó no ser suficiente para obtener señal en la muestra, lo que deja de manifiesto que la complejidad del genoma completo de la bacteria no es equiparable con la de una secuencia de hebra simple de 84 bases. Se decidió, por tanto, amplificar durante una hora y media y aumentar el volumen de enzima de 2 μ L a 3.5 μ L.

Las muestras se analizaron llevando a cabo diluciones seriadas de las mismas. Con el objetivo de confirmar que el proceso de amplificación funciona de forma adecuada se analiza simultáneamente ADN sintético en concentración 1000 aM. Además, para comprobar que en la matriz de la muestra no existen inhibidores de la amplificación se añade a las mismas ADN sintético en concentración 1000 aM. Los resultados obtenidos en estos experimentos son los siguientes:

1. La señal obtenida para ADN sintético en concentración 1000 aM fue saturante como se esperaba. Por tanto, la amplificación funcionó de forma adecuada.
2. La señal obtenida para una muestra diluida 1:10⁴ en la que se añadió ADN sintético en concentración 1000 aM fue también saturante, por lo que en la matriz de la muestra no existían inhibidores de la amplificación.
3. Se comprobó que la señal para la muestra fue saturante hasta diluciones 1:10⁴.

5. Conclusiones

A continuación se exponen las principales conclusiones extraídas de este trabajo:

1. El empleo de micropartículas magnéticas modificadas con estreptavidina como plataforma para el atrapamiento de una secuencia de 84 bases que forma parte del fragmento de inserción IS6110 del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y que por tanto es específica de este patógeno, en combinación con un ensayo de hibridación con amplificación enzimática y detección electroquímica, ha demostrado excelentes características analíticas para la cuantificación de secuencias de ADN sintéticas características de este microorganismo. El genoensayo presenta un límite de detección de 2 pM y una reproducibilidad del 5%.
2. Se ha acoplado a dicho ensayo una etapa previa de amplificación isotérmica dependiente de helicasa termoestable (tHDA). Empleando durante el proceso de amplificación una proporción 15 veces mayor de cebador indirecto biotinilado que de cebador directo se obtienen preferentemente copias monocatenarias biotiniladas de la secuencia de partida. De esta forma pueden medirse señales significativamente diferentes a las del blanco, y por tanto dar un resultado de ensayo positivo, para concentraciones iniciales de ADN tan bajas como 1 aM, que equivaldrían a 2 organismos de *Mycobacterium tuberculosis*.
3. El método resultante del acoplamiento entre los procesos de amplificación isotérmica y detección mediante el ensayo genomagnético electroquímico demostró un gran potencial para la detección de muestras de ADN genómico obtenidas a partir de cultivos de aislados clínicos de la bacteria. Diluciones seriadas de hasta 10^4 veces de estas muestras dieron un resultado positivo. El tiempo del ensayo se reduce de las más de 3 semanas necesarias en el ensayo de referencia mediante cultivo a solo unas horas, un avance particularmente útil cuando es necesario un diagnóstico temprano.

6. Referencias bibliográficas

- [1] P.C. Soo, Y.T. Horng, K.C. Chang, J.Y. Wang, P.R. Hsueh, C.Y. Chuang, C.C. Lu, H.C. Lai, *A simple gold nanoparticle probes assay for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex from clinical specimens*, Mol Cell Probe 23 (2009) 240-246.
- [2] C.R.E. McEvoy, A.A. Falmer, N.C.G. van Pittiues, T.C. Victor, P.D. van Helden, R.M. Warren, *The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis 87 (2007) 393-404.
- [3] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo
(http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_585.pdf).
- [4] S.G. Tanya S. Hauck, Yali Gao, Warren C.W. Chan, *Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries*, Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010) 438-448.
- [5] Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)
(http://www.hca.es/huca/web/contenidos/servicios/dirmedica/almacen/preventiva/EDOs/EDOs_Protocolos/Asturias_PROTOCOLO_TBC_090211.pdf).
- [6] Organización Mundial de la Salud
(http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/).
- [7] P. Kara, C. Cavusoglu, S. Cavdar, M. Ozsoz, *Direct electrochemical genosensing for multiple point mutation detection of Mycobacterium tuberculosis during the development of rifampin resistance*, Biosens Bioelectron 24 (2009) 1796-1800.
- [8] J.C. Palomino, *Molecular detection, identification and drug resistance detection in Mycobacterium Tuberculosis*, FEMS Immunol Med Microbiol (2009) 1-9.
- [9] N.S.H. Ram Pramod Tiwari, Ramesh N. Bharmal, S. Kartikeyan, Neeta M. Deshmukh, Prakash S. Bisen, *Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead*, Tuberculosis 87 (2007) 193-201.

- [10] J. A. Cascante, I. Pascal, V. M. Eguía, J. Hueto, *Diagnóstico de la infección tuberculosa*, Anales (CFNavarra) 30 (Suplemento 2) (2007) (<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol30/sup2/suple5a.html>).
- [11] Elsi Briceño, Marianella Perrone, Germán Pardi, Carolina Guilarte, Lucrecia Arvelo, *deteccion de Mycobacterium tuberculosis por métodos microbiológicos convencionales y características del periodonto de un grupo de pacientes con tuberculosis*, Acta odontológica venezolana [47\(1\) \(2009\)](#).
- [12] Andras SC, Power JB, Cocking EC, Davey MR, *Strategies for signal amplification in nucleic acid detection*, Mol Biotechnol 19 (2001) 29–44.
- [13] Ruth McNerney, Peter Daley, *Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities*, Nature Reviews Microbiology 9 (2011) 204-213.
- [14] Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A, *Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis*, Chest. 137(4) (2010) 952-968.
- [15] Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV., *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells.*, Am J Respir Crit Care Med. 163(4) (2001) 824-8.
- [16] Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV, *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*, Lancet. 357(9273) (2001) 2017-2021.
- [17] Pai M, Zwerling A, Menzies D, *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*, Ann Intern Med. 149(3) (2008) 177-184.
- [18] R.K. Saiki, S. Scarf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, *Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemina*, Science 230 (1985) 1350-1354.

- [19] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase*, Science 239 (1988) 487-491.
- [20] K.B. Mullis, *The Unusual Origin of the Polymerase Chain-Reaction*, Sci Am 262 (1990) 56-65.
- [21] Myriam Vincent, Yan Xu, Huimin Kong, *Helicase-dependent isothermal DNA amplification*, EMBO reports 5 (2004) 795-800.
- [22] Aurélie Motré, Richar Kong, Ying Li, *Improving isothermal DNA amplification speed for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Microbiological Methods 84 (2011) 343-345.
- [23] Victoria Doseeva, Thomas Forbes, John Wolff, Yuri Khripin, Dominic O'Neil, Thomas Rothmann, Irina Nazarenko, *Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 71 (2011) 354–365.
- [24] Peter J. Asiello and Antje J. Baeumner, *Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review*, Lab on a Chip 11 (2011) 1420-1430.
- [25] John J. Carrino, Helen H. Lee, *Nucleic Acid Amplification Methods*, Journal of Microbiological Methods 23 (1995) 3-20.
- [26] Lixin An, Wen Tang\$, Tamara A. Ranalli, Hyun-Jin Kim, Jamie Wytiaz, and Huimin Kong, *Characterization of a Thermostable UvrD Helicase and Its Participation in Helicase-dependent Amplification*, the journal of biological chemistry 280 (2005) 28952-28958.
- [27] Patente [US7282328](#), Helicase dependent amplification of nucleic acid.
- [28] Anping Cao and Chun-yang Zhang, *Real-Time Detection of Transcription Factors Using Target-Converted Helicase-Dependent Amplification Assay with Zero-Background Signal*, Anal. Chem. 85 (2013) 2543–2547.

- [29] Hubert Zipper, Herwig Brunner, Jürgen Bernhagen and Frank Vitzthum, [*Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*](#). *Nucleic Acids Research* 32 (2004).
- [30] Georges C Frech, Denton Munns, Robert D Jenison and Brian J Hicke, *Direct detection of nasal Staphylococcus aureus carriage via helicase-dependent isothermal amplification and chip hybridization*, *BMC Research Notes* 5 (2012).
- [31] Edith Torres-Chavolla, Evangelyn C. Alocilja, *Nanoparticle based DNA biosensor for tuberculosis detection using thermophilic helicase-dependent isothermal amplification*, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 4614– 4618.
- [32] M.A.M. Gijs, *Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications*, *Microfluid Nanofluid* 1 (2004) 22-40.
- [33] E. Gonzalez-Fernandez, N. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Aptamer-Based Inhibition Assay for the Electrochemical Detection of Tobramycin Using Magnetic Microparticles*, *Electroanalysis* 23 (2011) 43-49.
- [34] Base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [35] M.Zuker, *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3406-3415.
- [36] Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://eu.idtdna.com/site>).
- [37] S. Kwawetz, S. Misener (eds), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ 365-386 (Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>).
- [38] S.K. Poddar, *Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus*, *Molecular and Cellular Probes* 14 (2000) 25-32.

[39] Juan Agapito, Luis Cuadros, Sergio Tarrillo, Alonso Soto, *evaluación del medio Middlebrook 7H11 asociado a sangre humana u ovina para la detección de Mycobacterium tuberculosis en muestras de esputo*, Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica 26(3) (2009) 294-298.

ANEXO I: LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosomal

BtnTg-Cebador I: Cebador Inverso marcado con biotina-TEG

BtnTg-MBTc: Secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* marcada con biotina-TEG

Cebador D: Cebador Directo

CFP-10: Filtrado de cultivo de proteínas

dNTPs: Desoxinucleótidos

ESAT-6: Principios de antígeno secretor

Fab: Fragmento de unión al antígeno

Fic-IND: Sonda Indicadora marcada con fluoresceína

GC%: Porcentaje de guaninas-citosinas

HDA: Amplificación dependiente de Helicasa

IDT: Tecnologías del ADN integrado

IGRAS: Ensayos de Liberación del Interferón Gamma

INF- γ : Interferón-gamma

LAMP: Amplificación mediada por bucle

MBT: *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

NASBA: Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

POD: Peroxidasa

RNasa: Ribonucleasa

SDA: Amplificación por desplazamiento de cadena

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TB: Tuberculosis

TEG: Trietilenglicol

tHDA: Amplificación dependiente de Helicasa termoestable

T_m: Temperatura de fusión

TMB: Tetrametilbenzidina

T-Spot: T-SPOT®.TB test

QFT-GIT: QuantiFERON®-TB Gold In-Tube test

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

XDR-TB: Tuberculosis extremadamente resistente

ANEXO II: TABLAS DE DATOS

Tabla 1. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 7.

[MBT] / nM	i / μA	Desviación
0.000	0.07	0.008
0.020	0.26	0.09
0.050	0.77	0.05
0.075	1.15	0.06
0.100	1.5	0.3
0.200	2.5	0.1
0.340	5.0	0.4
0.580	7.0	0.3
2.000	7.9	0.2
10.000	9.4	0.8
20.000	10.0	0.6
75.000	10	2

Tabla 2. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 8.

[MBT] / μM	[Sonda] = 20 nM		[Sonda] = 75 nM		[Sonda] = 150 nM	
	i / μA	Desviación	i / μA	Desviación	i / μA	Desviación
0	0.048	0.008	0.05	0.01	0.06	0.02
20	0.21	0.01	0.67	0.01	0.54	0.05
50	0.80	0.02	1.60	0.09	1.28	0.06
75	1.15	0.06	2.49	0.09		
100	1.30	0.01	2.9	0.1		

Tabla 3. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 9.

Log([MBT] / nM)	i / μ A	Desviación
-1.7	0.26	0.09
-1.3	0.77	0.05
-1.1	1.15	0.06
-1.0	1.5	0.3
-0.7	2.5	0.1
-0.5	5.0	0.4
-0.2	7.0	0.3
0.3	7.9	0.2
1.0	9.4	0.8
1.3	10.0	0.6
1.9	10	2

Tabla 4. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 10.

[MBT] / μ M	i / μ A	Desviación
5	0.20	0.01
10	0.29	0.01
20	0.54	0.05
50	1.29	0.06

Tabla 5. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 12.

Relación de asimetría	B	[MBT] = 1 pM
5/1	0.27	8.15
15/1	0.11	9.45
50/1	0.09	4.46
100/1	0.10	3.93

Tabla 6. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 13.

Relación de asimetría	S / B
5/1	39.3
15/1	49.6
50/1	85.9
100/1	30.19

Tabla 7. Datos experimentales correspondientes a la representación de la figura 14.

[MBT] / aM	i / μ A	Desviación
0	0.11	0.06
1	8	4
10	8	1
50	5	1
100	7	2