

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 041**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/ES2010/070836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10837089 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2514833**

54 Título: **Detección de Streptococcus pneumoniae a través de genosensores magneto-
amperométricos empleando sondas y cebadores específicos para el gen lytA**

30 Prioridad:

16.12.2009 ES 200931177

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

22.05.2017

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%)**

Serrano 117

28006 Madrid, ES;

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(33.3%) y**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
(CIBERES) (33.3%)**

72 Inventor/es:

GARCÍA LÓPEZ, ERNESTO;

GARCÍA GONZÁLEZ, PEDRO;

GARCÍA LÓPEZ, JOSÉ LUIS;

CAMPUZANO RUIZ, SUSANA;

MORALES AREIZAGA, MARÍA;

ARDUNAY TISAIRE, MARÍA CARMEN;

PINGARRÓN CARRAZÓN, JOSÉ MANUEL y

PEDRERO MUÑOZ, MARÍA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 613 041 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de *Streptococcus pneumoniae* a través de genosensores magneto-amperométricos empleando sondas y cebadores específicos para el gen *lytA*

5 La presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria Gram-positiva que es un patógeno humano importante, en una muestra biológica aislada, a través de biosensores magneto-amperométricos, que comprende detectar fragmentos del gen *lytA* de dicho microorganismo, amplificados a través de PCR, preferiblemente PCR asimétrica o PCR asimétrica directa, por medio de la hibridación de los mismos con una sonda específica completamente complementaria a una región de dicho fragmento amplificado. Además, la presente invención también se refiere al uso de los cebadores SEQ ID NO: 3 y 4, junto con las sondas SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, para realizar dicha detección. El biosensor desarrollado para detectar *S. pneumoniae* hace posible que se aplique a diferentes tipos de muestras clínicas obtenidas a partir de pacientes infectados con esta bacteria u otras bacterias relacionadas. Preferiblemente, la muestra clínica es un fluido biológico aislado tal como sangre, líquido cefalorraquídeo, saliva u orina.

Estado anterior de la técnica

20 *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), o neumococo, es una bacteria Gram-positiva que produce una reacción α -hemolítica, cuando se incuba en medios apropiados. El neumococo es un patógeno que provoca un gran número de infecciones graves (neumonía, meningitis, otitis media aguda, bacteremia, etc.), principalmente en niños, personas ancianas y personas inmunocomprometidas. Tomada conjuntamente, la tasa de muerte debida a este microorganismo es superior a la producida por otras bacterias patógenas, particularmente en países en desarrollo (Scott, 2007. *Vaccine*, 25: 2398-2405).

25 La enfermedad neumocócica invasiva, definida como neumonía, bacteremia o meningitis, es una de las principales causas de morbilidad en el mundo. El neumococo es la causa de la muerte, anualmente, de más de un millón de niños de menos de 5 años en todo el mundo, muchos de ellos debido a neumonía (WHO, 2007. *Wkly. Epidemiol. Ree.*, 82: 93-104). *S. pneumoniae* es la causa principal de neumonía extrahospitalaria y meningitis bacteriana, al menos en países desarrollados (Brouwer *et al.*, 2009. *Lancet Infect. Dis.*, 9: 31-44). La neumonía neumocócica tiene una tasa de muerte de hasta el 30%, dependiendo de la existencia de bacteremia concomitante, así como de la edad de los pacientes y las enfermedades subyacentes. Cuando no se diagnostica ni se trata apropiadamente, neumonía neumocócica puede producir bacteremia y meningitis. Cuando hay una sospecha clínica de neumonía, se aplica habitualmente un tratamiento empírico con antibióticos de amplio espectro, lo que puede conducir al uso indiscriminado de antibióticos, una práctica que se ha demostrado que aumenta la resistencia bacteriana y a la que la mayoría de los centros sanitarios ha expresado su oposición. De hecho, el aumento de la resistencia a antibióticos de aislados clínicos neumocócicos es un problema sanitario en todo el mundo (Lode, 2009. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15: 212-217).

40 Los métodos convencionales usados para diagnosticar neumonía y la enfermedad neumocócica invasiva en general, basados en el cultivo de muestras de sangre o respiratorias, requieren tiempo y a menudo son complejos e imperfectos (Werno ó Murdoch, 2008. *Clin. Infect. Dis.*, 46: 926-932). En muchos pacientes, la etiología permanece oculta tras el procedimiento de diagnóstico habitual. La clasificación basada en el cultivo de muestras de esputo es controvertida debido al transporte orofaríngeo de neumococos presentes en portadores sanos o debido a muestras de esputo inadecuadas, contribuyendo así a un número indeterminado de falsos positivos. El resultado del cultivo, tras la tinción de Gram, requiere normalmente 48 horas, lo que junto con los problemas de sensibilidad y especificidad ya conocidos, hace que el método no sea económico. Como el cultivo de muestras de esputo, el cultivo de sangre padece también problemas de retraso y baja sensibilidad. Por otro lado, la serología requiere sueros de pacientes convalecientes para registrar un aumento del título de anticuerpos y habitualmente no proporciona información de diagnóstico lo suficientemente temprano como para que sea clínicamente relevante. El diagnóstico de la neumonía neumocócica a través de cultivo de sangre sólo es útil en el 10%-30% de los pacientes que padecen neumonía neumocócica que desarrollan bacteremia. Muestras invasivas, tales como las obtenidas a través de lavado broncoalveolar o aspiración transtraqueal, se consideran generalmente las más fiables para determinar la etiología de la neumonía, y el aislamiento de neumococos a partir de estas muestras demuestra el origen neumocócico. Sin embargo, esas son técnicas invasivas, que requieren personal formado, que no están libres de complicaciones y que, por tanto, no se usan de manera rutinaria en el diagnóstico (Werno y Murdoch, 2008. *Clin. Infect. Dis.*, 46: 926-932).

60 El desarrollo de métodos sencillos para determinar la presencia de antígenos neumocócicos en orina (antigenuria) en los últimos años ha representado un avance importante al solucionar parte de los problemas mencionados anteriormente. El reciente interés en la prueba urinaria responde al hecho de que los antígenos microbianos están más concentrados en la orina que en otros fluidos y que no existen anticuerpos en la misma que puedan alterar los resultados. La detección de antígenos neumocócicos (habitualmente polisacáridos capsulares) en orina ya se describió en 1917 (Dochez y Avery, 1917. *J. Exp. Med.*, 26: 477-493). Desde entonces ha habido intentos de analizarlos usando diferentes técnicas tales como contrainmunolectroforesis, aglutinación de látex, coaglutinación, inmunoensayo enzimático, etc. y algunas otras metodologías (Rai *et al.*, 2004. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.*

Dis., 27: 217-223; Samra *et al.*, 2003. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 45: 237-240; Stuertz *et al.*, 1998. J. Clin. Microbiol., 36: 2346-2348).

5 A finales de la década de 1990, se desarrolló un método sencillo y rápido (Binax NOW®) basado en un ensayo de membrana inmunocromatográfico para el presunto diagnóstico de neumonía neumocócica. Este método detecta el polisacárido C (un ácido teicoico que contiene colina), característico no sólo de todos los neumococos, sino también de patógenos tales como *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, en la orina de pacientes infectados. Aunque el Binax NOW es positivo para los 23 serotipos de neumococo responsables del 90% de las infecciones neumocócicas graves y proporciona resultados en sólo 15 minutos, tiene un límite de
10 detección alto [$\cong 1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (ufc) ml⁻¹], escasa selectividad hacia otros estreptococos (*S. mitis*, *S. oralis* y otros estreptococos α -hemolíticos) y otras bacterias patógenas (*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y, algunas veces, *Escherichia coli*), y tiene una fiabilidad limitada en pacientes pediátricos porque a menudo son portadores del germen y debido a la creciente vacunación entre la población infantil (Werno y Murdoch, 2008. Clin. Infect. Dis., 46: 926-932). Además, esta prueba está asociada tanto con la
15 falta de detección inmediatamente tras el inicio de la infección como con la aparición de resultados positivos a largo plazo a pesar del tratamiento (1-3 meses) o 48 horas tras la vacunación (Ehara *et al.*, 2008. J. Med. Microbiol., 57: 820-826).

20 En los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos para la identificación microbiana que incorporan tecnologías basadas en biología molecular y, más específicamente, en variaciones de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que, al menos en principio, deben proporcionar sensibilidad y especificidad superiores así como, idealmente, velocidad superior y costes inferiores (Klugman *et al.*, 2008. Clin. Infect. Dis., 47:S202-S206; Werno y Murdoch, 2008. Clin. Infect. Dis., 46: 926-932). Por otro lado, el desarrollo de métodos basados en biosensores es de gran interés actualmente ya que pueden conducir a resultados que son tan fiables
25 como los de los ensayos tradicionales, basados en cultivos y recuentos de colonias, pero en un tiempo mucho más corto. Sin embargo, todavía es necesario lograr los mismos niveles de detección alcanzados por las metodologías tradicionales (10-100 ufc ml⁻¹). Particularmente, los sensores de ADN, también conocidos como genosensores, basados en la integración de una sonda específica de secuencia (habitualmente un oligonucleótido sintético de cadena corta) y un transductor electroquímico, se consideran el enfoque más atractivo actualmente, debido a su
30 simplicidad, el bajo coste de los instrumentos requeridos y la posibilidad de una detección precisa en tiempo real con límites de detección muy bajos (Lucarelli *et al.*, 2008. Anal. Chim. Acta, 609: 139-159). Además, todavía es necesario llevar a cabo la amplificación de la muestra a través de PCR, debido a la escasa abundancia y extrema complejidad de los analitos sin amplificación. De manera similar, es necesario desarrollar nuevos diseños de sondas y procedimientos para llevar a cabo el tratamiento previo de las muestras que permitan que el proceso de reconocimiento biológico que tiene lugar en la superficie de contacto transductor-disolución sea verdaderamente eficaz.

35 Las partículas superparamagnéticas (MB) constituyen una herramienta versátil para el desarrollo de genosensores. De hecho, estas partículas proporcionan una gran área de superficie para la inmovilización de sondas, que pueden separarse por tanto fácilmente de la fase líquida con un pequeño imán, y dispersarse de nuevo inmediatamente cuando se retira (Erdem *et al.*, 2005. Electrochem. Commun., 7: 815-820, Gabig-Ciminska *et al.*, 2004. Biosens. Bioelectron, 19: 537-546). Además, las partículas que no se unen específicamente pueden retirarse automáticamente mediante lavado controlado magnéticamente (Lin *et al.*, 2007. Electrochem. Commun., 9: 1547-1552), demostrando así su utilidad para fines de purificación y preconcentración (Lin *et al.*, 2007. Electrochem. Commun., 9: 1547-1552; Wang *et al.*, 2001. Analyst, 126: 2020-2024).

40 En los últimos años, diferentes grupos de investigación han trabajado extensamente en el diseño y desarrollo de nuevos genosensores amperométricos, basados en el uso de MB modificadas y electrodos magnéticos de material compuesto de grafito-epoxi, aplicables a la detección de bacterias patógenas (*Salmonella sp.* y *E. coli* O157:H7) para el control de alimentos (Lermo *et al.*, 2007. Biosens. Bioelectron., 22: 2010-2017; Lermo *et al.*, 2008. Biosens. Bioelectron., 23: 1805-1811).

45 Carvalho m. *et al.*, 2007, Journal of Clinical Microbiology, 45(8): 2460-2466, divulgan ensayos de PCR en tiempo real diseñados para la detección de *S. pneumoniae*. Loaiza *et al.*, 2009, The Analyst, 134(1):34, y Loaiza *et al.*, 2008, Analytical Chemistry, 80(21): 8239-8245 divulgan la detección de productos amplificados por PCR de cultivo de *E. coli* usando un sensor amperométrico de hibridación de ADN magnético desechable.

Descripción de la invención

60 La presente invención se refiere al desarrollo de biosensores electroquímicos sensibles y selectivos (basados en el uso de electrodos impresos desechables, partículas superparamagnéticas (MB), sondas específicas de ADN y estrategias de amplificación asimétrica de ADN para la detección e identificación rápidas de neumococos, encapsulados o no, relacionados con infecciones neumocócicas en varias muestras, incluyendo muestras clínicas.

65 La metodología descrita en la presente invención tarda tan sólo unas cuantas horas ($\cong 5,5$ h) (en contraste con los 2-3 días requeridos por los análisis basados en técnicas de cultivo) y usa reactivos de bajo coste. Los sensores

desarrollados han demostrado ser útiles para la detección rápida, específica, cuantitativa y sensible de fragmentos amplificados (a continuación en el presente documento denominados “amplicón” o “producto de amplificación”) obtenidos directamente a partir de los cultivos de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) sin usar procedimientos complejos para tratar la muestra. Además, el uso de estos sensores de hibridación también evita una de las principales desventajas de los análisis que usan PCR, tal como falsos positivos. Usando esta metodología, se ha alcanzado un límite de detección de 1,1 nM para amplicones obtenidos a través de PCR asimétrica (aPCR) a partir de ADN genómico de *S. pneumoniae* R6, lo que significa que pueden fabricarse y usarse hasta 30 sensores al día. El sistema desarrollado se ha usado también satisfactoriamente en el pasado, detección específica y sensible de los productos obtenidos a través de PCR directa asimétrica (aDPCR) a partir de cultivos de *S. pneumoniae* y, por tanto, se simplifican incluso más los procedimientos para tratar la muestra. El acoplamiento de los sensores magnéticos de hibridación con aDPCR permite la detección selectiva de sólo 100 ufc ml⁻¹ de la cepa R6 de *S. pneumoniae*, mostrando la utilidad práctica de dicho método para la evaluación de muestras clínicas. Además, el uso de electrodos serigrafiados desechables producidos en masa permite el análisis de varias muestras al día con tiempos de ensayo cortos. Estas características son importantes para la aplicación de los genosensores desarrollados a la detección, en muestras clínicas, de *S. pneumoniae* y especies relacionadas. Los resultados obtenidos también muestran que los genosensores, además de actuar como dispositivo de alarma para el control de muestras clínicas, permiten la detección cuantitativa de neumococo.

Dado el interés implicado en la detección rápida e inequívoca de la presencia de bajas concentraciones de neumococo en diferentes muestras clínicas para comenzar el tratamiento más adecuado tan pronto como sea posible, la metodología propuesta en la presente invención soluciona el problema técnico de detectar los microorganismos de la especie *S. pneumoniae* en muestras clínicas en donde, preferiblemente, dichas muestras son de diferentes fluidos corporales: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural o de otras ubicaciones específicas tales como la nasofaringe o la conjuntiva.

El diseño de las secuencias de cebador y sonda específicas de *S. pneumoniae* se ha llevado a cabo gracias a la secuenciación del gen *lytA* a partir de 115 aislados clínicos de neumococo que no se habían publicado ni incluido en ninguna base de datos pública, de modo que, gracias a los resultados obtenidos en dicha secuenciación, ha sido posible proporcionar una solución a un problema técnico que no se había solucionado aún, con el objetivo de detectar de una manera rápida y eficaz el agente bacteriano que provoca neumonía, bacteremia o meningitis, una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *Streptococcus pneumoniae* en una muestra biológica aislada, por medio de biosensores magneto-amperométricos, que comprende:

a. inmovilizar sobre un soporte sólido una suspensión de MB marcadas con un compuesto A y con la sonda de ADN SEQ ID NO: 1 marcada en su extremo 5' con un compuesto B relacionado con el compuesto A, en el que dichas partículas y sonda se unen mediante la unión de los compuestos A-B,

b. añadir a la mezcla de la etapa (a) el producto de la amplificación a través de PCR obtenido usando el cebador directo SEQ ID NO: 3 y el cebador inverso SEQ ID NO: 4 del gen *lytA* de *S. pneumoniae*, a partir de una muestra biológica aislada, en el que el cebador SEQ ID NO: 4 está unido por su extremo 5' al compuesto B, y

c. detectar la hibridación de la sonda SEQ ID NO: 1 de la etapa (a) con el fragmento de ADN amplificado en la etapa (b), añadiendo el compuesto A conjugado con un elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse.

El término “muestra biológica” se refiere a una muestra aislada de material de origen biológico que puede ser de origen tanto humano como animal. Este método puede aplicarse principalmente a muestras de origen humano, pero el método de la presente invención también puede aplicarse a la detección de este microorganismo en otras criaturas vivas que puede actuar como vehículos para transmitir dicho microorganismo. La muestra biológica puede seleccionarse de la lista que comprende fluido biológico o biopsia de tejido. El fluido biológico puede ser, pero no se limita a, una muestra respiratoria, aspiraciones de médula ósea, líquido cefalorraquídeo, orina o fluido sanguíneo. Fluido sanguíneo significa sangre, suero o plasma.

El término “compuesto B relacionado con compuesto A” se refiere a la tendencia de dichos compuestos A y B a combinarse entre sí, es decir, a unirse o enlazarse mediante al menos una clase de enlace químico de cualquier tipo.

El término “elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse” se refiere a un componente que puede reaccionar con un sustrato, de modo que se deriva una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica del mismo. Este elemento está unido directamente al elemento A, o a través de otro compuesto. Un ejemplo del elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse es, pero no se limita a, la enzima peroxidasa del rábano (HRP), un marcador de sustrato cromogénico, tal como, la tetrametilbencidina (TMB), el ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o la fenilendiamina, no limitándose a los mismos y siendo posible usar otros sustratos.

Una realización preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio

de biosensores magneto-amperométricos, en el que la muestra biológica es un fluido biológico aislado. Una realización más preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, en el que el fluido biológico aislado es sangre, líquido cefalorraquídeo, saliva u orina.

Otra realización preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, en el que la PCR es asimétrica. Según una realización más preferida, se usa una cantidad del cebador SEQ ID NO: 3 que es de entre 8 y 12 veces más pequeña que la del cebador SEQ ID NO: 4, unido por su extremo 5' al compuesto B. Preferiblemente, se usa una cantidad del cebador SEQ ID NO: 3 que es 10 veces más pequeña que la del cebador SEQ ID NO: 4, unido por su extremo 5' al compuesto B.

La PCR asimétrica (aPCR) es una técnica para la amplificación de fragmentos de ADN a través de PCR que produce fragmentos monocatenarios usando los dos cebadores necesarios a concentraciones molares diferentes. De este modo, se produce ADN bicatenario exponencialmente hasta que el cebador minoritario se agota y entonces sólo se produce la cadena que se hibrida con el ADN en exceso, produciéndose después de eso en una base lineal. De este modo, el producto de PCR contiene más ADN monocatenario que ADN bicatenario, lo que permite que el ADN monocatenario se use para hibridarse con una sonda de ADN inmovilizada sobre un soporte. Dicho ADN monocatenario amplificado a través de aPCR debe estar unido al compuesto B por su extremo 5'.

Una realización más preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, en el que la PCR asimétrica es directa. PCR asimétrica directa (aDPCR) se refiere a la técnica de aPCR en la que el ADN de molde no se ha extraído, reduciendo de ese modo el tiempo de detección y evitando el uso innecesario de reactivos. La etapa crítica de este tipo de técnica es la eficacia en la permeación de las células para liberar el ADN para permitir que se hibride con los cebadores específicos mencionados anteriormente.

Otra realización preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, en el que el compuesto A conjugado un elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse según la etapa (c), a su vez, está conjugado covalentemente con una estructura principal de polímero hidrófilo.

Según otra realización preferida, en el método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, el compuesto A es estreptavidina y el compuesto B es biotina.

Otra realización preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos, en el que el elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse según la etapa (c) es una enzima oxidasa. Según una realización más preferida, el elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse según la etapa (c) es la enzima peroxidasa y dicha detección y/o cuantificación se lleva a cabo añadiendo H₂O₂.

Otra realización preferida se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*, por medio de biosensores magneto-amperométricos para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.

El procedimiento de monitorización comprende una serie de etapas que comienzan con una toma de muestras en serie. Toma de muestras en serie significa la extracción de cualquier tipo de muestra biológica, incluyendo las mencionadas en esta invención. La toma de muestras se lleva a cabo a diferentes tiempos desde el momento en el que se administra el tratamiento, de modo que la cuantificación de la amplificación de los fragmentos obtenidos a partir de muestras del mismo paciente mostrará la eficacia de dicho tratamiento. Por tanto, una disminución en la concentración del producto de amplificación con respecto a los valores de control, representados estos últimos, por ejemplo, por los valores de amplificación en un mismo individuo, antes del tratamiento, significa que el tratamiento está teniendo efecto en el sentido de disminuir el número de microorganismos que provocan la enfermedad. Este ejemplo no se limitaría al uso de este tipo de control.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del cebador directo SEQ ID NO: 3 y el cebador inverso SEQ ID NO: 4 para la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN del gen *lytA* de *S. pneumoniae* y a su detección y/o cuantificación con la sonda SEQ ID NO: 1 y/o con la sonda SEQ ID NO: 2, en el que dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica, usando como molde el ADN presente en una muestra biológica aislada. Según una realización preferida, dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección electroquímica. SEQ ID NO: 2 es la secuencia de la sonda diana, complementaria a la sonda de captura SEQ ID NO: 1 y, por tanto, puede usarse como control positivo del rendimiento de la técnica.

La detección isotópica comprende la detección de un isótopo radiactivo con el que se marca la sonda, en la que el isótopo puede ser por ejemplo, sin limitarse a, un isótopo radiactivo de fósforo (tal como, pero sin limitarse a, P³²) o un isótopo radiactivo de hidrógeno (tal como, pero sin limitarse a, tritio; H³). La detección colorimétrica o cromogénica se refiere a la detección de la aparición de un color cuya intensidad varía de una manera directamente

proporcional a la cantidad de fragmentos con los que la sonda marcada se hibrida. En el caso de la detección colorimétrica la sonda se marca con, por ejemplo, pero sin limitarse a, un sustrato capaz de reaccionar con uno de los componentes produciendo de ese modo un compuesto que puede detectarse mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, espectrofotometría o colorimetría. La detección fluorométrica se lleva a cabo por medio de la detección de una sonda marcada con un sustrato fluorogénico usando fluorometría. La detección electroquímica se refiere a especies que pueden oxidarse o reducirse sobre la superficie de electrodos o que, a través de determinadas reacciones o modificaciones, producen especies electroactivas.

Una realización preferida se refiere al uso de dichos cebadores para la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN del gen *lytA* de *S. pneumoniae* y a su detección y/o cuantificación por medio de la sonda SEQ ID NO: 1 y/o con la sonda SEQ ID NO: 2, en el que la muestra biológica aislada es un fluido biológico aislado. Una realización más preferida se refiere a dicho uso, en el que el fluido biológico aislado es sangre, líquido cefalorraquídeo, saliva u orina.

Otra realización preferida se refiere al uso de dichos cebadores para la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN del gen *lytA* de *S. pneumoniae* y a su detección y/o cuantificación por medio de la sonda SEQ ID NO: 1 y/o con la sonda SEQ ID NO: 2, en el que la PCR es asimétrica. Según una realización más preferida, la PCR asimétrica es directa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de dichos cebadores para la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN del gen *lytA* de *S. pneumoniae* y a su detección y/o cuantificación por medio de la sonda SEQ ID NO: 1 y/o con la sonda SEQ ID NO: 2 para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende el cebador directo SEQ ID NO: 3, el cebador inverso SEQ ID NO: 4, y la sonda SEQ ID NO: 1 y/o la sonda SEQ ID NO: 2, en el que dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica, para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende el cebador directo SEQ ID NO: 3, el cebador inverso SEQ ID NO: 4, y la sonda SEQ ID NO: 1 y/o la sonda SEQ ID NO: 2, en el que dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del kit descrito en el párrafo anterior para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*, o al uso de dicho kit para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprender” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes dibujos y ejemplos se proporcionan como ilustración, y no pretenden limitar la presente invención.

Descripción de los dibujos

Con el fin de complementar la descripción anterior, así como para ayudar a la comprensión de las características de la invención según algunos ejemplos presentados, se muestran las siguientes figuras como ejemplos ilustrativos y no limitativos de la invención:

Figura 1. Muestra el procedimiento de modificación de electrodos y la medición basada en el uso de MB y la amplificación enzimática de la señal amperométrica. (1) Lavado de MB modificadas con sonda; (2) proceso de hibridación sonda-diana o amplicón biotinilado monocatenario; (3) separación de MB modificadas con híbrido y extracción de oligonucleótidos no complementarios; (4) marcaje enzimático con un polímero de estreptavidina-HRP ultrasensible; (5) captura de MB modificadas en los electrodos impresos de oro modificados con tetratiafulvaleno (TTF-Au/SPE); (6) detección amperométrica de la reducción de H_2O_2 mediada por TTF.

Figura 2. Muestra los amperogramas obtenidos en los electrodos serigrafados modificados con MB tras la finalización del proceso de hibridación en ausencia (---) y en presencia (-) de la sonda diana biotinilada. Electrolito de soporte usado, PBS (pH 7,4). Condiciones experimentales: [sonda inmovilizada] = 1 μ M; [oligonucleótido complementario] = 150 nM; potencial aplicado (E_{ap}) = -0,15 V. La flecha muestra el momento de la adición de H_2O_2 .

Figura 3. Muestra la curva de calibración obtenida para la determinación amperométrica de la sonda diana en las condiciones experimentales optimizadas. Electrolito de soporte usado, PBS (pH 7,4). Condiciones experimentales: [sonda inmovilizada] = 1 μ M; E_{ap} = -0,15 V.

Figura 4. Muestra la electroforesis en gel de agarosa (1,5%). Carriles: 1) Marcadores de forma replicativa del ADN de ϕ X174 digerido con HaeIII, 2) PCR convencional y 3) aPCR usando ADN genómico la cepa R6 de *S. pneumoniae*

como molde, 4) control sin ADN.

Figura 5. Muestra los amperogramas obtenidos en los electrodos serigrafiados modificados mediante partículas superparamagnéticas (MB) para una concentración de 2 nM del amplicón obtenido usando ADN genómico de la cepa IR6 de *S. pneumoniae* (-) como molde. Molde de ADN genómico de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (-). La muestra de control (---) se amplificó en ausencia de ADN. Condiciones experimentales como en la figura 3. La flecha muestra el momento de la adición de H₂O₂.

Figura 6. Muestra una electroforesis en gel de agarosa (1,5%) que muestra los productos de amplificación de aDPCR a partir de los cultivos celulares de la cepa R6 de *S. pneumoniae*. Carriles: 1) marcadores, ADN RF de ϕ X174 digerido con HaellI. 2-7) aDPCR del cultivo celular de la cepa R6 de *S. pneumoniae* con diferente densidad celular (en ufc ml⁻¹): 1,3 x 10⁷ (2), 1,3 x 10⁶ (3), 1,3 x 10⁵ (4), 1,3 x 10⁴ (5), 1,3 X 10³ (6), 1,3 X 10² (7); carril 8, control sin ADN.

Figura 7. Muestra amperogramas obtenidos en los electrodos serigrafiados modificados con las MB para los amplicones de aDPCR obtenidos. 1) Muestra sin ADN. 2) Cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae* que contiene 130 ufc ml⁻¹, 3) cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae* que contiene 1,3 x 10⁷ ufc ml⁻¹, otras condiciones experimentales son las mismas que en la figura 3. La flecha muestra el momento de la adición de H₂O₂.

Figura 8. Muestra una electroforesis en gel de agarosa (1,5%) que muestra los productos de amplificación de aDPCR a partir de los cultivos celulares de la cepa R6 de *S. pneumoniae* y otras bacterias. Carriles: 1) marcadores, ADN RF de ϕ X174 digerido con HaellI. aDPCR de cultivos celulares (en ufc ml⁻¹) de: 2) *S. oralis* (1,0 x 10⁸); 3) *S. sanguinis* (1,3 x 10⁸); 4) *S. pseudopneumoniae* (2,3 x 10⁸); 5) *S. mitis* (1,0 x 10⁸); 6) *S. constellatus* (1,4 x 10⁸); 7) *S. anginosus* (1,2 x 10⁸); 8) *S. mitis* SK137 (1,0 x 10⁸); 9) *S. pneumoniae* R6 (1,1 x 10⁸); 10) *E. coli* (7,5 x 10⁷); 11) control sin ADN.

Figura 9. Muestra amperogramas obtenidos en los electrodos serigrafiados modificados con las MB para los productos de amplificación. 1) Amperograma de los productos de amplificación obtenidos usando como molde de aDPCR cultivos celulares de *S. mitis* (1,0 x 10⁸ ufc ml⁻¹). 2) Amperograma de los productos de amplificación obtenidos usando como molde de aDPCR cultivos celulares de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (130 ufc ml⁻¹). Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 3. La flecha muestra el momento de la adición de H₂O₂.

Figura 10. Muestra una electroforesis en gel de agarosa (1,5%) que muestra los productos de amplificación de aPCR a partir de los cultivos celulares de la cepa R6 de *S. pneumoniae* y otras especies relacionadas filogenéticamente. Carriles: 1) marcadores, ADN RF de ϕ X174 digerido con HaellI. 2 a 7) aPCR usando como molde 100 ng de ADN genómico de las cepas R6 de *S. pneumoniae*, CCUG 44455T de *S. pseudopneumoniae*, 10546, 1338, 1078 y 1629 respectivamente (las últimas 5 correspondientes a SGM). 8) Control sin ADN.

Ejemplos

Los siguientes ensayos, realizados por los inventores, que describen la detección y/o cuantificación de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), ilustran la invención de un modo no limitativo.

EJEMPLO 1. Ensayos para la detección de *S. pneumoniae*.

1.1 Desarrollo de sensores magneto-electroquímicos desechables.

Dichos sensores magneto-electroquímicos se basan en una estrategia de amplificación enzimática y el uso de partículas superparamagnéticas (MB) MB para la detección de una región característica de ADN de 235 pares de bases (pb) del gen *lytA*, específico de *S. pneumoniae*. Para la elección de este amplicón, se hizo un análisis de todas las secuencias de los diferentes alelos de *lytA* de todas las cepas neumocócicas cuya secuencia se conoce, incluyendo las de 150 aislados clínicos neumocócicos de *S. pneumoniae* secuenciados por los inventores (véase la tabla 2).

El amplicón elegido se centró en la región 5' del gen *lytA* en una zona específica de neumococos (SEQ ID NO: 5). Usando el mismo criterio de especificidad para los alelos de SGM, se eligió otra zona de la región 5' del gen *lytA* que se conservaba completamente entre dichas bacterias y que mostraba diferencias con los alelos de las cepas neumocócicas, en donde se eligió un amplicón de 259 pb específico para el SGM (SEQ ID NO: 10).

Se modificaron MB comerciales marcadas con estreptavidina con una sonda de captura de ADN biotinilada y se expusieron al amplicón de ADN biotinilado que se obtuvo cuando se usó o una PCR o una aPCR, usando para ese fin ADN genómico de *S. pneumoniae* como molde, y una PCR directa asimétrica (aDPCR) a partir de cultivos bacterianos, en ambos casos usando oligonucleótidos (cebadores) que permiten la amplificación específica de la región génica mencionada anteriormente.

El marcaje enzimático del híbrido biotinilado resultante se hizo a través de incubación con un polímero de

estreptavidina-peroxidasa ultrasensible comercial, preparado a través de la unión covalente de estreptavidina y HRP y una estructura principal de polímero hidrófilo. La existencia de múltiples biomoléculas activas en cada cadena de polímero aumentó la capacidad de unión a moléculas biotiniladas, aumentando por tanto la carga enzimática y la señal amperométrica debida a la peroxidasa, permitiendo una detección más sensible que con conjugados de estreptavidina-HRP convencionales.

Tras el marcaje enzimático del ADN híbrido y la inmovilización de las MB resultantes en electrodos impresos de oro (modificados con el mediador redox tetra[ti]fulvaleno (TTF)), se realizó la detección del proceso de hibridación de ADN mediante amperometría usando el sustrato apropiado. Se reduce el peróxido de hidrógeno añadido en presencia de HRP, y la regeneración de la forma reducida de la enzima está mediada por TTF. El TTF+ generado se reduce electroquímicamente cuando el potencial aplicado es más negativo que el potencial formal del par redox TTF/TTF+ (Campuzano *et al.*, 2005. *Talanta*, 66: 1310-1319).

Con este procedimiento, pueden manipularse hasta 30 sensores al día (o más si el proceso se automatiza), mostrando el uso de la metodología para la detección e identificación rápida, sencilla, específica, cuantitativa y ultrasensible (límite de detección [LOD] = 1,1 nM) de los amplicones de ADN obtenidos mediante aPCR. Además, los amplicones de ADN obtenidos a partir de cultivos bacterianos se detectan específicamente cuando se aplica aDPCR, es decir, sin ninguna necesidad de extracción/purificación previas del material genético.

El límite de detección obtenido, sin fases de concentración previas, era de 100 ufc de *S. pneumoniae* por ml de muestra, mostrando la gran sensibilidad de los genosensores desarrollados como dispositivos con utilidad relevante en el análisis de muestras clínicas. En las condiciones experimentales seleccionadas, la presencia de otros SGM (*S. oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus anginosus*) no interfería en la detección y identificación de *S. pneumoniae*.

1.2 Verificación de la fiabilidad del ensayo.

Se verificó la fiabilidad del ensayo propuesto comparando la señal de reducción obtenida para H₂O₂ tras completar el proceso de hibridación con la sonda biotinilada en presencia y ausencia de la secuencia sintética complementaria marcada con biotina y usando TTF como mediador. El TTF inmovilizado en la superficie del electrodo media en la reducción catalítica de H₂O₂ producido por la enzima HRP. Por tanto, la reducción electroquímica del TTF* generado puede medirse a un potencial determinado. La señal obtenida es directamente proporcional a la cantidad de oligonucleótido diana usado. Tal como se muestra en la figura 2, cuando el procedimiento se realiza en ausencia de la sonda diana biotinilada, se observa una respuesta amperométrica insignificante cuando se añade H₂O₂ a la superficie del electrodo modificado, verificando que la señal obtenida tras la hibridación es significativamente superior, mostrando la mayor inmovilización del marcador enzimático en el ADN hibridado. Los resultados obtenidos muestran que el ensayo propuesto es apropiado para la detección electroquímica de los procesos de hibridación de la sonda diana que caracteriza a los alelos de *lytA* de cepas neumocócicas.

Se ha usado el mismo protocolo para investigar la especificidad del procedimiento de hibridación realizando dicho procedimiento con secuencias no complementarias y secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales (0,1 μM = 10 pmol). Aunque se observa una señal amperométrica insignificante tras la hibridación con el oligonucleótido no complementario (similar a la señal obtenida en ausencia de la sonda diana biotinilada), tras realizar el procedimiento de hibridación con secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales se observa una respuesta amperométrica similar a la observada con sondas diana (perfectamente complementarias). Estos resultados muestran que la metodología desarrollada puede usarse para distinguir entre secuencias complementarias y secuencias no complementarias, pero que deben optimizarse condiciones de hibridación más restrictivas con el fin de discriminar apareamientos erróneos de bases individuales.

1.3 Detección de oligonucleótidos sintéticos complementarios.

Usando las condiciones experimentales optimizadas mencionadas anteriormente, se ha construido la correspondiente calibración para la sonda diana biotinilada que caracteriza a los alelos de *lytA* neumocócicos (figura 3). La tabla 1 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 1. Características del método de determinación amperométrica con amplificación enzimática para los alelos de *lytA* de *S. pneumoniae*.

| Característica | Valor |
|--------------------------------|----------------|
| Intervalo lineal (nM) | 5-36 (3-23 ng) |
| Pendiente (A M ⁻¹) | 56 ±3 |
| Coefficiente de correlación | 0,993 |
| Límite de detección (nM) | 5,1 |
| DER* (n = 8) (%) | 8,7 |

*DER, desviación estándar relativa.

Se calcularon los límites de detección (dl) y límites de determinación (dtl) según los criterios $dl = 3_{Sb} m^{-1}$ (16) y $dtl = 10_{Sb} m^{-1}$ (Long y Winefordner, 1983. Anal. Chem., 55: 712A-724A), respectivamente, en donde m es la pendiente de la curva de calibración y Sb corresponde a la desviación estándar ($n = 10$) de las señales amperométricas obtenidas a una concentración de sonda diana de 2,0 nM. El dl obtenido representa una sensibilidad aceptable, teniendo en cuenta que en este punto no se ha usado aún la amplificación por PCR.

Puesto que los genosensores basados en electrodos serigrafados desechables requieren el uso de un nuevo electrodo para cada medición, la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes genosensores hechos del mismo modo es un aspecto esencial para evaluar con el fin de garantizar la utilidad práctica real de este diseño. Para evaluar este aspecto, se compararon los valores de intensidad de corriente obtenidos con 8 genosensores (usando 13 nmoles \cong 8,5 ng de oligonucleótido diana biotinilado), preparados a partir de diferentes lotes de partículas modificadas. A partir de los valores obtenidos se tiene una DER del 8,7%, lo que garantiza que el procedimiento de fabricación de los genosensores es muy reproducible y fiable.

1.4. Detección de amplicones de ADN obtenidos a partir de aPCR.

Recientemente, se han propuesto diferentes protocolos para optimizar la detección de ADN por medio de la amplificación a través de PCR, incluyendo aPCR y PCR directa (DPCR), lo que permite la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas sin necesidad de ninguna extracción previa de material genético de las células. El uso de aPCR conduce a una mayor sensibilidad que la PCR simétrica debido a la presencia de fragmentos monocatenarios en mayor proporción, que pueden hibridarse de manera no competitiva con la sonda (Poddar, 2000. Mol. Cell. Probes, 14: 25-32). Esto también implica una hibridación más rápida de los amplicones en el genosensor desarrollado.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del método desarrollado, se decidió aplicar el formato propuesto para la detección del amplicón resultante de la aPCR, un fragmento de ADN de 235 bases que contiene la secuencia complementaria de la sonda de captura inmovilizada en las MB. Se confirmaron los productos obtenidos a través de electroforesis en geles de agarosa usando bromuro de etidio como revelador. Tal como puede observarse (figura 4), a diferencia de lo que sucede con una PCR normal (en la que el amplicón completo generado es bicatenario), con aPCR aparecen 2 bandas en el gel de electroforesis. Puesto que el ADN bicatenario migra más rápido que el ADN monocatenario (Gunnarsson *et al.*, 2006. Nat. Protoc., 1: 3011-3018), la banda con menos movilidad electroforética observada corresponde al fragmento monocatenario y la de mayor movilidad corresponde a ADN bicatenario (Kai *et al.*, 1998. Biotechnol. Techniques, 12: 935-939). Los resultados electroforéticos confirman la amplificación de los productos de PCR con el tamaño correcto (235 pb o nucleótidos), a pesar de la baja eficacia de la tinción de bromuro de etidio para el ADN monocatenario.

Se purificaron las muestras obtenidas a través de aPCR y se diluyeron adecuadamente (100-1000 veces en tampón Tris-HCl pH 7,2) y se usaron directamente para la detección electroquímica. Tal como puede observarse en la figura 5, el control usado como diana en la aPCR (sin ADN genómico), no produce una señal amperométrica significativa. Esto confirma de nuevo la ausencia de adsorciones no específicas a partir del polímero enzimático en ausencia de hibridación. La figura 5 también muestra que la presencia del amplicón a una concentración de 2 nM da lugar a una señal amperométrica perceptible.

Cuando se estudia la dependencia de la señal amperométrica con la concentración del amplicón obtenido a partir de *S. pneumoniae* R6, se obtuvo un intervalo lineal para la cuantificación del amplicón, obtenido a través de aPCR entre 1,0 y 6,0 nM, dando lugar a una sensibilidad de $134 \pm 6 \text{ A M}^{-1}$ (\cong 2,4 veces más que la sensibilidad obtenida para la detección de la sonda diana) (tabla 1) y un coeficiente de correlación de 0,997. Se observó una reducción en la sensibilidad para altas concentraciones de amplicón, lo que puede deberse al enroscamiento de las cadenas largas de ADN lo que hace que la eficacia del procedimiento de hibridación sea difícil. Se calcularon los límites de detección y determinación según los mismos criterios mencionados anteriormente tomando como DE la desviación estándar ($n = 10$) para las señales amperométricas obtenidas a un nivel de concentración de 1,0 nM de amplicón por medio de aPCR, obteniendo valores de 1,1 y 3,7 nM, respectivamente. Se obtuvo un valor de DER del 6,9% para 7 mediciones de una disolución con una concentración de amplicón de 1,1 nM obtenida a través de aPCR. Este resultado puede considerarse excelente si se tiene en cuenta la baja concentración de amplicón y el tipo de dispositivo (genosensor de un solo uso) usado.

1.5. Detección de neumococo a través de aDPCR.

Tal como se mencionó anteriormente, DPCR permite amplificar y detectar secuencias de aminoácidos específicas sin ninguna necesidad de extraer previamente el material genético de las células. Debido a su rápida velocidad, simplicidad y poca manipulación de la muestra, la DPCR ha demostrado ser útil en la detección y cuantificación de bacterias en muestras medioambientales (Fode-Vaughan *et al* 2001. Biotechniques, 31: 598-607). En esta técnica, el factor determinante de la cantidad de ADN disponible es la eficacia de la permeabilización celular, que puede aumentarse usando métodos de permeabilización de la membrana celular con el fin de permitir la entrada de reactivos para la amplificación y para retrasar la difusión de los productos fuera de las células, evitando también la destrucción de su morfología y de la microestructura de la comunidad microbiana (Flodson *et al.*, 1995. Appl.

Environ. Microbiol., 61: 4074-4082).

Con el fin de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo de ensayo, se aplicó la metodología desarrollada a la detección de los amplicones obtenidos a través de aDPCR realizada directamente sobre cultivos celulares de neumococo. Tras el procedimiento descrito se obtuvieron amplicones biotinilados de 235 pb (o nucleótidos) directamente a partir de cultivos de *S. pneumoniae* R6 con diferente densidad celular. La figura 6 muestra los productos de aDPCR usando cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae* con diferente densidad celular. Tal como puede observarse, se obtuvo un amplicón con sólo 100 ufc ml⁻¹ de cultivo.

Las muestras obtenidas a partir de la aDPCR de cultivos celulares con concentraciones entre 130 y 1,3 x 10⁷ ufc ml⁻¹ se diluyeron 1:200 usando un tampón Tris-HCl pH 7,2 y se usaron alícuotas de 100 µl preparadas como analito para preparar los genosensores. Tal como puede observarse en la figura 7 (amperograma 1), casi no se obtiene señal amperométrica para el control negativo, confirmando de nuevo la ausencia de absorción no específica del marcador enzimático en ausencia de formación de híbrido de ADN. Los amperogramas 2 y 3 de la misma figura muestran las señales obtenidas para los amplicones obtenidos a través de aDPCR a partir de los cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae* con diferente densidad celular. Tal como puede observarse, la señal amperométrica obtenida aumenta con la concentración de cultivo. Este resultado es lógico teniendo en cuenta que, en las condiciones de amplificación seleccionadas, la concentración final del amplicón obtenido depende de la del cultivo usado como molde en la aDPCR, tal como puede observarse en la figura 6 y tal como puede deducirse a partir de los resultados facilitados por las mediciones espectrofotométricas de la concentración de los amplicones purificados (30,3-12,3 ng/µl). Estos resultados se han confirmado tras cinco series de mediciones.

Los resultados descritos muestran que el método desarrollado, además de permitir una discriminación sencilla entre 100 ufc ml⁻¹ de cultivo de neumococo y el control, permite una cuantificación aproximada de los niveles de esta bacteria usando aDPCR, mostrando claramente la aplicabilidad de genosensores magnéticos desechables combinados con la aDPCR para evaluar la presencia de ausencia de neumococo en muestras clínicas.

1.6 Selectividad de la metodología desarrollada.

Se sometió a ensayo la selectividad de la metodología desarrollada usando varios SGM, así como otras bacterias como filogenéticamente alejadas de neumococo tal como *E. coli*. Tal como puede observarse en la figura 8, cuando se usa aDPCR, a partir de todas las cepas sometidas a ensayo sólo se obtuvo el amplicón correspondiente a *S. pneumoniae*, lo que muestra la alta especificidad de la metodología desarrollada en las condiciones experimentales de la amplificación.

En este punto, merece la pena destacar que cuando se hace la aDPCR en disoluciones madre de tres cepas encapsuladas de *S. pneumoniae* (TIGR4, D39 y Dawn), mantenidas en glicerol a -80°C, también se obtiene el amplicón esperado, lo que muestra la utilidad de la metodología para la detección de neumococo encapsulado como no encapsulado.

La figura 9 muestra los amperogramas resultantes para los amplicones obtenidos usando como molde de la aDPCR un cultivo de *S. pneumoniae* de 130 ufc ml⁻¹ y un cultivo de *S. mitis* de 1,0 x 10⁸ ufc ml⁻¹ mostrando la detección selectiva de concentraciones de *S. pneumoniae*, aproximadamente 106 veces inferiores a las de *S. mitis*.

1.7. Aplicación a muestras de fluidos biológicos inoculados.

Aunque la aplicabilidad de la metodología desarrollada a la detección de neumococo en diferentes muestras clínicas (sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.) va a evaluarse meticulosamente en el futuro, se han hecho ensayos preliminares realizando aDPCR en muestras de sangre desfibrinada de carnero, saliva humana y orina inoculada con neumococo, lo que demostró ser prometedor, obteniendo un amplicón usando como molde 2 µl de muestra (inoculada con 1,0 x 10⁴ ufc ml⁻¹ de neumococo) sin ninguna necesidad de aplicar ningún tratamiento previo a la misma.

1.8. Desarrollo de una metodología similar para la detección y cuantificación selectivas de otros estreptococos del grupo Mitis (SGM).

Debido al interés en la identificación inequívoca de los estreptococos responsables de un proceso infeccioso, se desarrolló una metodología complementaria que, usando otra sonda de captura apropiada y realizando la amplificación con otro par de oligonucleótidos, permite la detección selectiva de alelos de *lytA* que caracterizan a SGM.

Se evaluó la selectividad de esta metodología alternativa realizando aPCR con ADN genómico y aDPCR de cultivos de SGM usando tanto ADN como células de *S. pneumoniae* R6 como control negativo. Tal como puede observarse en la figura 10, el nuevo par seleccionado de cebadores permite obtener el amplicón correspondiente (en este caso de 259 pb o nucleótidos) y, por tanto, la detección específica de las cepas que portan los alelos que caracterizan a SGM.

En este punto, merece la pena destacar que, hasta la fecha, no hay ninguna metodología disponible comercialmente que permita discriminar alelos de *lytA* de neumococo y cepas de SGM y, por tanto, distinguir entre neumococo y otros estreptococos estrechamente relacionados filogenéticamente, que también pueden ser patógenos importantes, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Dispositivos y electrodos usados.

Se realizaron las mediciones amperométricas usando un potenciostato *Eco Chemie Autolab PSTAT 10* equipado con el módulo EDC y controlado mediante el software GPES 4.9 (*General Purpose Electrochemical System*).

Se realizaron las mediciones electroquímicas usando electrodos serigrafados con pasta de oro curada a alta temperatura 220AT (Dropsens) (3,4 x 1,0 x 0,05 cm), SPGE AT.

Se usó un concentrador MB (Dynal MPC-S, Dynal Biotech ASA) para modificar las MB.

Se realizaron todos los experimentos de PCR en un ciclador térmico 2720 de *Applied Biosystems*.

2. Cepas, reactivos y disoluciones usados.

Para preparar todas las disoluciones usadas, se usó agua desionizada obtenida usando un sistema Milli-Q de Millipore.

Todos los reactivos y disolventes usados eran de alta calidad para análisis.

- Tampón B&W: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2,0 M.

- Tetraiafulvaleno, TTF (Aldrich).

- Polímero de estreptavidina-peroxidasa del rábano (HRP) ultrasensible (Sigma).

- MB modificadas con estreptavidina (Dynabeads M-280 estreptavidina, 10 mg ml⁻¹) (Invitrogen Dynal AS).

- Medio Luria Bertani (LB) (Scharlau).

- Medio C+Y: medio C (Lacks y Hotchkiss, 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 39: 508-597) complementado con extracto de levadura al 0,08%.

- Tampón TE (pH 8,0): Tris-HCl 10 mM que contiene 1 mM de EDTA.

- Tampón Tris-HCl (pH 7,2): 50 mM de Tris-HCl que contiene 20 mM de NaCl.

- Tampón PBS: Tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,4) que contiene 138 mM de NaCl y 2,7 mM de KCl.

- Tampón PBST: Disolución de PBS (pH 7,4) que contiene el 0,05% (v/v) de Tween 20.

- Disolución de TTF 0,5 M: Preparada disolviendo 5,1 mg del compuesto en 50 µl de acetona.

- Patrón de disolución de H₂O₂ 0,1 M: Se disuelven 10 µl de la disolución comercial al 30% (v/v) en 1 ml de la disolución reguladora de PBS (pH 7,4). Las disoluciones con menos concentración se preparan diluyendo el volumen apropiado de la disolución anterior con la misma disolución tampón.

- Disolución del polímero de estreptavidina-HPR 10 pg ml⁻¹: Se diluyen 10 µg de la disolución original (1,0 mg ml⁻¹) en 1 ml de PBST (pH 7,4).

- Oligonucleótidos (Sigma)

Para la detección específica de alelos de *lytA* de *S. pneumoniae* se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

- Sonda de captura biotilada (*CSP_lytA*) en el extremo 5' (SEQ ID NO: 1).

- Sonda diana biotilada (*TSP_lytA*) en el extremo 5' (SEQ ID NO: 2).

- Cebador directo (*FSP_lytA*) (SEQ ID NO: 3).

- Cebador inverso (*RSP_lytA*) biotinilado en el extremo 5' (SEQ ID NO: 4).

lytAR6 (amplicón de *S. pneumoniae*, 235 pb, dirección 5'→3'): SEQ ID NO: 5

5 La sonda biotinilada se hibridaba con la secuencia de nucleótidos 187 a 206, asignando la posición 1 al primer nucleótido del codón de iniciación del gen *lytA*.

10 Para diseñar dichas sondas y cebadores era necesario tener la secuencia del gen *lytA* de 115 aislados tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Nuevas secuencias (no publicadas o incluidas en bases de datos públicas) del gen *lytA* obtenidas a partir de 115 aislados clínicos de *S. pneumoniae*.

| CEPA | AÑO DE AISLAMIENTO | SEROTIPO | ORIGEN ^a | ALELO | SECUENCIAS |
|------|--------------------|----------|---------------------|-------|---------------|
| 1001 | 1989 | 3 | LCR | A | SEQ ID NO: 11 |
| 1990 | 1991 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 1998 | 1991 | 3 | LCR | E | SEQ ID NO: 15 |
| 2629 | 1993 | 3 | LCR | A | SEQ ID NO: 11 |
| 2778 | 1993 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 2812 | 1993 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 3003 | 1994 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 3086 | 1994 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 3227 | 1994 | 3 | F. PLEURAL | A | SEQ ID NO: 11 |
| 3404 | 1995 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 3474 | 1995 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 3533 | 1995 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 4033 | 1996 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 4066 | 1996 | 3 | LCR | B | SEQ ID NO: 12 |
| 4107 | 1997 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 4520 | 1998 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 4532 | 1998 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 4889 | 1998 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 4920 | 1999 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 5294 | 1999 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 5407 | 2000 | 3 | ESPUTO | A | SEQ ID NO: 11 |
| 5410 | 2000 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 5416 | 2000 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 5456 | 2000 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 5788 | 2000 | 3 | LCR | A | SEQ ID NO: 11 |
| 5796 | 2000 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 5814 | 2001 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6008 | 2001 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6202 | 2002 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6316 | 2002 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6330 | 2002 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6411 | 2002 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6441 | 2002 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6497 | 2002 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6549 | 2002 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6612 | 2003 | 3 | F. PLEURAL | A | SEQ ID NO: 11 |
| 6729 | 2003 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6746 | 2003 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6810 | 2003 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6817 | 2003 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 6952 | 2003 | 3 | F. PLEURAL | A | SEQ ID NO: 11 |
| 6979 | 2003 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 6987 | 2003 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 6993 | 2003 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7027 | 2004 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7132 | 2004 | 3 | F. PLEURAL | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7151 | 2004 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 7207 | 2004 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7212 | 2004 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7225 | 2004 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |

ES 2 613 041 T3

| | | | | | |
|------|------|---|------------|---|---------------|
| 7300 | 2004 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7312 | 2004 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 7345 | 2004 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7361 | 2004 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7377 | 2004 | 3 | ESPUTO | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7374 | 2004 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 7386 | 2004 | 3 | F. PLEURAL | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7410 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7498 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7518 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7536 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7542 | 2005 | 3 | F. PLEURAL | B | SEQ ID NO: 12 |
| 7557 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7558 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7629 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7655 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7715 | 2005 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7827 | 2005 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 7840 | 2005 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 7845 | 2005 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 2900 | 2006 | 3 | ESPUTO | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8056 | 2006 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8057 | 2006 | 3 | F. PLEURAL | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8061 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8069 | 2006 | 1 | SANGRE | D | SEQ ID NO: 14 |
| 8080 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8084 | 2006 | 1 | ESPUTO | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8120 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8150 | 2006 | 3 | ABSCESO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8173 | 2006 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8199 | 2006 | 3 | F. PLEURAL | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8205 | 2006 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8230 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8237 | 2006 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8240 | 2006 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8273 | 2006 | 1 | ESPUTO | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8278 | 2006 | 3 | LCR | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8284 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8295 | 2006 | 3 | SANGRE | C | SEQ ID NO: 13 |
| 8328 | 2006 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8344 | 2006 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8359 | 2006 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8368 | 2007 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8417 | 2007 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8431 | 2007 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8446 | 2007 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8516 | 2007 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8564 | 2007 | 3 | SANGRE | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8573 | 2007 | 3 | ESPUTO | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8653 | 2007 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 8715 | 2007 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8797 | 2007 | 3 | F. PLEURAL | B | SEQ ID NO: 12 |
| 8874 | 2007 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 8955 | 2008 | 3 | SANGRE | A | SEQ ID NO: 11 |
| 9042 | 2008 | 1 | LCR | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9270 | 2008 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9322 | 2008 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9453 | 2008 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9494 | 2009 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9509 | 2009 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9521 | 2009 | 1 | LCR | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9522 | 2009 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9560 | 2009 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9572 | 2009 | 1 | F. PLEURAL | F | SEQ ID NO: 16 |
| 9638 | 2009 | 1 | SANGRE | F | SEQ ID NO: 16 |

^a LCR, líquido cefalorraquídeo.

Para la detección específica de alelos de *lytA* de SGM, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

- 5 - Sonda de captura biotinilada (CSMG_ *lytA*) en el extremo 5' (SEQ ID NO: 6).
- Sonda diana biotinilada (TSMG_ *lytA*) en el extremo 5' (SEQ ID NO: 7).
- Cebador directo (FSMG_ *lytA*) (SEQ ID NO: 8).
- 10 - Cebador inverso (RSMG_ *lytA*) biotinilado en el extremo 5' (SEQ ID NO: 9).

*lytA*_{AJ252194} (amplificación de SGM, 259 pb, dirección 5'→3'): SEQ ID NO: 10. La sonda biotinilada se hibridaba con la secuencia de nucleótidos 207 a 230.

15 Para los experimentos realizados, se usaron las siguientes cepas y especies bacterianas: cepas R6 (Hoskins *et al.*, 2001. J. Bacteriol., 183: 5709-5717), TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001. Science, 293: 498-506), D39 (Lanie *et al.*, 2007. J. Bacteriol., 189:38-51) y Dawn (Llull *et al.*, 2000. Microb. Drug. Resist., 6: 269-275) de *S. pneumoniae*, la cepa convencional de *S. pseudopneumoniae* CCUG 44455T, *S. oralis* NCTC 11427T, *S. sanguinis* CECT 480T, *S. constellatus* NCTC 10708, *S. anginosus* K51-Y, *S. agalactiae* CECT 183T, *S. gordonii* CECT 804T, *S. iniae* CECT 7363T, *S. salivarius* CECT 805T, las cepas NCTC 12261T, SK137 (3), SK598 (4), B6 y HER 1055 (Romero *et al.*, 2004. J. Bacteriol., 186: 8229-8239) de *S. mitis* y las cepas 1078/1997, 338/1996, 1629/1997, 101/1987, 1230/1996, 782/1996, 11923/1992 y 10546/1994 que corresponden al SGM (Hull *et al.*, 2006. J. Clin. Microbiol., 44: 1250-1256). Además, como control negativo, se usó *E. coli* DH5 α (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

25

3. Métodos de cultivo de bacterias.

Se realizaron los cultivos *E. coli* en medio LB durante la noche a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se prepararon disoluciones madre en glicerol (10%, v/v), se diluyeron en serie, se sembraron 100 μ l de las diluciones correspondientes en placas Petri que contenían medio LB y se incubaron durante 24 horas a 37°C para contar las colonias. Se realizó el cultivo de estreptococos en medio C+Y a 37°C sin agitación. Cuando el cultivo alcanza una DO₅₅₀ de aproximadamente 0,4, se preparan disoluciones madre en glicerol (10%) mientras que se preparan diluciones en serie que se siembran (100 μ l) en placas de agar sangre y se incuban durante 24 horas a 37°C para contar las colonias.

35

4. Pre calentamiento y modificación de los electrodos indicadores.

Se pretratan electrodos de oro serigrafados curados a alta temperatura (Dropsens) realizando diez barridos cíclicos consecutivos con un potencial de 0,00-+1,25 V, a una velocidad de 100 mV s⁻¹, en una disolución 0,5 M de H₂SO₄ que contiene KCl 10 mM. Se depositan 5 μ l de una disolución 0,5 M de TTF sobre la superficie seca de los electrodos pretratados y se dejan secar a temperatura ambiente.

40

5. Modificación de MB y transducción amperométrica.

45 Para este procedimiento, se colocan 10 μ l de la suspensión comercial de MB modificadas con estreptavidina en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml y se lavan con 10 μ l de tampón B&W. Se colocan las partículas en el concentrador de MB y, tras 2 minutos, se extrae el sobrenadante. Se repite este procedimiento dos veces. A continuación, se añaden 100 μ l de una disolución 1 μ M (\equiv 100 pmoles) de la sonda de captura de ADN (biotinilada en el extremo 5' y preparada en el tampón B&W) y se incuban a 37°C durante 60 minutos en una agitadora a 600 rpm. A continuación, se lavan las partículas dos veces, usando 100 μ l de tampón Tris-FICI (pH 7,2) cada vez. Posteriormente, se añade la cantidad deseada de ADN complementario (marcado con biotina en el extremo 5' y preparado en el tampón Tris-HCl, pH 7,2) y se incuban a 37°C durante 60 minutos en una agitadora a 600 rpm. Se coloca la mezcla en el concentrador de MB y, tras 2 minutos, se separa el sobrenadante. Entonces, se lavan dos veces las partículas modificadas con el híbrido siguiendo el procedimiento anterior (tampón Tris-HCl pH 7,2). A continuación, se añaden 100 μ l de una disolución de estreptavidina-HRP (10 μ g ml⁻¹) preparada en PBST (pH 7,4) y se deja reaccionar durante 60 minutos a 37°C agitando a 600 rpm. Tras el tiempo de reacción, se lavan las partículas cinco veces durante 5 minutos cada vez con 500 μ l de PBST y una última vez con PBS (pH 7,4).

55

Las MB, una vez modificadas, se resuspenden en 45 μ l de PBS (pH 7,4) y se inmovilizan sobre la superficie de los electrodos serigrafados pretratados y modificados con TTF. Se fijan las partículas a la superficie del electrodo colocando un imán de neodimio bajo el electrodo de trabajo.

60

Se obtienen las respuestas amperométricas aplicando un potencial de -0,15 V a los electrodos serigrafados con las partículas modificadas depositadas sobre la superficie. Cuando se alcanza un estado estacionario se añaden 5 μ l de una disolución 3,5 mM de H₂O₂ al potencial de medición.

65

La figura 1 muestra esquemáticamente el procedimiento descrito en el presente documento. En resumen, el método consiste en la captura de la sonda biotinilada de 20 bases sobre la superficie de las MB modificadas con estreptavidina y su hibridación posterior con una sonda diana o con el amplicón obtenido a través de aPCR (o aDPCR). El híbrido formado se marca con un polímero de estreptavidina-peroxidasa ultrasensible y las MB modificadas se depositan sobre la superficie de un electrodo modificado con TTF. El uso de MB permite la inmovilización de los híbridos de ADN directamente sobre la superficie de los electrodos serigrafados evitando la adsorción no específica asociada con los procedimientos de inmovilización sobre la superficie de electrodos metálicos. Finalmente, el procedimiento de hibridación se monitoriza amperométricamente a un potencial de -0,15 V (frente a Ag/AgCl) tras añadir una disolución de H₂O₂.

6. Obtención de un amplicón de ADN de 235 bases del gen *lytA* usando aPCR.

Para llevar a cabo la amplificación del fragmento de 235 bases del gen *lytA* de *S. pneumoniae*, se usó aPCR, un procedimiento que permite amplificar preferiblemente una única hebra del ADN original que contiene la secuencia complementaria (20 meros), en la sonda sintética inmovilizada sobre las MB modificadas con estreptavidina, siendo capaz por tanto de realizar la detección directa del procedimiento de hibridación.

Se realizó la aPCR en un volumen final de 100 µl de una mezcla que contenía, al menos, 2 µl del extracto de ADN genómico de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (50 ng/µl), 1,6 µl de la disolución del cebador directo (5 µM), 16 µl de la disolución del cebador biotinilado inverso (5 µM) y otros componentes siguiendo el protocolo convencional para la amplificación usando PCR con la *Taq* ADN polimerasa. Las condiciones de aPCR fueron: desnaturalización (94°C, 4 min), seguido por 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto (desnaturalización), 60°C durante 1 minuto (apareamiento), 72°C durante 1 minuto (extensión) y 3 minutos de extensión final.

Cuando se consume el cebador limitante, el cebador restante, que es el cebador biotinilado inverso, continúa amplificando el fragmento de ADN, por tanto el producto resultante en la PCR es principalmente una cadena monocatenaria de 235 bases biotiniladas en el extremo 5'.

7. Obtención del amplicón de 235 bases del gen *lytA* usando aDPCR.

En este caso, se usó la cepa R6 de *S. pneumoniae*, que se cultivó a 37°C en medio C+Y hasta una DO₅₅₀ de $\cong 0,4$. Se obtuvo el número de ufc ml⁻¹ del cultivo realizando diluciones en serie del cultivo anterior en placas de agar sangre. Se obtuvieron diferentes concentraciones de células de *S. pneumoniae* a través de diluciones en serie en agua desionizada estéril. Se usó una alícuota de 2 µl de cada una de las disoluciones como molde para el procedimiento de aDPCR, añadiendo 1,6 µl de la disolución (5 µM) del cebador directo, 16 µl de la disolución (5 µM) del cebador biotinilado inverso y otros componentes en un volumen final de 100 µl siguiendo el procedimiento de PCR normal con *Taq* ADN polimerasa. A continuación, se siguió el procedimiento descrito en la sección anterior referente a aPCR.

Se observaron los amplicones obtenidos (a través de aPCR o aDPCR) a través de electroforesis en gel de agarosa (1,5%) a través de tinción de bromuro de etidio y se purificaron usando un kit comercial para la purificación de productos de PCR (Roche).

Lista de secuencias

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad Complutense de Madrid

<120> Detección de *Streptococcus pneumoniae* mediante genosensores magneto-amperométricos empleando cebadores y sondas específicos del gen *lytA*.

<130> ES1641.605

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 1

tgccgaaaac gcttgatata

ES 2 613 041 T3

| | | | |
|----|---|--|-----|
| | <210> 2 | | |
| | <211> 20 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | |
| 5 | <400> 2 | | |
| | tgtatcaagc gtttcggca | | 20 |
| | <210> 3 | | |
| 10 | <211> 20 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | |
| | <400> 3 | | |
| 15 | ttggaacgg ttgcatcatg | | 20 |
| | <210> 4 | | |
| | <211> 21 | | |
| | <212> ADN | | |
| 20 | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | |
| | <400> 4 | | |
| | tcgtgcgttt taattccagc t | | 21 |
| 25 | <210> 5 | | |
| | <211> 235 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | |
| 30 | <400> 5 | | |
| | ttggaacgg ttgcatcatg caggtaggac ctggtgataa tggcgcctgg gacgttgggg | | 60 |
| | gcggttgaa tgctgagacc tatgcagcgg ttgaactgat tgaaagccat tcaaccaaag | | 120 |
| | aagagttcat gacggactac cgcctttata togaactctt acgcaatcta gcagatgaag | | 180 |
| | caggtttgcc gaaaacgctt gatacagga gtttagctgg aattaaacg cacga | | 235 |
| | <210> 6 | | |
| | <211> 24 | | |
| 35 | <212> ADN | | |
| | <213> Estreptococos del grupo mitis | | |
| | <400> 6 | | |
| 40 | ggtataccga aaacgctga tact | | 24 |
| | <210> 7 | | |
| | <211> 24 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Estreptococos del grupo mitis | | |
| 45 | <400> 7 | | |
| | agtatcaagc gtttcggta tacc | | 24 |
| | <210> 8 | | |
| 50 | <211> 23 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Estreptococos del grupo mitis | | |
| | <400> 8 | | |
| 55 | aattggcctt ctttctcac gta | | 23 |
| | <210> 9 | | |
| | <211> 25 | | |
| | <212> ADN | | |

ES 2 613 041 T3

| | | |
|----|--|-----|
| | <213> Estreptococos del grupo mitis | |
| | <400> 9 | |
| 5 | tcgtgtgtct tgatacctgc taaat | 25 |
| | <210> 10 | |
| | <211> 259 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Estreptococos del grupo mitis | |
| 10 | <400> 10 | |
| | aattgggctt cttttctcac gtagtcggta atggtcgtgt tatgcaggta ggacctgttg | 60 |
| | ataatgggtgc ctgggacggt gggggcgggt ggaatgcaga aggttatgca caagttgaac | 120 |
| | tgattgaaag ccatgaatca aaagaagagt ttctgattga ctatcgtctc tatatcgaac | 180 |
| | tcttacgcaa tctagcggat gaagctggta taccgaaaac gcttgatact gctgatttag | 240 |
| | caggtatcaa gacacacga | 259 |
| | <210> 11 | |
| 15 | <211> 957 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | |
| | <400> 11 | |
| | atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat | 60 |
| | aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat | 120 |
| 20 | tatcactggc ggaaagacc agaattaggt tttttctcgc acattgttgg gaacggttgc | 180 |
| | atcatgcagg taggacctgt tgataatggt gcctgggacg ttgggggcgg ttggaatgct | 240 |
| | gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ctaaagaaga gttcatgacg | 300 |
| | gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa | 360 |
| | acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa | 420 |
| | ccaaacaacc actcagacca tgtggatcca tacccttact tggcaaatg gggcattagc | 480 |
| | cgtgagcagt ttaagcatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag | 540 |
| | aatgacactg gctactggta cgtacactca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag | 600 |
| | aaaatcaatg gcacttggtg ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg | 660 |
| | aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc | 720 |
| | tggaagaaaa tcgctgataa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgcat gaagacaggc | 780 |
| | tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac ttagacgcta aagaaggcgc catggtatca | 840 |
| | aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctgggtact acctcaaacc agacggaaca | 900 |
| | ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaataa | 957 |
| | <210> 12 | |
| 25 | <211> 957 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Streptococcus pneumoniae</i> | |

ES 2 613 041 T3

<400> 12
atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat 60
aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120
tatcactggc ggaaagacct agaattaggt tttttctcgc acattgttgg gaacggttgc 180
atcatgcagg taggacctgt tgataatggt gcctgggacg ttgggggcgg ttggaatgct 240
gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ctaaagaaga gttcatgacg 300
gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa 360
acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420
ccaaacaacc actcagacca tgtggatcca tacccttact tggcaaatg gggcattagc 480
cgtgagcagt ttaagtatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540
aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600
aaaatcaatg gcacttggta ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg 660
aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc 720
tggaagaaaa tcgctgataa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgccat gaagacaggc 780
tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac ttagacgcta aagaaggcgc catgggtatca 840
aatgctttta tccagtcagc ggacggaaca ggctggtact acctcaaacc agacggaaca 900
ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaataa 957

<210> 13

5 <211> 957

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 13

ES 2 613 041 T3

atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat 60
 aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120
 tatcactggc ggaaagacc agaattaggt tttttctcgc acattgttgg gaacggttgc 180
 atcatgcagg taggacctgt tgataatggt gcctgggacg ttgggggcgg ttggaatgct 240
 gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ctaaagaaga gttcatgacg 300
 gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa 360
 acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420
 ccaaacaacc actcagacca tgtggatcca tacccttact tggcaaatg gggcattagc 480
 cgtgagcagt ttaagtatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540
 aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600
 aaaatcaatg gcacttggtg ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg 660
 aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc 720
 tggaagaaaa tcgctgataa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgccat gaagacaggc 780
 tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac ttagacgcta aagaaggcgc catggtatca 840
 aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctggtact acctcaaacc agacggaaca 900
 ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaataa 957

<210> 14

<211> 957

5 <212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 14

atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat 60
 aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120
 tatcactggc ggaaagacc agaattaggt tttttctcgc acattgttgg gaacggttgc 180
 atcatgcagg taggacctgt tgataatggt gcctgggacg ttgggggcgg ttggaatgct 240
 gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ccaaagaaga gttcatgacg 300
 gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa 360
 acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420
 ccaaacaacc actcagacca cgttgaccct tatccatata ttgctaaatg gggcattagc 480
 cgtgagcagt ttaagcatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540

ES 2 613 041 T3

aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600
 aaaatcaatg gcacttggta ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg 660
 aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc 720
 tggaagaaaa tcgctgataa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgccat gaagacaggc 780
 tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac ttagacgcta aagaaggcgc catggtatca 840
 aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctgggtact acctcaaacc agacggaaca 900
 ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaataa 957

<210> 15

<211> 957

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

5

<400> 15

atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat 60
 aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120
 tatcactggc ggaaagacc agaattaggt tttttctcgc acattggtgg gaacggttgc 180
 atcatgcagc taggacctgt tgataatggt gcctgggacg ttgggggcgg ttggaatgct 240
 gagacctatg cagcggttga actgattgaa agccattcaa ccaaagaaga gttcatgacg 300
 gactaccgcc tttatatcga actcttacgc aatctagcag atgaagcagg tttgccgaaa 360
 acgcttgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420
 ccaaacaacc actcagacca cgttgaccct tatccatatac ttgctaaatg gggcattagc 480
 cgtgagcagt ttaagcatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540
 aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600
 aaaatcaatg gcacttggta ctactttgac agttcaggct atatgcttgc agaccgctgg 660
 aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc 720
 tggaagaaaa ttgctgataa gtggtactat ttcaacgaag aaggtgccat gaagacaggc 780
 tgggtcaagt acaaggacac ttggtactac ttagacgcta aagaaggcgc catggtatca 840
 aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctgggtact acctcaaacc agacggaaca 900
 ctggcagaca agccagaatt cacagtagag ccagatggct tgattacagt aaaataa 957

<210> 16

<211> 957

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

10

<400> 16

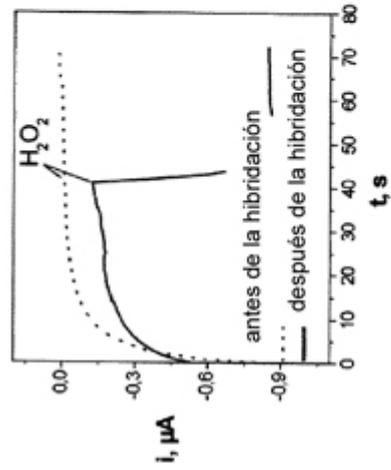
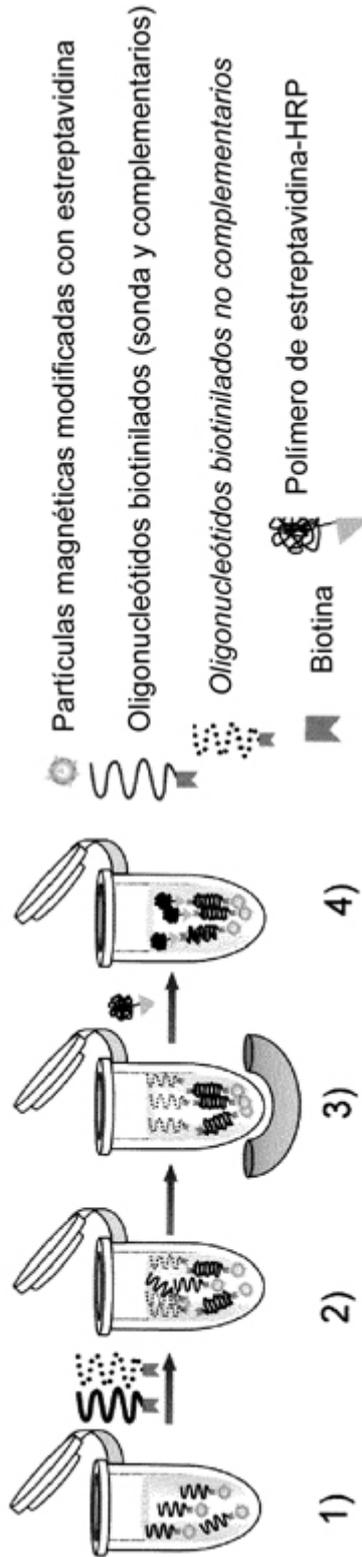
15

ES 2 613 041 T3

atggaaatta atgtgagtaa attaagaaca gatttgcctc aagtcggcgt gcaaccatat 60
aggcaagtac acgcacactc aactgggaat ccgcattcaa ccgtacagaa tgaagcggat 120
tatcaactggc ggaaagacc cagaattaggt tttttctcgc acattggttg gaacggttgc 180
 atcatgcagg taggacctgt tgataatgt gcctgggacg ttggggcgg ttggaatgct 240
 gagacctatg cagcgggtga actgattgaa agccattcaa ccaaagaaga gttcatgacg 300
 gactaccgcc ttatatcga actctacgc aatctagcag atgaagcagg ttgccgaaa 360
 acgctgata cagggagttt agctggaatt aaaacgcacg agtattgcac gaataaccaa 420
 ccaaacaacc actcagacca cgttgaccct tatccatata ttgctaaatg gggcattagc 480
 cgtgagcagt ttaagcatga tattgagaac ggcttgacga ttgaaacagg ctggcagaag 540
 aatgacactg gctactggta cgtacattca gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 600
 aaaatcaatg gcactggta ctacttgac agttcaggct atatgcttc agaccgctgg 660
 aggaagcaca cagacggcaa ctggfactgg ttcgacaact caggcgaaat ggctacaggc 720
 tggagaaaaa tcgctgataa gtgtactat tcaacgaag aaggtgcat gaagacaggc 780
 tgggtcaagt acaaggacac ttgtactac ttagacgcta aagaaggcgc catggtatca 840
 aatgccttta tccagtcagc ggacggaaca ggctgtact acctcaaacc agacggaaca 900
 ctggcagaca agccagactt cacagtagag cctgaaggct tgattacagt aaaataa 957

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar y/o cuantificar *Streptococcus pneumoniae* en al menos una muestra biológica aislada, a través de biosensores magneto-amperométricos, que comprende:
 - a. inmovilizar sobre un soporte sólido una suspensión de partículas superparamagnéticas (MB) marcadas con un compuesto A y con la sonda de ADN SEQ ID NO: 1 marcada en su extremo 5' con un compuesto B relacionado con el compuesto A, en el que dichas partículas y sonda se unen mediante la unión de los compuestos A-B,
 - b. añadir a la mezcla de la etapa (a) el producto de la amplificación a través de PCR obtenido usando el cebador directo SEQ ID NO: 3 y el cebador inverso SEQ ID NO: 4 del gen *lytA* de *S. pneumoniae*, a partir de una muestra biológica aislada, en el que el cebador SEQ ID NO: 4 está unido por su extremo 5' al compuesto B, y
 - c. detectar la hibridación de la sonda SEQ ID NO: 1 de etapa (a) con el fragmento de ADN amplificado en la etapa (b), añadiendo el compuesto A conjugado con un elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es un fluido biológico.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la PCR es asimétrica.
4. Método según la reivindicación 3, en el que, en dicha PCR asimétrica se usa una cantidad del cebador SEQ ID NO: 3 que es de 8 a 12 veces más pequeña que la de SEQ ID NO: 4 unido por su extremo 5' al compuesto B.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto A conjugado con un elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse según la etapa (c) está, a su vez, conjugado covalentemente con una estructura principal de polímero hidrófilo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto A es estreptavidina y el compuesto B es biotina.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el elemento capaz de detectarse y/o cuantificarse según la etapa (c) es una enzima oxidasa.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.
9. Uso del cebador directo SEQ ID NO: 3 y el cebador inverso SEQ ID NO: 4 para la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN del gen *lytA* de *S. pneumoniae* y su detección y/o cuantificación con la sonda SEQ ID NO: 1 y/o con la sonda SEQ ID NO: 2, en el que dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica, usando como molde el ADN presente en una muestra biológica aislada.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que la muestra biológica aislada es un fluido biológico aislado.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que la PCR es asimétrica.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.
13. Kit que comprende el cebador directo SEQ ID NO: 3, el cebador inverso SEQ ID NO: 4 y la sonda SEQ ID NO: 1 y/o la sonda SEQ ID NO: 2, en el que dichas sondas tienen un marcaje que permite una detección isotópica, colorimétrica, fluorométrica o electroquímica.
14. Uso del kit según la reivindicación 13, para la detección y/o cuantificación de *S. pneumoniae*.
15. Uso del kit según la reivindicación 13, para monitorizar la respuesta a un tratamiento de *S. pneumoniae*.



6)

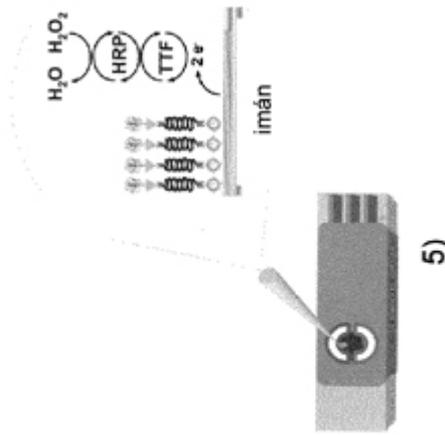


FIG. 1

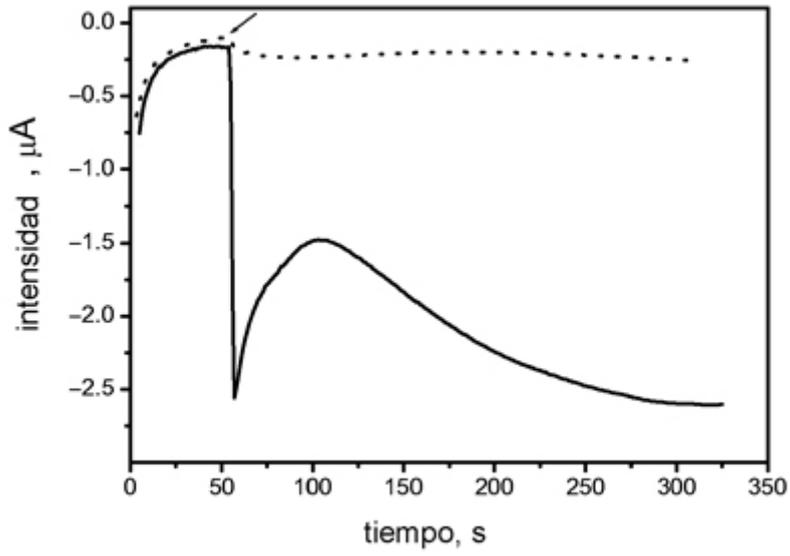


FIG. 2

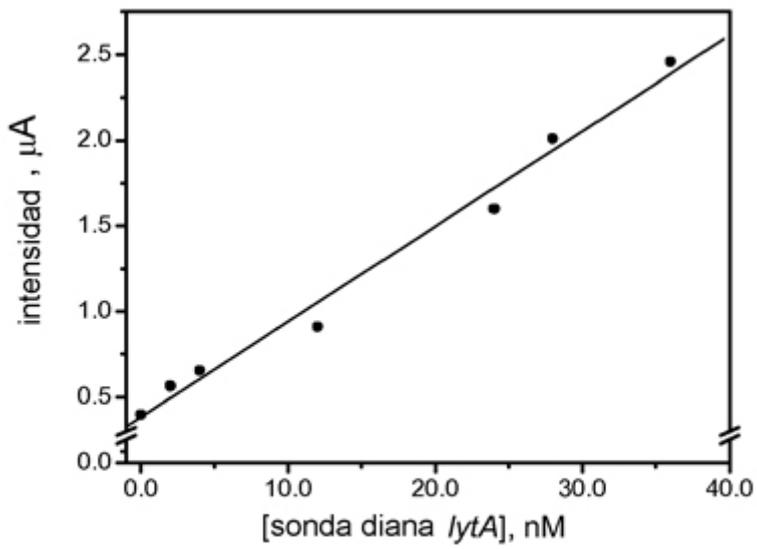


FIG. 3

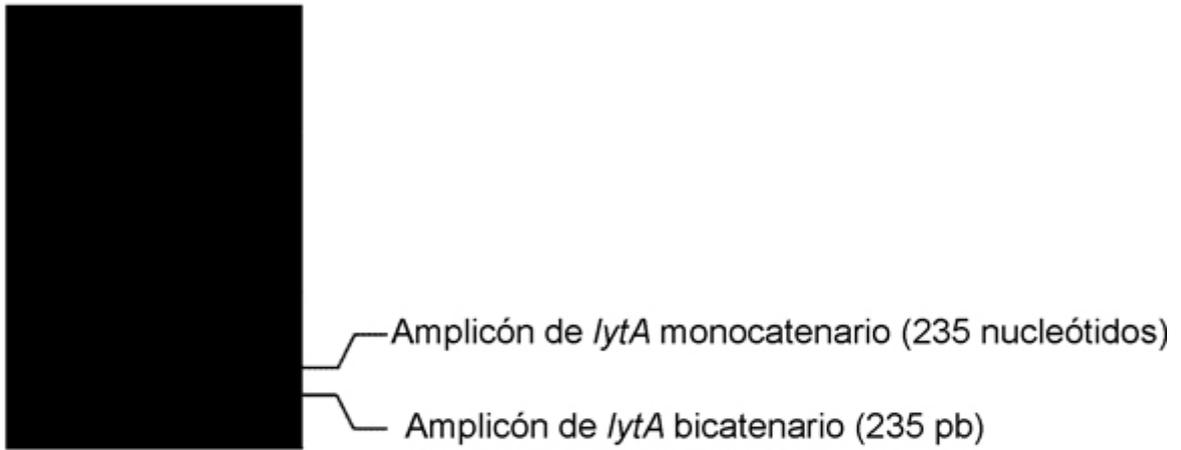


FIG. 4

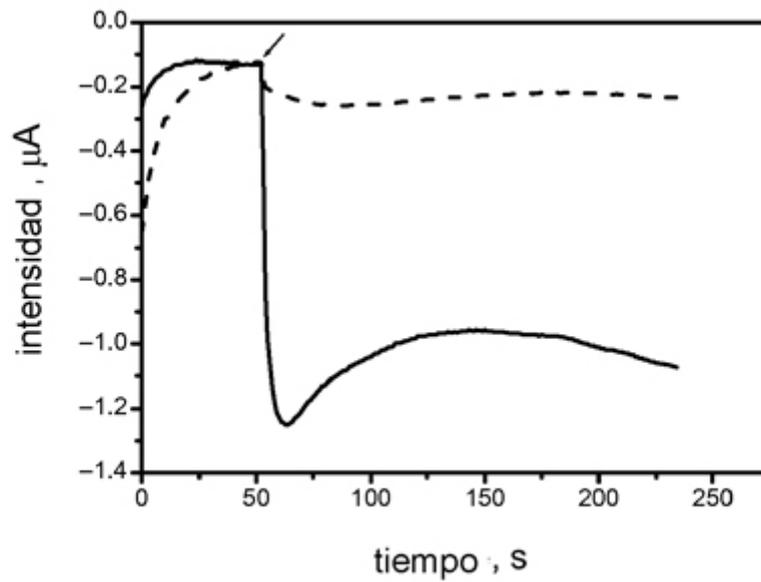


FIG. 5

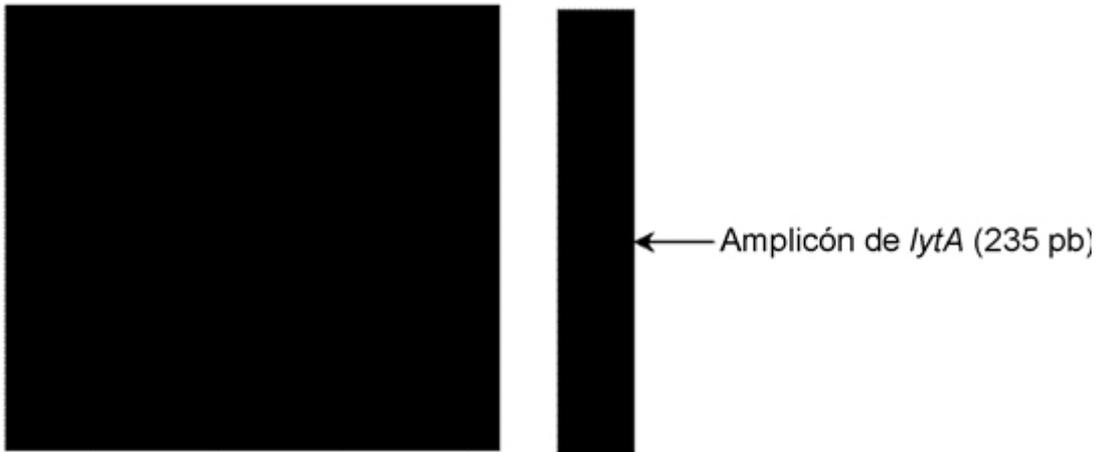


FIG. 6

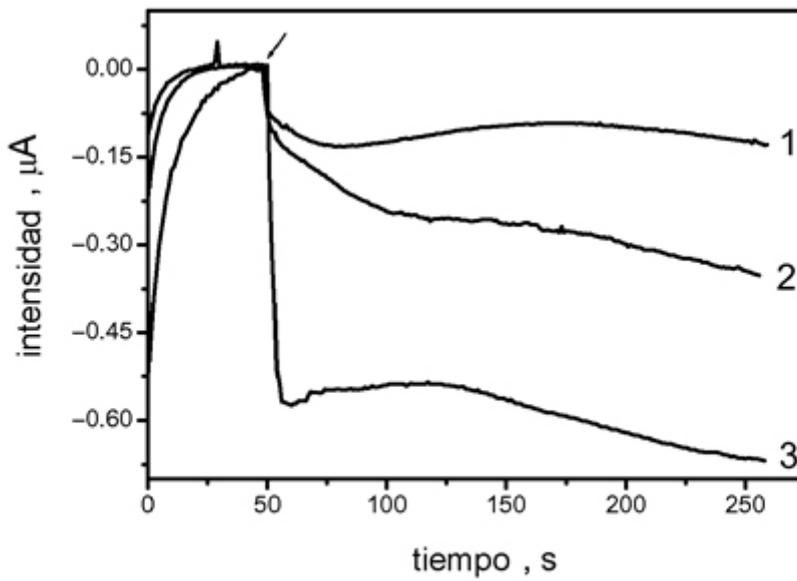


FIG. 7

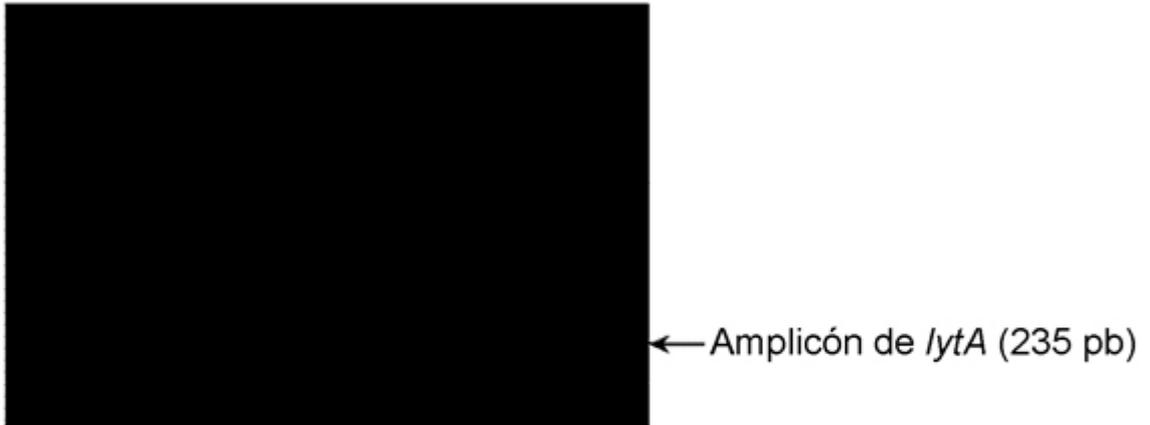


FIG. 8

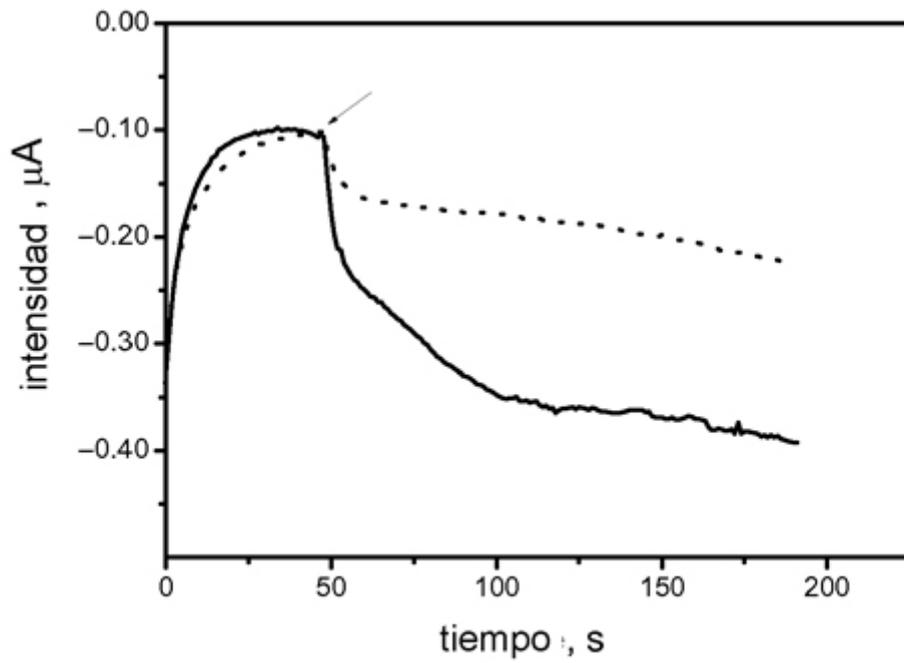


FIG. 9

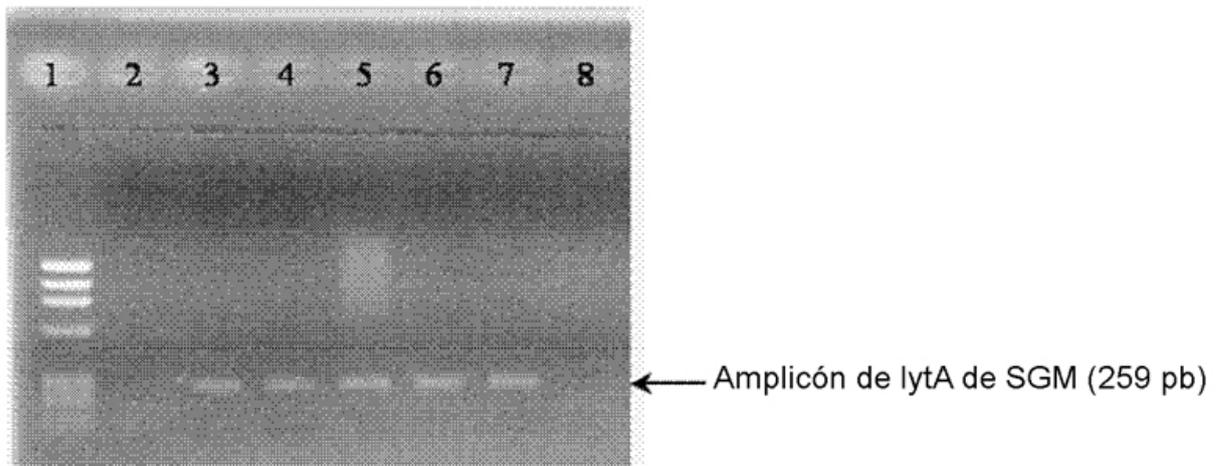


FIG. 10