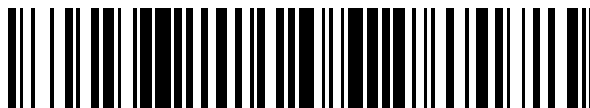


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 875**

21 Número de solicitud: 202130697

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.07.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.01.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (33.3%)

C/ San Francisco, nº 3

33003 Oviedo (Asturias) ES;

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LA RIOJA

(UNIR) (33.3%) y

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

(33.3%)

72 Inventor/es:

BELTRÁN SÁNCHEZ, José Francisco;

CIMA CABAL, María Dolores;

COSTA RAMA, Estefanía;

FERNÁNDEZ ABEDUL, María Teresa;

FERNÁNDEZ OTERO, Toribio;

GARCÍA HARO, Juan;

GARCÍA SÁNCHEZ, Antonio Javier;

GARCÍA SUÁREZ, María del Mar y

GONZÁLEZ LÓPEZ, Andrea

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

54 Título: **Método para la detección de un material genético en una muestra y dispositivo para llevarlo a cabo**

57 Resumen:

Método para la detección de un material genético en una muestra y dispositivo para llevarlo a cabo.

La presente invención se refiere a un método para la detección de un material genético en una muestra por amplificación del mismo mediante LAMP (amplificación isoterma mediada por bucle —del inglés loop-mediated isothermal amplification—) o RT-LAMP (amplificación isoterma mediada por bucle con transcripción reversa), así como el dispositivo para llevar a cabo la amplificación y detección.

ES 2 932 875 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de un material genético en una muestra y dispositivo para llevarlo a cabo

5

La presente invención se refiere a un método para la detección de un material genético en una muestra donde previamente se ha amplificado el material genético mediante LAMP (amplificación isoterma mediada por bucle –del inglés loop-mediated isothermal amplification–) o RT-LAMP (amplificación isoterma mediada por bucle con transcripción reversa), así como el dispositivo para llevar a cabo dicha amplificación y su detección.

10

Antecedentes de la invención

La detección de un agente infeccioso (bien sea en muestras biológicas para el diagnóstico de una enfermedad, o en muestras de alimentos, superficies, aguas, etc. para determinar la presencia de éste) se puede realizar a través de la detección de algún marcador proteico que posea el agente infeccioso en su estructura, si bien actualmente los métodos más fiables (gracias a su sensibilidad y selectividad) son los basados en la detección del material genético de dicho agente. Para llevar a cabo esta detección es necesario realizar la amplificación de ese material genético. Aunque hay diferentes estrategias de amplificación, actualmente, la más empleada es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa –del inglés Polymerase Chain Reaction–). La PCR es la prueba más utilizada en la mayoría de los hospitales, pero para llevarla a cabo se necesita personal especializado e instrumentación (termociclador para realizar los ciclos de temperatura necesarios) que requiere comúnmente de laboratorios centralizados, por lo que no pueden realizarse ensayos *in situ*. En cambio, la LAMP (amplificación isoterma mediada por bucle –del inglés loop-mediated isothermal amplification–) es una amplificación de material genético (ADN–LAMP– o ARN–RT-LAMP–) con una estrategia que no necesita termocicladores (es isoterma), lo que simplifica considerablemente el proceso y lo hace más rápido y económico.

20

25

30

Para determinar si existe material genético del agente patógeno y, por tanto, si la amplificación ha tenido lugar, es necesario un indicador que permita la detección visual (como el azul de hidroxinaftol, rojo fenol, calceína o berbeína) o instrumental (p. ej. Indicadores fluorescentes). Teniendo en cuenta la sencillez de la instrumentación electroquímica y la conveniencia de llevar a cabo la LAMP en dispositivos portátiles, se han utilizado técnicas electroquímicas para la detección de la amplificación. Existen ejemplos en

los que el producto de la amplificación LAMP se deposita sobre los electrodos de una celda electroquímica plana para registrar la señal de un indicador electroactivo que ha interaccionado previamente con las hebras de ADN amplificadas (amplicones) como es el caso del colorante H33258.

5

Otro indicador electroactivo que también interacciona con los amplicones es el azul de metileno, pero en este caso el producto de amplificación se captura previamente sobre un electrodo que contiene una hebra complementaria inmovilizada. Como el azul de metileno no inhibe la amplificación LAMP puede añadirse de forma inicial en la mezcla de reacción a diferencia del colorante H33258, que se adiciona una vez ésta ha transcurrido. La introducción de una celda miniaturizada en la disolución donde ha transcurrido la amplificación permite medir la señal del indicador. Ésta disminuye con la concentración de amplicones dado que, al unirse el indicador a la hebra de ADN, el aducto difunde mucho más lentamente hacia la superficie del electrodo en comparación con la molécula de azul de metileno libre.

15

Otra posibilidad es el empleo de una enzima que se une a las hebras amplificadas y genera un producto electroactivo. En estos casos, los amplicones generados contienen digoxigenina (por empleo de un nucleótido marcado) para permitir la detección. Tras ser capturados con una sonda inmovilizada sobre una partícula magnética, interaccionan con el anticuerpo antidigoxigenina conjugado a una enzima peroxidasa. Las partículas magnéticas se colocan sobre la celda serigrafiada para la detección electroquímica de un producto de la reacción enzimática, de forma que la señal se incrementa con la concentración de amplicones. En este caso, el procedimiento es muy complejo, empleando partículas magnéticas, interacciones antígeno-anticuerpo y enzimas. Además, el empleo de bioreactivos adicionales para la detección incrementa notablemente el coste del ensayo.

20

25

Otro tipo de estrategia se basa en la detección de iones que se liberan en el transcurso de la amplificación. Este es el caso del pirofosfato, que se convierte en fosfato con pirofosfatasa y posteriormente en molibdofosfato (especie electroactiva indicadora) tras adición de molibdato. En este caso, es necesaria también la adición de una enzima, por lo que el coste de la prueba se incrementaría por empleo de bioreactivos, además de complicar igualmente el procedimiento. También puede determinarse el pirofosfato magnésico (que produce turbidez) capturando el magnesio con un electrodo modificado con tetraciclina y detectándolo posteriormente tras interacción con nanopartículas de dióxido de circonio. Se trata también de un procedimiento complejo en el que hay que capturar una especie para su

30

35

posterior detección.

A lo largo de la amplificación también se liberan protones y, por lo tanto, el cambio de pH producido puede emplearse para su detección. Una de las estrategias consiste en emplear estructuras de ADN que cambian de conformación con el pH. Este es el caso de un dímero de ADN formado después de la liberación de protones, que puede interaccionar con hebras de ADN marcadas con ferroceno (molécula electroactiva) inmovilizadas sobre un electrodo. La participación posterior de una enzima exonucleasa libera la marca electroactiva (ferroceno), que difunde lejos del electrodo, disminuyendo su señal de oxidación.

En la solicitud de patente US20200408750A1, se presenta un dispositivo portátil que, a través de cartuchos desechables donde se depositan las muestras y empleando fluorescencia, se detecta el SARS-CoV-2 en pacientes de COVID. Estas técnicas son complicadas desde el punto de vista instrumental.

En la patente con número de solicitud JP2007037483A se describe un método que permite detectar si se ha producido una reacción enzimática, que se puede aplicar a una amplificación LAMP, pero que se basa en la detección electroquímica de un complejo formado entre un ion metálico de iones fosfato producidos en la reacción enzimática. En la patente con número de solicitud CN110982879A se describe un método para la detección del producto de una reacción LAMP que se deposita sobre un electrodo. La detección se basa en la respuesta electroquímica de dos sustancias electroactivas unidas a dos hebras de ADN que están inmovilizadas sobre el electrodo. Al añadir el producto de la reacción LAMP, si la amplificación se ha producido, una de las hebras inmovilizadas se une al ADN amplificado y la conformación de la otra hebra cambia, por lo que la señal electroquímica de los indicadores varía. En estos casos los procedimientos son complejos y caros al requerir la adición y/o inmovilización de (bio)reactivos.

Por todo lo mencionado es necesario desarrollar métodos y dispositivos más sencillos, más baratos, más fiables y portables para la detección de material genético amplificado por LAMP o RT-LAMP.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo de detección electroquímica, que puede ser aplicado en amplificaciones de material genético de

microorganismos, en las que se produzca un cambio de pH. El objetivo es la detección de la presencia de microorganismos o material genético modificado, así como una estimación precisa de su concentración por cuantificación de los amplicones generados, en caso de que la amplificación tenga lugar. En la detección se utiliza un indicador colorimétrico que se
5 añade para permitir la detección visual. El indicador colorimétrico presenta un comportamiento redox diferenciado según sea el pH del medio de amplificación.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de material genético en una muestra biológica que comprende:

- 10 a) extraer el material genético de la muestra biológica;
- b) adicionar el material genético a una mezcla de amplificación que comprende un indicador colorimétrico;
- c) amplificar el material genético mediante amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) o amplificación isoterma mediada por bucle con transcripción reversa
15 (RT-LAMP);
- d) detectar la amplificación del material genético de la muestra biológica;

caracterizado porque la detección es una detección electroquímica, con medida del potencial y/o de la corriente, correspondiente al proceso redox diferenciado, en función del número de copias iniciales del material genético en el medio de amplificación, del indicador
20 colorimétrico presente en la mezcla de amplificación.

El término material genético se refiere tanto a ADN como a ARN.

El indicador que se utiliza en la etapa de detección no solo cambia de color en función del
25 pH del medio de amplificación, sino que también en función del pH cambia el potencial al que ocurre su proceso redox. El pH cambiará sólo en caso de que ocurra la amplificación.

Por lo tanto, el proceso redox del indicador aparecerá a un potencial determinado antes de que la amplificación ocurra y, solo si ésta sucede, dicho potencial variará según ésta vaya
30 transcurriendo y se modifique el pH. En el caso de que se mida la intensidad de corriente y dado que sucede un cambio de potencial del proceso, la intensidad de corriente medida en un potencial anterior al de máxima corriente cuando no ocurre amplificación variará, siendo esta variación proporcional al número de copias de material genético a la concentración de los protones en el medio de amplificación.

35 En la amplificación de material genético por LAMP o RT-LAMP el pH disminuye según

avanza la amplificación del material genético debido a la producción inherente de protones por la ADN polimerasa en una solución tamponada débilmente.

5 El uso de un indicador colorimétrico con diferente potencial redox en función del pH es una estrategia diferencial muy ventajosa, dado que permite una detección dual: visual, al ser un indicador cuyo color varía con el pH, e instrumental, pudiendo realizar una medida precisa de parámetros característicos de su proceso redox, con lo que se pueden obtener límites de detección menores y una mayor fiabilidad. Esto permite disminuir los falsos negativos que se producen en metodologías con detección colorimétrica/óptica. Una ventaja adicional es que
10 como la metodología electroquímica se basa en una reacción que sucede en la superficie de un conductor, no le influyen ni el color ni la turbidez del medio, que suelen ser inconvenientes en una detección óptica.

En la presente invención además del procedimiento, se ha desarrollado un dispositivo
15 electrónico portable para la detección de material genético amplificado que es portable, sencillo y económico.

Las técnicas electroquímicas son mucho más sencillas desde el punto de vista instrumental, por lo que favorecen el análisis descentralizado, cada vez más requerido por la sociedad.
20 Además, la detección electroquímica resulta mucho más económica no sólo por el equipo utilizado sino también por las celdas electroquímicas empleadas. Por otra parte, aunque las metodologías empleen celdas miniaturizadas, su sensibilidad no tiene por qué disminuir frente a las basadas en medidas realizadas en celdas convencionales dado que se registran fenómenos interfaciales (transferencia electrónica en la superficie electrodo/disolución). En
25 el caso de los métodos ópticos, sin embargo, la disminución del paso óptico por miniaturización puede conllevar problemas de sensibilidad.

El dispositivo de la invención detecta la existencia de amplificación de material genético empleando un potenciostato para un registro voltamperométrico (intensidad-potencial) o
30 cronoamperométrico (intensidad-tiempo). Es un dispositivo portable.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un dispositivo portable para detección electroquímica del método del primer aspecto que comprende:
unidad de control;
35 celda electroquímica de tres electrodos desechables: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar;

un calentador bajo la celda electroquímica;

un potencióstato unido a la celda electroquímica mediante un conector;

amplificador de transimpedancia

un circuito de adecuación de señal, adquisición de datos, tratamiento de datos e

5 interpretación de resultados;

una interfaz de usuario;

conectividad inalámbrica y

batería.

10 Dicho dispositivo mide detecta la existencia de amplificación de material genético realizando:
o una voltamperometría cíclica y relacionando el potencial al que se produce el pico de
corriente anódica en el voltamperograma y/o la corriente que presenta a un determinado
valor de potencial con el número de copias de material genético inicial; o una
cronoamperometría midiendo la intensidad de corriente anódica a un tiempo fijo, al aplicar
15 un potencial correspondiente a un valor de potencial ligeramente inferior al del máximo del
proceso cuando no hay amplificación y relacionándolo con el número de copias de material
genético inicial. En particular, se relacionará la intensidad de corriente obtenida a un tiempo
determinado con la variación del pH. Para ello, un potencial se envía desde una unidad de
control a un conversor digital-analógico que actúa como un generador de la función de
20 tensión a aplicar en el potencióstato. En el potencióstato se aplica el voltaje de la
amperometría entre el electrodo de trabajo y referencia, dando lugar a la reacción de
oxidación, que genera una corriente a medir. La corriente generada es convertida a un valor
de tensión con un amplificador de transimpedancia y este valor es a su vez adquirido por el
controlador a través del conversor analógico-digital. Para la ejecución de la relación que
25 permite extrapolar la lectura de la señal del circuito en un número de copias de material
genético, previamente se han caracterizado y calibrado las corrientes y voltajes asociados a
diferentes reacciones, que son procesadas y almacenadas en la memoria interna del
microcontrolador.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la sensibilidad de la amplificación del gen de la neumolisina (ply) de *S. pneumoniae* mediante ensayos LAMP. La Figura 1A es la superior y muestra ensayos LAMP en H₂O de grado PCR: Tubos (1) 10⁹ copias; (2) 10⁸ copias; (3) 10⁷ copias; (4) 10⁶ copias;
35 (5) control negativo. La Figura 1B es la inferior y muestra los ensayos LAMP en muestras de orinas enriquecidas: Tubos (1) 10⁹ copias; (2) 10⁸ copias; (3) 10⁷ copias; (4) 10⁶ copias; (5)

control negativo.

La Figura 2 muestra el potencial de pico de oxidación del rojo de fenol frente al pH. pH 8 a pH 6,5 (rojo) y de pH 6 a pH 3 (naranja).

5

La Figura 3 muestra A) un ensayo LAMP en H₂O de grado PCR (en la figura se muestran copias.μL⁻¹). (B) Gráfica de calibración correspondiente a los tubos de ensayo LAMP que se muestran en (A). (C) Ensayo LAMP en muestras de orina. Tubos: (1) 10⁸, (2) 10⁷, (3) 2 · 10⁶, (4) 5 · 10⁵, (5) 2 · 10⁵, (6) 10⁵ copias.μL⁻¹, (7), (8) y (9) son controles negativos (NC). (D) Gráfico de potencial para todas las muestras. CN control negativo. Los puntos grises son controles negativos (NC). Valor de corte = ± 3SD del control negativo.

10

La Figura 4 muestra un diagrama detallado de los bloques de un dispositivo potenciostato portátil con electrodo y calentador integrado.

15

La Figura 5 muestra las señales electroquímicas obtenidas tras una reacción de amplificación LAMP o RT-LAMP empleando rojo fenol como indicador visual adicionado en la mezcla de amplificación. Se representan los voltamperogramas cíclicos (curvas intensidad-potencial) registrados tras el procedimiento de amplificación, correspondientes a un resultado negativo (20), es decir, donde no hay material genético específico y por lo tanto no ha sucedido la amplificación, así como un resultado positivo (21), en donde se produce un cambio en el potencial del proceso redox del rojo fenol hacia valores más positivos. También se observa un cambio en la intensidad para un valor fijo de potencial. Este último caso corresponde, por lo tanto, a un resultado positivo, en donde el cambio en el pH hace necesaria la aplicación de un mayor potencial para la oxidación del rojo fenol.

20

25

En la Figura 6 se representan los cronoamperogramas (curvas intensidad-tiempo) registrados tras el procedimiento de amplificación, correspondientes a un resultado negativo (22), es decir, donde no hay material genético específico y por lo tanto no ha sucedido la amplificación, así como un resultado positivo (23). Se observa por tanto una diferencia de intensidad entre ambos resultados, con una mayor intensidad para el resultado negativo.

30

Descripción de una realización preferida

Como se ha dicho, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de material genético en una muestra biológica que comprende:

35

- a) extraer el material genético de la muestra biológica;
- b) adicionar el material genético a una mezcla de amplificación que comprende un indicador colorimétrico;
- c) amplificar el material genético mediante amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) o amplificación isoterma mediada por bucle con transcripción reversa (RT-LAMP);
- d) detectar la amplificación del material genético de la muestra biológica;

caracterizado porque la detección es una detección electroquímica, con medida del potencial y/o de la corriente, correspondiente al proceso redox diferenciado, en función del número de copias iniciales del material genético en el medio de amplificación, del indicador colorimétrico presente en la mezcla de amplificación.

De manera preferente el indicador colorimétrico tiene el cambio de color entre pH 6 y pH 8. De manera particular el indicador colorimétrico es rojo fenol.

En una realización preferente, la etapa c) de amplificación isoterma comprende las subetapas de c1) mezclar la muestra y los reactivos en la mezcla de amplificación; c2) homogenizar la mezcla de amplificación de la etapa c1); c3) calentar a 65°C durante el tiempo necesario para la amplificación del material genético presente en la mezcla homogeneizada de la etapa c2).

Transcurrido el tiempo de amplificación, se detecta la amplificación electroquímicamente mediante la medida de la intensidad de corriente o del potencial del proceso redox del indicador colorimétrico, que presenta un comportamiento diferenciado según sea el pH del medio de amplificación. El indicador colorimétrico se encuentra en la mezcla de amplificación. De manera preferente la etapa d) comprende las subetapas d1) transferir un volumen de la mezcla amplificada a unos electrodos de una celda electroquímica plana: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y electrodo auxiliar, y cubrir con dicha mezcla los tres electrodos; d2) realizar un barrido de potenciales en una ventana que incluya el proceso redox del indicador y registrar la intensidad de la corriente generada.

El potencial y/o la intensidad pueden relacionarse con el pH, que cambia a medida que transcurre la amplificación. Un cambio de pH con el tiempo indica un resultado positivo (hay amplificación) y, para un mismo tiempo, un mayor cambio de pH indica una mayor cantidad de hebras de material genético amplificadas y, por lo tanto, de copias de material genético iniciales.

El comportamiento redox diferenciado según el pH del medio de amplificación, en el caso de que la amplificación ocurra puede observarse comparando las señales analíticas de una muestra y un blanco de reactivos obtenidos por medida de la variación de potencial o la variación de intensidad de corriente registrada a un potencial inferior al de la máxima corriente obtenida cuando no sucede amplificación.

De manera preferente la técnica electroquímica empleada para la medida de la intensidad o del potencial es una voltamperometría. De manera más preferente la voltamperometría se selecciona entre: voltamperometría de barrido lineal y cíclica, voltamperometría de onda cuadrada, voltamperometría de impulsos. De otra manera preferente la medida de la intensidad se realiza por cronoamperometría.

En una materialización preferente se realiza una voltamperometría cíclica y se relaciona el potencial al que se produce el pico de corriente anódica en el voltamperograma con el número de copias iniciales de material genético. En otra materialización preferente se relaciona la intensidad de corriente que presenta a un determinado valor de potencial con el número de copias iniciales de material genético. En una segunda realización preferente se realiza una cronoamperometría midiendo la intensidad de corriente anódica en función del tiempo, fijando el potencial al valor de potencial de pico (o a un valor ligeramente inferior) del proceso redox registrado voltamperométricamente.

Para la ejecución de la relación que permite extrapolar la lectura de la señal del circuito en un valor de copias iniciales de material genético, previamente se han caracterizado y calibrado las intensidades de corrientes y potenciales asociados a diferentes reacciones.

Como se ha dicho, un segundo aspecto de la invención se refiere a un dispositivo portable para detección electroquímica del método del primer aspecto que comprende:

unidad de control;

celda electroquímica de tres electrodos desechables: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar;

un calentador bajo la celda electroquímica;

un potencióstato unido a la celda electroquímica mediante un conector;

amplificador de transimpedancia

un circuito de adecuación de señal, adquisición de datos, tratamiento de datos e interpretación de resultados;

una interfaz de usuario;

conectividad inalámbrica y
batería.

5 En una realización específica puede utilizarse un potencióstato al que se conectan los tres electrodos de la celda electroquímica.

10 En otra realización específica, los reactivos de la amplificación están depositados en un material poroso situado sobre la celda electroquímica recubierto con una carcasa/cubierta para evitar la posible evaporación.

De manera particular los electrodos son electrodos serigrafiados.

15 De manera preferente el dispositivo utiliza una interfaz gráfica para mostrar instrucciones y resultados de la medición, permite guardar dichos resultados en memoria interna, y presenta botones de control para seleccionar modos de funcionamiento, permitiendo el uso por parte de personal no especializado.

20 De manera particular el dispositivo presenta interfaz de conectividad inalámbrica que puede incluir protocolos Bluetooth, WiFi, LoRa o 3G/4G, permitirá establecer conexiones con servidores remotos, donde guardar y consultar el valor presente o el histórico de los resultados; así como establecer conexiones con dispositivos portátiles como *smartphones* o *tablets*, donde poder consultar los resultados sin necesitar pantalla física adicional, o incluso, controlar el proceso.

25 De manera particular, el calentador aplica una temperatura en el rango 20°C-100°C con una precisión de temperatura de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

De manera particular el dispositivo comprende varias celdas electroquímicas para realizar una multidetección.

30 La Figura 4 muestra una materialización particular de la celda electroquímica con electrodos serigrafiados (1) que es estimulada mediante un potencióstato (2) con una forma de onda generada por un generador de funciones (3). Mientras, un amplificador de transimpedancia (5) convierte la corriente resultante de la estimulación en un voltaje que es registrado por un
35 conversor analógico-digital (4). Un controlador (6) es el responsable de configurar la forma de onda generada y de procesar el registro de corriente. Un calentador resistivo (8) activado

por un generador de pulsos PWM (7) calienta la celda electroquímica (1) cuya temperatura es registrada por sensor de temperatura (9) y procesada por el controlador (6) para controlar la temperatura, configurando el funcionamiento del generador de pulsos (15). Una interfaz física del dispositivo (18) compuesta por botones y pantalla, y una interfaz de conectividad (19), permiten a los usuarios interactuar con el dispositivo, ya sea directamente con él o mediante dispositivos externos (smartphone, Tablet, etc.).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos tienen únicamente carácter ilustrativo de esta invención, y no deben ser interpretados en sentido limitativo de la misma.

En todos los ejemplos los métodos para cuantificar electroquímicamente las muestras preparadas son los siguientes.

Ejemplo 1

Muestras biológicas

Se obtuvieron muestras de orina de diez niños sanos en un centro de atención sanitaria en Lugones (Asturias, España) durante una revisión rutinaria pediátrica. Los niños se consideraban sanos si no mostraban síntomas respiratorios, no habían recibido ningún tratamiento antibiótico durante la semana anterior y no habían sido hospitalizados por ninguna razón durante el mes anterior. Las muestras fueron congeladas hasta que fueron analizadas a -70°C.

Después, las muestras se descongelaron durante la noche a 8°C, se centrifugaron 20 ml de muestras a 3000 x g durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El pH de las muestras se ajustó a 7,2 y 1 ml de sobrenadante se centrifugó a 15000 x g durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Este estudio se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias. El consentimiento informado por escrito se obtuvo de los padres/tutores de todos los participantes, de conformidad con la Declaración de Helsinki.

Preparación de ADN

El plásmido pTrc99A-ply, que contiene el gen de la neumolisina (ply), se extrajo utilizando una columna de intercambio aniónico Qiagen-tip (Qiagen). El ADN fue cuantificado en un

espectrofotómetro Ultrospec 3300 Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido Ltd., Little Chalfont, Reino Unido).

Ensayos LAMP

5 Basado en la secuencia de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (GenBank AE008540), se diseñaron cebadores LAMP específicos de cuatro capas utilizando el soporte de cebadores LAMP software de diseño (PrimerExplorer v4; Eiken Chemical Ltd., Tokio, Japón) para amplificar un 175 pb fragmento. La mezcla de reacción con WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (New England Biolabs) contenía 1x master mix (incluye ADN polimerasa Bst 2.0), dUTG 0,7 mM, mezcla de cebadores (1,6 µM cada FIP y BIP, 0,4 µM cada uno de imprimación ply-F3 y ply-B3) 0,3 U de UDG Antartic termolábil (uracilo-ADN glicosilasa) (New England Biolabs, Ipswich, MA) y ADN molde. Como control negativo se utilizó H₂O de grado PCR en lugar de las muestras. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos seguidos a 65° C durante 90 minutos y luego se calentaron a 80°C durante 2 minutos para detener la reacción en un termociclador PCR (ciclador térmico de 96 pocillos Veriti, Applied Biosystems). Para confirmar la amplificación del ADN, los productos de reacción LAMP se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% y teñido con bromuro de etidio.

20 Medidas electroquímicas

Para el estudio del comportamiento electroquímico del rojo fenol, se usaron tampones Britton Robinson (BR) de pH 3.3 a 8.0 para preparar disoluciones 0,01 M de rojo de fenol tanto para estudios electroquímicos y medidas LAMP. Se registraron voltamperogramas cíclicos desde -0,5 V hasta +1 V utilizando electrodos de carbono de película gruesa (S1PE, 25 Micrux Technologies®) conectado a un potenciostato µ AUTOLAB TYPE III (Metrohm) a través de un conector BOX (ED-SPE-BOX, Micrux Technologies®).

Resultados

30 Sensibilidad analítica de los ensayos LAMP en tubos.

Para eliminar la contaminación de arrastre, se agregó dUTG y UDG Antartic termolábil a la mezcla colorimétrica (WarmStartR Colorimetric LAMP). La sensibilidad del ensayo LAMP de *S. pneumoniae* se evaluó utilizando diluciones en serie x10 en un rango de número de 35 copias del ADN molde de plásmido pTrc99A-ply que variaba entre 10⁹ y 10⁶ copias. El ensayo LAMP mostró un límite de detección visual de aproximadamente 10⁷ copias / µl

(Figura 1A).

Adición de ADN en muestras de orina.

Un grupo de 10 muestras de orina de niños sanos fueron utilizadas para los experimentos de adición de ADN. Después del tratamiento de las muestras para eliminar sales y ajustar el pH, se utilizaron para realizar los ensayos LAMP series de dilución x10 de orina que varía entre 10^9 y 10^6 el número de copias de la plantilla del ADN plasmídico (Figura 1B).

Estudios de comportamiento electroquímico del rojo fenol.

Se registraron voltamperogramas cíclicos en disoluciones de rojo fenol 0,1 mM en disoluciones tampón BR de pH 3 a pH 8 con el fin de estudiar el comportamiento del rojo de fenol.

Como puede observarse en la Figura 2, a medida que el pH disminuye, los valores del potencial de pico de oxidación del rojo de fenol aumentan obteniendo dos rangos lineales (potenciales de pico de oxidación vs. pH) con diferentes pendientes (una desde pH 3 a pH 6 y otra desde pH 6,5 a pH 8).

Se sabe que el rango de pH para las amplificaciones LAMP con rojo de fenol varía de pH 8 (control negativo) a pH 6-6.5 por lo que, sobre la base de los resultados observados en la Figura 2, se espera que la amplificación LAMP pueda detectarse a través de las variaciones en el potencial del pico anódico.

Cada medición LAMP se realizó con un nuevo electrodo

Se evaluó la reproducibilidad entre electrodos realizando voltamperometrías cíclicas de rojo de fenol 0,1 mM en BR pH 8 en 4 electrodos diferentes obteniendo un potencial pico anódico de $381 \pm 0,006$ mV (RSD 1,6%) y una corriente pico anódica de $3,142 \pm 0,149$ μ A (RSD 4,8%) demostrando la alta precisión de estos electrodos.

Detección electroquímica para LAMP.

En la Figura 3A se muestran los resultados del ensayo LAMP en H₂O de grado PCR. Como se puede observar, las muestras conteniendo de $2 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^5$ copias μ L⁻¹ serían consideradas negativas basándose en la detección colorimétrica. Luego, se registraron voltamperogramas cíclicos como se ha descrito anteriormente y puede verse una tendencia

lineal ($y = -5.9069x + 587.68$, R^2 de 0,988). El límite de detección es $1 \cdot 10^5$ copias μL^{-1} .

Teniendo en cuenta los resultados y con el fin de evaluar la capacidad de este método para identificar falsos negativos tras detección colorimétrica, se estableció un punto de corte para muestras de orina. Para este estudio, seis muestras de orina enriquecidas (10^8 , 10^7 , $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^5$ copias μL^{-1}) y tres controles negativos fueron medidos electroquímicamente después de llevar a cabo el ensayo LAMP como se indicó anteriormente. La Figura 3C muestra los resultados obtenidos para los ensayos LAMP. Como puede verse, solo las muestras 1 (10^8 copias μL^{-1}) y 2 (10^7 copias μL^{-1}) pueden ser consideradas positivas a simple vista. Después de las medidas electroquímicas realizadas para cada muestra, se estableció un valor de corte (± 3 veces la desviación estándar de las señales correspondientes a los controles negativos). Los resultados recogidos en la Figura 3D pueden confirmar que las muestras conteniendo de 10^8 a $2 \cdot 10^5$ copias μL^{-1} , pueden considerarse positivas mientras que la muestra con $1 \cdot 10^5$ copias μL^{-1} está por debajo del punto de corte.

Ejemplo 2

Amplificación RT-LAMP de un gen del SARS-CoV-2 para diagnóstico de COVID-19. Realizada sobre una celda electroquímica con electrodos serigrafiados y calentador integrado bajo la celda.

Una vez tomada la muestra (exudado nasofaríngeo o saliva) con ayuda de un hisopo se procede a la inactivación del virus (SARS CoV-2) por calentamiento y se realiza la extracción posterior del material genético. Se prepara una disolución premezcla de amplificación RT-LAMP conteniendo todos los reactivos necesarios para la amplificación. Se aplica el voltaje necesario entre los terminales del calentador para provocar el aumento de temperatura y situarla en la temperatura óptima capaz de producir la amplificación isoterma. La transcripción inversa (RT) produce la conversión de ARN en ADN y la reacción LAMP produce la amplificación del ADN. La mezcla de amplificación es de color rojo por la presencia de un indicador visual de pH, rojo de fenol, que presenta esta coloración a valores de pH cercanos a 8, que es la zona de pH inicial. A medida que transcurre la amplificación (con duración aproximada de 30 min) se van liberando protones y el pH disminuye, por lo que el indicador visual vira a amarillo (forma ácida del indicador). En la zona intermedia aparece una coloración naranja. Transcurrido el tiempo de amplificación se deja de aplicar el voltaje necesario para el calentamiento y se procede al registro de un voltamperograma cíclico en la ventana de potenciales comprendida entre +0,2 y +0,9 V. Se mide el potencial

de pico del proceso y la intensidad de corriente a un potencial fijo. Estos valores se comparan con los obtenidos para un blanco de reactivos. Un valor de potencial de pico superior (al valor medio más 3 veces la desviación estándar del valor del blanco, que correspondería al límite de detección) o un valor de intensidad de corriente menor (al valor medio menos 3 veces la desviación estándar del valor del una intensidad de corriente ligeramente inferior a la de pico, que correspondería al límite de detección) indicaría un resultado positivo, es decir, que se ha producido la amplificación de material genético y, por lo tanto, permite confirmar la presencia de virus. Alternativa o adicionalmente, se puede realizar el registro de un cronoamperograma a un potencial constante (inferior al potencial de pico del rojo de fenol cuando no ocurre amplificación) durante un tiempo determinado. Los valores de intensidad obtenidos se comparan con los obtenidos para un blanco de reactivos: un valor de intensidad menor (al valor medio menos 3 veces la desviación estándar del valor del blanco) indicaría un resultado positivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de material genético en una muestra biológica que comprende:

- a) extraer el material genético de la muestra biológica;
- b) adicionar el material genético a una mezcla de amplificación que comprende un indicador colorimétrico;
- c) amplificar el material genético mediante amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) o amplificación isoterma mediada por bucle con transcripción reversa (RT-LAMP);
- d) detectar la amplificación del material genético de la muestra biológica;

caracterizado porque la detección es una detección electroquímica, con medida del potencial y/o de la corriente, correspondiente al proceso redox diferenciado, en función del número de copias iniciales del material genético en el medio de amplificación, del indicador colorimétrico presente en la mezcla de amplificación.

2. El método según la reivindicación 1 caracterizado porque el indicador colorimétrico es rojo de fenol.

3. El método según alguna de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizado porque la etapa c) comprende las subetapas de c1) mezclar el material genético y los reactivos en la mezcla de amplificación; c2) homogenizar la mezcla de amplificación de la etapa c1); c3) calentar a 65°C durante el tiempo necesario para la amplificación del material genético contenido en la mezcla homogeneizada de la etapa c2).

4. El método según alguna de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque la etapa d) comprende las subetapas d1) transferir un volumen de la mezcla amplificada a una celda electroquímica conteniendo unos electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y electrodo auxiliar, y cubrir con dicha mezcla los tres electrodos d2) realizar un barrido de potenciales en una ventana que incluya el proceso redox del indicador y registrar la intensidad de corriente.

5. El método según alguna de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la técnica empleada para la detección electroquímica es una voltamperometría y/o una cronoamperometría.

6. El método según la reivindicación 5 caracterizado porque la voltamperometría es una voltamperometría cíclica o de barrido lineal.

7. Un dispositivo portable para detección electroquímica del método de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende:
- unidad de control;
 - celda electroquímica plana de tres electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar;
 - un calentador bajo la celda electroquímica;
 - 10 un potencióstato unido a la celda electroquímica mediante un conector;
 - amplificador de transimpedancia
 - un circuito de adecuación de señal, adquisición de datos, tratamiento de datos e interpretación de resultados;
 - una interfaz de usuario;
 - 15 conectividad inalámbrica y
 - batería.

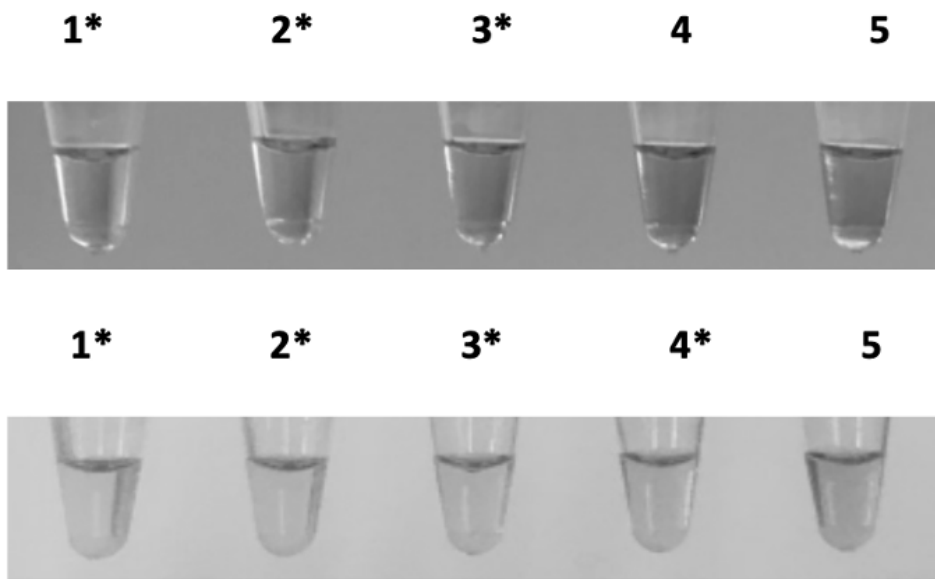


Figura 1 A y Figura 1B

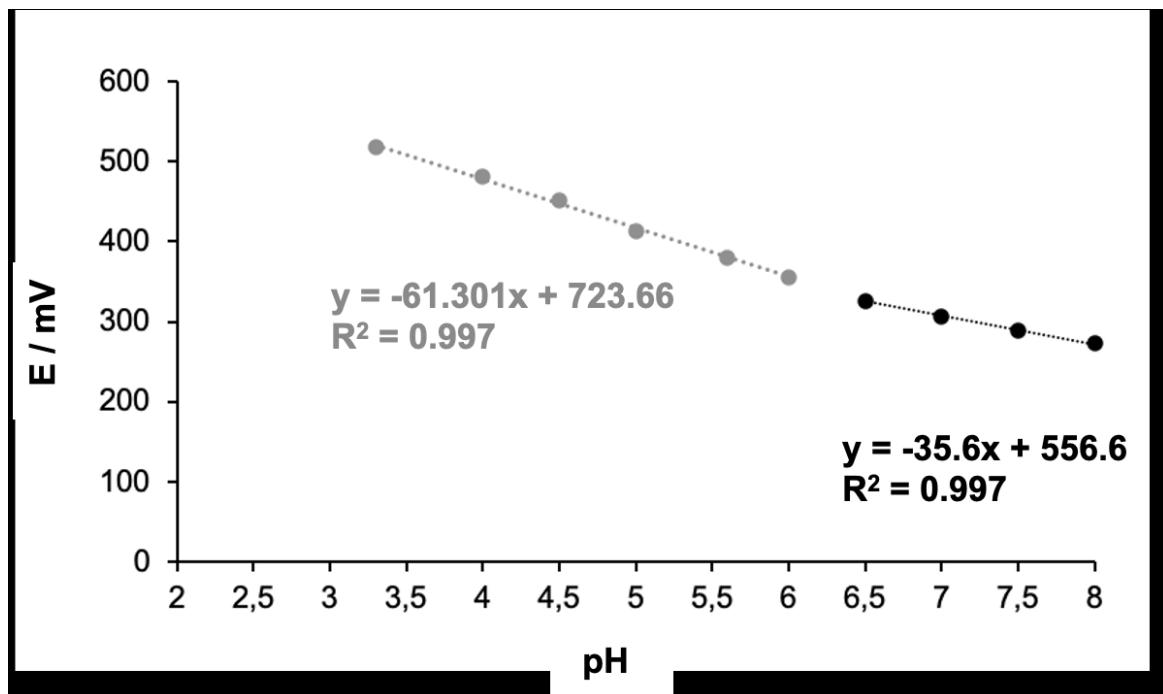


Figura 2

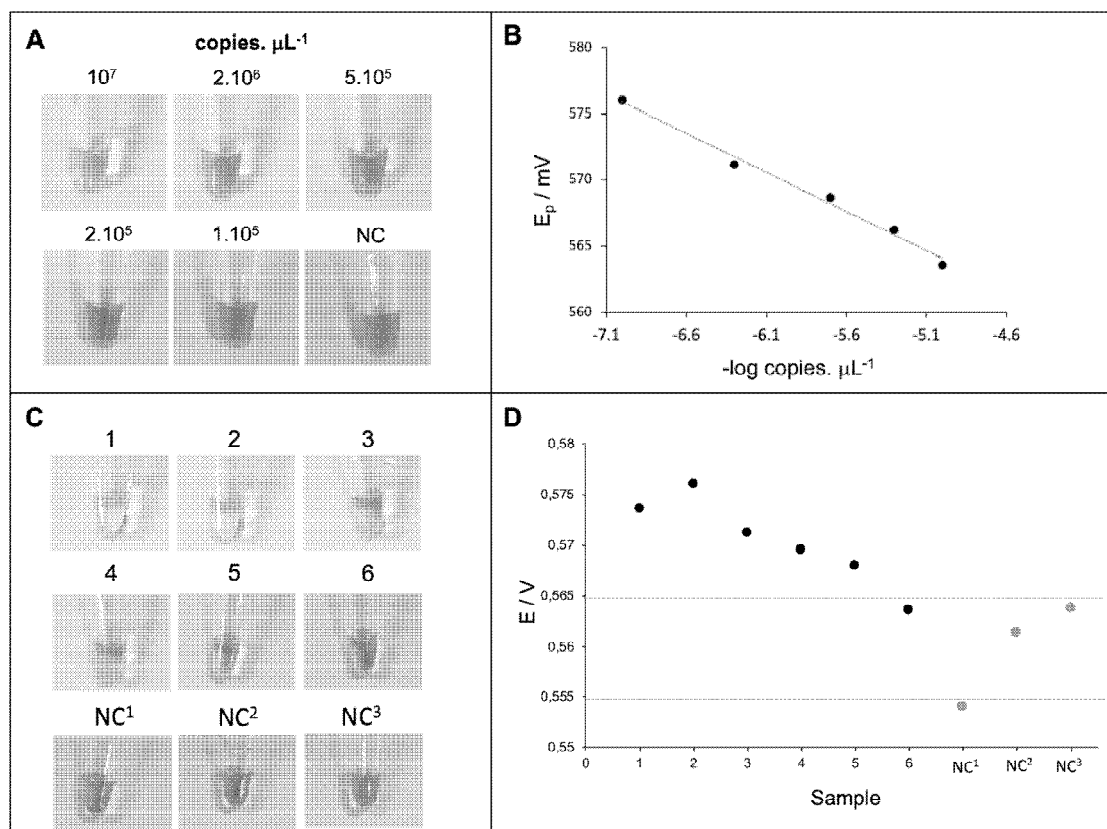


Figura 3 A-D

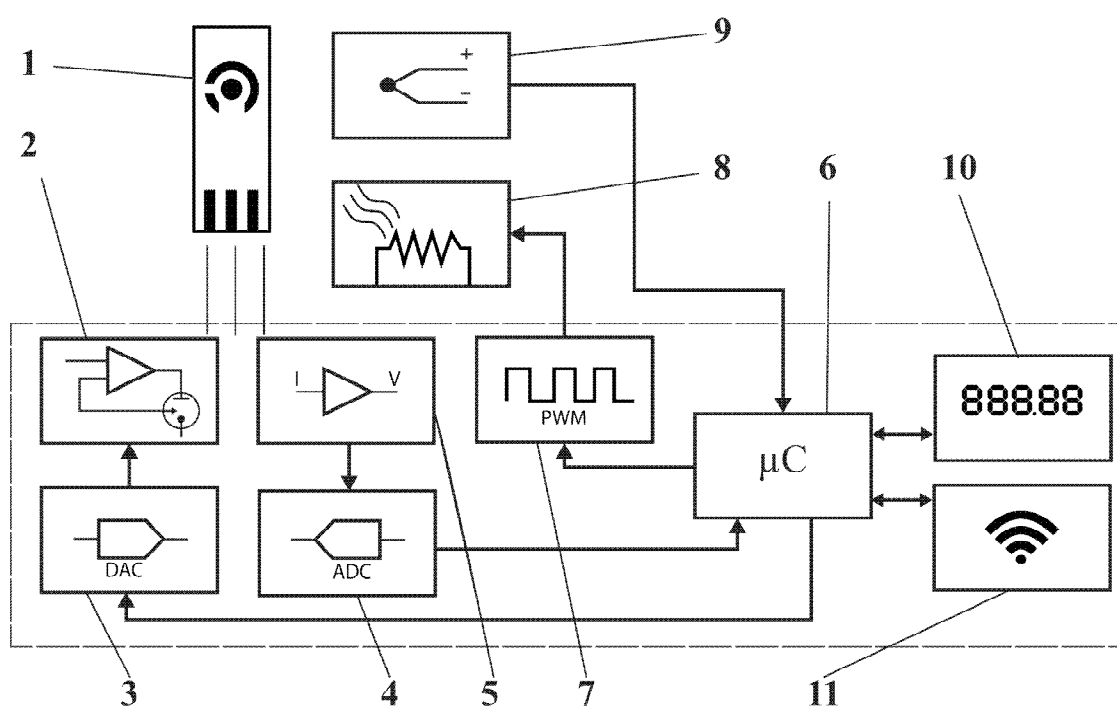


Figura 4

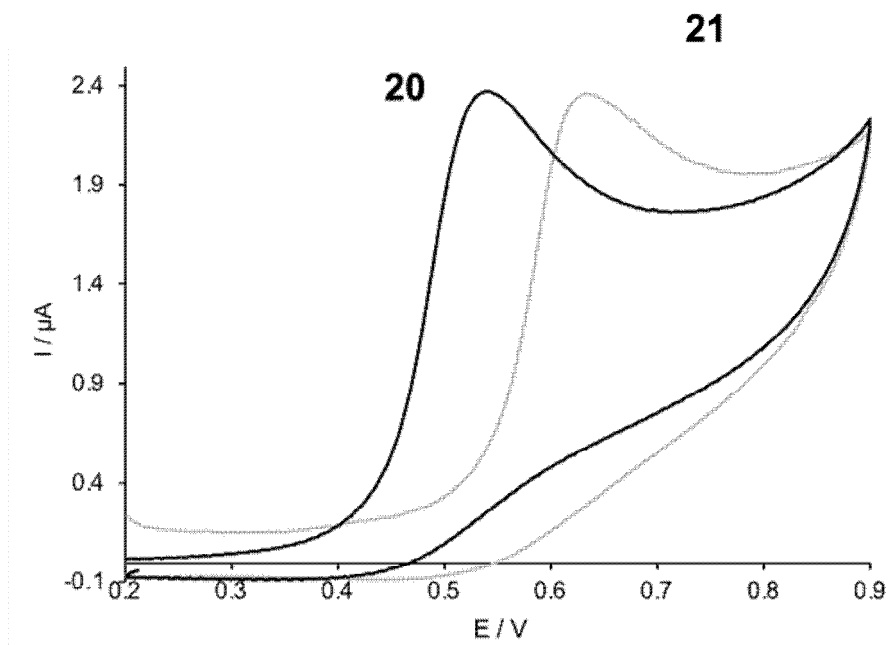


Figura 5

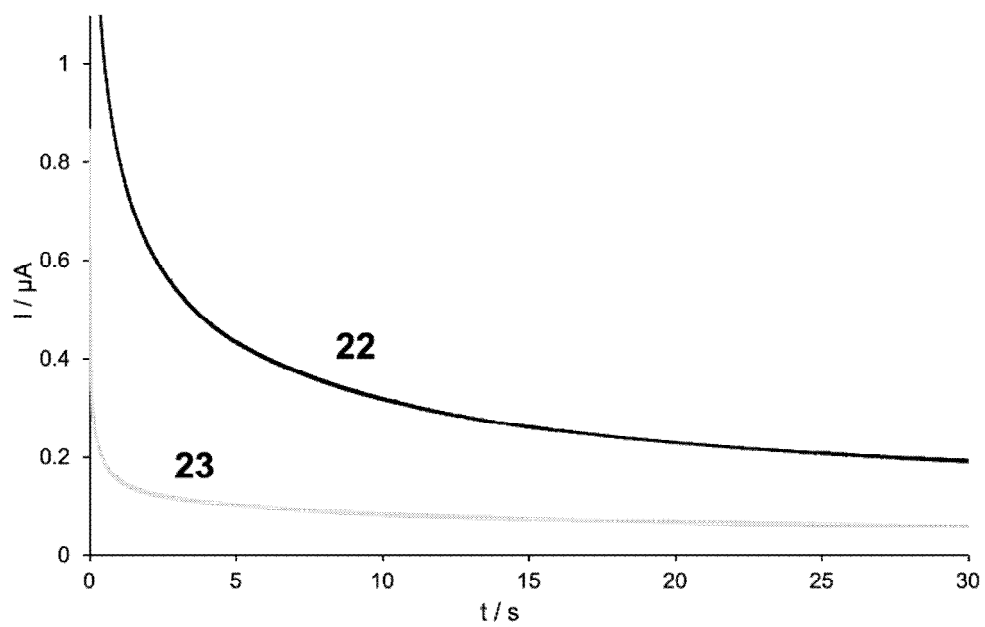


Figura 6



②① N.º solicitud: 202130697

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.07.2021

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2017209920 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS INC et al.) 07/12/2017, todo el documento.	1-7
A	WO 2015164770 A1 (DIASSESS INC) 29/10/2015, todo el documento.	1-7
A	MU-TAO HSIEH et al. Mechanistic investigation on the electropolymerization of phenol red by cyclic voltammetry and the catalytic reactions toward acetaminophen and dopamine using poly(phenol red)-modified GCE. Journal of Electroanalytical Chemistry 15 June 2017 Elsevier B.V. Netherlands., 15/06/2017, Vol. 795, Páginas 130 - 140, ISSN 1572-6657 (print), <DOI: doi:10.1016/j.jelechem.2017.05.001>. todo el documento, Resultados; Discusión, Figuras 1-3, 8.	1-7
A	SENNE, J.K. et al., Electrochemical reduction of phenol red. Analytical Chemistry, 1970, Vol. 42, Páginas 1147-1150, <DOI: DOI: 10.1021/ac60293a008>. todo el documento, Resultados y Discusión, Figuras 1 y 2.	1-7
X	SALM ERIC et al. Electrical detection of nucleic acid amplification using an on-chip quasi-reference electrode and a PVC REFET. Analytical chemistry United States 15 Jul 2014., 15/07/2014, Vol. 86, Páginas 6968 - 6975, ISSN 1520-6882 (Electronic), <DOI: doi:10.1021/ac500897t pubmed:24940939>. Métodos, Resultados, Figura 1.	7
X	KANG-HO LEE et al. A Sensitive Potentiometric Sensor for Isothermal Amplification-Coupled Detection of Nucleic Acids. Sensors July 2018 MDPI Switzerland. , 30/06/2018, Vol. 18, Páginas 2277 (10 pp.), ISSN 1424-8220 (print), <DOI: doi:10.3390/s18072277>. Materiales y métodos, Figuras 1 y 2.	7
X	TABATA M et al. Electrochemical real-time monitoring of isothermal nucleic acid amplification for quantitative analysis. 2015 Transducers - 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS). Proceedings 2015 IEEE Piscataway, NJ, USA., 30/11/2014, Páginas 1553 - 1556 [en línea][recuperado el 15/03/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=7181234>, ISSN ISBN 978-1-4799-8955-3, <DOI: doi:10.1109/TRANSDUCERS.2015.7181234>. Métodos experimentales, Figuras 1 y 2.	7
E, X	WO 2021198533 A1 (DIAGONAL BIO AB) 07/10/2021, Ejemplos, Figuras 4-9, Reivindicaciones.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.03.2022

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/6844 (2018.01)

G01N27/26 (2006.01)

G01N27/28 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET