

ENTREGABLE 5. EVALUACIÓN DE LOS BIOSENSORES PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO

1. Identificación de la entidad beneficiaria.

NIF	G-46421988
ACRÓNIMO	AINIA
NOMBRE COMPLETO	AINIA

2. Número de expediente, programa y actuación subvencionable.

Nº EXPEDIENTE	MDEEA/2021/98
PROGRAMA	PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS
ACTUACIÓN SUBVENCIONABLE	IMDEEA-PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS

3. Título del proyecto.

Tecnologías de detección rápida de microorganismos en alimentos. SAFEFOOD.

4. Objetivo.

El objetivo general del paquete de trabajo N.º 3 Evaluación del control microbiológico mediante biosensores fuera de línea era demostrar la viabilidad del control microbiológico de productos alimenticios fuera de línea mediante la tecnología de biosensores.

Para ello, se plantearon los siguientes dos objetivos particulares:

- Evaluar la tecnología de biosensores acústicos con muestras inoculadas en el laboratorio en el primer periodo de ejecución.
- Desarrollar un prototipo para la estimación de los niveles de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales en el segundo periodo de ejecución.

5. Actividades desarrolladas.

Definición del formato del ensayo de detección

La detección de bacterias basada en la tecnología de microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCMD, del inglés *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*) puede basarse en dos estrategias: la detección de bacterias completas o de antígenos bacterianos.

En el caso de las bacterias completas, podría inmovilizarse sobre la superficie del sensor anticuerpos, aptámeros o lectinas que reconozcan específicamente antígenos o glicanos expuestos en la superficie bacteriana. Con esta aproximación, la superficie QCMD funcionalizada sería expuesta a soluciones con concentraciones variables de bacteria para determinar el límite de detección (LOD, del inglés *Limit Of Detection*). Hasta la fecha el LOD para la detección de bacterias completas es de $10^5 - 10^6$ ufc/ml.

En el caso de los antígenos bacterianos, existen varias posibilidades para llevar a cabo esta estrategia: la adsorción directa inespecífica, el inmunoensayo tipo sándwich y el inmunoensayo competitivo. Todas ellas implican la lisis química o mecánica de las bacterias, seguida de la detección mediante QCMD.

En la adsorción directa inespecífica (Figura 1), los componentes de la bacteria se adsorben directamente sobre el sensor. Después, las adsorciones inespecíficas se bloquean con BSA o leche. Por último, la detección se realiza utilizando anticuerpos específicos contra la especie o cepa de interés. Es posible amplificar la señal acústica utilizando un anticuerpo secundario modificado con biotina. De esta manera, la señal es amplificada mediante la unión de estreptavidina y, finalmente, con la adición de nanopartículas biotiniladas para amplificar el LOD.

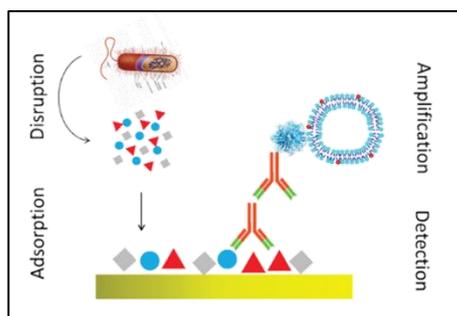


Figura 1. Detección directa mediante adsorción de antígenos bacterianos

En el inmunoensayo tipo sándwich (Figura 2), la superficie QCMD se funcionaliza con un anticuerpo o aptámero específico del antígeno objetivo. A continuación, las partículas bacterianas se pasan por el sensor y, por último, un anticuerpo o aptámero secundario se utiliza para amplificar la señal.

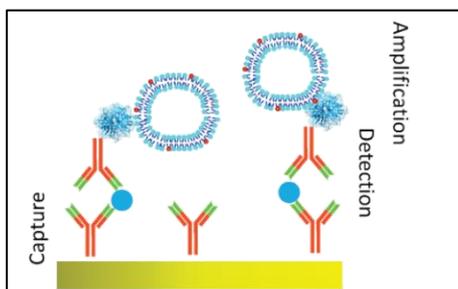


Figura 2. Inmunoensayo tipo sándwich. Captura y detección de antígenos bacterianos.

En el inmunoensayo competitivo (Figura 3), el antígeno de interés se inmoviliza sobre el sensor QCMD. Seguidamente, los productos bacterianos se mezclan con el anticuerpo y

la mezcla se pasa a través del sensor. La presencia de antígenos bacterianos presentes anteriormente en el sensor evita que el anticuerpo se adsorba sobre el sensor. De esta manera, la concentración de antígeno en la muestra puede determinarse mediante una curva de calibración. Este tipo de ensayos es más sensible que el inmunoensayo tipo sándwich, con el inconveniente de que no es válido para antígenos de gran tamaño. Así, la cantidad de anticuerpo unido a la superficie disminuye de manera inversamente proporcional a la concentración de antígeno en solución (imagen de la derecha).

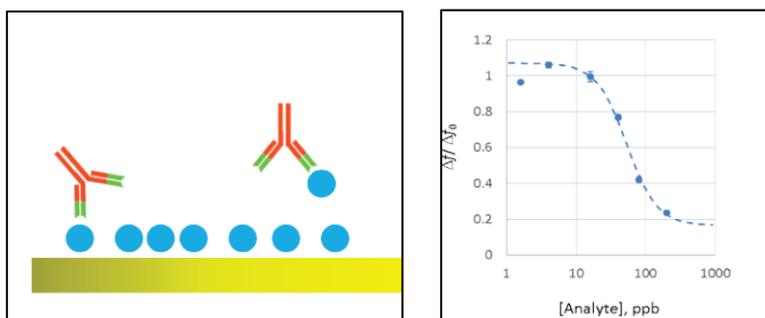


Figura 3. Inmunoensayo competitivo. El antígeno (azul) es inmovilizado en la superficie del sensor. Después, la mezcla antígeno-anticuerpo se pasa sobre el sensor.

Considerando los diferentes inmunoensayos disponibles, el protocolo seleccionado fue el de tipo sándwich. En este, se debe anclar covalentemente un anticuerpo específico contra *Listeria* a la superficie del sensor. A continuación, se debe pasar la mezcla de antígenos bacterianos y, por último, un anticuerpo secundario se encarga de amplificar la señal.

Definición del protocolo de solubilización de las membranas de las bacterias

Previamente a la implementación del inmunoensayo tipo sándwich, se requirió la optimización de la extracción y el aislamiento de los antígenos procedentes de *Listeria*. A este respecto también se estudiaron diferentes estrategias (Figura 4): el aislamiento de antígenos procedentes de la bacteria completa y el aislamiento de antígenos de membrana.

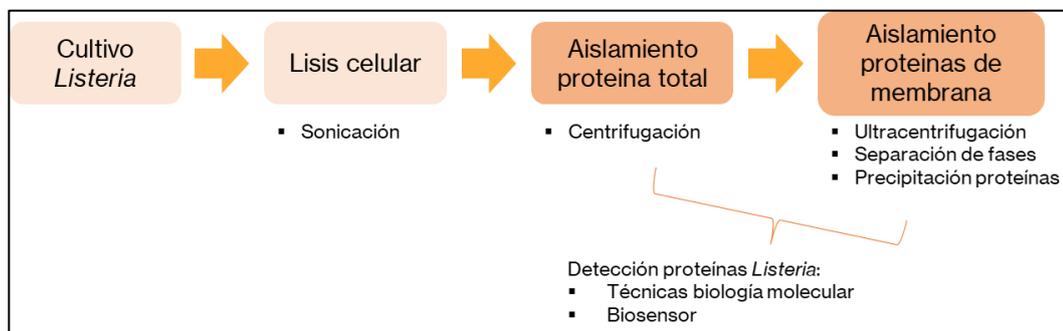


Figura 4. Proceso de extracción y aislamiento de las proteínas totales y proteínas de membrana de *Listeria*.

Por un lado, en el aislamiento de antígenos procedentes de la bacteria completa, el cultivo de *Listeria* se somete a un proceso de lisis celular mecánico por sonicación.

Seguidamente, se aíslan mediante centrifugación los antígenos solubles y estos se suministran al sensor, previamente funcionalizado con el anticuerpo primario específico contra alguno de los antígenos aislados.

Por otro lado, en el aislamiento de antígenos de membrana (Venkatesh Padmanabhan, G. Arun Govind, 2018), el cultivo de *Listeria* también se lisa mecánicamente mediante sonicación. La muestra resultante se somete a un doble proceso de centrifugación: en primer lugar, se centrifuga y, en segundo lugar, el sobrenadante resultante se ultracentrifuga. A partir del sedimento obtenido, se extraen las proteínas de membrana utilizando detergente Zwittergent 3-14. Para ello, la muestra se incuba con (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 0.4% Zwittergent™ 3-14) durante 4-6 horas a 37°C. Seguidamente, se centrifuga y el extracto se somete a separación de fases en Tritón X-114 al 5% y un gradiente de glicerol (agente de separación). La muestra resultante se centrifuga de nuevo, obteniéndose dos fases diferenciales. A partir de la fase superior se precipitan las proteínas, utilizando acetona a 4°C. Después, las muestras se centrifugan una última vez y el sedimento obtenido se resuspende en solución salina (50 mM fosfato de sodio monobásico, 50 mM fosfato de sodio dibásico, 150 mM cloruro de sodio, pH 7,6), constituyendo las proteínas de membrana aisladas.

Considerando el tiempo necesario para la extracción de proteínas de membrana de *Listeria*, se concluyó que la aproximación más fácilmente implementable sería el protocolo dirigido a la detección de antígenos de la bacteria completa. No obstante, se decidió ensayar ambos protocolos con el fin de identificar aquel más sensible para el objetivo de SAFEFOOD.

Caracterización del crecimiento de *Listeria innocua*

Se realizó una caracterización del crecimiento de *Listeria innocua*. Aunque el objetivo último del proyecto es la detección de *Listeria monocytogenes*, se planteó esta primera aproximación para la optimización del protocolo de detección de antígenos con una cepa segura e inocua y, en consecuencia, más fácil de manipular.

Se caracterizó el crecimiento en biorreactor de 5 litros. De esta manera, empleando un inóculo al 1%, *Listeria innocua* se cultivó en medio TSB a 37°C a 200 rpm y 1,5 L/min de aireación. El crecimiento del microorganismo se siguió mediante la evaluación de la densidad óptica a 600 nm (D.O. 600nm) y recuento de ufc/ml en placa. Además, se determinó la biomasa obtenida de cultivo, resultando en 9 g.

Como se observa en la Figura 5, *L. innocua* alcanzó la fase de crecimiento estacionaria tras 12 horas de cultivo. Por tanto, el proceso empleado se consideró optimizado a fin de recuperar la mayor cantidad de biomasa para los siguientes ensayos de reconocimiento de antígeno.

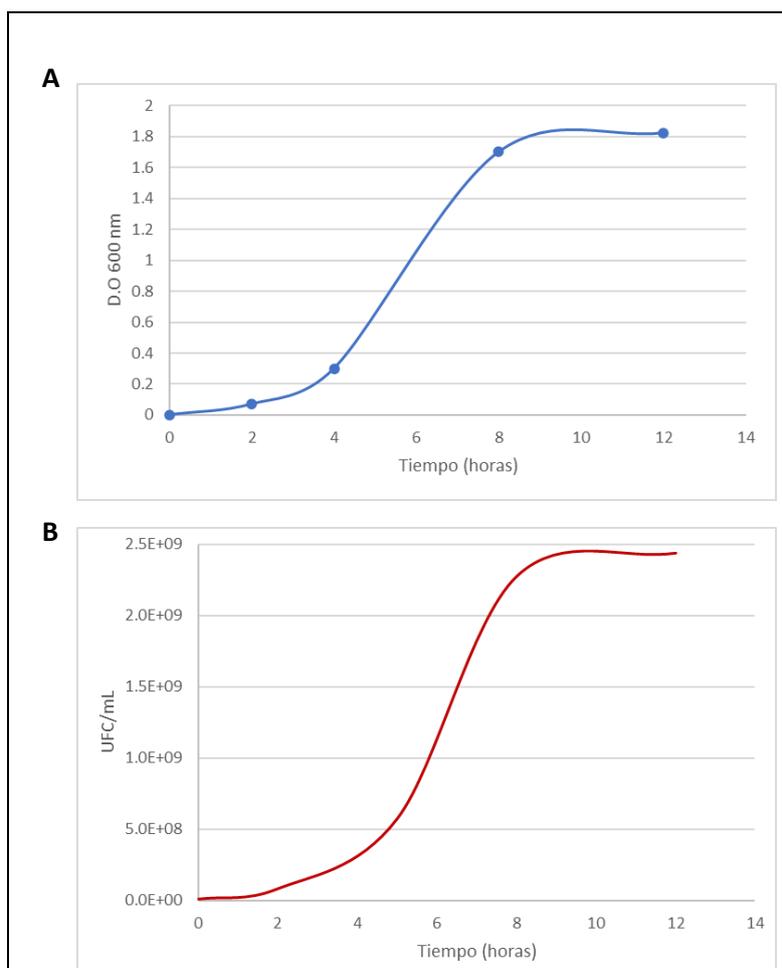


Figura 5. Caracterización del crecimiento de *L. innocua* mediante D.O. 600nm (A) y recuento de ufc/ml (B) tras 24 horas de crecimiento.

Optimización del protocolo de limpieza de los sensores

Previamente al inicio de un nuevo ensayo de funcionalización, en el caso de sensores que hayan sido modificados covalentemente, es necesario eliminar la capa de materia orgánica (p. ej., grupos tiol, PEG-tiol, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) anclada sobre la superficie.

Existen diferentes protocolos de limpieza con diferentes eficiencias respecto a la capacidad de limpieza de la superficie (Figura 6) (Fischer et al., 2009). Entre todos ellos, habitualmente, se emplea la disolución piraña ($H_2SO_4 + H_2O_2$) por su elevada capacidad de limpieza. No obstante, se acordó evaluar la eficacia de la solución $KOH + H_2O_2$ como alternativa como parte de la investigación en el presente proyecto, dados los buenos resultados recogidos en la bibliografía, así como también una mayor rapidez del proceso, ya que no requiere del tratamiento posterior del sensor con radiación UV-ozono, al contrario que la limpieza con disolución piraña.

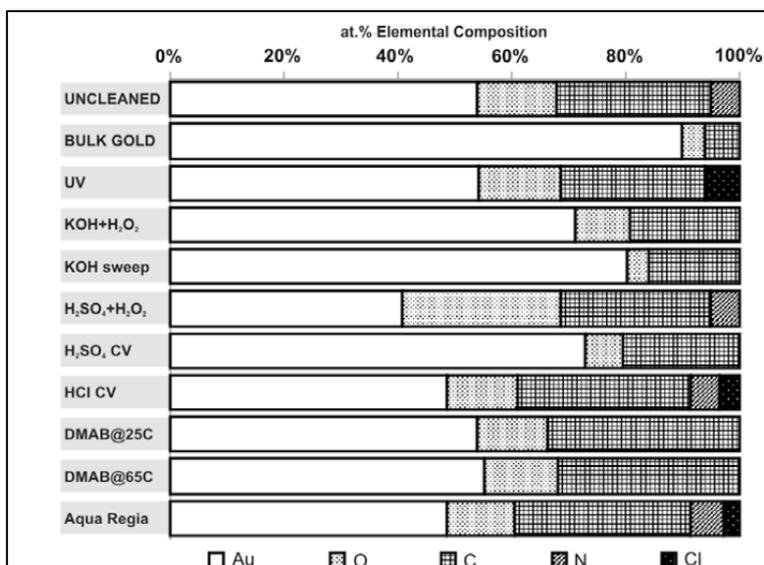


Figura 6. Composición de la superficie de oro tras cada protocolo de limpieza (Fischer et al., 2009)

Tabla 1. Protocolos de limpieza del sensor.

Paso	KOH + H ₂ O ₂	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂
1	2% SDS (30 minutos)	
2	Aclarado H ₂ O destilada	
3	50 mM KOH + 25% H ₂ O ₂ (10 minutos)	50 mM H ₂ SO ₄ + 25% H ₂ O ₂ (3 minutos)
4	Aclarado H ₂ O destilada	
5	UV-Ozono (15 minutos)	
6	EtOH (15 minutos)	
7	Secado e instalación	

Para evaluar la eficacia del nuevo protocolo de lavado con KOH + H₂O₂, se comparó la capacidad de adsorción de un sensor nuevo y un sensor ya utilizado tras ser lavado con KOH. Concretamente, se evaluó la capacidad de absorción de 100 µg de BSA.

Como puede observarse en las gráficas, tanto el sensor nuevo (Figura 7A), como el sensor ya utilizado previamente y tras el lavado con KOH (Figura 7B), presentaron una capacidad equivalente de adsorción de BSA. La cantidad de BSA suministrada al sensor (100 µg) representó un exceso de proteína capaz de saturar la superficie de funcionalización. De esta manera, se demostró la eficacia del protocolo de limpieza con KOH + H₂O₂ para eliminar los grupos funcionales previamente anclados sobre el sensor, dejando la superficie completamente disponible para una nueva funcionalización. Tanto el sensor nuevo como el lavado fueron capaces de adsorber en torno a 350 ng/cm² de BSA. De esta manera, se optó por seleccionar el presente protocolo de limpieza para los sucesivos experimentos.

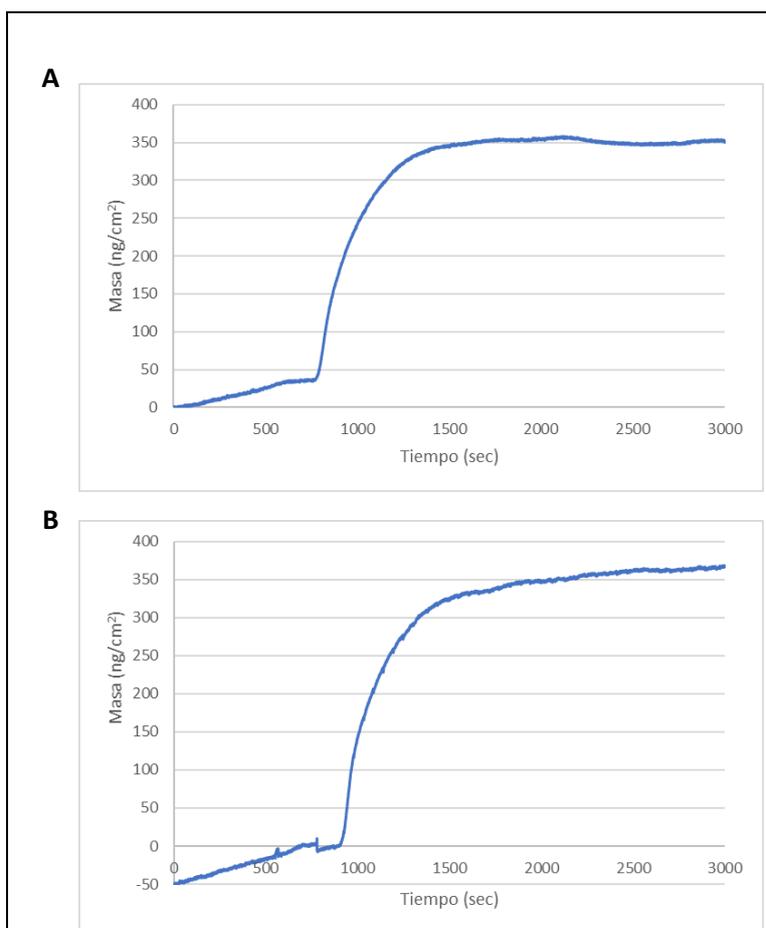


Figura 7. Absorción de BSA sobre un sensor nuevo lavado con KOH (A) y absorción de BSA sobre un sensor utilizado previamente lavado con KOH (B).

Selección y validación de los anticuerpos de *Listeria innocua*

Para la detección preliminar específica de *L. innocua* empleando el biosensor, se realizó una selección y validación de anticuerpos previa. En primer lugar, se seleccionaron dos anticuerpos disponibles comercialmente (Tabla 2):

Tabla 2. Anticuerpos seleccionados contra *Listeria*.

Ref. anticuerpo	Microorganismo diana
LZF7	<i>L. monocytogenes</i>
ABIN2145902	<i>Listeria spp.</i>

La especificidad de los diferentes anticuerpos seleccionados se evaluó mediante Dot Blot. La reactividad de los anticuerpos se evaluó frente a diferentes cepas de *Listeria*: *Listeria ivonovii* (CECT 913), *Listeria monocytogenes* (CECT 940), *Listeria innocua* (CECT 910) y *Listeria monocytogenes* (CECT 4032).

Los resultados obtenidos demostraron que ninguno de los anticuerpos seleccionados reaccionó frente a ninguna de las cepas de *Listeria*. Por tanto, se realizó una optimización

de las diluciones de anticuerpo primario y secundario a utilizar, así como la dilución de cultivo.

Funcionalización de los sensores

En primer lugar, se realizó un ensayo dirigido a la adsorción de un anticuerpo primario sobre la superficie del sensor, así como a evaluar la masa adsorbida (Figura 8). Tras el bloqueo utilizando BSA, se realizaron incorporaciones seriadas de concentraciones crecientes de anticuerpo primario. Los resultados indicaron la detección de la señal a partir de la concentración de 50 nM, lo que se tradujo en un incremento de masa de en torno a 300 ng/cm². La concentración más elevada utilizada, 100 nM, supuso 400 ng/cm² adicionales sobre la superficie del biosensor.

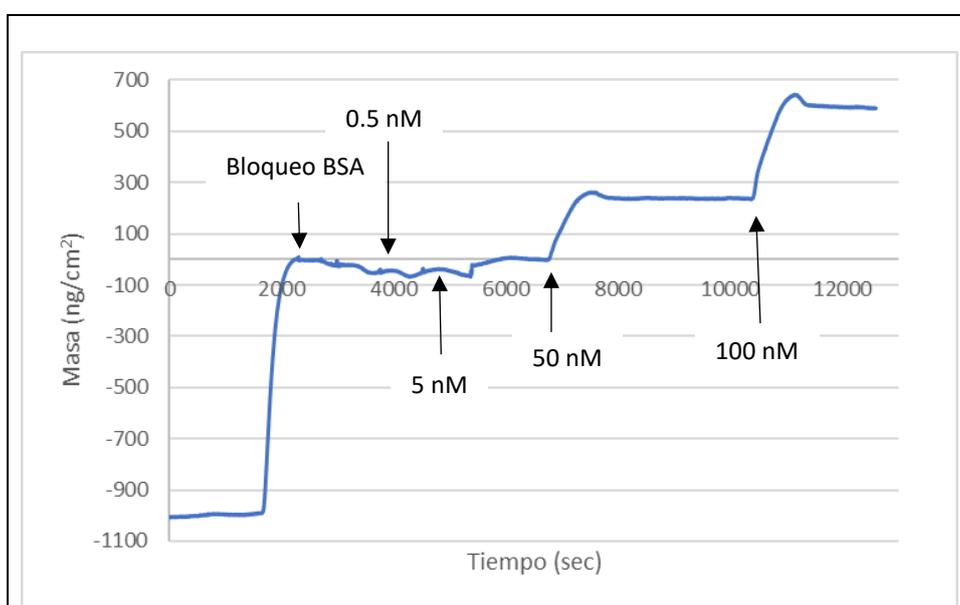


Figura 8. Adsorción de concentraciones crecientes de anticuerpo primario. Las flechas indican el momento de adición del anticuerpo y sus concentraciones.

En segundo lugar, se realizó el ensayo dirigido al reconocimiento del anticuerpo primario mediante un anticuerpo secundario para simular un inmunoensayo tipo sándwich (Figura 9). Tras la funcionalización con el anticuerpo primario, se observó un incremento en la masa adsorbida en el sensor. A continuación, se realizó un bloqueo con BSA para funcionalizar los sitios del sensor que hubieran podido quedar libres. Por último, se aplicó el anticuerpo secundario, observándose de nuevo un incremento en la masa absorbida sobre el sensor, debido al reconocimiento específico del anticuerpo primario.

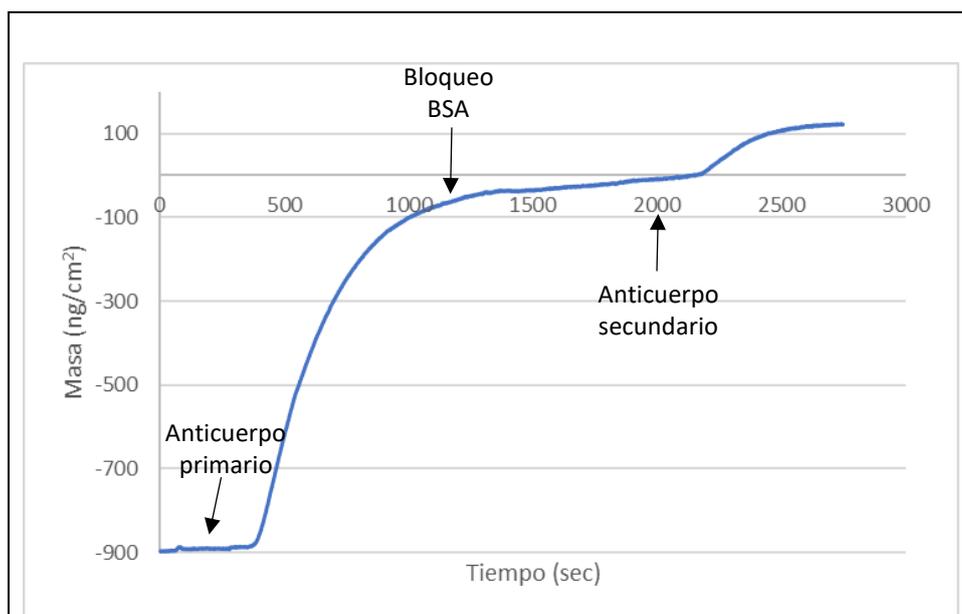


Figura 9. Inmunoensayo tipo sándwich. Las flechas indican el momento de adición del anticuerpo y sus concentraciones.

Estudio microscópico de los sensores

En primer lugar, el sensor QCMD se funcionalizó en distintas etapas. Cada una de estas etapas se observó a posteriori mediante microscopía AFM. El primer paso consistió en la funcionalización del sensor con una SAM mixta (16-MHDA / 11- MUOH) a través de un grupo tiol. A continuación, se añadió el anticuerpo primario mediante inmovilización covalente a través de un enlace amida entre el grupo carboxilo presente en la SAM y los grupos amino aportados por el anticuerpo. Por último, se unió el anticuerpo secundario gracias al reconocimiento específico con el anticuerpo primario.

Así pues, se observaron los siguientes sensores:

- Un sensor limpio, en seco y mojado.
- Un sensor con una SAM mixta (16-MHDA / 11- MUOH) en su superficie.
- Un sensor con anticuerpos primarios unidos a la SAM.
- Un sensor con anticuerpos secundarios unidos a los anticuerpos primarios.

Las muestras se observaron en un microscopio AFM (Bruker, modelo CON Dimension). Para la adquisición de datos se utiliza el método Scan Asyst en disolución. El modo exclusivo ScanAsyst® de Bruker ofrece varias funciones automáticas: optimiza la imagen para obtener resultados más rápidos y consistentes; ajusta continuamente la tasa de escaneo, el punto de ajuste y las ganancias para obtener imágenes de mayor calidad; y monitoriza continuamente la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, eliminando así la desviación del punto de ajuste. La punta utilizada fue de nitruro de silicio con geometría triangular (20nm), con una frecuencia de resonancia en el rango 100-200 KHz y una constante de resonancia media de 0.7 nm.

El tratamiento posterior de las imágenes de las muestras se realizó con el programa Gwyddion.

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas:

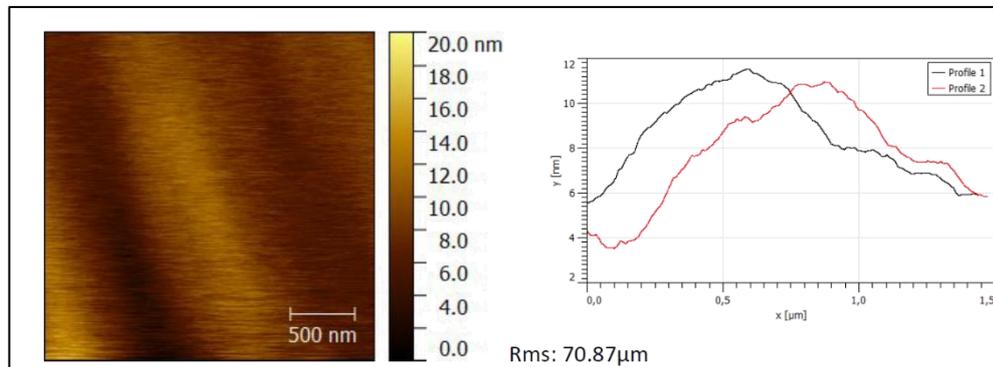


Figura 10. Imagen de un sensor en seco y de su perfil de 20 x 20 micras con 512 líneas.

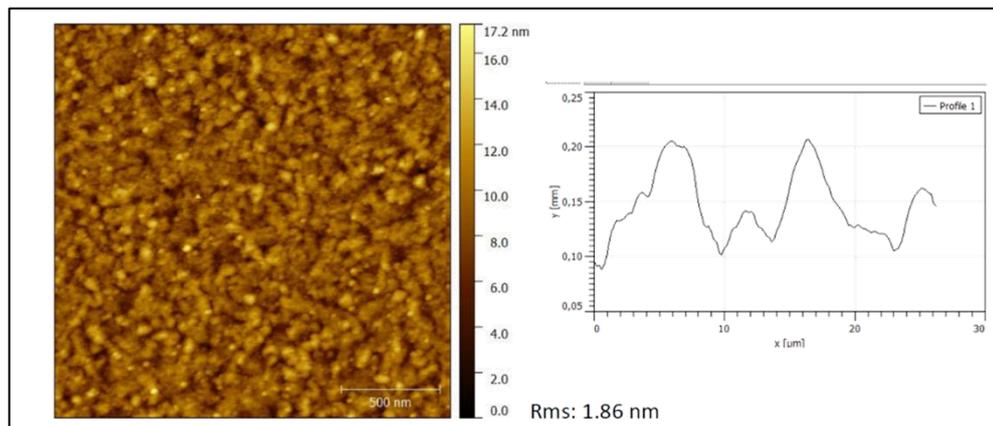


Figura 11. Imagen de un sensor en disolución y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas.

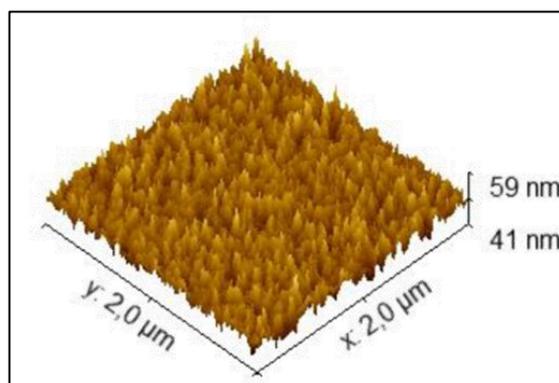


Figura 12. Imagen de un sensor en disolución y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas en 3D.

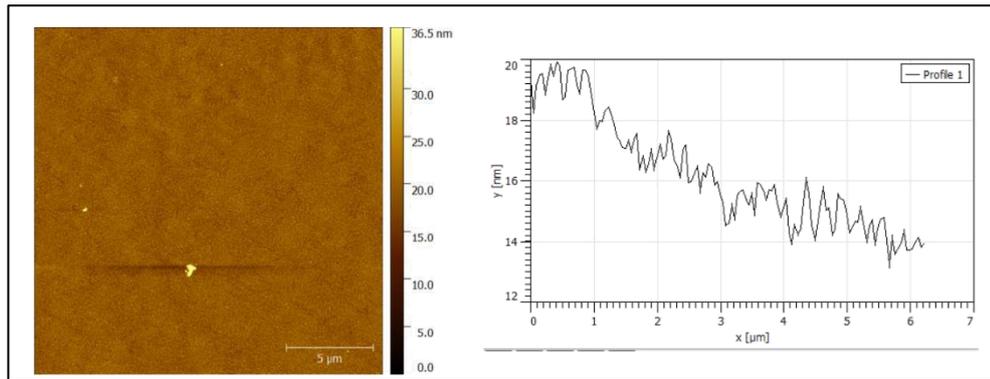


Figura 13. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta y de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas.

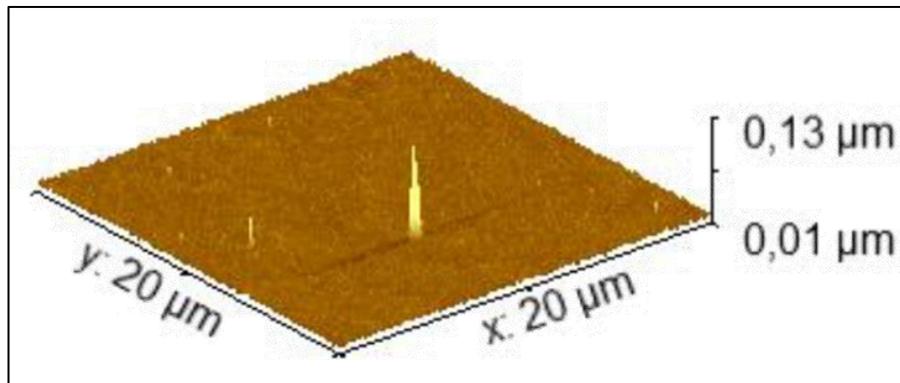


Figura 14. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta y de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas en 3D.

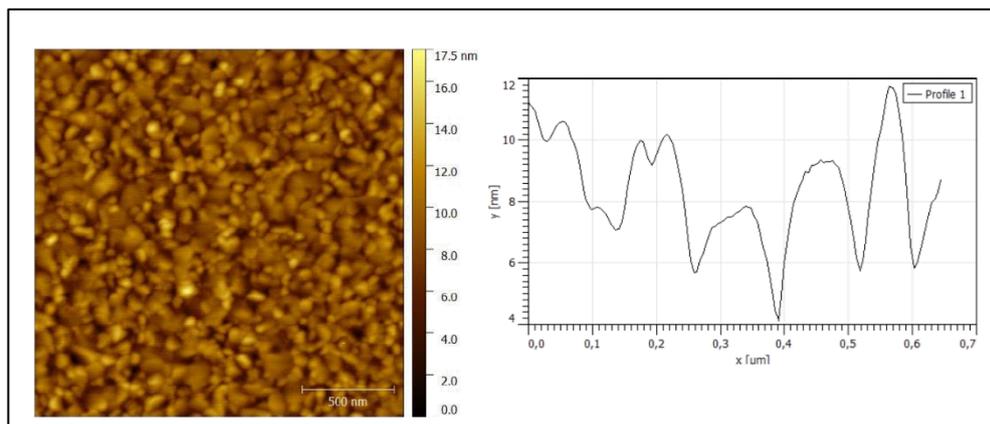


Figura 15. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas.

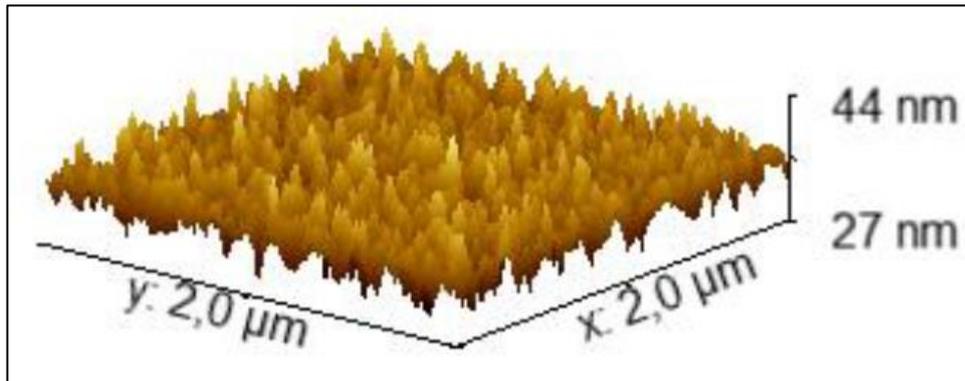


Figura 16. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas en 3D.

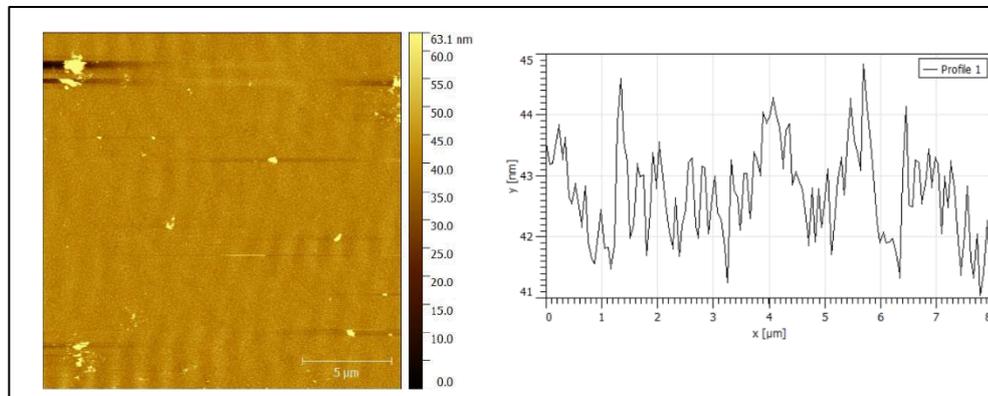


Figura 17. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas.

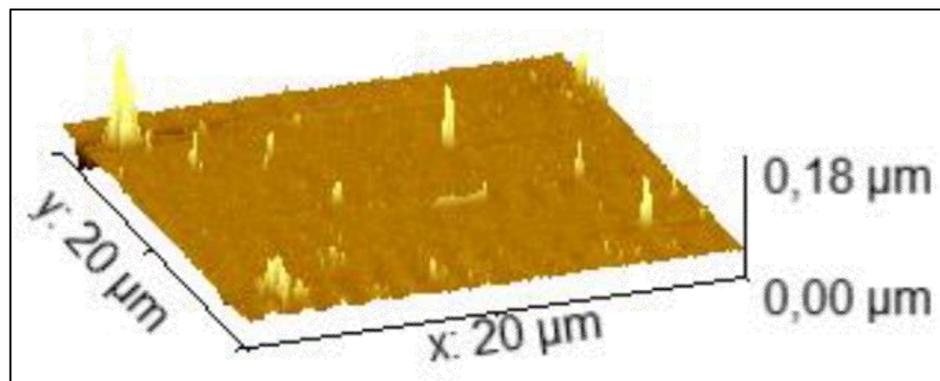


Figura 18. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas en 3D.

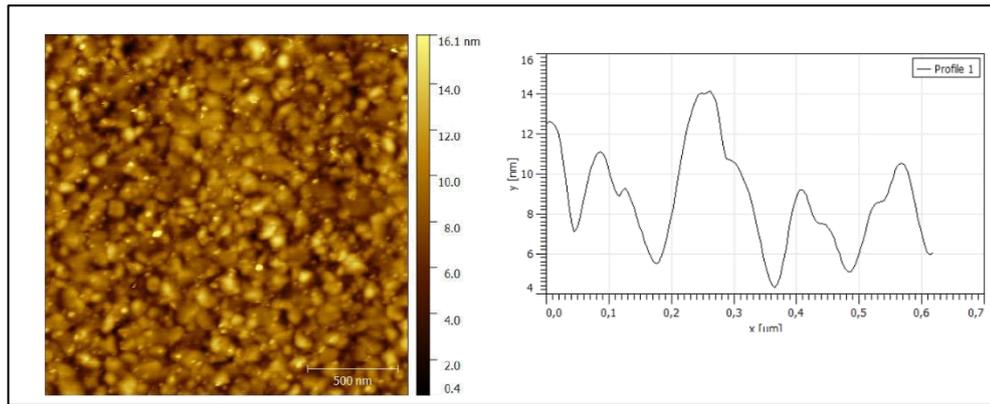


Figura 19. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas.

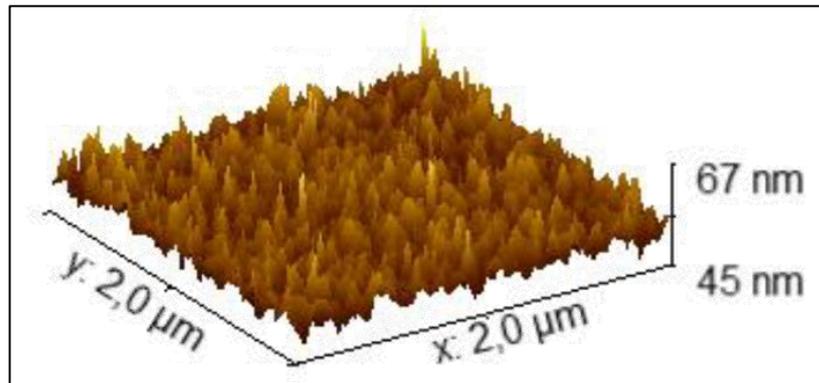


Figura 20. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas en 3D.

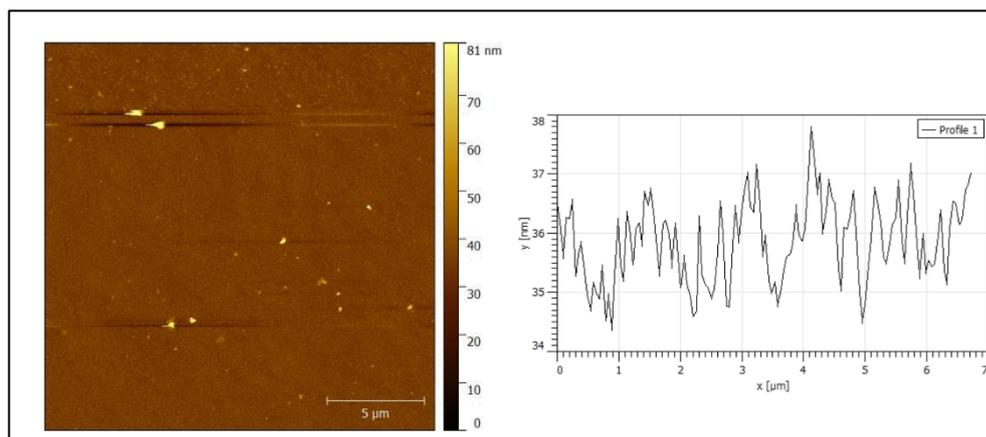


Figura 21. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y secundarios de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas.

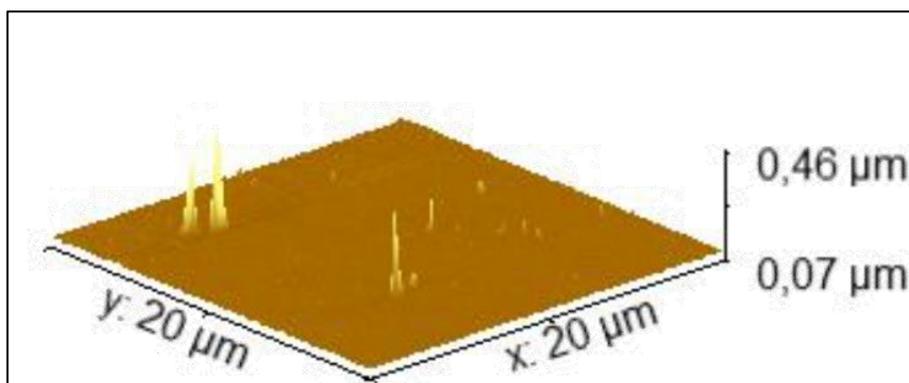


Figura 22. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y secundarios de su perfil de 20x20 micras con 512 líneas en 3D.

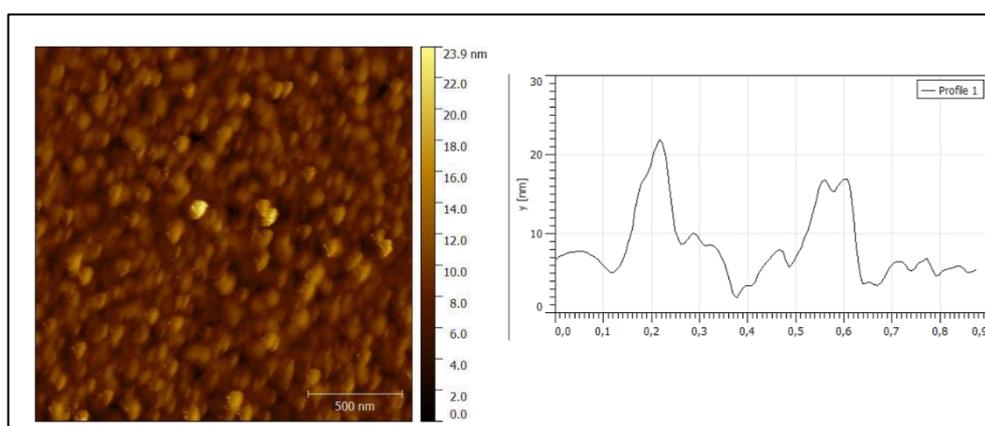


Figura 23. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y secundarios de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas.

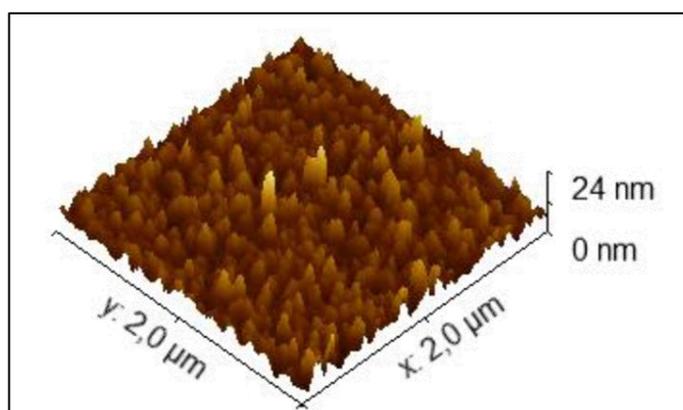


Figura 24. Imagen de un sensor en disolución con SAM mixta con anticuerpos primarios y secundarios de su perfil de 2x2 micras con 512 líneas en 3D.

A la vista de los resultados obtenidos, se pudieron determinar distintas morfologías según las distintas muestras tratadas. Las medidas del perfil y de la rugosidad media nos indicaron una altura de unos 2 nm en las imágenes cuando las muestras fueron observadas en escalas pequeñas. En cambio, cuando se realizó el análisis de las imágenes

de tamaño 20x20 nm, aparecieron algunos motivos más grandes y la rugosidad media de la imagen aumentó a valores de 4 nm.

Una de las opciones esperadas era la posibilidad de ir aumentando en altura conforme se iban añadiendo al sensor los distintos materiales. Sin embargo, en las imágenes estudiadas este fenómeno no se apreció. No obstante, la morfología de las imágenes y el tamaño de grano sí aumentó conforme se habían añadido al medio los distintos anticuerpos.

6. Conclusiones.

- Se han evaluado diferentes aproximaciones descritas en la bibliografía dirigidas al reconocimiento de patógenos empleando el biosensor. Se ha escogido el inmunoensayo tipo sándwich para la detección de *Listeria* y evaluar la detección de antígenos procedentes de la bacteria completa y antígenos de membrana.
- Se han evaluado 2 procedimientos para el reconocimiento de antígenos de *Listeria*. Por un lado, el reconocimiento de antígenos procedentes de la bacteria completa y, por otro lado, el aislamiento y reconocimiento de antígenos de membrana. En los siguientes pasos se evaluará cuál de las opciones ofrece mayor sensibilidad como método de detección.
- Se ha caracterizado el crecimiento de *Listeria innocua*, consiguiendo una cepa modelo con la que optimizar posteriormente el protocolo de reconocimiento de antígenos de patógenos.
- Se ha optimizado un protocolo de limpieza basado en KOH y H₂O₂ alternativo a la limpieza con la solución piraña e irradiación con ozono-UV que aporta una mayor rapidez a la limpieza del sensor entre experimentos.
- Se han evaluado los anticuerpos seleccionados contra 4 cepas diferentes de *Listeria* mediante Dot-Blot. Los resultados negativos obtenidos indican la necesidad de la puesta a punto de las diluciones tanto del organismo diana como de los anticuerpos empleados.
- Se ha optimizado el protocolo de funcionalización del anticuerpo primario mediante adsorción sobre el sensor.
- Se ha ensayado un inmunoensayo tipo sándwich para el reconocimiento específico de los anticuerpos primarios adsorbidos sobre el sensor mediante anticuerpos secundarios.
- Se ha funcionalizado la superficie del sensor con una SAM 16-MHDA / 11- MUOH. Sobre esta se ha anclado covalentemente un anticuerpo primario para favorecer el reconocimiento específico por parte del anticuerpo secundario.
- Se han evaluado los pasos intermedios en la funcionalización del sensor mediante microscopía AFM. Los resultados muestran un cambio en la morfología de los sensores conforme se avanza en dicho proceso, así como un aumento en el tamaño de grano.
- Los siguientes pasos incluyen, en primer lugar, la optimización de la purificación de antígenos procedentes de diferentes cepas de *Listeria*. También se llevará a cabo la funcionalización covalente del sensor con anticuerpos específicos para la detección de *L. innocua* y, posteriormente, de *L. monocytogenes*. Por último, se desarrollará el protocolo para la detección de *L. monocytogenes* de manera específica y sensible, siendo capaz de discernir entre diferentes cepas de *Listeria*.