

SENSORI DI IBRIDAZIONE DI DNA BASATI SU MICROCANTILEVER PER L'IDENTIFICAZIONE DI *SALMONELLA*

Microcantilver-based DNA hybridization sensors for Salmonella identification

Patti Rossella^{1*}, Bottero Maria Teresa¹, Dalmaso Alessandra¹, Grassi Ausilia¹, Ferrante Ivan², Santoro Karin², Ciprianetti Niccolò², Ricciardi Carlo²

*Corresponding author. Tel: (+39) 011.6709219; Fax: (+39) 011.6709224. E-mail: rossella.patti@unito.it

¹Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Torino, Italia.

²Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia, Politecnico di Torino, Torino, Italia.

ABSTRACT

The detection of pathogenic microorganisms in foods remains a challenging since the safety of foodstuffs has to be ensured by the food producing companies. Conventional methods for the detection and identification of bacteria mainly rely on specific microbiological and biochemical identification. Biomolecular methods, are commonly used as a support for traditional techniques, thanks to their high sensitivity, specificity and not excessive costs. However, new methods like biosensors for example, can be an exciting alternative to the more traditional techniques for the detection of pathogens in food. In this study we report *Salmonella enterica* serotype Enteritidis DNA detection through a novel class of label-free biosensors: microcantilevers (MCs). In general, MCs can operate as a microbalance and is used to detect the mass of the entities anchored to the cantilever surface using the decrease in the resonant frequency. We use DNA hybridization as model reaction system and for this reason, specific single stranded probe DNA of the pathogen and three different DNA targets (single-stranded complementary DNA, PCR product and serial dilutions of DNA extracted from *S. Enteritidis* strains) were applied. Two protocols were reported in order to allow the probe immobilization on cantilever surface: i) MC surface was functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde and an amino-modified DNA probe was used; ii) gold-coated sensors and thiolated DNA probes were used in order to generate a covalent bonding (Th-Au). For the first one, measures after hybridization with the PCR product showed related frequency shift 10 times higher than hybridization with complementary probe and detectable signals were obtained at the concentrations of 10^3 and 10^6 cfu/mL after hybridization with bacterial DNA. There are currently optimizations of the second protocol, where preliminary results have shown to be more uniform and therefore more precise within each of the three hybridizations.

Keywords: Biosensor, Microcantilever, Pathogen detection, *Salmonella enterica*.

INTRODUZIONE

Salmonella enterica è uno dei più comuni agenti zoonotici responsabile di patologie gastroenteriche infettive a trasmissione alimentare nell'uomo. Di solito il decorso è breve e senza necessità di trattamento medico, ma in fasce di popolazione a rischio (neonati e immunodepressi) può svilupparsi in una forma più grave (CDC, 2010). Normalmente, sono necessarie 10^7 - 10^9 cellule per scatenare la patologia, ma sono stati riportati focolai di infezioni causati da un numero significativamente inferiore di cellule (Piknova *et al.*, 2005). Il rilevamento di *Salmonella* negli alimenti e la determinazione del livello di contaminazione possono

quindi rivelarsi strumenti importanti per valutare i potenziali rischi connessi al consumo di alimenti contaminati e prevenire l'insorgenza di infezioni correlate. I metodi convenzionali per la ricerca di microrganismi in matrici alimentari basati principalmente sull'identificazione fenotipica e biochimica, sono stati attualmente affiancati da metodiche biomolecolari caratterizzate da elevata specificità, sensibilità e rapidità di analisi. Ciò nonostante, la ricerca di metodi rapidi alternativi è in continua evoluzione e negli ultimi anni un interesse sempre maggiore è stato rivolto all'uso di biosensori per l'identificazione di biomolecole. Recentemente è stato dimostrato che i biosensori ba-

sati su microcantilever (MC), piccole travi oscillanti di dimensioni microscopiche, sono in grado di interagire con biomolecole e agenti patogeni, e di rilevarne la presenza anche a basse concentrazioni (10^3 cfu/mL) (Ricciardi *et al.*, 2010).

MATERIALI E METODI

La presente ricerca ha previsto l'ottimizzazione di microcantilever in silicio di forma rettangolare la cui superficie è stata funzionalizzata al fine di consentire l'immobilizzazione di una sonda oligonucleotidica specifica per *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis precedentemente disegnate per un protocollo in Real Time PCR (Piknova *et al.*, 2005). Sono state testate tre tipologie differenti di molecole target: oligonucleotidi complementari alla sonda (contro sonda), amplicone contenente la regione complementare alla sonda (Piknova *et al.*, 2005), DNA estratto mediante bollitura da concentrazioni batteriche scalari (10^1 - 10^8 cfu/mL) di ceppi di *S. Enteritidis* precedentemente coltivati in BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C overnight.

I biosensori a microcantilever possono essere considerati come microbilance a due principali modalità di funzionamento: modo statico e modo dinamico. Nella prima modalità i biosensori sono funzionalizzati solo su una superficie, quindi l'adsorbimento delle molecole provoca una deflessione del sensore dovuta all'instaurarsi di uno stress superficiale a causa della variazione delle forze intermolecolari. Nella seconda modalità, entrambe le superfici del biosensore sono biologicamente reattive e vengono poste in vibrazione grazie ad un attuttore piezoelettrico, oscillando in base alla forzante a cui sono sottoposti. I microcantilever, in base alla massa e alla costante elastica, sono caratterizzati da una specifica frequenza di risonanza alla quale l'ampiezza di oscillazione è massima. Una volta effettuato il binding, l'aumento di massa del biosensore determina una diminuzione della frequenza di risonanza. Lo shift di frequenza permette quindi di quantificare la quantità di molecola target immobilizzata sulla superficie (Johnson e Mutharashan, 2012). Tramite un sistema di lettura a leva ottica (simile ai commerciali sistemi di lettura dei DVD) è stata quindi valutata la variazione dell'ampiezza di oscillazione del cantilever in funzione della frequenza, individuando in particolare il valore di frequenza, inversamente proporzionale alla massa immobilizzata, in corrispondenza del quale si è verificata la risonanza.

Sono state utilizzate due metodiche di funzionalizzazione chimica della superficie degli array di microcantilever: nella prima, l'immobilizzazione della sonda è stata realizzata modificando l'oligonucleotide all'estremità 5' con un gruppo amminico su MC derivatizzati con gruppi aldeidici, in seguito alla reazione con APTES e GA (3-aminopropyltriethoxysilane e glutaraldehyde). Nel secondo pro-

collo è stato sfruttato il legame Au-Th ottenuto utilizzando sonde modificate all'estremità 5' con un gruppo tiolico. Successivamente ciascun cantilever è stato ricoperto con un sottile strato di titanio e oro (Thian *et al.*, 2005). Ad ogni passaggio (ossidazione termica dei MC, funzionalizzazione chimica, immobilizzazione della sonda, incubazione con il target) sono state eseguite le misure in vuoto della rispettiva frequenza di risonanza.

RISULTATI

Nel caso di cantilever con sonda amminata immobilizzata le prime misure effettuate hanno rilevato un forte segnale dopo incubazione con prodotti di PCR: le variazioni relative di frequenza risultavano circa 10 volte maggiori rispetto alle incubazioni con la contro sonda. Le prove con gli estratti di DNA batterico mostrano segnali rilevabili alle concentrazioni di 10^3 e 10^6 cfu/mL, mentre per concentrazioni minori le variazioni di frequenza sono confrontabili col segnale dovuto al buffer di ibridazione senza DNA (blank). Proprio per cercare di diminuire il segnale dovuto al blank e migliorare la ripetibilità delle misure (ancora limitata), attualmente è in prova la chimica a base di sonde tiolate: i primi risultati mostrano un miglioramento nell'uniformità dei risultati e quindi nella precisione della misura.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In conclusione, le misure effettuate mostrano che i biosensori basati su microcantilever possono essere una promettente alternativa alle metodiche tradizionali e molecolari: i limiti di rilevabilità risultano paragonabili al protocollo proposto da Piknova *et al.* (2005). Particolare attenzione va posta sulla chimica di legame tra la sonda modificata e la superficie dei sensori: attualmente le misure effettuate sfruttando un legame Au-Th rispetto a GA-NH₂ sembrano garantire una migliore uniformità di risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. CDC, 2010. *Salmonella* serotype Enteritidis. Centers for Disease Control and Prevention ed., Atlanta, GA, USA. In website: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/
2. Johnson B.N., Mutharasan R. 2012. Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: a review. *Biosens. Bioelectron.* 32:1-18.
3. Piknova L., Kaclikova E., Pangallo D., Polek B., Kuchta T. 2005. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to fimC gene. *Curr. Microbiol.* 50:38-42.
4. Ricciardi C., Canavese G., Castagna R., Di-gregorio G., Ferrante I., Marasso S.L., Ricci A., Alessandria V., Rantsiou K., Cocolin L.S.

2010. Online Portable Microcantilever Biosensors for *Salmonella Enterica* Serotype Enteritidis Detection. *Food Bioprocess. Tech.* 3:956-960.

5. Thian F., Hansen K.M., Ferrell T.L., Thundat T. 2005. Dynamic Microcantilever Sensors for Discerning Biomolecular Interactions. *Anal. Chem.* 77:1601-1606.

Non-commercial use only