

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR PARA DETECCIÓN DE BACTERIAS BASADO EN CAPTURA INMUNOMAGNÉTICA Y TRANSDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA

I. Emilio⁽¹⁾, G. Longinotti⁽¹⁾, G. Ybarra⁽¹⁾

iemilio@inti.gob.ar

⁽¹⁾ Dto. Nanomateriales Funcionales-DT Micro y Nano Tecnologías-SOAC-GODTel-INTI

Palabras Clave: Biosensores; partículas magnéticas; separación inmunomagnética; detección electroquímica

INTRODUCCIÓN

Los patógenos bacterianos son objetivos importantes para la detección e identificación en medicina, seguridad alimentaria, salud pública y medio ambiente. Los métodos actuales de detección bacteriana en matrices complejas se basan en técnicas de laboratorio como el cultivo celular, el análisis microscópico y los ensayos bioquímicos. Estos procedimientos requieren mucho tiempo y son costosos, necesitan equipos especializados y usuarios capacitados. Si bien se pueden encontrar en el mercado tests comerciales rápidos para detección de bacterias patógenas, el procesamiento de la muestra suele ser igual de laborioso que para un método microbiológico clásico, ya que requieren un enriquecimiento previo de la cepa a detectar.

En general, la concentración de los microorganismos en la muestra es baja, con lo cual la separación inmunomagnética presenta una gran ventaja ya que permite concentrar la muestra en la bacteria de interés.

OBJETIVOS

Diseñar biosensores basados en nanopartículas con propiedades magnéticas. Para ello se requirió de la síntesis *de novo* de las partículas, su posterior funcionalización y, finalmente, la inmovilización de anticuerpos específicos para la captura de *E. coli* (cepa ATTC 25922).

Realizar la captura de bacterias con estas partículas y detectar su presencia mediante la utilización de anticuerpos secundarios.

Mejorar la eficiencia de captura y aumentar la sensibilidad del sistema con el fin de poder detectar menores cantidades de bacterias y así determinar contaminaciones en muestras de agua.

DESARROLLO

Se utilizaron partículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ sintetizadas por el método solvotermal, recubiertas con sílice por el método sol-gel. La superficie de las partículas se funcionalizó con grupos ácido carboxílico [1]. La inmovilización de anticuerpos primarios específicos se realizó mediante la activación de los grupos ácidos carboxílicos de las partículas con EDC/NHS. Para ello, las partículas magnéticas fueron lavadas y puestas en contacto con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M y N-hidroxisuccinimida (NHS) 25 mM por treinta minutos en agitación. Posteriormente, se realizaron lavados y se agregó la solución de anticuerpos (*E. coli* serotipo O/K policlonal) en dilución 1/200 en PBS 0.1 M pH 7 y se incubó por tres horas. Finalmente, se lavó con PBS-T 0,005% y se dejó en contacto con buffer de bloqueo compuesto por BSA 1% en TBST toda la noche y, finalmente, almacenado en buffer de almacenamiento (BSA con azida de sodio). La captura de las bacterias se realizó utilizando partículas magnéticas con el anticuerpo específico contra dichas bacterias inmovilizado previamente. Se dejaron en contacto 150 miligramos de partículas con 150 μl de cultivo bacteriano por 15, 60, 90 y 120 minutos [2]. Posterior a la captura y separación inmunomagnética de las partículas y las bacterias, se agregó un anticuerpo secundario específico contra las mismas bacterias (*E. coli* serotipo O/K policlonal), conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante)[3] (Figura 1).

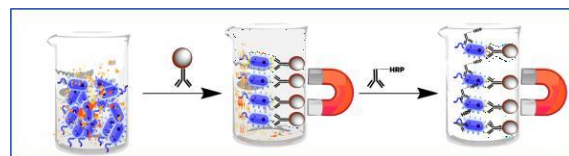


Figura 1. Esquema del ensayo de inmunoseparación magnética para la detección de bacterias.

Se procedió a realizar la medida de la actividad catalítica de enzima inmovilizada de forma electroquímica, utilizando cartuchos conformados por ocho celdas electroquímicas

compuestas por un electrodo de referencia de Ag/AgCl, un electrodo de trabajo y contra-electrodo de carbono [4] (Figura 2).

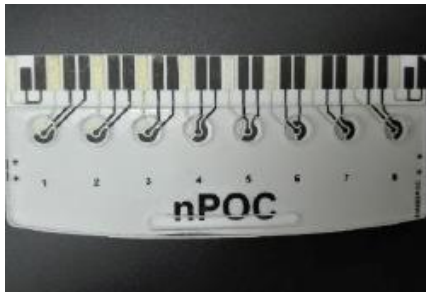


Figura 2. Imagen del cartucho con los electrodos utilizados para la medición electroquímica.

Como mediador redox se utilizó ABTS 3,4 mM y se inició la reacción catalítica con H_2O_2 1 mM como sustrato para la enzima HRP. Se realizaron cronoamperometrías aplicando un voltaje de 0 voltios por 60 segundos a los 5 minutos de iniciada la reacción redox.

RESULTADOS

Se logró la correcta síntesis, recubrimiento y funcionalización de las partículas magnéticas. Las mismas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y mediante un software de procesamiento (ImageJ), se estimó el radio promedio, dando como resultado partículas de un tamaño de entre 600 y 800 nm, incluyendo el recubrimiento de sílica (Figura 3).

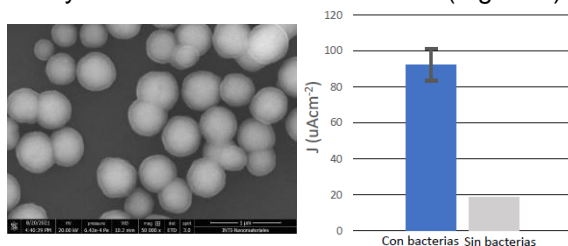


Figura 3 (izq.). Microscopía electrónica de transmisión de las partículas sintetizadas. (der.) Valor promedio de densidad de corriente obtenida para las partículas interaccionando con las bacterias y luego el agregado de un anticuerpo secundario con HRP conjugada.

Se logró la inmovilización de anticuerpos primarios que permitieron llevar a cabo la captura de la bacteria a detectar. Se llevaron a cabo las medidas electroquímicas y se pudo medir una corriente eléctrica en presencia de bacterias (Figura 3).

A su vez, se logró encontrar el tiempo óptimo de contacto entre las partículas con el anticuerpo inmovilizado y las bacterias. Se observa un pico en la señal detectada a los quince minutos y a la hora de contacto entre partículas y bacterias (Tabla 1). Tiempos mayores a este intervalo, arrojaron una señal

menor que la que obtuvimos en los tiempos previamente mencionados. Es por eso que, al obtener una señal similar entre 15 minutos y una hora, se decidió optar por realizar el ensayo con menor tiempo de contacto entre partículas y bacterias, a fin de disminuir los tiempos de ensayo.

Tabla 1. Valores promedio de densidad de corriente medidos luego de utilizar distintos tiempos de incubación entre las partículas con el anticuerpo primario y las bacterias.

Tiempo (min.)	J ($\mu A/cm^2$)	SD
15	76	10
60	72	27
90	36	23
120	32	18

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La captura y posterior detección electroquímica funcionaron de forma correcta.

Como ventaja, podemos mencionar que, a diferencia de la mayoría de los trabajos reportados que emplean inmunoseparación magnética usando micropartículas comerciales, en este trabajo se realizó la síntesis de las partículas magnéticas empleando un método económico y escalable, lo cual facilita la posibilidad de transferencia al sector productivo.

Además, el uso de partículas magnéticas genera una reducción de los tiempos de incubación respecto a otros métodos que utilizan enzimas inmovilizadas como por ejemplo el método ELISA.

Work in progress: determinar eficiencia de captura, optimizar sensibilidad y límite de detección, y adaptación del método para la detección de otras bacterias en muestras de agua para consumo humano.

AGRADECIMIENTOS

Roxana Coppola y Octavio Garate (Nanomateriales funcionales-CMNT- INTI) por las medidas de SEM. Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas (SOQyA) del INTI por facilitar las cepas bacterianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jang y Lim, *Microchemical Journal*, vol. 94, no. 2, pp. 148–158, 2010.
- [2] Wang et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 19, no. 6, pp. 3802–3824, 2020.
- [3] Lebedeva et al., *Russian Chemical Bulletin*, vol. 45, no. 1, pp. 18–25, 1996
- [4] Cortina et al., "Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases". *Biosens Bioelectron*, 2016.