

**REGIONE TOSCANA**  
**PROGRAMMA PRSE 2016-2020**  
  
**PROGRAMMA HORIZON 2020 – AZIONE ERANET-COFUND**  
**BANDO REGIONALE IN ATTUAZIONE DEL BANDO COMUNE JOINT-CALL TRANSNAZIONALE**  
**PHOTONICSENSING (G.A. n. 688735)**  
**Decreto Dirigenziale n. 11131 del 26/10/2016**

**Operazione: 11131.26102016.101000012**

**Soggetto capofila/partner: Università degli Studi di Firenze – Dipartimento di Chimica “U. Schiff”**

**Titolo del Progetto: ADVANCED PLASMONIC BIOSENSOR ANALYSIS OF NUCLEIC ACID BIOMARKERS**

**Acronimo: PLABAN**



**Logo:**

**Data inizio progetto: 30/03/2018**

**Indirizzo della sede operativa del progetto: Dip. Di Chimica “U. Schiff” – Via della Lastruccia, 3/13 – 50019 Sesto Fiorentino**

**Nome, titolo e organizzazione del referente scientifico del progetto:**

**MARIA EMANUELA MINUNNI, Professore Ordinario, Università degli Studi di Firenze**

### **Obiettivo generale del progetto**

L'obiettivo principale di PLABAN è la rivelazione ultraveloce e ultrasensibile di materiale genetico, sfruttando le sinergie tra metodi innovativi di PCR, marcatura plasmonica e/o focalizzazione plasmonica e approcci complementari di rilevamento fotonico.

In primo luogo, nel progetto è stata esplorata una combinazione inventiva di PCR plasmonica e marcatura plasmonica in un ciclatore fototermico, che sfrutta le stesse particelle plasmoniche come trasduttori

fototermici e traccianti plasmonici. In pratica, questo obiettivo è stato perseguito immobilizzando sequenze oligonucleotidiche i.e. primer (uno solo ovvero entrambi i primer senso e anti-senso) sulle particelle plasmoniche, che sono miscelate con gli altri reagenti necessari per la Reazione Polimerasica a Catena (l'amplificazione PCR dell'acido nucleico identificato come biomarcatore, target, specifico di riconoscimento di microorganismi patogeni). Nel primo caso (uno solo dei primer immobilizzato sulle particelle plasmoniche e l'altro libero in soluzione), il processo di

amplificazione produce un target di DNA a singolo filamento marcato con un tracciante plasmonico, pronto all'uso per la rilevazione mediante SPR, PEF o saggi a dot blot con la più alta specificità.

Accanto alla risposta strumentale è stato realizzato un saggio colorimetrico semplice ed efficace, con rivelazione ad occhio nudo. In particolare, utilizzando le nanoparticelle con entrambi i primer legati, è stato sfruttato il fatto che durante la reazione di polimerizzazione, il loro prolungamento produce la flocculazione della sospensione di nanostrutture che è, appunto, percepibile ad occhio nudo.

Per sviluppare il processo di conversione fototermica, sono state impiegate le particelle plasmoniche di elezione i.e. nanocilindri d'oro (nanorods NPs), che presentano bande accordabili nella finestra del rosso lontano - infrarosso vicino, di interferenza minima con molecole biologiche capaci di fornire assorbimento alle stesse lunghezze d'onde che potrebbero quindi risultare come interferenti nella misura analitica. È stato ipotizzato che questa configurazione consentisse l'esecuzione di un ciclo fototermico completo in circa 10 secondi, ovvero sino a 20 volte più veloce dei dispositivi commerciali per PCR convenzionale.

In secondo luogo, sono stati sviluppati biosensori fotonici la determinazione di sequenze target di patogeni. In questo caso sono stati realizzati biosensori ad acidi nucleici basati sul rilevamento dell'ibridazione tra una sonda di acido nucleico e.g. DNA a singolo filamento su un substrato plasmonico e un target di DNA a singolo filamento. In particolare, nel progetto sono impiegate piattaforme complementari di biosensori SPR e PEF compatti e adatti per multiplexing, iniziative traslazionali e con sviluppi commerciabili.

Un biosensore SPR è stato applicato all'analisi di sequenze di interesse sulla base di uno strumento commerciale. In questo caso, la cattura del target di DNA provoca un

aumento dell'indice di rifrazione all'interfaccia metallo/dielettrico, che si traduce in un redshift dei modi plasmonici con conseguente rivelazione analitica.

L'effetto di amplificazione PEF è realizzato in una micropiastre multipozzetto per la rilevazione ultrarapida del target di DNA in associazione con la reazione di amplificazione dedicata, la rolling circle amplification (RCA). Il substrato plasmonico è stato ingegnerizzato e fissato sul fondo di ciascun pozzetto per assolvere a molteplici funzioni: l'amplificazione dell'assorbimento ed emissione ottica di un tracciante luminescente e la focalizzazione di questa emissione ottica nel sistema di rilevamento di uno scanner a fluorescenza. Le componenti plasmoniche sono progettate e ottimizzate per uso con micropiastre multipozzetto e scanner a fluorescenza standard. La possibilità di isolare l'emissione ottica dal fondo di ogni pozzetto offre prospettive ulteriori di funzionamento in tempo reale e multiplexing.

Infine, entrambi i biosensori SPR e PEF sono saggiati con il target di DNA a singolo filamento marcato con un tracciante plasmonico e con dsDNA, proveniente dalla combinazione di PCR plasmonica e marcatura plasmonica al fine di implementare il limite di rilevabilità in SPR, per esempio tramite accoppiamento plasmonico tra il plasmone superficiale e quello localizzato della nanostruttura o tramite variazione significativa dell'Indice di Rifrazione (IR) della nanostruttura nei pressi della superficie plasmonica.

Un tratto distintivo di PLABAN è la versatilità e la complementarità dei suoi concetti e piattaforme tecnologiche.

Il problema analitico affrontato in PLABAN è la discriminazione ultraveloce di DNA virale e/o batterico e l'identificazione di impronte genetiche di resistenza agli antibiotici in campioni clinici.

In conseguenza di un utilizzo eccessivo e improprio, molti microrganismi hanno acquisito resistenza a molti antibiotici. Ogni anno, soltanto in Europa, questo fenomeno

crescente causa oltre 33000 morti e circa 2 miliardi di € in spese sanitarie e perdita di produttività. L'uso di antibiotici può essere ridotto e ottimizzato attraverso un riconoscimento corretto e tempestivo degli agenti patogeni in gioco, in modo da circoscrivere e personalizzare un ventaglio di farmaci adeguati. Attualmente, il gold standard per l'identificazione degli agenti patogeni sono metodi di coltivazione che garantiscono una sensibilità eccellente, sono maturi e sostenibili. Queste tecniche, però, sono inadeguate per test rapidi e per l'identificazione affidabile di molti agenti patogeni. In particolare, il run-time degli approcci di crescita dei microorganismi, è di solito di 2 - 3 giorni, e risulta drammaticamente inadeguato nei pazienti con sepsi, la cui mortalità aumenta del 50% ogni 24 ore.

Lo scopo di PLABAN è stato di mirare allo sviluppo di alternative ultraveloci per discriminare i più importanti virus e batteri patogeni e identificare la presenza o l'assenza di meccanismi di resistenza agli antibiotici nei batteri, come le carbapenemasi, che disattivano gli antibiotici di *extrema ratio*, come i carbapenemi.

A livello europeo si è svolto un meeting on line con gli officers, i.e. dissemination EANET



### **PhotonicSensing Dissemination Event**

**November 4<sup>th</sup> 2020**

Meeting location (online): Microsoft TEAMS

Photonic Sensing on November 4<sup>th</sup>, in cui il progetto è stato presentato dal Dr. Jacub Dostalek dell'AIT, insieme ad altri progetti in ambito ERANET. Il progetto è stato valutato molto positivamente.

Inoltre, e si è presentata la possibilità di intervenire ad un evento a livello europeo di disseminazione, in presenza, in coincidenza con l'evento *Photonics21*, possibilmente in aprile 2022 (data da confermare) come da

comunicazione del Dr. Francis Depez (francis.depez@vlaio.be).

Nel periodo, del progetto i tre principali OO portati avanti dai partner in collaborazione transnazionale possono essere sinteticamente descritti come segue:

1. Per quanto riguarda IFAC e Laboratori Victoria, l'attività ha visto lo sviluppo di un termociclatore fotonico, da un lato e da IFAC anche la sintesi di nanoparticelle plasmoniche e lo sviluppo di metodi di funzionalizzazione atti all'immobilizzazione di sequenze nucleotidiche, su di esse, finalizzate alla realizzazione della PCR plasmonica sia a fungere da amplificazione del segnale in SPR convenzionale ed in PEF, tecniche con le quali sono stati saggiati i campioni di amplificato Plasmonico per i geni selezionati nel progetto. Utilizzando le nanostrutture è stato sviluppato un saggio dot blot.
2. CHEMFI ha partecipato agli obiettivi prefissi nei vari WP; ha organizzato periodicamente meeting locali con i colleghi IFAC per aggiornamenti sullo stato di avanzamento, discussioni e confronti scientifici sulle metodologie e le strategie da intraprendere. Revisione dei risultati parziali ottenuti durante lo svolgimento del progetto sono state effettuate tramite meeting in modalità telematica con il partner AIT.
3. AIT ha portato avanti lo sviluppo del biosensore plasmonico PEF, preparando una serie di strutture plasmoniche, caratterizzate sperimentalmente, e saggiate in accordo con il programma. Sono state studiate due tipi di nanostrutture al fine di utilizzare la trasduzione PEF:

- 1) array periodici di nanoparticelle d'oro immobilizzate su substrato solido in grado di generare risonanza plasmonica localizzata (LSPR);
- 2) reticoli a diffrazione multipla ottenuti mediante film continui di oro, in grado di esprimere plasmoni di superficie di tipo propagativo (PsPs).

### **Obiettivi operativi e risultati conseguiti dai partner toscani**

- Sviluppo di hardware e software per la PCR plasmonica
- Test della PCR plasmonica con entrambi i primer in soluzione.
- Saggi bioanalitici: impiego oligonucleotidi (i.e. primer) marcati con nanoparticelle (marcatura plasmonica) in saggi di ibridazione.
- Saggi di ibridazione su membrana di nylon di sequenze immobilizzate (ssDNA ed ampliconi) e oligonucleotidi marcati con nanoparticelle (nuova marcatura plasmonica termolabile, i.e. sequenza "ant-zip").
- Ricerca del gene *mecA*, caratteristico della meticillina resistenza del patogeno *Staphylococcus aureus*. Il batterio in questione rappresenta un importante problema in ambienti ospedalieri e nella popolazione per il suo antibiotico resistenza.
- Marcatura plasmonica di ampliconi del gene di resistenza agli antibiotici *mecA*.
- Disegno di una piattaforma biosensoristica a DNA per la determinazione di campioni standard di DNA, riconducibili a porzioni genomiche specifiche del patogeno e/o riconducibili al tratto di farmaco-resistenza.
- Genosensore SPR per TARGET *mecA* (*Staphylococcus mecA* resistente) e *vanA* (*Enterococcus faecium vanA* resistente), e una regione dell'rRNA

ribosomiale, altamente specifica, per il riconoscimento del patogeno *Candida auris* (CAUR),

- Saggio sandwich SPR con nanocilindri d'oro (GNRs)

La disseminazione del progetto ha riguardato la realizzazione di prodotti scientifici, viste le limitazioni imposte dal periodo pandemico. Si riportano qui i prodotti dei soli partner toscani.

In sostanza si riportano di seguito le

- Relazioni a congressi su invito:

1. F. Ratto, "Hybrid devices exploiting the photothermal and photoacoustic features of plasmonic systems", African Materials Research Society 2019, Arusha, Tanzania, 10-13/12/2019 (keynote)
2. F. Ratto, "A bionic construct to target the tumor microenvironment with a plasmonic contrast agent", INO annual symposium 2019, Sixth Florentine, Italy, 3-5/4/2019
3. F. Ratto, "Cellular vehiculation to target the tumor microenvironment with gold nanorods", Nanodelivery 2019 London, UK, 18-20/3/2019
4. F. Ratto, "New opportunities at the crossroads of photoacoustics and plasmonics", Optics Within Life Sciences 2018, Perth, WA, Australia, 25-28/11/2018
5. F. Ratto, "Integration of plasmonic particles into multifunctional devices", Saratov Fall Meeting 2018, Saratov, Russia, 24-29/9/2018
6. F. Ratto, "Integration of plasmonic particles into multifunctional devices", Universidad Nacional Autónoma de México, Oct 29 2018, Mexico City, Mexico, 29/10/2018

Altri contributi orali:

7. F. Ratto, G. Frigenti, L. Cavigli, G. Nunzi Conti, A. Fernandez-Bienes, S. Centi, A. Barucci, R. Pini, T. Garcia-Fernandez, S. Soria, "Design of an all-optical

photoacoustic platform based on a microcavity resonator," SPIE Photonics West, San Francisco, CA

8. F. Ratto, S. Soria-Huguet, L. Cavigli, G. Frigenti, F. Micheletti, A. Fernandez-Bienes, S. Centi, T. Garcia-Fernandez, R. Pini, "Design of an all-optical photoacoustic platform for the inspection of plasmonic particles", Plasmonica 2018, Florence, Italy, 4-6/7/2018
9. F. Ratto, S. Soria-Huguet, L. Cavigli, G. Frigenti, F. Micheletti, A. Fernandez-Bienes, S. Centi, T. Garcia-Fernandez, R. Pini, "Alternative models of photoacoustic applications", Fotonica 2018, Lecce, Italy, 23-25/5/2018
10. S. Centi, C. Borri, P. Bogani, S. Scarano, M. Minunni, R. Pini, F. Ratto, Design of a paper-based platform for the detection of DNA/proteins with plasmonic particles. Photonics & Electromagnetics Research Symposium (PIERS), Rome, 17-20/06/2019.
11. S. Centi, C. Borri, P. Bogani, S. Scarano, M. Minunni, R. Pini, F. Ratto, Paper-based platforms for the detection of proteins/DNA with plasmonic particles. SPIE Photonics Europe Digital Forum 2020, 6-10 April 2020.
12. M. Minunni et al. (plenary), "Advances in Affinity based sensing"XII Reunion Nacional de Optoelectronica, Evento on line, Spanish Optoelectronic meeting, OPTOEL2021 30/06-2/07 2021, Invited 45 min; plenary, invited by (Javier Mateo [jmateo@unizar.es](mailto:jmateo@unizar.es)) [https://www.sedoptica.es/storage/docs/20210209100324\\_OPTOEL-2021.pdf](https://www.sedoptica.es/storage/docs/20210209100324_OPTOEL-2021.pdf)

Due to pandemic one international events have been postponed:

13. M. Minunni et al. "Advances and challenges in affinity based sensing International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis", July 2022,

Nancy, France, (Plenary 50 min, invited by Prof. Igor Clarot)

14. M. Minunni et al. Reunion Biennial Real Sociedad Espanola de Quimica (RSEQ) 28 June-1 July Granada 2022, Spain (Keynote 30 min, Symposium S9. Bioanalytical Chemistry in Health and Food Safety) (invited by Prof. Susana Campuzano) <https://bienal2021.com/index.php/en/>

In also these two fore coming events the project will be eventually acknowledged.

Publicazioni scientifiche correlate al progetto:

1. S. Centi, L. Cavigli, C. Borri, A. Milanesi, M. Banchelli, S. Chioccioli, B. N. Khlebtsov, N. G. Khlebtsov, P. Matteini, P. Bogani, F. Ratto, R. Pini (2020). Small Thiols Stabilize the Shape of Gold Nanorods. *Journal of Physical Chemistry C*, 124, 20, 11132–11140.
2. P. Palladino, F. Torrini, S. Scarano, M. Minunni, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as multi-colorimetric indicator of chlorine in water in line with health guideline values, *Anal. Bional. Chemistry*, 412, pages 7861–7869, 2020, 10.1007/s00216-020-02918-9
3. P. Palladino, F. Torrini, S. Scarano, and M. Minunni, Colorimetric analysis of the early oxidation of dopamine by hypochlorous acid as preliminary screening tool for chemical determinants of neuronal oxidative stress. *J. Pharmaceutical Biomed. analysis*, 179, pages 113016, 2020, 10.1016/j.jpba.2019.113016
4. V. Baldoneschi, P. Palladino, M. Banchini, M. Minunni and S. Scarano Norepinephrine as new functional monomer for molecular imprinting: an applicative study for the optical sensing of cardiac biomarkers, *Biosensor and Bioelectronics*, 157, 112161, 2020, 10.1016/j.bios.2020.112161
5. V. Baldoneschi, P. Palladino, S. Scarano and M. Minunni, Polynorepinephrine: state of art and perspectives applications in biosensors and molecular recognition perspective article, *Anal. Bional. Chemistry, Topical collection, Female role models*,

412, pages 5945–5954, 2020,  
10.1007/s00216-020-02578-9

6. M.G. Lettieri, P. Palladino, S. Scarano, M. Minunni Protein-templated copper nanoclusters for fluorimetric determination of human serum albumin *Microchimica Acta*, 2021, 10.1007/s00604-021-04764-7
7. F. Torrini, S. Scarano, P. Palladino, and M. Minunni, Polydopamine-based quantitation of albuminuria for the assessment of kidney damage. *Anal. Bioanal. Chemistry*, 413, pages 2217-2224, 2021, 10.1007/s00216-021-03192-z