

IMMUNOSENSORE ELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DEI TRICOTECENI DI TIPO A IN CEREALI DA COLAZIONE E ALIMENTI DESTINATI ALL'INFANZIA A BASE DI CEREALI

Silvia Vesco, Daniela Romanazzo, Giulia Volpe, Francesco Ricci, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Le Tossine T-2 ed H-T2 appartengono ai Tricoteceni, un gruppo di metaboliti secondari di specie fungine appartenenti per lo più al genere *Fusarium*. Queste muffe infettano diverse specie vegetali, in particolare cereali, contaminando i relativi prodotti agricoli con i loro metaboliti (1). L'infezione può avvenire nel campo prima della raccolta, ma anche dopo la raccolta, nel caso in cui la derrata non venga adeguatamente conservata. La contaminazione da T-2 ed HT-2 si manifesta di frequente a concentrazioni più basse nelle derrate di frumento, orzo, granturco, segale e a livelli più elevati nell'avena (2).

La presenza dei Tricoteceni nelle derrate alimentari rappresenta un rischio per la salute degli uomini e degli animali: essa è causa di intossicazioni acute e croniche provocando vomito, infiammazioni, emorragie, mancanza di appetito, diarrea, alterazioni ematiche, disordini del sistema nervoso, distruzione del midollo osseo. Il meccanismo secondo cui vengono causati i danni alla salute implica l'interazione delle tossine con DNA, RNA, inibendo la sintesi delle proteine e impedendo la proliferazione dei tessuti (in particolare midollo osseo, sistema immunitario e cellule epiteliali). Le caratteristiche tossicologiche variano a seconda del tricotecene ingerito e della specie animale (o umana) che lo ha assunto: in generale T-2 ed HT-2 sono tra i Tricoteceni con più alto effetto tossico (3). La tossicità di questi due metaboliti è interconnessa e esse non possono essere valutate singolarmente in quanto la Tossina T-2 *in vivo* è rapidamente trasformata in HT-2 all'interno del tratto intestinale. Questo implica che la contaminazione da T-2 ed HT-2 va valutata considerando la presenza complessiva delle due.

I tenori massimi di tossina nelle varie matrici alimentari non sono ancora stati stabiliti ufficialmente dalla Unione Europea in quanto al momento attuale il Comitato Scientifico incaricato non ha valutato sufficienti i dati raccolti; mancano inoltre metodi analitici rapidi standardizzati e gli studi sulla valutazione del rischio per l'alimentazione zootecnica. È stato stabilito tuttavia dalla *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* nel 2001 un valore di TDI (*Tolerable Daily Intake*) pari a 0,06 µg/kg riferito alla somma complessiva di T-2 ed HT-2 (4).

In questo contesto è stato messo a punto un sistema per l'analisi rapida della somma di T-2 ed HT-2. Il metodo è basato su un saggio *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) di tipo competitivo indiretto in cui il supporto solido è rappresentato da microsferi di materiale paramagnetico, accoppiato ad un sistema di rilevazione elettrochimico (5). Il sistema fornisce una misura rapida poiché grazie ad una speciale connessione denominata "Multi-8" è in grado di eseguire automaticamente la misura relativa ad otto campioni o standard di tossina. L'utilizzo delle microsferi magnetiche come supporto solido permette di condurre le reazioni del saggio immunoenzimatico in soluzione senza entrare in contatto diretto col sensore fino al momento della misura.

Il metodo è stato messo a punto su due differenti matrici, cereali da colazione e alimenti a base di mais destinati all'infanzia, a diversi livelli di contaminazione e con diversi probabili limiti di legge (più alto per i cereali da colazione destinati al consumo degli adulti e più basso per gli alimenti destinati all'infanzia con un limite di legge indicato come più probabile pari a 200 ng/g e 25 ng/g rispettivamente).

Materiali e metodi

Per la messa a punto del sistema di analisi sono stati utilizzati campioni bianchi di cereali da colazione e alimenti per l'infanzia privi di contaminanti. I campioni sono stati sottoposti ad estrazione, eventuale purificazione dell'estratto e portati a secco sotto flusso di azoto. L'estratto essiccato è riportato in soluzione con tampone PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e diluito in PBS di un fattore che è funzione del tipo di matrice in esame. L'estratto ricostituito e diluito viene fortificato in modo da avere soluzioni standard di tossina compresi nell'intervallo di lavoro del sistema e la curva di taratura così ottenuta è confrontata con curve di taratura ottenute dagli stessi standard di tossina preparati però in tampone PBS. Per la verifica del suo funzionamento, è stato impiegato lo stesso tipo di matrici naturalmente contaminate.

Reagenti

Tutti i reagenti impiegati sono di grado analitico noto. L'acqua si intende distillata ove non specificato.

- Tampone PBS Dulbecco A.
- Tampone Dietanolammina (DEA): sciogliere 0,0476g di $MgCl_2$ anidro e 5,59g di KCl in ~ 300 mL di acqua, dopo la dissoluzione aggiungere poco per volta 51 mL di DEA (99,5%). Aggiustare il pH a 9,8. Portare al volume finale di 500 mL.
- Tampone Borato: sciogliere 3,09 g di H_3BO_3 in ~ 300 mL di acqua; aggiustare il pH a 9,5 con NaOH (6 M). portare al volume finale di 0,5 L.
- Tampone Tris[idrossimetil]-amminometano: sciogliere 4,85 g in 0,1 L d'acqua e aggiustare il pH con HCl (6M). Portare al volume finale di 0,2 L con acqua.
- Soluzione TRIS + Albumina da Siero Bovino (BSA) (0,1%).
- Soluzione tampone PBS +Tween® 20 (0,05%).
- Soluzione PBS + BSA (0,1%).
- Soluzione PBS + BSA (0,1%) + NaN_3 (0,02%).
- Acetonitrile per HPLC.
- Metanolo per HPLC.
- Solvente di estrazione: acetonitrile-acqua (84:16).
- Solvente di estrazione: metanolo-acqua (80:20).
- Soluzione di bloccaggio: sciogliere 0,2 g di latte in polvere totalmente scremato in 20 mL di PBS.
- Soluzione substrato enzimatico: 1-Naftil fosfato in DEA (1mg/mL).
- Materiale di riferimento Tossina T-2 in polvere.
- Materiale di riferimento Tossina HT-2 in polvere.
- Soluzione standard madre di Tossina T-2, 1 mg/mL in aceto nitrile.
- Soluzione standard madre di Tossina HT-2, 1 mg/mL in aceto nitrile.

- Soluzione standard di lavoro di Tossina HT-2: prelevare 20 μ L della soluzione r) e trasferirli in un matraccio tarato da 2 mL contenente circa 1 mL di acetonitrile. Dopo l'aggiunta portare al volume finale di 2 mL con aceto nitrile.
- Soluzioni standard di taratura di Tossina HT-2: prelevare dalla soluzione s) e trasferire in un set di matracci tarati da 2 mL i volumi riportati in Tabella 1.
- Soluzioni in PBS di anticorpo monoclonale HT-2 C-12 B8.
- Soluzioni in PBS di anticorpo secondario coniugato con Fosfatasi Alcalina (diluizione 1:100).

Tabella 1. Aliquote da prelevare e soluzioni da utilizzare per la preparazione delle soluzioni standard di taratura per la Tossina HT-2

Soluzione standard di taratura	Concentrazione di tossina (ng/mL)	Soluzione utilizzata	Volume prelevato (μ L)
n. 1	100	Soluzione standard di lavoro	20
n.2	20	Soluzione standard di taratura n° 1	400
n. 3	8	//	160
n. 4	6	//	120
n. 5	4	//	80
n. 6	2	//	40
0	0	PBS	0

Apparecchiature

La strumentazione utilizzata è di seguito elencata:

- Bilancia analitica.
- Bilancia tecnica.
- Omogenizzatore ad alta velocità.
- Centrifuga da banco.
- Colonnina di purificazione Mycosep 227 ® Trich+.
- Colonnina purificazione Bond Elut.
- Tubi da saggio in vetro da 4 mL.
- Sistema di portata a secco in flusso di azoto.
- Concentratore di microparticelle magnetiche.
- Cronometro.
- Computer portatile.
- Potenzziostato portatile.

Messa a punto del metodo

È stata studiata la messa a punto di un metodo rapido per l'esecuzione di analisi di screening su campioni di cereali destinati al consumo umano nell'infanzia e nell'età adulta, eseguibili anche da personale non specializzato. Requisito fondamentale di una metodica di screening, oltre alla rapidità del metodo, è quello di evitare i risultati falsi conformi. L'efficienza del metodo è stata dunque valutata calcolando i valori di recupero su campioni naturalmente e sperimentalmente contaminati in condizioni di misura ottimizzate.

Ottimizzazione del sistema

Sono stati ottimizzati in primo luogo parametri immunologici del saggio ELISA competitivo indiretto quali: la selezione dell'anticorpo specifico più adatto, la quantità di Tossina HT-2 da immobilizzare, la quantità di anticorpo monoclonale specifico per T-2 ed HT-2. La selezione del clone è stata fatta in base ai valori di *cross* reattività che i vari anticorpi a nostra disposizione avevano nei confronti delle due tossine da analizzare. È stato scelto il clone HT-2 C12 B8 la cui *cross* reattività era più simile nei confronti delle due tossine; in questo modo è possibile determinare correttamente la somma delle due tossine.

La quantità di tossina da immobilizzare sulla superficie delle microparticelle magnetiche così come la concentrazione di anticorpo specifico da utilizzare sono state studiate attraverso curve di *binding*. Le prestazioni del sistema sono state valutate eseguendo l'analisi su soluzioni standard di tossina preparate in tampone fosfato. I risultati ottenuti in termini di limite di rivelazione sono soddisfacenti e adatte all'analisi dei campioni di cereali da colazione e alimenti per l'infanzia a base di cereali tenendo presente i limiti proposti ma non ufficializzati per queste due matrici (25 ng/g e 200 ng/g rispettivamente).

Quantitativo di campione da sottoporre ad analisi

Il quantitativo di campione da sottoporre ad analisi deve essere sufficientemente ampio in modo tale da minimizzare l'eterogeneità della contaminazione da Tricoteceni su un campione solido di cereali. Per questo motivo l'estrazione viene eseguita su un campione di 25g come suggerito in letteratura (6).

Trattamento del campione

Il trattamento del campione prevede una fase di estrazione e una eventuale fase di purificazione dell'estratto. Sono state studiate diverse combinazioni tra solvente di estrazione e strategia di purificazione: estrazione con acetonitrile/acqua (84:16) o con metanolo/acqua (80:20) e purificazione con colonna Mycosep o colonna Bond Elut.

I valori di recupero su estratti non purificati mostrano una sovrastima dovuta all'effetto matrice che indica la necessità del passaggio di purificazione. I valori di recupero ottenuti da estratti purificati hanno invece riportato un recupero intorno al 100% per entrambi i tipi di colonna esaminati, nel caso in cui l'estrazione sia stata eseguita con la miscela acetonitrile/acqua. A parità di prestazioni in termini di valori di recupero, è stato selezionato per il protocollo l'impiego della colonna Mycosep, in quanto di più rapido e facile utilizzo e quindi più idonea ad un'analisi di screening (6).

Fattore di diluizione

Il fattore di diluizione dell'estratto essiccato e ricostituito in PBS è stato scelto in funzione del limite di legge della specifica matrice in esame in modo tale da far ricadere il segnale relativo ad un campione con un contenuto di tossina pari al limite di legge nel mezzo dell'intervallo di lavoro.

Condizioni elettrochimiche di misura

Il saggio ELISA elettrochimico viene effettuato tramite un anticorpo secondario coniugato con Fosfatasi Alcalina come marcatore. La lettura è eseguita utilizzando come substrato della Fosfatasi Alcalina l'1-Naftil Fosfato, trasformato in 1-Naftolo per idrolisi. La quantificazione dell'1-Naftolo è condotta applicando condizioni elettrochimiche già da noi standardizzate e riportate in letteratura (7):

- Tampone di analisi: DEA pH 9,8.
- Potenziale inizio scansione: 0 (V).
- Potenziale fine scansione: 0,6 (V).
- Altezza dello *step*: 0,016 (V).
- Altezza dell'impulso: 0,0339 (V).
- Velocità di scansione: 0,1 (V/s).
- Larghezza impulso: 0,06 (s).

Risultati e discussione

L'applicabilità del sistema ottimizzato è stata valutata esaminando i valori di recupero relativi ad una serie di campioni naturalmente contaminati. È stato analizzato un campione di cereali da colazione, mentre per quanto riguarda gli alimenti destinati all'infanzia a base di mais, un campione con un'elevata contaminazione naturale di tossina è stato omogeneizzato in diverse proporzioni con un campione bianco della stessa composizione. I valori ottenuti sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 2 e 3.

Tabella 2. HT-2/T-2: risultati di analisi su campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati

Contenuto endogeno di HT-2/T-2 (ng/g)	Giorno di analisi	Contenuto di HT2-2/T-2 ± DS (ng/g)	Recupero (%)
80±15	1	n.d.	-
	2	n.d.	-
	3	100±3	125±4

DS: Deviazione Standard

Tabella 3. HT-2/T-2: risultati di analisi su campioni di alimenti destinati all'infanzia naturalmente contaminati

Campione contaminato/ campione bianco	Contenuto endogeno di HT-2/T-2 (ng/g)	Giorno di analisi	Contenuto di HT2-2/T-2 ± DS (ng/g)	RSD (%)	Recupero (%)
10/90	6,90	1	14,1 ± 0,3	2,0	204
30/70	20,70		26±1	4,0	126
50/50	34,50		37±1	3,0	108
75/25	51,75		42±6	14,0	81
100/0	69,00		47±4	9,0	68
10/90	6,90	2	15,6±0,7	4,0	226
30/70	20,70		25,1±0,6	2,0	121
50/50	34,50		41,0±0,3	0,7	119
75/25	51,75		55±1	2,0	106
100/0	69,00		60±3	5,0	87

DS: Deviazione Standard

Per i cereali da colazione si può osservare come con un'opportuna diluizione dell'estratto ricostituito si possa determinare il contenuto di tossina con un valore intorno al 120%.

Per quanto riguarda i campioni di alimenti per l'infanzia vediamo che i campioni con un contenuto complessivo di tossine pari al limite di legge, il cui segnale ricade nell'intervallo di lavoro, possono essere quantificati con un recupero intorno al 100%. Nello stesso tempo, i campioni il cui contenuto di tossina è al di fuori dell'intervallo di lavoro possono comunque essere valutati distinguendo tra campioni conformi al limite di legge e campioni non conformi. Non sono stati rilevati falsi positivi.

Il metodo sviluppato è una valida alternativa ai metodi di screening tradizionali basati su tecniche ELISA a rilevazione spettrofotometrica per la determinazione della concentrazione complessiva delle tossine T-2 ed HT-2, poiché in grado di fornire risultati in tempi più rapidi (1,5 ore rispetto alle 3,5 ore di un saggio ELISA spettrofotometrici).

Bibliografia

1. Koch P. State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology Letters* 2004;153:109-12.
2. GLM Gruppo di lavoro Micotossine. *Sintesi del V forum Fusarium Tossine DG-SANCO UE BRUXELLS del 10 e 11 gennaio 2008*. Disponibile all'indirizzo http://www.micotossine.it/public/pag_561.pdf; ultima consultazione 13/9/10.
3. Schlatter J. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology Letters* 2004;153:83-9.
4. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 856/2005 della Commissione del 6 giugno 2005 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine. *GUCE* L143, 7 giugno 2005.
5. Delibato E, Bancone M, Volpe G, De Medici D, Moscone D, Palleschi G. Development and Comparative Evaluation of Different Screening Methods for Detection of *Staphylococcus aureus*. *Analytical Letters* 2005;38:1569-86.
6. Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in analysis of type A trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001;371:285-99.
7. Micheli L, Radoi A, Guarrina R, Massaud R, Moscone D, Palleschi G. disposable immunosensor for determination of domoic acid in shellfish. *Biosensors and Bioelectronics* 2004;20:190-6.