

IMMUNOSAGGI BASATI SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DI TOSSINE DI *FUSARIUM* E LORO FORME MODIFICATE IN FRUMENTO

Vincenzo Lippolis (a), Anna C.R. Porricelli (a), Erminia Mancini (a), Veronica M.T. Lattanzio (a), Biancamaria Ciasca (a), Annalisa De Girolamo (a), Sarah De Saeger (a), Chris M. Maragos (c), Susan McCormick (a), Peiwu Li (d), Antonio F. Logrieco (a), Michelangelo Pascale (a)
(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia*
(b) *Centre of Excellence in Mycotoxicology and Public Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgio*
(c) *Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL, USA*
(d) *Key Lab for Mycotoxins Detection, Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Cina*

Introduzione

Le tossine di *Fusarium*, tra cui ritroviamo i tricoteceni, sono le principali micotossine prodotte in campo. I tricoteceni sono una grande famiglia di tossine, chimicamente correlate con struttura ad anello sesquiterpenoide, contenente un gruppo epossidico in posizione C12-C13 che è responsabile della loro attività tossica. Nonostante abbia una tossicità più bassa di altri tricoteceni, il deossinivalenolo (DON), che appartiene ai tricoteceni di tipo B, ha ricevuto particolare attenzione in quanto è la micotossina che viene più frequentemente ritrovata nel frumento e in altri cereali come mais, orzo, avena e segale (1, 2). La tossina T-2 (T-2) e la tossina HT-2 (HT-2) sono invece tricoteceni di tipo A noti per la loro elevata tossicità e che possono essere ritrovate in un'ampia varietà di cereali (3). Tali tossine per la loro tossicità rappresentano un rischio per la salute dell'uomo e degli animali. Pertanto, al fine di proteggere la salute dei consumatori, la Commissione Europea ha fissato i livelli massimi consentiti di DON nei cereali e negli alimenti trasformati a base di cereali compresi tra 200 e 1750 µg/kg (4) e livelli indicativi per la somma di T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti derivati che vanno da 15 a 2000 µg/kg (5). I tricoteceni vengono, inoltre, ritrovati nelle forme chimicamente modificate che sono biosintetizzate dal metabolismo di piante, funghi e animali (6) e che hanno tossicità e incidenza già ampiamente studiate. Tra le forme modificate del DON, il 3-acetil-deossinivalenolo (3Ac-DON), il 15-acetil-deossinivalenolo (15Ac-DON) e il deossinivalenolo-3-glucoside (DON3G) rappresentano le forme maggiormente ritrovate in natura (2). Analogamente, T-2 glucoside (T-2G) e HT-2 glucoside (HT-2G) sono i derivati di T-2 ed HT-2 di maggiore rilevanza per i cereali (3).

Lo sviluppo di metodi analitici in grado di rilevare simultaneamente le micotossine e le loro forme modificate, anche espresse come somma, è altamente richiesto perché potrebbe soddisfare le richieste di future normative europee. L'approccio più utilizzato per la determinazione simultanea di tricoteceni e relative forme modificate prevede l'analisi LC-MS/MS (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*) (7). Tuttavia, poiché tali metodi analitici hanno costi elevati, richiedono personale specializzato e tempi lunghi di analisi, non sono adatti per scopi di screening. Per tale motivo, sono richiesti metodi analitici di facile realizzazione, rapidi, economici, robusti e affidabili per il monitoraggio simultaneo di tricoteceni e forme modificate al

fine di raccogliere un maggior numero di dati. Tra i metodi di screening, gli immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza (*Fluorescence Polarization Immunoassay*, FPIA) hanno ampiamente dimostrato le loro elevate potenzialità nella determinazione di micotossine (8).

Per questo motivo, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare e validare due FPIA per la determinazione simultanea, espressa come somma, di (i) DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G nel frumento e (ii) T-2, HT-2, T-2G e HT-2G nel frumento. I metodi sviluppati sono stati validati sia come metodi quantitativi, che come metodi di screening in accordo con le linee guida stabilite dalla Commissione Europea nel Regolamento (UE) 519/2014 (9).

Materiali e metodi

Lo sviluppo e la validazione dei sono state condotte attraverso le seguenti quattro diverse fasi: i) preparazione e test dei reagenti, ii) sviluppo dei test immunochimici, iii) ottimizzazione dei protocolli di estrazione e iv) valutazione degli effetti della matrice, v) ottimizzazione e validazione sia come metodi quantitativi, sia come metodi di screening.

Risultati e discussione

Sviluppo dei metodi

Per quanto riguarda il metodo per la determinazione simultanea di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G è stato sviluppato un saggio FPIA competitivo con una curva di calibrazione nell'intervallo di concentrazione 0,8-206 ng/mL di tali tossine (espresso come somma), con $IC_{50} = 18$ ng/mL e che prevede un tempo di incubazione di 2 minuti. Per tale immunosaggio è stato messo a punto un protocollo di estrazione da campioni di frumento che prevede l'estrazione di un'aliquota campione (25 g) con soluzione salina tampone fosfato (100 mL) miscelando ad alta velocità per 2 minuti e filtrando attraverso filtro di carta e filtro in microfibra di vetro. Un'aliquota di estratto filtrato (equivalente a 30 mg di matrice) viene sottoposta ad analisi FPIA (Figura 1).

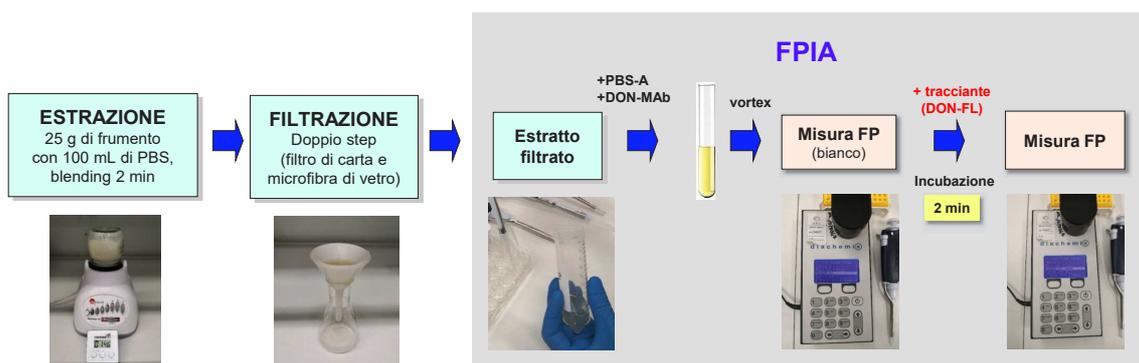


Figura 1. Schema del metodo FPIA per la determinazione di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G

Per quanto riguarda, invece, il metodo la determinazione simultanea di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G è stato sviluppato un saggio FPIA competitivo con una curva di calibrazione nell'intervallo di concentrazione 0,1-73,2 ng/mL di tali tossine (espresso come somma), con $IC_{50} = 2$ ng/mL e che prevede un tempo di incubazione di 5 minuti (10). Sono stati messi a punto due protocolli di estrazione alternativi basati sull'uso di solvente organico (protocollo A) e acquoso (protocollo B) da campioni di frumento. In particolare, per il protocollo A l'analisi prevede l'estrazione di un'aliquota di campioni di frumento (50 g) con una miscela organica (100 mL di metanolo/acqua, 90/10 v/v) miscelando ad alta velocità per 3 minuti. L'estratto previa filtrazione su carta viene diluito con una soluzione di NaCl al 4% (rapporto 1:5, v/v) e lasciato riposare per 5 minuti. L'estratto diluito viene quindi filtrato con filtro in microfibra di vetro.

Nel caso del protocollo B, l'analisi prevede che un'aliquota di campioni di frumento (10 g) viene estratta con 100 mL di acqua miscelando ad alta velocità per 3 minuti e filtrando attraverso filtro di carta e filtro in microfibra di vetro. Per entrambi i protocolli A e B, un'aliquota di estratto filtrato (equivalente a 20 mg di matrice) viene sottoposta ad analisi FPIA (10) (Figura 2).

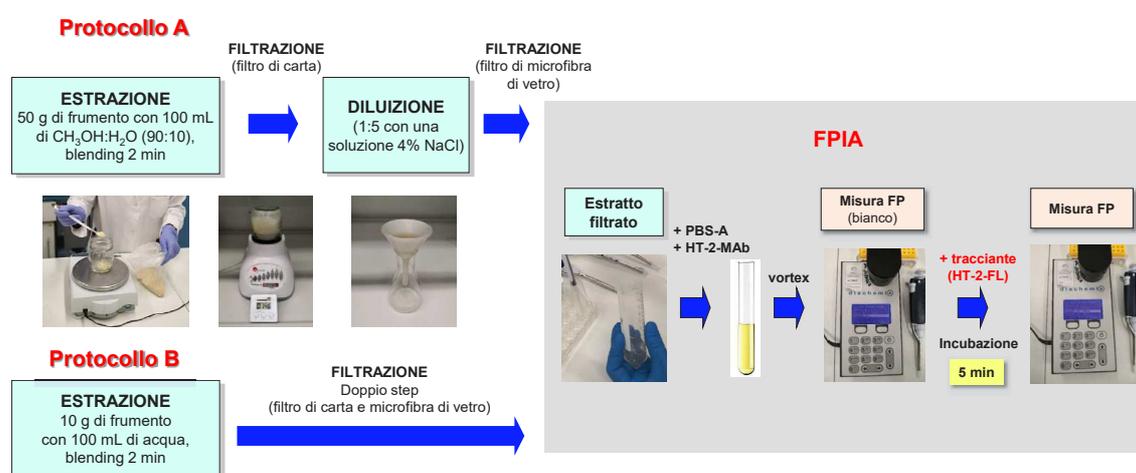


Figura 2. Schema dei metodi FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G

Validazione dei metodi

I metodi sviluppati sono stati validati *in-house* come metodi quantitativi, al fine di valutare le loro prestazioni in termini di sensibilità, recupero e ripetibilità. Nel caso dell'FPIA per la determinazione di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G nel frumento, il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) erano rispettivamente di 80 e 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (espressi come somma). Mentre, per gli FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G nel frumento utilizzando entrambi i protocolli di estrazione (Protocollo A e B) sono stati ottenuti LOD e LOQ rispettivamente di 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (espressi come somma). I valori medi di recupero per campioni di frumento non contaminati e addizionati con DON e forme modificate a livelli compresi nell'intervallo 500-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (prove in triplicato) variavano dal 92 al 112% con RSD inferiori al 7%. Nel caso dell'FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G, i campioni di frumento sono stati addizionati con tali tossine a livelli compresi nell'intervallo 50-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. I recuperi medi per FPIA utilizzando il protocollo A variavano dal 92 al 102% con

RSD inferiori al 13%, mentre i recuperi medi per FPIA utilizzando il protocollo B erano compresi nell'intervallo 89-98% con RSD inferiori al 7% (10). I valori dei recuperi e della precisione ottenuti per tutti i metodi FPIA sviluppati soddisfano i criteri di accettabilità per un metodo analitico per la determinazione quantitativa delle forme native stabilite dalla Commissione Europea.

I metodi sviluppati sono stati inoltre validati in accordo con le linee guida per i metodi di screening stabiliti dalla Commissione Europea nel Regolamento (UE) 519/2014 (9). L' idoneità allo scopo dei metodi FPIA sviluppati è stata valutata calcolando i profili di precisione, il tasso di falsi positivi e il livello di *cut-off* ai livelli regolamentati/indicativi dell'UE delle forme native nel frumento duro. In particolare, le prove sono state condotte in 5 differenti giorni, in condizioni di ripetibilità, per un totale di 20 misurazioni, per campioni di frumento non contaminato e contaminato artificialmente alla concentrazione target di screening (STC) di 1750 µg/kg per la somma di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G e di 100 µg/kg per la somma di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G. Per quanto riguarda l'FPIA per la determinazione di DON e forme modificate i valori medi della risposta del metodo per campioni contaminati artificialmente alla STC e dei campioni non contaminati erano rispettivamente di 1815 e 116 µg/kg, con RSD del 6 e 47% e con precisione intermedia (RSD_{PI}) del 7 e 51%, rispettivamente. Il livello di *cut-off* calcolato era 1585 µg/kg e la percentuale di risultati falsi sospetti per campioni non contaminati era inferiore allo 0,1%. Nel caso di FPIA per la determinazione di T-2, HT-2 e forme modificate i valori medi delle risposte al metodo con protocollo A e protocollo B erano rispettivamente di 115 e 104 µg/kg per campioni alla STC e 12 e 21 µg/kg per i campioni non contaminati. Nel caso di FPIA con protocollo A, i valori di RSD e RSD_{PI} erano 5 e 10% per campioni alla STC e 16 e 25% per i campioni non contaminati. Nel caso di FPIA con protocollo B, i valori di RSD e RSD_{PI} erano 9 e 13% per i campioni alla STC e 14 e 16% per i campioni non contaminati. I livelli di *cut-off* calcolati erano 96 e 80 µg/kg, rispettivamente per FPIA con protocollo A e protocollo B, e la percentuale di risultati falsi positivi per campioni non contaminati era in entrambi i casi inferiore allo 0,1% (10). In definitiva, tutti i metodi sviluppati hanno mostrato soddisfacenti prestazioni analitiche, in termini di precisione in condizione di ripetibilità, di precisione intermedia, livello di *cut-off* e percentuale di falsi positivi.

Conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano l'applicabilità dei metodi sviluppati, basati sulla tecnica FPIA, sia come metodi quantitativi, sia come metodi di screening per valutare il contenuto delle tossine target nel frumento ai livelli indicati dall'UE per le forme native. Inoltre i metodi FPIA proposti utilizzano procedure a basso impatto ambientale e, essendo rapidi, facili da realizzare, a basso costo e portatili possono considerarsi utili e robusti strumenti per lo screening di un elevato numero di campioni.

Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del progetto MYCOKEY (H2020-Grant Agreement No 678781).

Bibliografia

1. WHO/FAO. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Geneva: World Health Organization; 2001. (WHO food additives series 47. FAO food and nutrition paper 74).
2. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)). Scientific opinion on risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal* 2017;15(9):4718, 345 pp.
3. European Food Safety Authority. Scientific report on human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal* 2017;15(8):4972, 57 pp. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4972.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364 del 20.12.2006.
5. Europa. Raccomandazione della Commissione del 27 marzo 2013 relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali. (2013/165/UE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 91/12 del 3.4.2013.
6. Bryla M, Waskiewicz A, Ksieniewicz-Wozniak E, Szymczyk K, Jedrzejczak R. Modified Fusarium Mycotoxins in Cereals and Their Products-Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review. *Molecules* 2018;23:963.
7. Freire L, Sant'Ana AS. Modified mycotoxins: An uptake review on their formation, detection, occurrence and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology* 2018;111:189-205.
8. Lippolis V, Maragos C. Fluorescence polarization immunoassays for rapid, accurate and sensitive determination of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* 2014;7(4):479–89.
9. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 147 del 17 maggio 2014.
10. Lippolis V, Porricelli ACR, Mancini E, Ciasca B, Lattanzio VMT, De Girolamo A, Maragos CM, McCormick S, Li P, Logrieco AF, Pascale M. Fluorescence Polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins and their glucosides in wheat. *Toxins* 2019;11:380.