

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**



**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**

Dottorato di ricerca in  
Produzione e sanità degli alimenti di origine animale  
Indirizzo: Ispezione degli alimenti di origine animale  
XXIII ciclo

**AVANZATE METODOLOGIE BIOSENSORISTICHE PER LA  
SICUREZZA ALIMENTARE APPLICATE NEL RILEVAMENTO  
DI OCRATOSSINA A.**

**Coordinatore:**

Ch.mo Prof.ssa MARIA LUISA CORTESI

**Relatore:**

Ch.mo PROF. ANIELLO. ANASTASIO

**Correlatori:**

Dr. SABATO. D' AURIA

**Candidata:**

Dott.ssa LUISA IOZZINO

PROF.SSA LORELLA SEVERINO

TRIENNIO ACCADEMICO 2007/2010

# Indice

## Indice

<i>Summary</i>	1
<i>Premessa</i>	5
<b>1. INTRODUZIONE</b>	7
<b>1.1. Micotossine</b>	8
<i>1.1.1. Effetti tossici</i>	10
<b>1.2. Ocratossine</b>	13
<i>1.2.1. Caratteristiche chimiche delle ocratossine</i>	16
<i>1.2.2. Fattori che influenzano lo sviluppo dei funghi tossinogeni e la sintesi di ocratossine.</i>	18
<i>1.2.3 Substrati contaminati da OTA.</i>	22
<i>1.2.4. Tossicità dell'ocratossina nell'uomo e nelle specie allevate</i>	26
<i>1.2.5. Limiti di legge</i>	30
<i>1.2.6. Tecniche analitiche di rivelazione</i>	33
<b>1.3. Biosensori</b>	36
<i>1.3.1. Classificazione dei biosensori</i>	39
<i>1.3.2. Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS)</i>	48
<i>1.3.3. Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)</i>	50
<b>1.4. Scopo del lavoro</b>	54
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	56
<b>2.1. Materiali e Reagenti</b>	57
<b>2.2. Sintesi dei coniugati della ocratossina A alla BSA, GlnBP e alla OVA</b>	58
<i>2.2.1. Coniugazione della GlnBP alla ocratossina A</i>	58
<i>2.2.2. Coniugazione dell' ovalbumina (OVA) e della albumina da siero bovino (BSA) alla ocratossina A</i>	59
<b>2.3. Produzione, purificazione di anticorpi policlonali anti-BSA-OTA.</b>	60
<i>2.3.1. Produzione di anticorpi anti-OTA</i>	60
<i>2.3.2. Purificazione delle IgG.</i>	60
<i>2.3.3. Titolazione degli anticorpi mediante saggio ELISA indiretto</i>	61
<b>2.4. Sviluppo del saggio immunologico basato sulla Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS).</b>	63
<i>2.4.1. Marcatura del coniugato Glutamine Binding Protein- Ocratossina (GlnBP-OTA) alla fluoresceina isotiocianato (FTIC).</i>	63
<i>2.4.2. Misure di Spettroscopia di correlazione di fluorescenza (FCS)</i>	64

2.4.3. <i>Analisi dei dati</i>	66
<b>2.5. Sviluppo del saggio immunologico basato sulla metodologia della Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)</b>	<b>67</b>
2.5.1. <i>Immobilizzazione del coniugato OTA-OVA alla superficie di un Chip CM5 mediante “amine reaction”.</i>	67
2.5.2. <i>Ottimizzazione delle condizioni di legame degli anticorpi anti-OTA e di rigenerazione del sensore.</i>	68
2.5.3. <i>Preparazione delle soluzioni standard di ocratossina A e sviluppo del saggio inibitivo.</i>	69
<b>3. RISULTATI e DISCUSSIONI</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Coniugazione dell’ocratossina A a proteine carrier, produzione e purificazione di anticorpi da coniglio anti-OTA</b>	<b>71</b>
3.1.1. <i>Titolazione degli anticorpi</i>	74
<b>3.2. Saggio immunologico basato sulla Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS).</b>	<b>76</b>
3.2.1. <i>Coniugazione del coniugato GlnBP-OTA alla Fluoresceina isotiocianato (FTIC).</i>	77
3.2.2. <i>Rivelazione della ocratossina A mediante saggio competitivo basato sulla metodologia FCS.</i>	79
<b>3.3. Saggio immunologico basato sulla Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR).</b>	<b>84</b>
3.3.1. <i>Immobilizzazione del coniugato OVA-OTA alla superficie del chip e verifica del legame dell’anticorpo</i>	85
3.3.2. <i>Efficienza della rigenerazione</i>	88
3.3.3. <i>Sviluppo del saggio quantitativo mediante la tecnologia SPR.</i>	91
<b>4. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>95</b>
<i>Bibliografia</i>	<b>99</b>

# *Summary*

Ochratoxins are a group of toxic fungal secondary metabolites produced by several fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. They can be frequently found in a variety of foodstuffs and feeds, including cereals, coffee, cocoa, spices, beer, wine, blood derived meat products (in particular pork ), etc. The family of ochratoxins consists of several members in which the ochratoxin A (OTA) is the most toxic ones. Indeed, several studies in animals have shown that OTA is a nephrotoxin, hepatotoxic, carcinogen and teratogen and it enters into the alimentary chain by different sources: cultivation practices, production processes, food transportation and storing processes. The identification of the effect of mycotoxins on human health has increased the attention on the detection of these compounds in human and animal food. Although it is difficult to remove mycotoxins from human and animal diets, it is possible to decrease the risk of exposure through a rigorous program of monitoring these mycotoxins in foods and feeds. Monitoring of mycotoxins in animal feeds is especially important because it provides not only a healthier diet for animals, but it also may indirectly prevent any mycotoxin residue carryover in animals for human consumption. Conventional methods used for detection and identification of OTA comprise thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography, high-pressure liquid chromatography (HPLC) and mass

spectroscopy (MS). Recently, some ELISA assays have been developed too. While these methods can be sensitive and give both qualitative and quantitative information about presence of mycotoxins, they are greatly restricted by assay time and their high cost. In addition they do not allow analysis of mycotoxins in real time.

As a consequence, the need for a more rapid, reliable, at low cost, specific and sensitive method for detecting these analytes, is the focus of a great deal of research, especially for applications outside the laboratory environments.

In this perspective, the aim of my thesis has been the development of two easy immunosensors based on two advanced optical methodologies for the detection of traces of ochratoxin A. We used Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and Surface Plasmon Resonance (SPR) as optical techniques for toxin detection .

The FCS immunoassay is based on the measurement of the fluctuations of a fluorescein-labeled compound by a focused laser beam in the absence and in the presence of specific antibodies anti-compound. In this respect, a competitive assay based on the utilization of unlabeled analytes was developed. The study of the interaction between the fluorescein-labeled GlnBP-OTA and the unlabeled antibodies anti-OTA was carried out in a three-step procedure. First, we studied the diffusion of GlnBP-OTA-F alone. The registered diffusion coefficient value was  $128.71 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Second, we studied the formation of the complex fluorescein-labeled GlnBP-Neo/unlabeled Ab-anti-OTA. In this case the formation of the complex was accompanied by a drastic variation of the diffusion coefficient from  $128.71 \mu\text{m}^2/\text{s}$

to  $74.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . The last step was the addition of different concentrations of unlabeled OTA to the complex fluorescein-labeled GlnBP-OTAF/ unlabeled Ab-anti-OTA. The result of the addition of increasing concentrations of unlabeled OTA was a variation of the diffusion coefficient of the complex. In particular this value returned to the value of  $102.66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . The obtained results indicated that the combination of high-avidity IgG antibodies together with an innovative fluorescence immunoassay strategy resulted in the detection limit of  $0.0078 \text{ ng}$  for ochratoxin A, suggesting the application of this experimental strategy for analyses in which a high sensitivity detection is required.

As regard the immunoassay-based on SPR technique, we monitored the presence of free ochratoxin A by using an indirect sensing method. In particular, we measured the changes in refractive index of the complex by BIAcore. OTA conjugated to OVA was covalently immobilized onto the surface of a sensor gold chip, a mix of antibodies anti-OTA and free mycotoxins, at different concentrations ( $25 \text{ ng/mL}$  a  $1 \mu\text{g/mL}$ ), were flow continuously over the surface of the chip. The conjugate and free toxin in solution competed for the binding to the antibody in solution. As antibodies bind to the conjugate, the refractive index of the buffer in contact with the sensor chip changes. We observed that the binding of antibody to the surface of the chip was inversely proportional to the amount of free ochratoxin A in solution. The  $R^2$  value for this range was found to be  $0.99$ . The results presented showed a limit of quantification of OTA in solution was  $25 \text{ ng/mL}$  ( $2,5\text{ppb}$ ), this value is under the low limits for this mycotoxin. One of the major

difficulties with optical immunosensor systems was that of assessing how actual regeneration of antibody-antigen binding is taking place, due to the high-affinity binding of the antibodies. We used 100 mM of NaOH that did not damage the conjugate surface, and allowed a complete regeneration of surface chip for next application. Moreover, the combination of a high sensitivity and fast measurements (less than 10 min) permits to use this methodology as an analytical tool for detection of OTA for routine surveillance and analysis of food materials.

# *Premessa*

La contaminazione chimica degli alimenti rappresenta un rischio sanitario che va tenuto in debita considerazione, sia attraverso un'efficace rete di controlli lungo l'intera filiera che, a monte, attraverso strategie di prevenzione. In particolare, nel controllo della sanità degli alimenti, sarebbe di notevole utilità poter disporre di metodi analitici che consentano, a costi ridotti ed in tempi brevi, di effettuare una valutazione sulla sicurezza alimentare del prodotto in esame.

Attualmente, le micotossine, ed in particolare l'ocratossina A, rappresentano uno degli aspetti più rilevanti e preoccupanti della contaminazione di alimenti e mangimi. La loro elevata tossicità e diffusione, il numero crescente delle derrate alimentari passibili di contaminazione e l'impatto delle micotossine sulla salute dell'uomo, degli animali e sull'economia, rappresentano alcuni dei parametri causali di questo rischio emergente. Di conseguenza sono necessarie, per prevenirne lo sviluppo, scrupolose procedure di controllo al fine di tutelare la salute del consumatore. A tale scopo le Organizzazioni nazionali ed internazionali valutano costantemente il rischio che queste sostanze rappresentano per gli esseri umani.

Allo stato attuale delle conoscenze, i metodi convenzionali usati per la ricerca delle micotossine negli alimenti, prevedono l'impiego di tecniche cromatografiche quali TLC, HPLC gas cromatografia accoppiate a spettrometria di massa (LC/MS o

GC/MS), oppure test immunoenzimatici, quali l'ELISA, molto utilizzati come metodi di screening. Benché queste tecniche abbiano una notevole riproducibilità e sensibilità, presentano numerosi inconvenienti. In primo luogo, sono metodi estremamente laboriosi e costosi, e non realmente adatti per lo screening di un largo numero di campioni nella ricerca sul campo. In secondo luogo, sono necessari numerosi reagenti di derivatizzazione utilizzati per convertire le tossine nei corrispondenti derivati fluorescenti, mediante una complessa procedura. Infine, sono necessari processi di estrazione e *clean-up* che richiedono tempo e personale specializzato, non applicabili per monitorare un largo numero di campioni. La complessità di questo tipo di analisi ha spinto, quindi, la ricerca verso la messa a punto di sistemi di analisi più efficaci e rapidi, quali i biosensori, che consentano il monitoraggio "real time" delle micotossine, come l'ocratossina A.

# ***1. INTRODUZIONE***

## 1.1. Micotossine

Le micotossine rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche con attività tossica prodotte dal metabolismo secondario di funghi microscopici e filamentosi, meglio note come muffe. Il termine micotossina, infatti, trae origine dal greco, “*mykes*” che significa fungo e “*toxicon*” che significa veleno. Le micotossine non sono correlate direttamente alla crescita del fungo, ma risultano essere piuttosto una sua risposta a determinati stimoli ambientali (Steyen, 1998).

Il metabolismo primario è sostanzialmente uguale per tutte le specie fungine, viceversa quello secondario dipende dalla specie e talvolta dal ceppo.

Le muffe tossigene più diffuse in Europa appartengono al genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Alcuni di questi sono in grado di produrre più di una micotossina, così come, alcune micotossine possono essere prodotte da funghi appartenenti a generi diversi (Betina, V. 1984; Bu'Lock, J. D. 1980).

Sino ad ora sono state identificate più di 400 micotossine, tutte composti organici con una massa compresa tra i 200 e 800 kDa, non volatili a temperatura ambiente.

Sebbene sia stato identificato un elevato numero di micotossine, solo per alcune sono stati riconosciuti effetti tossici. A seconda della disponibilità attuale di informazioni, esse sono generalmente classificate in due grandi categorie: “micotossine principali o maggiori” e “micotossine minori”. Alle micotossine principali appartengono quelle più studiate e comprendono le aflatossine (AFLs), l'ocratossina A (OTA), le fumonisine (FBs), i tricoteceni, lo zearalenone (ZEA), la

patulina e le tossine dell'ergot. Fanno parte, invece, delle micotossine minori: l'acido ciclopiazonico, la sterigmatocistina, la gliotossina, la citrinina, le tossine tremorgeniche, quali il penitrem, la fusarina C, l'acido fusarico, l'acido penicillico, l'acido micofenolico, la roquefortina, la tossina PR e le tossine prodotte dal genere *Stachybotrys* (particolarmente rilevanti per gli ambienti domestici).

Il problema dell'infestazione delle derrate alimentari da micotossine è probabilmente vecchio come l'agricoltura: già nell'Antico Testamento si hanno delle descrizioni di malattie alimentari riconducibili a micotossicosi, tuttavia solamente negli anni '60, in seguito alla "Turkey X disease", malattia che colpì in Inghilterra migliaia di tacchini e riconducibile all'ingestione di arachidi di importazione contaminate da aflatossina B1, si può parlare di "approccio scientifico al problema delle micotossine".

La crescita fungina e la formazione delle micotossine può avvenire sia in campo sulla pianta, sia in una qualunque delle successive fasi di trasformazione, trasporto e conservazione degli alimenti (Hussein e Brasel, 2001). In particolare modo le micotossine si sviluppano su una grande varietà di derrate alimentari, granaglie e mangimi per animali, tra cui; cereali, semi oleaginosi, spezie, frutta secca ed essiccata, vino, birra, cacao, caffè tostato; ma possono essere ritrovate come residui o metaboliti tossici anche nei prodotti alimentari che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati, come latte e prodotti lattiero-caseari, carni e uova.

È stato stabilito che organismi del genere *Stachybotrys* sono in grado di colonizzare gli ambienti interni, ed è stata verificata, inoltre, la presenza di alcune micotossine in materiali da costruzione (Andersson, M. A.1997; Miller, J. 1988; ). Ai principali responsabili di questo tipo di contaminazione appartengono anche quelle micotossine con proprietà carcinogene e immunosoppressive, che normalmente contaminano alimenti di origine animale e vegetale. Tra queste è possibile annoverare le aflatossine, ocratossine, fumonisine, tricoteceni, zearalenone, patulina e citrinine (Hendry, K. M, 1993).

Le principali micotossine sono molto resistenti al calore e non vengono completamente distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti a cui vengono normalmente sottoposte le derrate durante i processi di preparazione degli alimenti. Pertanto, le stesse micotossine o loro derivati ancora attivi possono persistere laddove la muffa abbia cessato il suo ciclo vitale ed essere presenti anche quando il prodotto stesso non appare ammuffito.

### ***1.1.1. Effetti tossici***

L'interesse veterinario verso le micotossine non è limitato agli effetti sul bestiame, ma riguarda anche gli eventuali riflessi negativi sulla salubrità dei prodotti di origine animale, ai quali questi contaminanti, e i loro metaboliti attivi, possono in alcuni casi trasferirsi.

Gli effetti tossici delle micotossine sono molto diversi e in massima parte riconducibili alla formazione di addotti con vari recettori molecolari quali DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici e costituenti di membrana, causando la disorganizzazione dei processi metabolici delle cellule dei tessuti bersaglio ( fegato, rene, midollo osseo), pertanto la loro azione lesiva può essere di vario tipo: nefrotossica, epatotossica, immunotossica, mutagenica, teratogena e cancerogena. Quest'ultima, per il breve ciclo di vita degli animali, non trova particolare riscontro nella pratica di allevamento, ma ha dei riflessi molto importanti per la sicurezza delle derrate prodotte. Infatti, alcuni effetti tossici correlati alle basse concentrazioni di micotossine nell'alimento, pur non impedendo all'animale di giungere a macellazione, compromettono irreparabilmente il prodotto finale. Si pensi ad esempio alle petecchie emorragiche che possono presentarsi nelle carni del pollame per esposizione ad aflatoxina, tossina T2 e HT2, oppure alle degenerazioni epatiche da fumonossina nel suino. Premesso che, se le quantità assunte sono sufficientemente alte, qualsiasi specie animale può subire gli effetti negativi dell'esposizione alle micotossine, è importante considerare che i bassi livelli di contaminazione, frequentemente presenti negli alimenti destinati ai nostri animali d'azienda, possono essere decisamente dannosi per determinate specie ed esserlo poco o niente affatto per altre. In alcuni casi gli animali con ruminazione attiva risultano meno sensibili per il ruolo protettivo che i microrganismi esplicano, tramite le loro attività metaboliche, nei confronti delle micotossine. La specie suina invece è probabilmente quella che paga il maggior tributo, presentando una sensibilità media o alta praticamente a

tutte le micotossine degne di considerazione; anche il coniglio e il pollo sono sovente sensibili.

L'ingestione di alimenti contaminati da micotossine può portare nell'uomo un'ampia varietà di quadri patologici, sia acuti che cronici, di difficile diagnosi. In particolar modo dal punto di vista sanitario sarebbe auspicabile la completa assenza di micotossine ad azione cancerogena e genotossica, almeno negli alimenti destinati all'uomo. Infatti, mentre per i cancerogeni non genotossici è sempre possibile stabilire una soglia di dose al di sotto della quale l'effetto cancerogeno non può verificarsi, per i cancerogeni genotossici anche una sola molecola, in teoria, potrebbe essere in grado di far sviluppare un cancro.

L'ingestione non è l'unica via attraverso la quale l'uomo entra a contatto con le micotossine. Infatti l'esposizione è possibile anche mediante inalazione di materiale particolato, o di origine fungina (di solito spore), o derivante da substrati contaminanti. L'inalazione di questo materiale può trasportare le micotossine fino agli alveoli polmonari (Smoragiewicz, W., B, 1993; Croft, W. A., 1986).

L'impatto delle micotossine sulla salute dipende principalmente dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti e dalla sensibilità specie-specifica, nonché da tutti quei fattori che possono influenzare l'attività biologica di una sostanza chimica (età, peso, razza, sesso, stato fisiologico, alimentazione, ecc.). Per stabilire un rapporto di causalità tra l'ingestione di micotossine e una specifica malattia umana, devono essere soddisfatti alcuni criteri: presenza di micotossine negli alimenti, accertata esposizione alle micotossine, correlazione tra esposizione ed

incidenza di una data patologia, riproducibilità dei sintomi caratteristici negli animali da esperimento e simile modalità di azione nell'uomo e nei modelli animali.

Tali effetti rendono necessario il monitoraggio costante ed efficace degli alimenti e dei mangimi soggetti a contaminazioni dirette ed indirette.

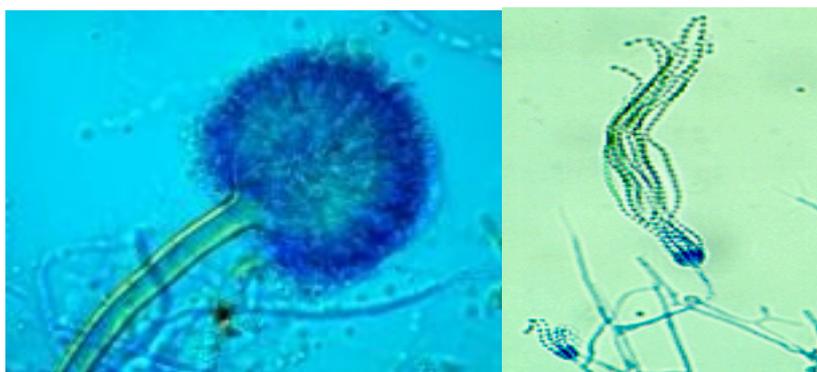
## 1.2. Ocratossine

Come precedentemente evidenziato le ocratossine sono metaboliti secondari prodotti da numerose specie di funghi eterotrofi appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium* particolarmente diffusi in alcuni Paesi quali Nord Europa, Nord e Sud America (Devegowda et al., 1998). In particolare, l'ocratossina A (OTA), che tra le ocratossine rappresenta il metabolita dotato di maggiore tossicità, è stata isolata per la prima volta nel 1965 in Sud Africa da un ceppo di *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965) (**Figura 1**). In seguito alla sua scoperta la sintesi di questo metabolita fungino è stata associata ad altre classi appartenenti al genere di *Aspergillus* (Hesseltine et al., 1972). Nell'ambito del genere *Aspergillus* ha ricevuto particolare attenzione la classe *Nigri*. Infatti nonostante sia un possibile produttore di tale metabolita esso viene utilizzato molto spesso come agente di biocontrollo (Lee e Magan, 1999). Infatti la Food and Drug Administration (FDA) non ha attribuito alla specie della sottoclasse *Nigri* proprietà nocive per l'uomo (GRAS, Generally Recognised As Safe) (Bigelis e Lasure, 1987) pertanto, data la capacità di queste specie di sintetizzare acidi organici ed enzimi idrolitici, vengono

abituamente utilizzati nell'industria alimentare e nella elaborazione degli alimenti tradizionali (soprattutto in Oriente). Tuttavia alcuni ricercatori pensano che l'uso di tali specie possa costituire un potenziale rischio per la salute umana. (Pitt et al. 1997).

Nel 1969 si osservò per la prima volta che l'OTA viene prodotta anche da miceti del genere *Penicillium* in particolare *Penicillium viridicatum* (Van Walbeek et al., 1969). *P. verrucosum* *P. brevicompactum* (Kozakiewicz et al., 1993), *P. chrysogenum* (Vazquez-Belda et al., 1995; Mills et al., 1982; Mills et al., 1989) *P. expansum* (Kozakiewicz et al., 1993; Mills et al., 1989), *P. aurantiogriseum* (Mills et al., 1989) e *P. cyclopium* (Vazquez-Belda et al., 1995; Mills et al., 1982). Attualmente a causa dei frequenti cambiamenti nella tassonomia dei *Penicillium* e dei conseguenti frequenti errori di identificazione, è stato da molti studiosi accettato che le più frequenti se non le uniche specie, appartenenti al genere *Penicillium*, capaci di produrre OTA sono il *Penicillium verrucosum* ed il *Penicillium nordicum* (Larsen et al., 2001) (figura 1). È opinione comune che la contaminazione da ocratossina A nelle regioni a clima freddo sia dovuta principalmente a *Penicillium verrucosum* (Frisvad e Lund, 1993; Holmberg et al., 1991; Mills et al., 1995; Pitt e Hocking, 1997; Scudamore et al., 1993; Sweeney e Dobson, 1998) infatti, tale specie cresce anche a 0°C (Bullerman, 1985; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979) e sintetizza la micotossina a partire da 4°C (Bullerman, 1985; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979); anche se la temperatura ottimale per la produzione di OTA da parte di *P. verrucosum* è di 25°C (Northolt et al.,

1979). Invece nelle regioni a clima caldo o temperato, la presenza di OTA sembra sia dovuta principalmente ad *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus nigri* e ad *Aspergillus ochraceus* (Accensi et al., 2001; Heenan et al., 1998; Urbano et al., 2001).



**Figura 1: *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum***

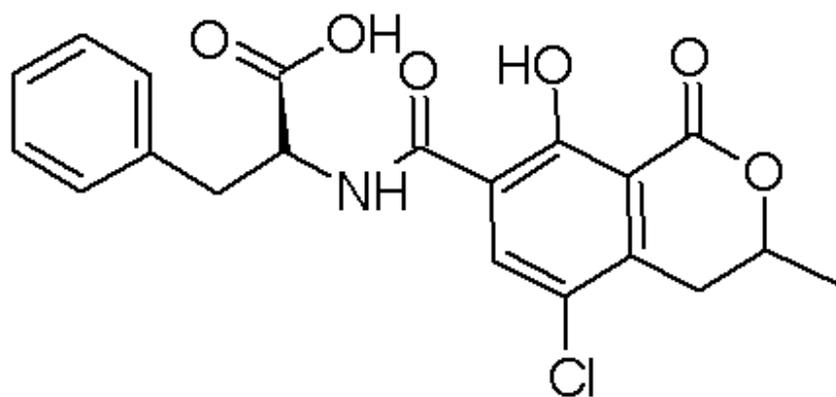
Le ocratossine sono prodotte raramente dal tallo nella sua fase di crescita, lo sono più frequentemente nella fase di biosintesi, quando l'ambiente tende ad essere sprovvisto in nutrienti che forniscono azoto e fosforo (probabile reazione di difesa). Come detto precedentemente, la formazione delle ocratossine è strettamente correlata allo sviluppo e alla crescita fungina, tuttavia la presenza di funghi tossinogeni in un alimento non implica necessariamente la presenza delle relative micotossine, in quanto, sono le condizioni ambientali e la presenza di substrati ottimali ad indurre la loro produzione. Lo sviluppo di tali muffe e la successiva sintesi può avvenire in qualunque fase del ciclo produttivo dell'alimento, a partire dalla contaminazione fino ad arrivare al consumo, passando per lo stoccaggio, il trasporto e la conservazione, fattori che variano in rapporto alla fase (campo,

raccolta, stoccaggio) di vita del vegetale. Pertanto per prevenire la contaminazione delle derrate alimentari dalle micotossine occorre impedire la crescita fungina tenendo conto quindi delle leggi che regolano la vita delle muffe.

### ***1.2.1. Caratteristiche chimiche delle ocratossine***

Le ocratossine costituiscono un gruppo di derivati isocumarinici strettamente correlati tra loro, legati al gruppo amminico della L-fenilalanina e classificati come pentacetidi nell'ambito del gruppo dei polichetidi in base alla loro origine biosintetica (Turner, 1971).

Esistono diversi tipo di ocratossina: A, B, C,  $\alpha$ ,  $\beta$ , 4R/Sidrossiocratossina A, 10-idrossiocratossina A, ocratossina A aperta (OP-OTA) (**Figura 2**).



**Figura 2: ocratossina A**

La prima ad essere scoperta fu l'ocratossina A, isolata da di *Aspergillus ochraceus*, da cui poi è derivato il nome, che rappresenta il composto più comune e quello dotato di maggiore tossicità (Van der Merwe et al., 1965; Neshiem, 1969). Le ocratossine B e C sono i derivati rispettivamente dechlorurato ed etilestere dell'ocratossina A. L'OTB manca del gruppo cloridrico in posizione C-5 ed è dieci volte meno tossico dell'OTA; l'OTC invece possiede una struttura ed una tossicità simile a quella dell'OTA. Gli esteri dell'ocratossina A (oltre alla già citata OTC) possiedono una tossicità simile a quella dell'OTA mentre la tossicità degli esteri dell'OTB è pressoché nulla (Ueno, 1987); l'OT $\alpha$  ed i derivati idrossilati dell'ocratossina A (4R/S-OH-OTA) invece, non risultano essere tossici; al contrario, la forma aperta dell'OTA sembra possedere una tossicità simile a quella dell'ocratossina A (Xiao et al.,1996a). L'ocratossina A, e molto più raramente l'ocratossina B, sono i soli composti ritrovati come contaminanti naturali in organismi vegetali. In generale sono anche i più stabili sopravvivendo alla maggior parte dei processi industriali alimentari (Scott, 1996). Possono essere conservati in etanolo a temperature di refrigerazione per oltre un anno senza decremento di attività (Chu e Butz, 1970); tuttavia quando presenti in soluzione devono essere protetti dalla luce, in quanto soggetti a decomposizione (Neely e West, 1972). L'ocratossina A è un composto cristallino poco colorato, che esibisce una fluorescenza blu sotto i raggi UV.

Essa ha un punto di fusione di circa 90°C, e contiene approssimativamente una mole di benzene; dopo disseccamento per un'ora a 60°C il punto di fusione oscilla

in un range di 168° – 173°C. E' poco solubile in acqua, altamente solubile in solventi polari, e in bicarbonato di sodio acquoso. In seguito ad idrolisi acida, essa produce fenilalanina ed un acido lattone otticamente attivo, l'ocratossina A (che rappresenta il metabolita inattivo dell'OTA).

### ***1.2.2. Fattori che influenzano lo sviluppo dei funghi tossinogeni e la sintesi di ocratossine.***

I fattori che influenzano la crescita fungina su differenti substrati e che consentono la successiva sintesi delle micotossine sono numerosi. Tali condizioni possono essere riassunte nei seguenti punti:

- **Umidità ambientale o acqua libera (aw):** la colonizzazione fungina degli alimenti si verifica più frequentemente di quella batterica a livelli di aw inferiori a 0.85; questo non perché i funghi non possano crescere a tenori più elevati, ma piuttosto perché i batteri sono fortemente competitivi e diventano la microflora predominante a valori di "aw" compresa tra 0.85 e 1.00. A valori compresi tra 0.85 e 0.93, l'invasione da parte di muffe e lieviti prende il sopravvento grazie al fatto che solo alcuni batteri sono in grado di moltiplicarsi rapidamente a queste condizioni. In base alle loro differenze di comportamento in funzione delle disponibilità d'acqua, le specie fungine sono state classificate in: idrofile (aw superiori a 0.9); mesofile ("aw" compresi tra 0.8 e 0.9); xenofile ("aw" inferiori a 0.8). La maggior parte delle muffe deputate alla sintesi di ocratossina sono idrofile,

con optimum di produzione a valori di aw compresi tra 0.95- 0.99 (Adebajo et al., 1994; Ramos et al., 1998) (Patterson e Darnogloul, 1986; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979). Tale parametro va tenuto sotto stretta osservazione durante la conservazione o la commercializzazione stessa di prodotti in precedenza ben essiccati, in particolare quando tali prodotti ritornano ad inumidirsi in seguito a una cattiva conservazione, ad esempio quando questi vengono conservati alla rinfusa in magazzini o silos per condensazione d'acqua sui pavimenti o su altre superfici fredde. Piuttosto frequente è anche l'eventualità di una condensazione di acqua sui prodotti confezionati in buste di plastica quando il confezionamento avviene ad elevate temperature ed umidità, in quanto in un secondo momento, se le buste vengono esposte a basse temperature, l'umidità residua nella plastica si condensa e consente la crescita dei micromiceti. Pertanto per limitare la contaminazione degli alimenti il tenore in acqua deve essere contenuto durante la conservazione e mantenuto inferiore ad es. al 13-13,5% per i cereali e al 7-8% per i semi oleosi (se questo non supera il 10% le contaminazioni gravi sono scongiurate).

- **Temperatura:** le temperature ideali per lo sviluppo delle specie fungine produttrici di ocratossine sono comprese tra 20 e 30°C con l'umidità del substrato del 30% e quella relativa prossima al 100%. Le tossine vengono prodotte a temperature in genere lievemente più basse di alcuni gradi rispetto a quelle ottimali per lo sviluppo del micelio fungino, ma che possono oscillare in un range di 10°-50°C (per i generi *Aspergillus* e *Penicillium*) (Osweiler, 1992). *A. ocraceus* sintetizza l'OTA a partire da una temperatura di 12°C, con un massimo di

produzione a 30°C (Bacon et al., 1973;; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979; Ramos et al., 1998); mentre *A. nigri* cresce a temperature comprese tra 6 e 47°C con un optimum di sviluppo a 35-37°C e sintetizza la micotossina in un range di 20-25°C. Infine *A. carbonarius* si sviluppa a temperature comprese tra 10 e 40°C e produce l'OTA tra i 15 e i 35°C (Esteban et al., 2004). La temperatura di crescita varia in rapporto anche al verificarsi delle altre condizioni di crescita come la disponibilità in acqua del substrato. Il fattore temperatura risulta essere, inoltre, determinante per la sintesi di una specifica tossina se si considera che uno stesso fungo può elaborare tossine diverse a temperature diverse (*Aspergillus ochraceus* a 25°C sintetizza ocratossina A, a 20°C sintetizza invece acido penicillico). I trattamenti termici classici di sterilizzazione degli alimenti permettono di distruggere le muffe ma sono, per lo più, poco efficaci contro le ocratossine (termostabili come la maggior parte delle micotossine) (Pasteiner, 1997).

- **pH**: un altro fattore importante per la crescita dei funghi ocratossigeni e la relativa sintesi di OTA è il pH. In generale, lo sviluppo del micelio avviene a valori di pH compresi tra 4 e 8, con un pH ottimale per le specie del genere *Penicillium* di 6.5 (Bullerman, 1985).

- **Atmosfera gassosa**: anche la composizione gassosa dell'atmosfera può influenzare la crescita delle specie tossigene e lo sviluppo delle relative micotossine (Northolt e Bullerman, 1982; El-Halouat e Debevere, 1997; Paster et al., 1983). Le muffe che sintetizzano ocratossine, come la maggior parte delle specie fungine tossinogene, sono aerobie ma possono adattarsi all'ambiente, quando sussistono le

altre condizioni ottimali, in atmosfera contenente più CO<sub>2</sub> della norma. Tuttavia è stato dimostrato che modificando la composizione in CO<sub>2</sub> nell'atmosfera al 20% era possibile ridurre apprezzabilmente l'accrescimento fungino (Hesseltine, 1972), e che, un atmosfera contenente il 30% di CO<sub>2</sub> è capace di inibire totalmente la produzione di OTA da parte di *A. ochraceus* (Paster et al., 1983). La mancanza di ossigeno non comporta l'eliminazione dei micromiceti ma ne sospende l'attività e quindi la sintesi di micotossine. Per questo motivo si sta puntando sulla messa a punto di impianti di conservazione in atmosfera controllata, che prevedono l'impiego di aria arricchita di anidride carbonica e/o azoto congiuntamente ad una ridotta temperatura. Tali impianti potrebbero notevolmente ridurre le contaminazioni anche di prodotti non completamente essiccati.

- **Substrato**: uno dei fattori che più influenza la tossinogenesi è la composizione chimica del substrato. Sembra, infatti, che le specie ocratossigene sintetizzino più facilmente ocratossina A sfruttando proprio le riserve aminoacidiche dell'ospite; in particolare prolina ed acido glutammico favoriscono la produzione di OTA nell'orzo (Haggbloom e Ghosh, 1985). Studi sperimentali condotti da Stell e collaboratori (1973) sulla produzione di ocratossina A da parte di *A. ochraceus* NRRL 3174 hanno dimostrato che la composizione chimica del substrato in termini di concentrazione di microelementi è un fattore importante per tale produzione. Pertanto è ipotizzabile che la presenza di ocratossine su diverse specie vegetali potrebbe essere messa in relazione ad un diverso contenuto di tali microelementi quali ad esempio zinco, boro, ferro, manganese e molibdeno. Anche lo stato fisico

dell'alimento è interviene nel favorire o meno la crescita dei miceti. I semi macinati anche se grossolanamente, verranno più velocemente contaminati poiché la funzione protettiva offerta dal tegumento viene a mancare. Un prodotto poco comprimibile come granturco e arachidi, lascerà uno spazio interstiziale importante, con maggiore interposizione di ossigeno per cui le muffe si svilupperanno più facilmente che nei silos dove i semi (ad es. di grano) sono più piccoli.

- **Errori umani:** sono un altro aspetto che non va sottovalutato e che più influenza la tossinogenesi del substrato. Infatti la meccanizzazione dei raccolti, più che le improprie pratiche colturali, è associata ad indebolimento degli involucri protettivi dei cereali favorendo la germinazione delle spore fungine. Una pratica comune nella manipolazione e commercializzazione delle granaglie è la miscelatura di partite di diversa provenienza. Tale pratica viene eseguita sia per migliorare la qualità di una partita, aggiungendo un prodotto più pregiato, sia per raggiungere standard commerciali di contenuto di umidità mediante l'aggiunta di prodotto più secco. Tuttavia la miscelazione di partite di dimensioni ed umidità diverse porta alla mescolanza di semi più o meno umidi, alcuni dei quali con umidità ancora sufficiente per lo sviluppo delle muffe. Nella migliore delle ipotesi occorrono 2-4 giorni per ottenere un'uniforme distribuzione dell'umidità in tutti i punti della massa.

### ***1.2.3 Substrati contaminati da OTA.***

Numerosi sono gli alimenti che possono essere contaminati dalle diverse specie fungine e dai loro metaboliti secondari, quali ad esempio l'ocratossina A.

I principali substrati contaminati da OTA sono: riso, segale, mais, grano, sorgo, orzo, frumento, i cereali in genere e i prodotti da forno quali ad esempio pane e biscotti (**Figura 3**). Di frequente sono contaminati da OTA anche noci, pistacchi, arachidi e i sottoprodotti delle loro rispettive lavorazioni (panelli e farine di estrazione), come anche fagioli e legumi in genere.



**Figura 3 Mais contaminato da *Aspergillus ochraceus*.**

Nell'ultimo decennio è stata dimostrato che l'ocratossina A è un contaminante anche di vino birra e caffè. È stato comprovato, inoltre, come la sua concentrazione varia a seconda della tipologia di vino in base al diverso processo di lavorazione dell'uva e al tempo della vendemmia. Infatti poiché la produzione di vino rosso prevede la fermentazione del succo insieme alle bucce probabilmente contaminate dalla micotossina la concentrazione di quest'ultima risulta maggiore rispetto ai vini bianchi. Inoltre, i vini dolci risultano anche più contaminati dai vino rossi in quanto,

per ottenere un uva più dolce, si effettua la vendemmia più tardi, favorendo quindi lo sviluppo delle muffe ocratossigene e delle relative micotossine (Zimmerli e Dick, 1996). Per quanto riguarda il caffè è stato dimostrato che circa l'80% di OTA viene distrutta dai processi di torrefazione industriale, pertanto il caffè contaminato, offre solo un contributo marginale all'assunzione quotidiana di OTA (Van Der Stegen et al., 1997). È stata riscontrata una notevole presenza di OTA anche sulla frutta sottoposta a procedimenti di essiccazione quale prugne, albicocche e fichi. Il cacao, le spezie in genere, le foglie di tè (Halt, 1998), le mandorle ed i pistacchi possono evidenziare concentrazioni discrete di ocratossine. Le radiazioni possono determinare una drastica riduzione della loro concentrazione su questi prodotti di piccolo volume.

La contaminazione da parte dell'ocratossina A non coinvolge solo alimenti di origine vegetale, infatti, è stata dimostrata la sua presenza anche in alimenti di origine animale. Tra le specie animali, il suino è particolarmente sensibile all'esposizione all'OTA, pertanto è possibile ritrovare contaminazioni di OTA principalmente in prodotti a base di carne suina e specie avicole (Canela et al., 1994; Curtui et al., 2001; Gareis e Wolff, 2000; Gareis e Scheuer, 2000; Holmberg et al., 1991; Jimenez et al., 2001; Jorgensen, 1998). In questo caso la contaminazione può essere scaturita da numerosi fattori quali ad esempio l'utilizzo di mangimi contaminati da OTA. (Abramson et al., 1983; Fukal, 1990; Gareis e Wolff, 2000; Pohland et al., 1992; Kuiper-Goodman e Scott, 1989; Speijers e Van Egmond, 1993). Alcuni studiosi, tuttavia, attribuiscono la presenza di OTA negli

alimenti di origine animale anche ad ingredienti del prodotto sottoposto a lavorazione, come ad esempio i pistacchi utilizzati per aromatizzare la mortadella. Un'altra pericolosa fonte di contaminazione può essere quella derivante dalla presenza di miceti utilizzati nell'industria di lavorazione dei prodotti carnei (ad es. salumi), quali vari ceppi di *Penicillium* ed *Aspergillum*, in grado di conferire al prodotto proprietà organolettiche apprezzabili. Tali ceppi se esposti alle idonee condizioni sono potenziali produttrici di ocratossina, citridina, citroviridina e sterigmatocistina.

La presenza della micotossina è stata riscontrata anche nel latte bovino di animali alimentati con mangime contaminato (Hohler, 1998; Skaug, 1999; Valenta e Goll, 1996), tuttavia sono ancora discordanti i pareri relativi alla sua presenza in questa matrice biologica i cui livelli risultano a concentrazioni tali da non destare pericolo.

Il rischio connesso alla contaminazione da OTA nella specie suina è da non sottovalutare anche per la salute dell'animale stesso. Tale specie, infatti, a differenza della specie bovina non è in grado di idrolizzare l'ocratossina A in fenilalanina e ocratossina  $\alpha$ , residuo lattone non tossico, prodotto dalla flora batterica presente nello stomaco dei ruminanti, che si assicurano così una efficace biotrasformazione dell'ocratossina A. Infatti nei suini si osservano molto spesso manifestazioni croniche caratterizzate da ridotto consumo di alimento, disidratazione e dimagrimento, connesse all'interessamento del rene che è organo bersaglio di questa tossina. Nei polli si riscontrano ascite, idropericardio, depositi di

urati in cavità e organi, colorazione scura del fegato, scarsa resistenza alla tensione dell'intestino dovuta a riduzione del collagene ed ossa gommose, con aumento dei diametri tibiali e scarsa mineralizzazione.

#### ***1.2.4. Tossicità dell'ocratossina nell'uomo e nelle specie allevate***

Delle ocratossine, solo l'ocratossina A sembra essere dotata di notevole attività tossica, suscitando maggiori preoccupazioni per i riflessi sulla salute umana.

L'ocratossina A è essenzialmente una nefrotossina, ma in relazione alla dose e alla specie animale, può esplicare numerosi altri effetti a carico di diversi organi e tessuti.

L'esposizione cronica a basse concentrazioni di OTA determina alterazioni morfologiche e funzionali in particolare a livello dei reni, in specie animali da sperimentazione (Kanisawa e Suzuki, 1978; Bendele et al., 1985; Boorman, 1989). È stato dimostrato che il 70% dell'ocratossina A ingerita attraverso la dieta, viene riassorbita nei tubuli prossimali dei nefroni, dove si accumula maggiormente (Zingerle e collaboratori 1997). L'ocratossina A infatti inibisce la sintesi proteica soprattutto nelle cellule renali (68%). Un'esposizione cronica determina nei ratti lesioni primarie di tali tubuli seguita da alterazioni strutturali e funzionali dei glomeruli ed involuzione glomerulare (Krogh, 1980); un'esposizione acuta, invece, determina una marcata degenerazione acidofila con necrosi e desquamazione dell'epitelio dei tubuli prossimali (Kanisawa et al., 1977).

Il rene è sicuramente il principale organo bersaglio dell'OTA ma, non vanno sottovalutati i suoi effetti a livello del fegato. Infatti esposizioni di ratti e topi a bassi livelli di ocratossina A per brevi periodi, sono sufficienti ad innescare processi apoptotici negli epatociti di topo e necrosi centrotubulare (Atroschi et al., 2000).

Numerosi studi hanno, tuttavia, dimostrato che l'azione nefrotossica ed epatotossica non sono le uniche dovute a tale micotossina. Infatti sono stati riscontrati lesioni a carico del miocardio, dei polmoni, midollo spinale, emorragie e trombosi della milza, del cervello, del fegato e del cuore, in seguito ad una singola somministrazione di 10 mg/Kg di OTA, nonché marcata riduzione del livello del fibrinogeno e plasmatico, dei fattori di coagulazione II, VII, X, del numero dei trombociti e dei megacariociti (Galtier et al., 1979; Albassam et al., 1987).

Particolarmente preoccupanti sembrano anche gli effetti a carico del sistema immunitario. L'azione immunosoppressiva deriverebbe dalla capacità di inibire la sintesi proteica da parte ocratossina A, che determinerebbe soprattutto una riduzione dei fattori umorali e delle immunoglobuline; infatti, è stata riscontrata, nel topo, in seguito al trattamento prolungato nel tempo (alcune settimane) con piccole dosi di ocratossina A, una diminuita sintesi dei precursori delle cellule bianche con una marcata soppressione dell'attività chemiotattica dei macrofagi (Dhuley, 1997) e dell'attività microbica delle cellule "natural killer" (NK) (Luster et al., 1987; Lea et al., 1989). È stato evidenziato da una marcata riduzione della massa timica e da una ipocellularità del midollo osseo, che l'OTA induce mielotossicità, portando a diminuzione delle cellule staminali totipotenti e riduzione significativa della sintesi

dei precursori degli eritrociti, dei granulociti, dei megacariociti e dei macrofagi (Boorman et al., 1984).

Per molto tempo l'OTA è stata considerata una sostanza non genotossica poiché i saggi relativi condotti davano sempre risultati negativi anche se, spesso, controversi. E' stato recentemente dimostrato che l'ocratossina A, determina la sintesi non programmata del DNA (UDS) in maniera concentrazione dipendente, in colture cellulari epiteliali di vescica di maiale ed uroteliali umane trattate con 250-1000 nM della micotossina, tale sintesi, è stata evidenziata anche alla concentrazioni di 50 nM (Follmann et al., 1995).

È stata osservata un'azione mutagena dell'OTA in seguito al trattamento di frazioni microsomiali di rene di topo con la micotossina in associazione con il NADPH o l'acido arachidonico come cofattori. I risultati di tali esperimenti hanno rivelato che l'OTA induceva la formazione di mutazioni principalmente in presenza dell'acido arachidonico piuttosto che in presenza del NADPH nel ceppo TA1535 (Obrecht-Pflumio et al., 1999). L'analisi di queste mutazioni ha evidenziato che erano costituite, principalmente, da grandi delezioni. Questi esperimenti sembrano indicare che l'OTA non ha un'azione mutagena diretta sul DNA ma che tuttavia può generare le mutazioni indirettamente in seguito alla bioattivazione metabolica. Infatti è noto che gli xenobiotici possono generare in vivo composti endogeni reattivi che successivamente possono formare addotti al DNA. I risultati di alcune indagini dimostrano che l'attivazione dell'OTA a composti genotossici avvenga attraverso reazioni biochimiche che coinvolgono enzimi perossidasi e che

comportano la formazione di addotti prevalentemente a livello delle basi guaniniche del DNA.

La nefropatia micotossina (MN) è un disordine renale causato dall'ingestione di metaboliti secondari, prodotti da funghi, dotati di proprietà nefrotossiche, e presenti in mangimi/foraggi come cereali e piante fibrose, conservate in condizioni non appropriate.

Sebbene nell'uomo non siano stati riportati chiari casi di nefropatia micotossica, è abbastanza verosimile che questa potente nefrotossina, che determina danni renali ingenti in diverse specie animali, possa anche indurre alterazioni renali negli uomini esposti. Tra le intossicazioni causate dall'OTA vi è la ocratossicosi classica che colpisce gli allevamenti zootecnici e che comprende in particolare la Nefropatia micotossica dei suini e la Nefropatia micotossica aviaria. Si ha ragione di ritenere che le ocratossine possano essere coinvolte anche in una malattia dell'uomo nota come Nefropatia endemica Balcanica (BEN). Quest'ultima è una patologia renale segnalata, fin dagli anni 50, soprattutto nell'area dei Balcani, compresi ex-Jugoslavia, Romania, Bulgaria. Studi epidemiologici hanno dimostrato una correlazione tra la presenza di OTA negli alimenti e la maggiore incidenza di BEN nelle suddette aree geografiche. Ulteriori conferme sono state ottenute con il riscontro di una più elevata presenza di ocratossina A nel sangue di pazienti oltre (1-2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) di un'area della Croazia caratterizzata da un'elevata incidenza della malattia (Castegnaro et al. 1991). Ciò è stato spiegato considerando che le popolazioni contadine di questi paesi poveri consumano alimenti prodotti in proprio

e conservati, spesso, in condizioni non idonee e quindi altamente contaminati da OTA, mentre le popolazioni urbane consumano cibo prodotto a livello industriale. I primi sintomi sono aspecifici; essi includono affaticamento, anemia, proteinuria, ingiallimento della pelle, dolore di testa, perdita di peso, anoressia ed uremia. All'esame autoptico i reni appaiono notevolmente ridotti di volume con una diffusa fibrosi corticale, spesso senza alcun segno di infiammazione (Vukelić et al., 1992). L'esame istologico mostra la presenza di lesioni croniche della corteccia renale con fibrosi interstiziale, ialinizzazione dei glomeruli, degenerazione dell'epitelio tubulare e perdita dell'orlo a spazzola del tubulo renale (Scott, 1994; Heptinstall, 1974).

Numerosi studi hanno evidenziato un alta incidenza di mortalità da tumori delle vie urinarie in pazienti colpiti da BEN, in quanto essi risultano 90 volte più a rischio di contrarre tumori della pelvi, del rene e dell'uretere rispetto alla popolazione non colpita. L'OTA è stata classificata pertanto, nel gruppo 2B come sostanza potenzialmente cancerogena per gli uomini.

### ***1.2.5. Limiti di legge***

L'accumulo di ocratossina e dei suoi derivati nei tessuti rende le carni suine una delle fonti di introduzioni di Ocratossina nella dieta umana. La presenza di ocratossine nella filiera agro-alimentare oltre a produrre danni sulla salute umana, incide notevolmente anche sulla produzione e sulla qualità del prodotto finale; con

conseguente impatto sull'economia. Da un'indagine svolta a livello europeo risulta che i cereali rappresentano la fonte primaria di contaminazione (50%) anche se si sono riscontrate positività per il vino (13%), il caffè (10%), le spezie (8%), i succhi di frutta (6%), la birra (5%), il cacao (4%), la frutta essiccata (3%), la carne (1%).

Pertanto per garantire la qualità e la sicurezza dei cibi, sono state indotte una serie di leggi che hanno decretato i livelli massimi accettabili delle varie micotossine.

Lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) ha classificato numerose sostanze in base all'intensità dell'effetto cancerogeno e tra queste anche le ocratossine.

Per questa tossina non si è giunti ancora a chiarire in modo definitivo se gli effetti cancerogeni siano o meno di origine genotossica diretta. Per motivi cautelativi, comunque, la valutazione del rischio viene effettuata come se si trattasse di un cancerogeno genotossico, pertanto l'OTA è classificata nel gruppo 2B.

Il Comitato Scientifico per l'Alimentazione (SCF) ha concluso che l'esposizione giornaliera all'ocratossina per l'uomo deve essere inferiore a 5 ng/Kg di peso corporeo. Tuttavia, in Danimarca, che per particolari condizioni climatiche, è particolarmente esposta al problema, già dal 1986 si effettuano controlli alla macellazione sui reni di suino, e livelli superiori a 10 ppb comportano l'eliminazione delle viscere, mentre livelli superiori a 25 ppb comportano l'eliminazione dell'intera carcassa.

In Italia una circolare del Ministero della Salute ha indicato in 1 ppb il valore guida per carni suine e prodotti derivati. I limiti massimi ammissibili di Ocratossine nei prodotti destinati all'alimentazione umana sono regolamentati dal Reg. (CE) 683/2004 e dal Reg. (CE) 472/2002 e sono sintetizzati nella **Tabella 1**.

**Tabella 1: Limiti di legge per l'Ocratossina A**

<b>PRODOTTO</b>	<b>OCRATOSSINA A Limiti massimi (ppb)</b>
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0.50
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati in modo specifico ai lattanti	0.50
Cereali non lavorati (compreso riso non lavorato e grano saraceno)	5.0
Tutti i prodotti derivanti da cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali e cereali destinati al consumo umano diretto)	3.0
Frutti essiccati dalla vite ( uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10.0
Carni suine e prodotti derivati	1.0
Vino, mosto e succo d'uva	2.0

### ***1.2.6. Tecniche analitiche di rivelazione***

Per controllare l'introduzione in commercio di prodotti contenenti ocratossina, secondo i limiti di legge, si è resa necessaria la messa a punto di tecniche in grado di rivelare la presenza di piccole quantità di micotossine nei prodotti alimentari. I metodi convenzionali di analisi, validati dalle principali istituzioni deputati alla sicurezza alimentare, prevedono l'impiego di tecniche cromatografiche, come la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con UV e/o rilevamento fluorescente (FLD) (Lai C.L. et al 2000; Watanabe M. e Shimitzu H, 2005), oppure la cromatografia liquida o gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (Sforza S. et al 2005). In passato è stata largamente utilizzata anche la TLC (Thin-Layer Chromatography) ma attualmente l'HPLC rappresenta il metodo quantitativo più diffuso ed efficace.

Nonostante le tecniche sopra citate abbiano una notevole riproducibilità e sensibilità, presentano numerosi inconvenienti. In primo luogo, sono metodi estremamente laboriosi e costosi, e non realmente adatti per lo "screening" di un largo numero di campioni nella ricerca sul campo. In secondo luogo, sono necessari numerosi reagenti di derivatizzazione utilizzati per convertire le tossine nei corrispondenti derivati fluorescenti, mediante una complessa procedura. Infine, sono necessari processi di estrazione e *clean-up* che richiedono tempo e personale specializzato, non applicabili per monitorare un largo numero di campioni.

Di fatto, le metodologie utilizzate per la preparazione del campione, ai fini della successiva analisi quantitativa, mediante le tecniche sopracitate, variano molto

a causa delle differenze chimiche delle varie micotossine e soprattutto della varietà delle matrici in cui esse possono essere presenti.

Ad esempio, il metodo ufficiale per i prodotti caseari approvato dall' "International Union of Pure and Applied Chemistry", "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), e "The International Dairy Federation" è la procedura analitica Stubblefield (1989). In questa procedura, per l'estrazione, il cloruro di sodio è aggiunto per ridurre la possibilità che si verifichino emulsioni. Nel caso del latte in polvere, esso deve essere disciolto in acqua prima dell'estrazione. I formaggi vengono tagliati in piccoli cubetti prima dell'estrazione. Se ci sono problemi nella fase di estrazione esiste un metodo alternativo descritto da Fukayama et al.,1980. Per quanto riguarda grano e mangimi, il metodo conosciuto come metodo CB ( Contaminants Bureau, FDA) rappresenta il metodo ufficiale di analisi di aflatossine e ocratossine in arachidi e prodotti derivati (Helrich, 1990). Brevemente, i campioni sono adeguatamente macinati e minuziosamente amalgamati, i sub campioni sono poi prelevati per l'estrazione con cloroformio. Una porzione dell'estratto viene fatta passare attraverso una colonna di gel di silicio in modo tale che lipidi e pigmenti vengono eluiti prima dell'eluizione della micotossina. In seguito gli eluati contenenti la micotossina vengono analizzati mediante TLC, HPLC, o gas-cromatografia- spettrometria di massa (GC-MS). Per quanto riguarda i tessuti animali il metodo ufficiale approvato dalla AOAC, prevede un processo di estrazione in cui il passaggio cruciale è la miscela con acido citrico (per la denaturazione delle proteine) e terra diatomacea dei tessuti animali e il

filtraggio, al fine di ottenere un buon omogenato. La colonna di clean-up utilizza tre lavaggi per eliminare impurità prima dell'eluizione della ocratossina. A questo punto, l'estratto finale può essere utilizzato per l'analisi quantitativa (L. Richard et al 1993).

È importante assicurare che sia analizzato un campione rappresentativo di una data matrice, specialmente se la quantificazione è importante.

L'analisi quantitativa può essere valida anche con una varietà di test immunochimici. Negli ultimi vent'anni sono stati sviluppati numerosi saggi, specifici per l'ocratossina A, basati sulla reazione di riconoscimento antigene-anticorpo, che utilizzano anticorpi policlonali o monoclonali, e che presentano una certa adattabilità, semplicità, selettività e relativamente bassi costi di analisi. Tuttavia la sensibilità di tali metodi non è sufficientemente alta per l'analisi del campione, ed inoltre è richiesto il pretrattamento di quest'ultimo al fine di migliorarne le prestazioni (Pestka JJ, et al. 1981; Cho YJ, et al. 2005).

La complessità di questo tipo di analisi ha spinto, quindi, la ricerca verso la messa a punto di sistemi alternativi sempre più efficaci, ai fini di un controllo di tipo routinario, difficilmente effettuabile con i metodi cromatografici. Lo sviluppo di un metodo di analisi quantitativo più semplice e rapido che consenta una rapida identificazione di contaminanti alimentari (l'ocratossina A nelle carni di suino e nei relativi prodotti derivati) è da considerarsi, quindi, una strategia estremamente utile e innovativa per il monitoraggio "real time" di residui in campo. Negli ultimi anni si è avuto un forte incremento dello sviluppo delle "Tecniche di Sensing", infatti, c'e'

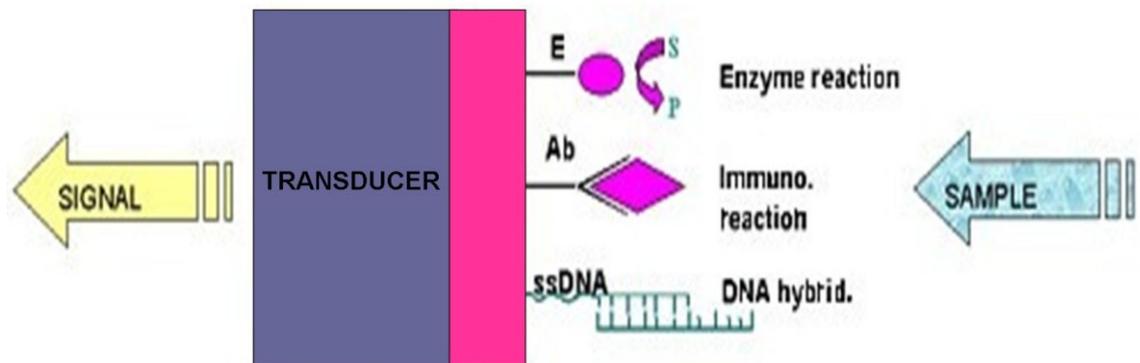
stata l'esigenza di approfondire e focalizzare le competenze biologiche e tecnologiche esistenti, soprattutto nella realizzazione di biosensori innovativi per la determinazione di analiti d'interesse, direttamente in campo.

### **1.3. Biosensori**

Lo sviluppo di sensori altamente selettivi che siano in grado di rivelare la presenza di sostanze chimiche rappresenta al giorno d'oggi un campo di ricerca in continua e rapida espansione e richiede competenze che vanno dalla biologia alla chimica, dalla microelettronica all'ottica. In particolare, il livello avanzato delle tecnologie di miniaturizzazione e la scoperta di nuovi materiali dalle proprietà adattabili alle specifiche esigenze della ricerca hanno notevolmente ampliato lo spettro di applicabilità.

L'elemento cruciale di un biosensore è il riconoscimento molecolare di un dato analita. Tale azione è esplicata da elementi di riconoscimento costituiti da reagenti di affinità di origine biologica, quali ad esempio proteine, enzimi, anticorpi ed acidi nucleici, generalmente immobilizzati ad un supporto solido cui è accoppiato un apparato di trasduzione che rende visibile e quantificabile l'interazione con l'analita (Turner 2000). Il principio di funzionamento alla base di un biosensore è il seguente: l'interazione tra l'elemento di riconoscimento (ERB) ed il campione sottoposto ad esame modifica uno o più parametri chimico-fisici di ERB, il

trasduttore capta questa variazione e produce un segnale che può essere opportunamente amplificato, elaborato e quindi letto dall'operatore (**Figura 4**).



**Figura 4:** Schema di funzionamento di un biosensore.

Il termine “biosensore” è applicabile solo a quegli strumenti che utilizzano come elemento di riconoscimento una molecola di natura biologica. Ad esempio, un pHmetro convenzionale che opera all’interno di un fermentatore non può essere considerato come un biosensore, non possedendo un sistema di rilevamento di origine biologica.

I biosensori, rispetto ai più convenzionali sensori di tipo chimico e fisico oltre a presentare un’elevata sensibilità e specificità di riconoscimento, permettono l’acquisizione di una risposta quantitativa e veloce.

Le applicazioni biosensoristiche spaziano in campi molto diversi: dal settore ambientale (con biosensori in grado di monitorare inquinamenti ambientali), al settore industriale (con sensori posizionati all’interno delle linee di produzione in

grado di valutare il raggiungimento di obiettivi specifici), al settore bio-medico (con sensori diagnostici in grado di evidenziare malattie e/o predisposizioni genetiche in tempi brevi e a basso costo), al settore agro-alimentare (con sensori per la valutazione della qualità e della sicurezza dei cibi, per la ricerca di contaminati in matrici alimentari o per la ricerca di OGM). Di fatto, proprio in quest'ultimo campo, l'utilizzo di un biosensore potrebbe essere un prezioso aiuto al sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), strategia che dal 1970 viene utilizzata come principale metodo per il controllo e la sicurezza degli alimenti lungo l'intera filiera.

Il primo biosensore è stato sviluppato da Updike e Hicks nel 1967, in seguito al quale ne sono stati studiati e sviluppati numerosi tipi. Negli ultimi anni stanno assumendo un sempre crescente interesse di mercato, grazie ad alcuni loro aspetti caratterizzati quali:

- ❖ la facilità di utilizzo: generalmente i campioni non necessitano di particolari preparazioni prima delle analisi e ciò rende possibile le misurazioni direttamente su cibo, sangue, acqua inquinata, ecc
- ❖ i tempi di risposta sono ridotti e le dimensioni degli strumenti sono compatte, inoltre, la sicurezza dell'operatore è garantita, in quanto non necessitano di radioisotopi o marcatori
- ❖ i costi, rispetto ai metodi di analisi tradizionali, sono molto più contenuti
- ❖ non necessitano di personale tecnico specializzato per il loro utilizzo

Negli ultimi vent'anni siamo stati testimoni di una straordinaria crescita nella ricerca di sensori in generale e dei sensori chimici e biologici in particolare. Attualmente i biosensori rappresentano per la scienza un allettante combinazione di discipline ed una sfida scientifica formidabile. D'altro canto, le indagini di mercato hanno guidato esponenzialmente la crescita nello sviluppo dei biosensori rendendo sempre più appetibile l'interesse verso tale campo di ricerca. È possibile avere una misura della crescita esponenziale nell'ambito della ricerca considerando che nel 1985 potevano essere trovate in letteratura 213 pubblicazioni scientifiche e 119 brevetti, mentre nel 1996 c'erano 3300 pubblicazioni e 600 brevetti (A F Collings e Frank Caruso, 1997). La grandezza degli sforzi fatti nello sviluppo dei biosensori è, naturalmente, anche un riflesso delle diverse applicazioni e tipi di biosensori che possono essere prodotti.

### ***1.3.1. Classificazione dei biosensori***

I biosensori possono essere classificati in vari modi; (i) in base al tipo di elemento di riconoscimento, (ii) in base al sistema di trasduzione del segnale, o ancora, (iii) in base all'applicazione.

Per quanto riguarda l'area di interesse è possibile suddividerli in: area medico/clinica; robotica/industriale; ambientale; controllo/monitoraggio; veterinaria/agro-alimentare. A quest'ultima la rilevazione di contaminanti negli alimenti rappresenta il campo più esteso per il maggior interesse a livello pubblico.

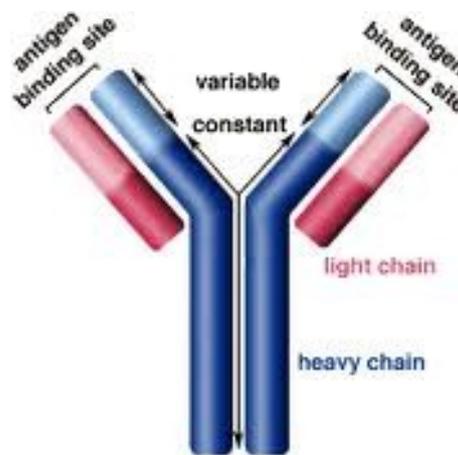
Come è stato precedentemente menzionato, l'elemento di riconoscimento è il componente basilare del biosensore, essendo questo responsabile del riconoscimento con l'analita. In base ad esso i biosensori possono ancora essere classificati in catalitici e biosensori di affinità.

**Biosensori catalitici** fanno uso di biocomponenti capaci di riconoscere specie (bio)chimiche e trasformarle poi in un prodotto mediante una reazione chimica. Questo tipo di biosensore è rappresentato principalmente da biosensori enzimatici che utilizzano enzimi specifici o combinazioni di questi. Alcuni biosensori catalitici possono essere realizzati con cellule intere o con polinucleotidi ad attività catalitica (DNAzimi). Dei 3000 enzimi naturali che sono stati identificati, 200 sono ora commercialmente disponibili e probabilmente 80 sono stati utilizzati nelle applicazioni di *sensing* (Madou and Tierney 1993; Schultz 1991). Un esempio è dato dall'enzima ureasi che è stato ampiamente utilizzato come elemento di riconoscimento di un biosensore grazie alla necessità di determinare/controllare l'urea sia in ambito medico che ambientale (Barhoumi et al., 2006). Di tutti i biosensori che hanno come elemento di riconoscimento enzimi, il biosensore per il glucosio è il più ampiamente studiato ed apprezzato per i successi raggiunti. L'importanza di tale successo deriva dalla rilevanza a livello clinico per i pazienti diabetici; 17 milioni di persone, solo negli US, sono affette da questo incurabile disordine. Inoltre la necessità medica di monitorare il glucosio ha influenzato i numerosi

progressi nello sviluppo di tale biosensore, portando alla realizzazione di numerose varianti: biosensori elettrochimici impiantabili per il glucosio (Heller,1999), misure del glucosio che non richiedono sangue (Roe and Smoller, 1998); chip per elettroforesi micro fabbricati (Wang et al.,2000); biosensori basati su proteine ingegnerizzate (Yamazaki et al., 2000). Attualmente, i biosensori per il glucosio utilizzano la glucosio ossidasi come elemento di riconoscimento che catalizza l'ossidazione del glucosio in gluconolattone, anche se esistono alcuni tipi che utilizzano la glucosio deidrogenasi.

**Biosensori di affinità** fanno uso, invece, della specifica capacità di un analita di legare un elemento di riconoscimento. Questo gruppo può essere quindi suddiviso in immunosensori (i quali dipendono dall'interazione antigene-anticorpo), biosensori basati su acidi nucleici (che sfruttano l'affinità tra oligonucleotidi complementari) e biosensori basati sull'interazione tra analita e un recettore biologico. La maggior parte dei biosensori utilizza gli anticorpi per il riconoscimento, identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse. Gli anticorpi sono glicoproteine altamente selettive prodotte dal sistema immunitario dei mammiferi in risposta all'introduzione di un antigene, una molecola estranea all'organismo produttore. Un antigene, invece è una sostanza (molecola, ormone, virus, batterio ecc) che provoca una risposta anticorpale e reagisce specificamente con gli anticorpi prodotti. Gli anticorpi possono essere schematicamente rappresentati con una struttura a

forma di Y (**Figura 5**), e consistono di due porzioni identiche Fab collegate ad una parte chiamata frammento Fc. I frammenti Fab sono le regioni variabili degli anticorpi, dove la sequenza amminoacidica è organizzata a produrre il sito di legame per l'antigene specifico.



**Figura 5: Struttura di un anticorpo**

Inoltre il legame antigene-anticorpo è un legame reversibile quindi non covalente, pertanto è possibile la rigenerazione del sensore (attraverso lavaggi con soluzioni ad alta osmolarità, forza ionica, o bassi pH) al fine di effettuare misure multiple con un singolo dispositivo. Anche le proteine recettoriali si adattano molto bene allo scopo dei biosensori. La loro applicabilità è data dal fatto che esse sono in grado di legare un fattore specifico, definito ligando. Tale interazione causa nel recettore una variazione conformazionale in seguito alla quale si ha l'insorgenza di una risposta cellulare o un effetto biologico. Possono essere proteine di membrana o proteine solubili all'interno della cellula che mediano la generazione di messaggeri secondari così come

apertura di canali, che portano ad una cascata di reazioni cellulari, volte alla trasduzione di un segnale che è rappresentato dall'iniziale legame con il ligando. Valdes e collaboratori hanno riconosciuto l'utilità dei recettori come elementi di riconoscimento di un biosensore per una varietà di ligandi (Valdes et al., 1988), grazie alla loro elevata specificità e affinità per esso.

Per quanto riguarda invece l'elemento di trasduzione del segnale nella **Tabella 2** sono sintetizzati i vari tipi di biosensori.

Di questi ed in particolare dei biosensori ottici se ne parlerà ampiamente nei paragrafi successivi. Il trasduttore di segnale deve rivelare la variazione di una proprietà chimico fisica che si produce a seguito del legame della biomolecola con l'analita che sia direttamente correlabile con la stechiometria dell'interazione.

### **Biosensori piezoelettrici**

sfruttano la variazione di risonanza di un onda acustica che attraversa un

cristallo di un materiale piezoelettrico come il quarzo. La frequenza dell'oscillazione risultante è una funzione della massa del cristallo. Pertanto

**Tabella 2:** Classificazione dei biosensori basata sui differenti tipi di elemento di trasduzione

<i><b>Elettrochimici</b></i>	<b>Potenziometrici Amperometrici Voltammetrici ISE/ISFET/CHE MFET</b>
<i><b>Elettrici</b></i>	<b>Conduttività superficiale Conduttività Capacitanza</b>
<i><b>Termici</b></i>	<b>Calorimetrici</b>
<i><b>Magnetici</b></i>	<b>Paramagnetismo</b>
<i><b>Ottici</b></i>	<b>Fluorescenza Luminescenza Riflessione Assorbimento Surface plasmone</b>
<i><b>Piezoelettrici</b></i>	<b>QCM SAW SH/APM Lamb wave Love wave</b>

l'interazione dell'analita in un campione con, ad esempio, il corrispondente anticorpo, precedentemente immobilizzato per adsorbimento passivo o interazione covalente con il quarzo, porta ad un incremento della massa che è misurato da cambiamenti nella frequenza di oscillazione. I principali tipi di biosensori piezoelettrici sono la fibra acustica (BA, bulk acoustic) e l'onda acustica di superficie (surface acoustic wave SAW). Nel primo l'assorbimento specifico dell'analita con la corrispondente biomolecola immobilizzata avviene sulla superficie del cristallo che è connessa al circuito oscillante, in questo caso la variazione della risonanza avviene sull'intera massa del cristallo. Nel sensore SAW, invece, un'onda acustica attraversa solo la parte superficiale della superficie coperta con lo specifico ligando. Lo spostamento della frequenza di oscillazione è dovuta all'assorbimento di un analita sulla superficie del cristallo ed è direttamente proporzionale alla massa dell'analita adsorbito. La limitazione di questa tecnica è la bassa sensibilità.

**Biosensori elettrochimici** sono costituiti da un trasduttore del segnale elettrico, chiamato elettrodo, e da un sistema biologico, che generalmente è un enzima immobilizzato sulla sua superficie. Il principio di funzionamento è il seguente: una specie chimica, non elettroattiva viene trasformata dalla componente enzimatica in una specie elettroattiva che diffonde sulla superficie elettronica, generando un segnale elettrico che viene rilevato e relazionato con la concentrazione del metabolita in esame. Come schematizzato nella **Tabella**

2 esistono diversi tipi di biosensori elettrochimici, i più importanti sono quelli amperometrici e potenziometrici. Il sensore potenziometrico è uno strumento basato sull'utilizzo di una misura potenziometrica che consiste nel rilevare un potenziale di membrana tramite due elettrodi di riferimento posti su entrambi i lati della membrana stessa. Se un lato della membrana è immerso in una soluzione di riferimento a composizione chimica costante e l'altro lato è immerso in una soluzione che contiene una specie che interagisce selettivamente con essa, si produce ai capi della membrana una variazione di potenziale che viene registrata da un apposito strumento detto potenziometro. A questa classe di elettrodi appartiene l'ormai ben noto elettrodo a vetro per la misura del pH. Poiché molte reazioni enzimatiche producono ioni idrogeno, ammoniaca, anidride carbonica, cianuro, ioduro, ecc. sono stati utilizzati molti sensori potenziometrici accoppiandoli a questi enzimi (Mascini e Liberti 1974; Mascini e Palleschi 1982; Mascini e Palleschi 1983). Nei biosensori amperometrici si misura, invece, la corrente che passa tra due elettrodi, un elettrodo di misura ed un elettrodo di riferimento, ai quali è stata applicata una differenza di potenziale costante.

**Biosensori calorimetrici** sono sensori in grado di individuare piccole variazioni termiche associate all'interazione proteina-ligando o enzima-substrato. La concentrazione di ligando o substrato è direttamente proporzionale alla variazione di energia termica misurata. Gli svantaggi di

questi sensori sono gli elevati costi e la complessità delle apparecchiature utilizzate.

**Biosensori ottici** sono dispositivi analitici che sfruttano alcune proprietà ottiche delle molecole biologiche, direttamente correlate alle variazioni conformazionali che esse subiscono in seguito all'interazione con l'analita, come: il semplice assorbimento della luce, fluorescenza e fosforescenza, bio o chemiluminescenza, riflettanza, Raman scattering e indice di rifrazione (Dakin and Culshaw, 1989). Uno dei maggiori vantaggi dell' utilizzo dei sensori ottici è la loro abilità di sondare in maniera non distruttiva la superficie del sensore. Inoltre, offrono vantaggi nella velocità, sensibilità e robustezza così come la possibilità di effettuare misure in situ e in tempo reale. Un altro affascinante aspetto dei biosensori ottici è la loro adattabilità all' utilizzo di componenti miniaturizzati nonché alla capacità di poter rilevare più analiti contemporaneamente.

Attualmente i biosensori ottici, ed in particolare gli immunosensori ottici, stanno ricevendo particolare attenzione in quanto possibile alternativa ai convenzionali saggi immunochimici, grazie alla capacità di aumentare la sensibilità della rilevazione e alla eliminazione di costi, tempo e procedure di incubazione, che normalmente vengono effettuate in tali saggi. La funzione principale di questo tipo di sensori è la produzione di un segnale misurabile (che può essere seguito otticamente) dopo interazione con il componente

biospecifico. Questo segnale deve essere relativo alla quantità di analita di interesse presente nel campione. Esistono numerose tecniche ottiche che possono essere utilizzate per monitorare l'interazione tra analita presente nel campione e biomolecola immobilizzata sulla superficie del biosensore. Tra le tecniche più utilizzate per lo sviluppo di un biosensore ottico è possibile annoverare la spettroscopia di fluorescenza e la Risonanza Plasmonica Superficiale.

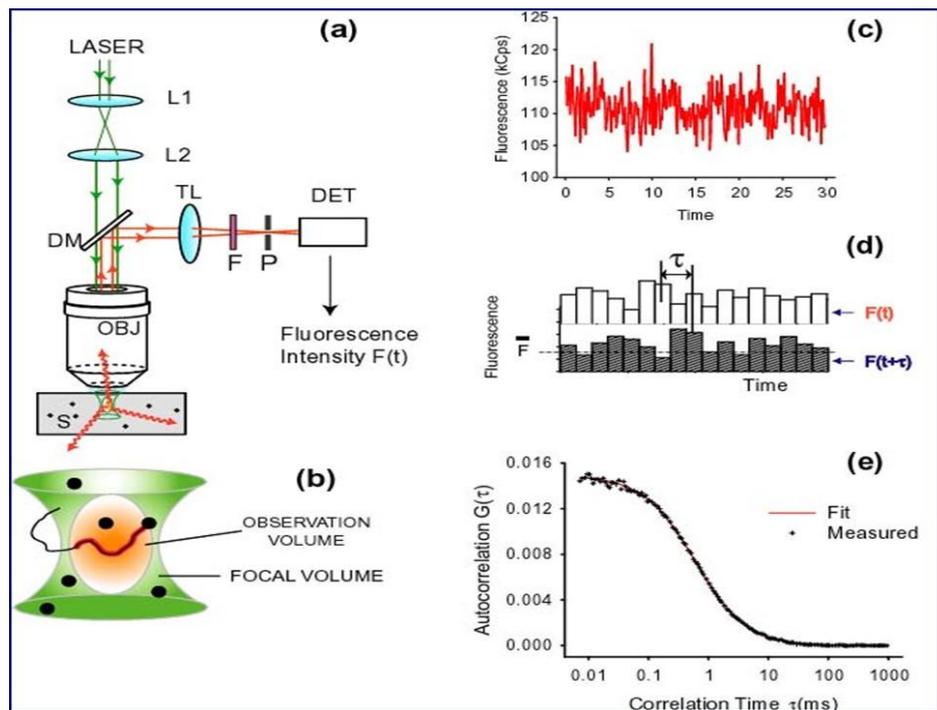
La fluorescenza è il metodo dominante di rilevazione nel campo biotecnologico in quanto esiste un'ampia piattaforma di tecniche utilizzabili a seconda delle esigenze. Infatti è possibile studiare l'intensità di emissione di fluorescenza, la variazione del rapporto tra l'intensità di emissione di fluorescenza di due diversi fluorofori (metodo raziometrico), la rotazione del piano di polarizzazione della radiazione emessa rispetto a quella incidente (anisotropia) ed infine la variazione del tempo di decadimento dell'emissione di fluorescenza. In tale contesto una tecnica che offre numerosi vantaggi sia in termini di applicabilità che di produzione in larga scala è la spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS), che permette di seguire le fluttuazioni dell'emissione di fluorescenza di una singola molecola, dovute al suo cambiamento di massa o forma in seguito all'interazione con l'analita.

### ***1.3.2. Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS)***

La “Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza” (FCS), è un’avanzata metodologia di fluorescenza, molto utile per studiare la diffusione così come transizioni conformazionali di macromolecole. Essa permette di seguire le fluttuazioni dell’emissione di fluorescenza di una singola molecola, dovute al suo cambiamento di massa o forma in seguito all’interazione con un analita. Questo cambiamento viene determinato come variazione della diffusione.

Tale tecnica è un prezioso strumento in molte discipline scientifiche. In particolare, ha ricevuto notevole attenzione proprio grazie al fatto che permette l’osservazione di una singola molecola.

Il primo passo importante per effettuare misure di una singola molecola è quello di limitare il volume “attivo” del campione , ovvero la parte di esso che è illuminata dal fascio di luce di eccitazione (volume di eccitazione) e dal quale la fluorescenza e la luce diffusa vengono raccolti e guidati verso il rivelatore (volume di rivelazione). Nella tecnologia FCS, in effetti, vengono monitorate le fluttuazioni di fluorescenza del campione, nel tempo, in un piccolo volume di eccitazione otticamente delimitato di circa 1 fL (Bacia, K. and Schwille, P. Methods, 2003). Sperimentalmente la concentrazione del campione che generalmente viene utilizzata è nell’ordine dei nanomolare, cosicché, statisticamente, nel volume di eccitazione è presente una singola molecola (**Figura 6**).



**Figura 6: Spettroscopia di correlazione a fluorescenza; (a): Tipica strumentazione per FCS; (b): Volume osservato; (c)/(d): Intensità di fluttuazioni nel tempo; (e): Funzione di correlazione.**

Quando il fluoroforo diffonde nel raggio di luce focalizzata, si verifica un'accelerazione dei fotoni emessi, dovuta a multipli cicli di eccitazione-emissione da parte dello stesso fluoroforo. Le fluttuazioni di fluorescenza sono dovute ai moti Browniani delle molecole in soluzione, questo significa che se una molecola di piccole dimensioni lega, ad esempio, un'altra di dimensioni maggiori, il complesso neoformato più grande diffonde più lentamente ed emette fotoni in un tempo più lungo rispetto alla molecola fluorescente non legata.

Al contrario di altre metodologie, come ad esempio l'HPLC, l'FCS non ha bisogno di processi di separazione ed è estremamente sensibile a bassissime

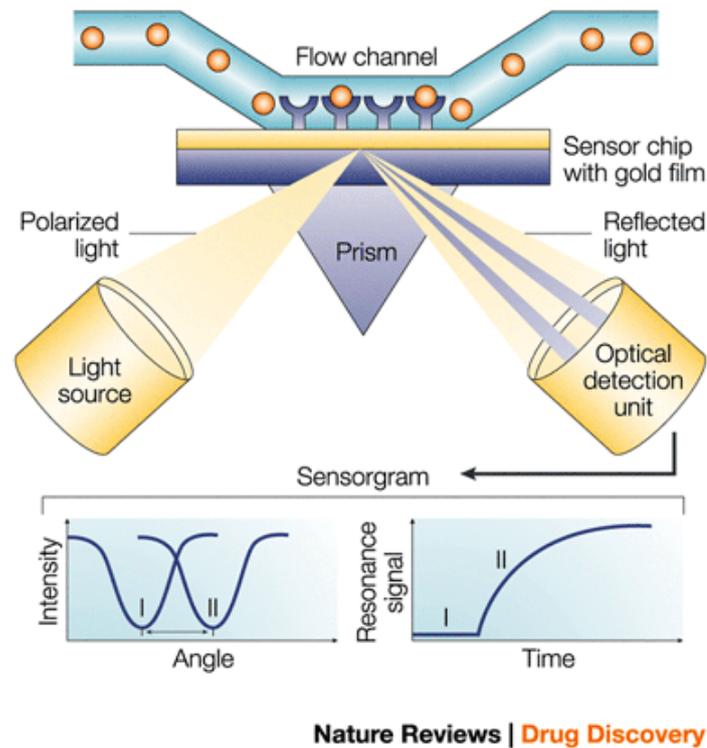
concentrazioni di un dato analita nel campione in esame. Pertanto l'FCS si adatta molto bene alle applicazioni biosensoristiche.

### ***1.3.3. Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)***

La risonanza plasmonica superficiale (SPR) è una tecnica spettroscopica grazie alla quale è possibile determinare la cinetica di associazione e dissociazione dell'interazione tra due (o più) molecole in tempo reale. L'SPR si basa sul monitoraggio della riflessione di un fascio di luce polarizzata inviato all'interfaccia tra una soluzione acquosa di molecole potenzialmente leganti, ed una superficie recante la controparte molecolare immobilizzata.

La struttura di base di tale biosensore è costituita da un chip ricoperto da uno strato sottile d'oro. Lo strato d'oro viene posto in stretto contatto con un prisma attraverso cui viene fatta passare un fascio di luce polarizzata. Il fascio di luce inciderà con l'interfaccia con diversi angoli di incidenza, tuttavia esiste un particolare angolo di luce incidente al quale una parte dell'energia della luce interagisce con la nube elettronica del film metallico, generando un plasmone, ossia un'oscillazione di elettroni ad angoli perpendicolari rispetto al piano del film, che rimbalzano tra la superficie superiore e quella inferiore. Il plasmone, per contro, genera un campo elettrico che si estende lungo una distanza breve, circa pari alla lunghezza d'onda della luce, sopra e sotto la superficie metallica. Qualunque variazione nella composizione dell'ambiente all'interno del raggio del campo

elettrico causa una variazione misurabile dell'angolo di risonanza (Rich, RL, Myszka, DG 2000) Le misure sono fatte sotto flusso continuo (**Figura 7**).



**Figura 7: Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)**

Per misurare l'affinità di un legame, si inietta una soluzione contenente l'analita lungo la superficie del chip sul quale è stata preventivamente immobilizzata una molecola di interesse. Quando l'analita lega la molecola presente sul chip, la composizione molecolare dei complessi presenti sulla superficie metallica varia causando un cambiamento dell'angolo di rifrazione. Tale cambiamento viene registrato come segnale SPR, o unità di risonanza (RU), in funzione del tempo, permettendo quindi di osservare e analizzare in tempo reale l'evento di legame. Sono disponibili diverse strategie di legame chimico tra il ligando e la superficie del

chip, come reazioni con ammine, tioli, aldeidi. Normalmente il legame che si viene a formare è stabile ed il chip così derivatizzato può essere riutilizzato più volte. Caratteristica che rende questa tecnologia particolarmente efficiente nell'analisi in situ di campioni, e che permetterebbe un abbassamento notevole dei costi di analisi. Il vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che si possono misurare affinità che vanno dal milli- al picomolare. Inoltre, l'intervallo di concentrazioni di analita utilizzate è molto basso ed i volumi utilizzati sono dell'ordine di 0.1 mL (Rich, R.L.; Myszka, D.G. 2007; Abrantes M, 2001).

Tale tecnica non richiede alcun tipo di marcatura delle biomolecole che compongono il sensore. La risposta è abbastanza indipendente dalla natura delle biomolecole, così che tutti i passaggi di interazione possono essere seguiti con la stessa tecnica di rilevazione. Tuttavia una limitazione, che in alcuni casi può essere ovviata con l'utilizzo di strategie alternative, è che gli analiti devono avere una massa sufficientemente grande da apportare una significativa variazione in RU qualora avvenga il legame. I cambiamenti a livello della superficie possono, inoltre, essere monitorati in un intervallo di tempo più piccola di 0.1 s. Tale tecnologia permette di determinare la specificità di legame, la cinetica e la concentrazione con analiti aventi una massa dai 150 ai  $10^6$  g/mole (dalton) o più.

Questa tecnica si presta molto bene in numerose aree di applicabilità. Alcuni di questi usi sono i seguenti:

- ❖ misura delle costanti cinetiche, e dei gradi cinetici delle relative specie molecolari;
- ❖ rilevazione dei partner di legame nelle applicazioni di screening;
- ❖ analisi degli schemi multipli di legame, data, ad esempio, la capacità di diversi analiti di legare in sequenza un dato legando può indicare interferenze e cooperatività tra gli analiti stessi;
- ❖ monitoraggio di processi enzimatici, ad esempio, proteolisi, fosforilazione sintesi di acidi nucleici, legasi ecc.;
- ❖ misure di concentrazione, usando una superficie biosepecifica come una sonda selettiva in grado di misurare la concentrazione di una sostanza target in una matrice complessa.

## ***1.4. Scopo del lavoro***

L'obiettivo prioritario del presente progetto di ricerca è stato lo sviluppo di sistemi analitici quantitativi, rapidi e sensibili, per la determinazione dell'ocratossina A in matrici alimentari. L'utilizzo di avanzate metodologie ottiche, al fine di realizzare biosensori in grado di effettuare una valutazione sulla sicurezza del prodotto in esame, è da considerarsi una strategia estremamente utile ed innovativa in quanto valida alternativa ai convenzionali saggi immunochimici.

La funzione principale di un sensore di tipo ottico è la produzione di un segnale facilmente misurabile, che può essere seguito otticamente, dopo interazione con il componente biospecifico. Questo segnale deve essere relativo alla quantità di analita di interesse presente nel campione. A tale scopo sono stati realizzati due saggi immunologici basati su due avanzate tecniche di spettroscopia.

In una prima fase del lavoro è stato realizzato un saggio immunologico, oggetto di una pubblicazione scientifica, basato sulla Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS), una tecnica di fluorescenza estremamente sensibile, che permette di seguire le variazioni delle fluttuazioni di fluorescenza a livello di una singola molecola. È stato sviluppato un saggio competitivo basato sull'utilizzo di anticorpi specifici anti-OTA e OTA coniugata ad una proteina *carrier* marcata con un fluoroforo (OTA-GlnBP-F). La combinazione di anticorpi altamente specifici e

l'utilizzo di tale metodologia fluorescente suggerisce l'applicazione di tale strategia sperimentale per analisi in cui è richiesta un'alta sensibilità di rilevazione.

Nella seconda fase del presente lavoro, invece, è stato messo a punto un saggio immunologico competitivo basato sull'utilizzo della Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR). Grazie all'utilizzo di questa tecnica è possibile analizzare le interazioni tra due o più molecole. Uno dei principali vantaggi dell'SPR è l'elevata sensibilità a concentrazioni molto basse e soprattutto la capacità di monitorare l'interazione in tempo reale e in pochi minuti. L'SPR consente, inoltre, la rilevazione anche di più campioni contemporaneamente permettendo di effettuare quindi uno *screening* in larga scala.

## ***2. MATERIALI E METODI***

## 2.1. Materiali e Reagenti

Tutti i reagenti utilizzati sono facilmente reperibili in commercio. L'albumina da siero bovino (BSA, frazione V), l'ovalbumina (OVA, grado 5), 1-(3-dimetilamminopropil)-3-etilcarbodiimmide (EDC) ed il kit di purificazione delle immunoglobuline PURE1A sono stati acquistati presso la Sigma; l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi ("Goat polyclonal to rabbit IgG-HRP conjugate") è Abcam. I test ELISA sono stati eseguiti su piastre per microtitolazione a 96 pozzetti "Lock Well Maxisorp" della Nunc, mentre il substrato della perossidasi utilizzato per la reazione colorimetrica, 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB), è stato acquistato da Sigma. Per la lettura a  $\lambda = 450$  nm è stato utilizzato uno spettrofotometro per piastre da microtitolazione "Multiskan EX" della Thermo. Le misurazioni UV ( $\lambda = 278$  nm) sono state effettuate con uno spettrofotometro "Varian Cary 50 bio". Gli esperimenti di fluorescenza sono stati eseguiti con un fluorimetro ISS K2 (ISS Champaign US), mentre la Fluorescein-5-isothiocyanato (FITC) è stata acquistata alla Invitrogen, Eugene. Standard chimici, solventi, tamponi, Ocratossina A sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich. L'Ocratossina A è una sostanza carcinogena e dovrebbe essere maneggiata con estrema cura.

Gli esperimenti di Surface Plasmon Resonance sono stati effettuati con lo strumento BIACORE 2000 della Biacore AB. Il chip di carboxymethyl dextran CM5, N-hydroxysuccinimide (NHS), N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimmide hydrochloride (EDC), ethanolamine, HBS-EP (10mM HEPES pH

7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05% Biacore Surfactant P20), HBS-P (10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% Biacore Surfactant P20) sono stati acquistati dalla GE Healthcare Biacore.

## **2.2. Sintesi dei coniugati della ocratossina A alla BSA, GlnBP e alla OVA**

### ***2.2.1. Coniugazione della GlnBP alla ocratossina A***

Una soluzione di Ocratossina A alla concentrazione di 0,005 mg è stata incubata in presenza di 0,0075 mg di 1,1 carbonildiimidazolo disciolti in 100  $\mu$ L di DMF per 10 minuti. Il carbonildiimidazolo è *crosslinker* che agisce convertendo i gruppi carbossilici in intermedi isourea ammino reattivi in grado di legare i gruppi amminici presenti sui residui di lisina delle proteine. Pertanto tale miscela è stata aggiunta goccia a goccia ad 1 mL di una soluzione di 5 mg di GlnBP in 0,1 M sodio bicarbonato a pH 8,5 sotto agitazione, ed incubata al buio per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente per eliminare l'eccesso di attivante e di ocratossina A non coniugata alla proteina la miscela è stata dializzata tutta la notte contro 0,1 M di sodio bicarbonato 0,1 M NaCl a pH 8,5, (500 ml per tre giorni con cambi del tampone giornalieri). L'ocratossina A è una molecola fluorescente che assorbe la radiazione ultravioletta ad una lunghezza d'onda di 380 nm pertanto

l'avvenuta coniugazione è stata determinata spettrofotometricamente mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Cary Varian 50 Bio.

### ***2.2.2. Coniugazione dell' ovalbumina (OVA) e della albumina da siero bovino (BSA) alla ocratossina A***

L'OTA è stata coniugata all'Ovalbumina (e alla BSA) mediante il metodo *mixed anhydride* utilizzando EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) senza purificazione. In breve 0,6 mg di OTA e 1,8 mg di EDC sono stati disciolti in 100 $\mu$ L di DMF secco. La miscela è stata aggiunta goccia a goccia ad 1 mL di OVA concentrata 1 mg/mL in 100mM di tampone bicarbonato di sodio a pH 8,5. Tale miscela è stata incubata sotto lenta agitazione per 2 ore a temperatura ambiente al buio. Successivamente la miscela è stata dializzata contro 0,1 M di tampone sodio bicarbonato, 0,1 M NaCl a pH 8,5 per una notte intera, per eliminare l'eccesso di OTA libera non coniugata, (500 ml per tre giorni con cambi del tampone giornalieri). Anche in questo caso l'avvenuta coniugazione è stata determinata spettrofotometricamente mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Cary Varian 50 Bio.

La spessa procedura sperimentale è stata utilizzata per la coniugazione della BSA alla OTA, necessaria per la produzione degli anticorpi anti OTA.

## **2.3. Produzione, purificazione di anticorpi policlonali anti-BSA-OTA.**

### ***2.3.1. Produzione di anticorpi anti-OTA***

Il coniugato BSA-OTA è stato utilizzato per la produzione di anticorpi diretti contro l'ocratossina A. Molecole di piccole dimensioni come l'ocratossina A, con un peso molecolare inferiore a 2-5 kDa generalmente non sono immunogene, anche quando somministrate in presenza di un adiuvante (molecole in grado di aumentare la risposta immunitaria senza provocare la produzione di anticorpi diretti contro di esse). Pertanto è necessario legare ad esse proteine o altri composti chiamati *carrier*, come la BSA estremamente immunogeni. Pertanto due conigli sono stati immunizzati tramite iniezioni intradermiche di una miscela di antigene BSA-OTA (0.5 mg per ciascun coniglio), seguendo un protocollo standard. Al termine del periodo di immunizzazione, i due conigli sono stati sacrificati ed il sangue prelevato è stato centrifugato per separare le cellule del sangue dall'antisiero (SI1, siero del coniglio 1 e SI2, siero del coniglio 2).

### ***2.3.2. Purificazione delle IgG .***

Le immunoglobuline G (IgG) sono state purificate dagli altri anticorpi presenti nel siero, utilizzando un *kit* commerciale basato sul riconoscimento delle IgG da

parte della proteina A, immobilizzata sulla matrice della fase stazionaria. La Proteina A è un polipeptide, purificato da *Stafilococcus Aureus*, che presenta una elevata affinità per la porzione Fc delle IgG della maggior parte dei mammiferi, quali: cavallo, cane, gatto, maiale, coniglio, capra, pecora, topo e bue. A tale scopo 2.0 mL di antisiero sono stati caricati su colonna e le IgG sono state purificate seguendo un protocollo standard fornito dalla casa produttrice del kit. Le IgG si legano reversibilmente alla proteina A legata alla matrice di sepharosio mentre le altre molecole presenti nel siero vengono eluite. L'eluizione delle IgG viene effettuata con glicina 0.1 M, pH 2.8 (frazioni da 1 mL) ed il pH è stato immediatamente tamponato con una goccia di Tris 1 M, pH 8.0. L'eluizione degli anticorpi è stata monitorata mediante misure di assorbanza, effettuate ad una lunghezza d'onda di 280 nm. Le frazioni contenenti IgG, sono state concentrate fino ad un volume di 4.0 mL, utilizzando una membrana Amicon XM50 e dializzate contro PBS 20 mM, NaCl 50 mM, a pH 7.0.

### ***2.3.3. Titolazione degli anticorpi mediante saggio ELISA indiretto***

In due esperimenti diversi i coniugati GlnBP-OTA e OVA-OTA, 0,1 M di tampone sodio bicarbonato, 0,1 M NaCl a pH 8,5, sono stati fatti adsorbire su piastre per microtitolazione in polistirene (Lock Well Maxisorp, Nunc), utilizzando le seguenti concentrazioni; 0.03, 0.1, 0.3, 0.6 µg/mL in triplicato (100 µL per pozzetto), overnight a 4 °C. Otto pozzetti di controllo sono stati incubati per lo

stesso periodo con semplice tampone 0,1 M di tampone sodio bicarbonato, 0,1 M NaCl a pH 8,5, mentre due pozzetti sono stati incubati con BSA e altri due con GlnBP o OVA rispettivamente come controllo negativo per il coniugato GlnBP-OTA e OVA-OTA. La piastra è stata saturata incubando per 2 ore a temperatura ambiente una soluzione di PBS 1X contenete 2 % ovalbumina (*blocking* 100 µL per pozzetto). La piastra è stata lavata per 3 volte con PBS 1X contenete 0,2 % Tween (PBS-T) per eliminare l'eccesso di ovalbumina non legata. A questo punto ai pozzetti sono state aggiunte soluzioni di anticorpi diluite serialmente (1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000) ed incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con PBS-T, una soluzione di anticorpo secondario coniugato alla perossidasi, diluito 1:6000 in tampone utilizzato per il *blocking* è stata aggiunta ai pozzetti (100 µL) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS-T, è stato aggiunto il substrato dell' enzima TMB (100 µL per pozzetto) e la reazione colorimetrica è stata bloccata dopo 5 min per aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (100 µL per pozzetto). I valori di assorbanza sono stati letti a 450 nm utilizzando un lettore di piastra Thermo Multiskan EX.

## **2.4. Sviluppo del saggio immunologico basato sulla Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS).**

### ***2.4.1. Marcatura del coniugato Glutamine Binding Protein-Ocratossina (GlnBP-OTA) alla fluoresceina isotiocianato (FTIC).***

Ad una soluzione di GlnBP concentrata 2 mg/mL in 1 ml di 0,1 M sodio bicarbonato a pH 9 sono stati aggiunti 10  $\mu$ L di una soluzione di FTIC in N,N-dimetilformamide (DMF; 1  $\mu$ g di FITC/100  $\mu$ L di DMF). La miscela di reazione è stata incubata per 1 ora a 30°C, e le molecole marcate sono state separate dal fluoroforo libero mediante colonna Sephadex G-25, seguendo le specifiche riportate dal produttore della colonna. Le frazioni sono state analizzate allo spettrofotometro al fine di verificare la presenza del coniugato marcato. In seguito è stata effettuata una dialisi contro 50 mM di tampone fosfato contenete 100 mM NaCl a pH 7, utilizzando tubi da dialisi con un *cutoff* di 500 Da (Spectrum Labs) per 16 ore a 4°C al fine di eliminare l'eccesso di FTIC non legato covalentemente alla proteina. È stato effettuato uno spettro di assorbimento ed uno spettro di emissione della fluorescenza utilizzando un fluorimetro della ISS (Urbana-Champaign, IL USA) al fine di verificare l'efficienza di marcatura. Tali misure sono state fatte eccitando il campione a 488 nm, lunghezza d'onda massima di eccitazione della fluoresceina isotiocianato.

### ***2.4.2. Misure di Spettroscopia di correlazione di fluorescenza (FCS)***

Le misure di FCS non richiedono una superficie di immobilizzazione e possono essere eseguite su molecole in soluzione. Le molecole osservate sono continuamente mantenute mediante diffusione all'interno di un piccolo volume osservato. Questa tecnica quindi, rende possibile una continua osservazione per periodi di tempo più lunghi e non richiede la selezione di specifiche molecole per l'osservazione. Quando il fluoroforo diffonde nel raggio di luce focalizzata, si verifica un'accelerazione dei fotoni emessi, dovuta a multipli cicli di eccitazione-emissione da parte dello stesso fluoroforo. Se il fluoroforo diffonde rapidamente al di fuori del volume irraggiato, l'accelerazione fotonica è di breve durata, viceversa se il fluoroforo diffonde più lentamente, l'accelerazione fotonica è di più lunga durata. Mediante analisi di correlazione dell'emissione in funzione del tempo, è possibile dunque, determinare il coefficiente di diffusione del fluoroforo. Tale tecnologia può determinare processi come le interazioni proteina-proteina, le dinamiche interne delle macromolecole, i processi di membrana, inclusi l'endo e la esocitosi. Essa richiede per i campioni analizzati, concentrazioni molecolari dell'ordine delle pico/nano moli, poiché più alte concentrazioni genererebbero più piccole fluttuazioni e quindi alterazioni nei risultati. L'FCS è anche influenzata dalla viscosità della soluzione, poiché essa mantiene le molecole nel volume osservato per un tempo più lungo e comporta una minore intensità di fluttuazioni. Queste fluttuazioni possono inoltre, essere dovute al cambiamento del numero di

fluorofori nel volume di osservazione dovuto alla diffusione, oppure al cambiamento delle proprietà di fluorescenza delle molecole in conseguenza a reazioni chimiche o a fluttuazioni conformazionali.

Le misure per lo sviluppo dell'immunoassay sono state effettuate con un Alba FCS, uno strumento di correlazione di fluorescenza a due canali della ISS (Urbana-Champaign, IL USA).

Lo strumento combina un microscopio confocale a scansione con FCS e usa dei fotodiodi come sistemi di rilevazione. Per queste misure è stato utilizzato un microscopio confocale a fluorescenza epi-illuminato (Eclipse TE300, Nikon) ed un laser a ioni di argon alla lunghezza d'onda di 488 nm (Argon Ion laser IMA 100, Melles Griot).

Il laser con una potenza di 34  $\mu\text{W}$  è stato messo a fuoco nel campione con un obiettivo ad immersione ad olio 60 x 1,2 (Zeiss, Jena). La fluorescenza risultante è stata connessa attraverso lo stesso obiettivo e separata dalla luce del laser attraverso uno specchio diroico (Croma). Un foro di 50  $\mu\text{m}$  è stata utilizzata nel canale di detection del confocale. Tutti gli aggiustamenti delle aperture, *shutter*, ottici, motore dei filtri, posizionamento degli assi XYZ degli stadi e il posizionamento degli obiettivi erano sotto il controllo di un computer supportato con Vista, FCS software package. I tempi e i coefficienti di diffusione sono stati registrati per il coniugato GlnBP-OTA-F da solo, in presenza di anticorpi anti-OTA e in presenza di anticorpi anti-OTA e OTA libera a diverse quantità per 200  $\mu\text{L}$  (0.0078, 0.0156, 2.0, 6.0, 8.0, 12.0 ng di OTA libera).

### 2.4.3. Analisi dei dati

Diverse equazioni sono necessarie per descrivere ciascun processo e di solito due o più processi influenzano contemporaneamente gli stessi dati. Ecco perché la teoria dell'FCS risulta essere abbastanza complessa. L'intensità di fluttuazioni verificatesi nel tempo (amplitudine e velocità) all'interno del volume osservato è fondamentalmente usata per determinare la funzione di correlazione.

Tutti i dati ottenuti sono stati fittati con un programma di analisi dei dati Vinci Analysis ed è stata utilizzata una equazione 1 fotone 1 componente 3D Gaussiana. L'equazione è la seguente:

$$G(\tau) = \left( \frac{1}{\pi \sqrt{\pi} w_0^2 z_0} \langle C \rangle \right) \frac{1}{\left( 1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}}} \exp \left[ \frac{-(V\tau)^3}{w_0^2 z_0 \left( 1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}}} \right]$$

In questa equazione,  $G(\tau)$  rappresenta la funzione di autocorrelazione,  $C$  la concentrazione delle molecole fluorescenti,  $W_0$  è il raggio waist,  $Z_0$  è l'altezza del raggio,  $D$  il coefficiente di diffusione,  $V$  il volume di eccitazione,  $\pi$  la costante di Archimede, e  $\tau$  è il tempo di diffusione. Per questa analisi, è stato misurato il tempo di diffusione delle singole molecole (R6G, glutamine binding protein (GlnBP), albumina da siero bovina (BSA)), e tale valore è stato utilizzato per i parametri fissati.

## **2.5. Sviluppo del saggio immunologico basato sulla metodologia della Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)**

### ***2.5.1. Immobilizzazione del coniugato OTA-OVA alla superficie di un Chip CM5 mediante “amine reaction”.***

Il coniugato OTA-OVA è stato immobilizzato su un chip CM5 utilizzando un protocollo standard di “amine coupling reaction”. Prima di effettuare l’immobilizzazione vera e propria è stato eseguito un pH *scouting*, ovvero sono state trovate le condizioni ottimali di concentrazione e di pH adatte per il legame covalente della ovalbumina coniugata alla OTA, alla matrice di destrano. Il punto isoelettrico teorico dell’ovalbumina è pari a 5,2, pertanto sono state utilizzate soluzioni tampone, in cui era contenuto il coniugato, nell’intervallo di pH compreso tra 3,5 e 5. Tali soluzioni sono: 10 mM tampone acetato di sodio a pH 5; 4,5; 4; 3,8. A concentrazioni di coniugato maggiori o uguali a 40 µg/mL il coniugato si mostrava non adatto all’immobilizzazione successiva, mentre a concentrazioni inferiori la risposta era positiva. La migliore risposta in RU è stata osservata per le seguenti condizioni:

Tampone = 10 mM acetato di sodio a pH 4

[OVA-OTA] = 35 µg/mL

A questo punto la matrice di destrano carbossimetilata della superficie del chip è stata attivata utilizzando una miscela di N-idrossisuccinimide (NHS) e N-etil-N (dimetilaminopropil) carbodimide hydrochloride (EDC) iniettata per 7 min ad un flusso di 5  $\mu$ L/min (Jonsson, U, 1991). In seguito ad attivazione il ligando alla concentrazione di 35  $\mu$ g/mL disciolto in 10 mM tampone fosfato a pH 4 è stato iniettato sulla superficie del chip per 24 min ad un flusso 20  $\mu$ L/min. Successivamente una soluzione di 1M etanolamina a pH 8 è stata iniettata per 30 secondi per stoppare la reazione e rimuovere le proteine non legate alla superficie.

### ***2.5.2. Ottimizzazione delle condizioni di legame degli anticorpi anti-OTA e di rigenerazione del sensore.***

Prima di mettere a punto il saggio inibitivo sono state analizzate diverse diluizioni di anticorpi anti-OTA al fine di trovare le condizioni ottimali per il legame di questi al coniugato OVA-OTA immobilizzato. Pertanto diluizioni di 1/100, 1/50, 1/25 e 1/10 di anticorpi anti-OTA disciolti in tampone di corsa HBS sono stati iniettati separatamente con un flusso di 10  $\mu$ L/min per 3 min.

Per quanto riguarda la rigenerazione della superficie del chip sono state condotte diverse prove utilizzando diversi tipi di reagenti caotropici 25-100 mM NaOH, 1 M etanolamina a pH 12 e 10 mM di tampone glicina a pH 2,5. Tali tamponi sono stati iniettati per diversi tempi e con un diverso flusso (20  $\mu$ L/min, 10  $\mu$ L/min, 5  $\mu$ L/min) allo scopo di trovare le condizioni ottimali. Tutti i campioni e le

soluzioni utilizzate sono state preparate con acqua ultrapura, degassate e filtrate con filtro Millipore con un *cutoff* di 0,22  $\mu\text{m}$ .

### ***2.5.3. Preparazione delle soluzioni standard di ocratossina A e sviluppo del saggio inibitivo.***

Per la costruzione della retta di taratura e quindi lo sviluppo di tale saggio immunologico sono stati preparati degli standard di OTA a concentrazioni nell'intervallo di concentrazione tra 25 ng/mL a 1  $\mu\text{g/mL}$  in tampone di corsa HBS. Ciascun campione è stato incubato per 10 min con lo stesso volume di una diluizione 1/5 di anticopi anti-OTA per assicurare una diluizione finale di 1/10 e iniettati successivamente sulla superficie del chip con un flusso di 10  $\mu\text{L/min}$  per 3 min. Le misure sono state ripetute per tre volte per ciascuna concentrazione di OTA. Tutte le misure effettuate sono state condotte alla temperatura costante di 25°C,

### ***3. RISULTATI e DISCUSSIONI***

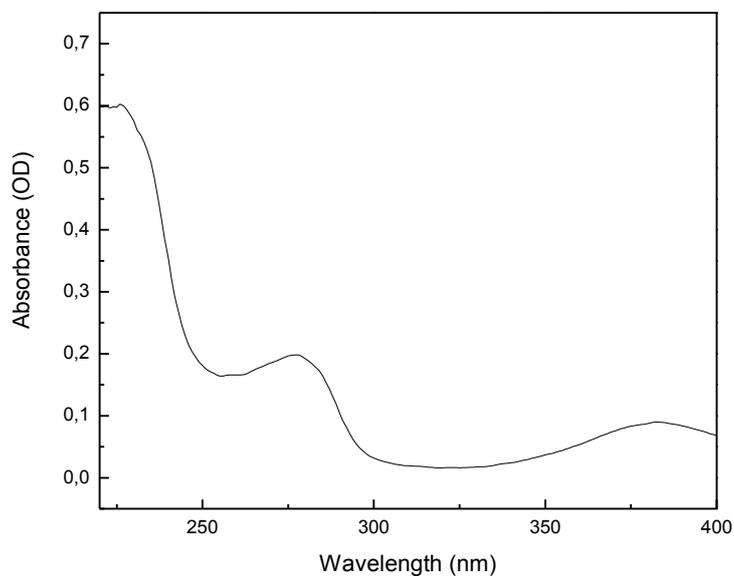
### **3.1. Coniugazione dell'ocratossina A a proteine carrier, produzione e purificazione di anticorpi da coniglio anti-OTA**

La realizzazione dei saggi per la rilevazione della ocratossina A ha richiesto la coniugazione dell' OTA a due diverse proteine al fine di permettere la produzione di anticorpi da parte di conigli e lo sviluppo dei saggi stessi.

Gli animali producono anticorpi in risposta a proteine o altre molecole (chiamate immunogeni) riconosciute come estranee dal sistema immunitario. Gli anticorpi sono secreti nel plasma dai linfociti B che sono capaci di interagire con l'immunogeno. L'intensità della risposta è determinata da diversi fattori incluse le dimensioni della molecola, le sue caratteristiche chimiche e quanto essa è diversa dalle proteine dell'animale stesso. I principali immunogeni naturali sono proteine con un peso molecolare di 5 kDa con un'origine filogeneticamente lontana (ad esempio, proteine umane iniettate in conigli o capre). Inoltre è molto importante utilizzare proteine estremamente pure al fine di evitare la produzione di piccole quantità di anticorpi diretti contro contaminanti presenti nel campione di immunogeno stesso.

Molecole di piccole dimensioni come l'ocratossina A, con un peso molecolare inferiore a 2-5 kDa generalmente non sono immunogene, anche quando somministrate in presenza di un adiuvante (molecole in grado di aumentare la risposta immunitaria senza provocare la produzione di anticorpi diretti contro di esse). Pertanto per generare una risposta immune di questi composti è necessario legare ad esse proteine o altri composti, chiamati *carrier*, estremamente

immunogeni. A tale scopo è stata scelta l'albumina da siero bovino (BSA) come proteina *carrier* per la produzione di anticorpi policlonali in coniglio diretti contro l'ocratossina A. L'efficienza della reazione di coniugazione è stata determinata in quanto l'ocratossina A ha un massimo di assorbimento della luce ultravioletta intorno a 380 nm, mentre, come è noto, il massimo assorbimento proteico (così come tutte le proteine) è di 280 nm. È stato, pertanto, registrato uno spettro di assorbimento del campione, sottoposto al protocollo di coniugazione, in seguito a eccessiva dialisi la quale permette di eliminare l'eccesso di OTA non legata. Come mostrato in **Figura 8** è possibile osservare l'avvenuta coniugazione data la presenza di un picco a 280 nm pari a circa 0,2 OD, indicante la presenza della BSA e uno a 380 nm tipico dell'ocratossina di circa 0,1 OD.



**Figura 8:** Spettro di assorbimento del coniugato BSA-OTA

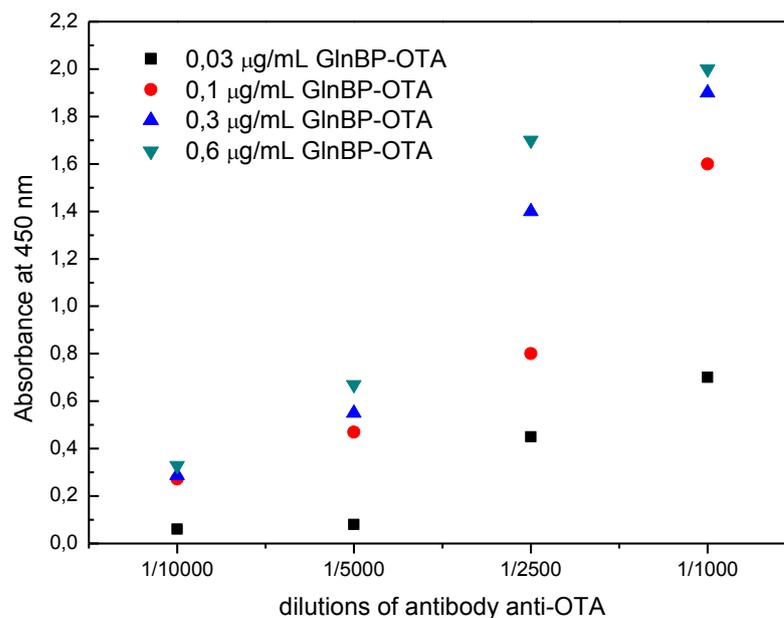
Secondo un protocollo standard, il coniugato BSA-OTA è stato utilizzato per immunizzare un coniglio, per la produzione di anticorpi policlonali contro l'OTA. Al termine del periodo di immunizzazione la presenza nel siero immune di anticorpi anti-OTA è stata verificata mediante saggio ELISA (dati non mostrati). Le IgG anti-OTA dal siero sono state purificate mediante l'impiego di un kit commerciale basato sul riconoscimento delle IgG da parte della proteina A, immobilizzata sulla matrice della fase stazionaria. Al fine di eliminare l'interferenza dovuta alla presenza di anticorpi diretti contro la BSA, ed essendo l'ocratossina A una molecola di piccole dimensioni (403,82 Da) quindi non adatta all'adsorbimento diretto su piastra per microtitolazione, è stato necessario coniugare tale molecola ad altre proteine *carrier* diverse dalla BSA. Si è scelto di utilizzare la proteina legante la glutammina (GlnBP) di *E.coli* e l'ovalbumina OVA di *G. gallus*. Entrambi i coniugati (GlnBP-OTA, OVA-OTA) sono stati prodotti utilizzando lo stesso protocollo già impiegato per la coniugazione alla BSA, in seguito, il primo è stato utilizzato per la realizzazione del saggio basato sulla Spettroscopia di Fluorescenza di Correlazione, mentre il secondo per quello basato sulla Risonanza Plasmonica di Superficie. Le reazioni di coniugazione sono state verificate effettuando uno spettro di assorbimento della luce ultravioletta verificando la presenza dei picchi a 280 nm e a 380 nm; per la GlnBP-OTA è stato possibile osservare valori di 0,24 e 0,17 rispettivamente a 280 e 380 nm, mentre per la OVA-OTA 0,34 e 0,198.

### ***3.1.1. Titolazione degli anticorpi***

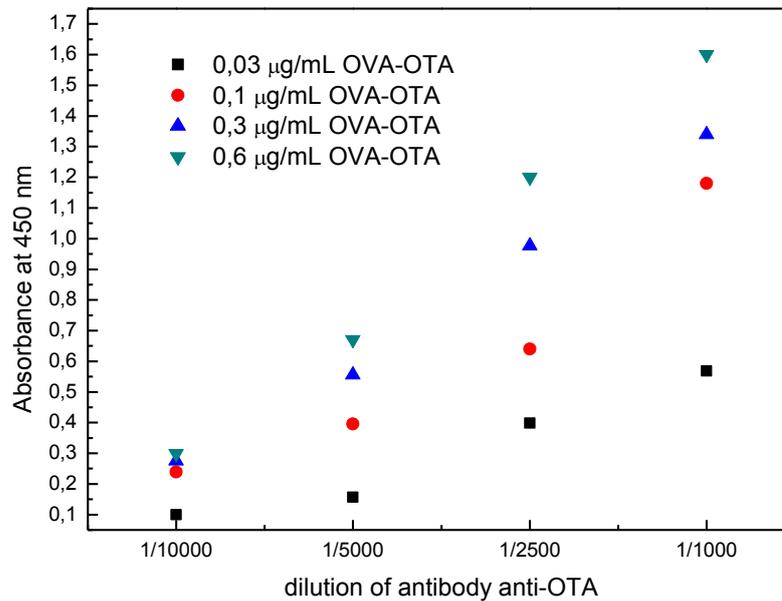
Il titolo anticorpale è una modalità analitica che consente di valutare la quantità e l'efficacia degli anticorpi prodotti. La quantità di un anticorpo può essere determinata testando diluizioni crescenti del campione con l'antigene specifico in esame. Il rapporto di diluizione più alto che ancora mostra una reazione positiva identifica il titolo anticorpale. Per reazione positiva si intende la possibilità di apprezzare con la tecnica utilizzata il segnale dovuto all'avvenuto riconoscimento dell'antigene da parte dell'anticorpo. Il titolo degli anticorpi purificati, diretti contro l'ocratossina A, è stato determinato mediante un saggio ELISA indiretto. I coniugati GlnBP-OTA e OVA-OTA sono stati fatti adsorbire, in momenti diversi, su piastre per microtitolazione in polistirene, utilizzando le seguenti concentrazioni; 0.03, 0.1, 0.3, 0.6  $\mu\text{g/mL}$  in triplicato. In seguito ad incubazione, bloccaggio con una soluzione di ovalbumina e una serie di lavaggi, le piastre sono state incubate con soluzioni di anticorpo, diluite serialmente (da 1/1000 a 1/10000). La rilevazione è stata eseguita utilizzando un anticorpo secondario diretto contro IgG di coniglio coniugato alla perossidasi di rafano, che catalizza l'ossidazione della TMB, in presenza di perossido di idrogeno, sviluppando una colorazione blu dovuta al radicale cationico della TMB. L'intensità di quest'ultimo è funzione della quantità di enzima presente e quindi della concentrazione di tracciante.

Riportando sull'asse delle ascisse la diluizione dell'anticorpo e su quello delle ordinate l'assorbanza a 450 nm, letta per una determinata concentrazione di antigene, sono state costruite le curve di titolazione relative agli anticorpi anti-OTA

per i coniugati GlnBP-OTA e OVA-OTA. Come mostrato nei grafici in **Figura 9a e 9b** è possibile osservare che, per entrambi i coniugati, la minima diluizione che ancora mostra una risposta positiva alla minima concentrazione di antigene analizzata è di 1/5000. Questi valori sono significativi per lo sviluppo dei saggi immunologici, infatti è possibile lavorare a basse concentrazioni di anticorpo, pur mantenendo una moderata affinità tale da poter sviluppare biosensori in cui sia rispettata la caratteristica di reversibilità e quindi la riutilizzabilità.



**Figura 9a:** Grafico relativo alla titolazione degli anticorpi anti-OTA per il coniugato GlnBP-OTA



**Figura 9b: Grafico relativo alla titolazione degli anticorpi anti-OTA per il coniugato OVA-OTA**

Gli opportuni controlli positivi e negativi hanno dimostrato che tali anticorpi policlonali riconoscono l'ocratossina ma non la GlnBP e l'OVA rendendo il saggio specifico per tale micotossina.

### **3.2. Saggio immunologico basato sulla Spettroscopia di correlazione di Fluorescenza (FCS).**

La Spettroscopia di correlazione di Fluorescenza (FCS) è una tecnica molto utile, che permette di seguire le fluttuazioni dell'emissione di fluorescenza di una singola molecola, dovute ai moti Browniani delle molecole in soluzione, questo

significa che se una molecola di piccole dimensioni lega, ad esempio, un'altra di dimensioni maggiori, il complesso neoformato più grande diffonde più lentamente ed emette fotoni in un tempo più lungo rispetto alla molecola fluorescente non legata. Mediante modelli matematici è possibile ricavarne il coefficiente di diffusione delle molecole in esame. Sulla base di tale principio è basato il primo saggio immunologico sviluppato in questo progetto di ricerca, frutto di una pubblicazione scientifica.

### ***3.2.1. Coniugazione del coniugato GlnBP-OTA alla Fluoresceina isotiocianato (FTIC).***

Per la realizzazione di tale saggio fluorescente è stato necessario marcare il coniugato GlnBP-OTA ad una molecola con proprietà fluorescenti (fluoroforo). I fluorofori sono molecole che, quando vengono colpite (eccitate) da una luce di una certa lunghezza d'onda, emettono luce ad una lunghezza d'onda maggiore, in particolare possono assorbire nell'ultravioletto ed emettere nel visibile. Quando una radiazione elettromagnetica colpisce una molecola causa una oscillazione degli elettroni, se l'energia del fotone è uguale alla differenza di energia tra i due stati elettronici della molecola, vi è un'alta probabilità che la molecola stessa assorba il fotone e passi da uno stato elettronico ad un altro di energia superiore (assorbimento). La molecola, ritornando allo stato elettronico che aveva prima emette un fotone (emissione): questo fenomeno prende il nome di fluorescenza. A

seconda del tipo di esperimento che viene sviluppato e a seconda della tecnica di fluorescenza utilizzata è possibile scegliere tra una vasta gamma di fluorofori, presenti in commercio, quello più adatto agli scopi prefissati. In questo caso si è scelto di utilizzare la fluoresceina isotiocianato (FTIC)

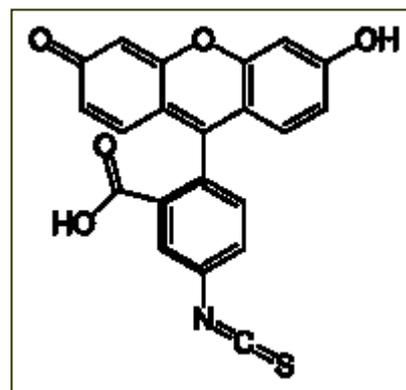


Figura 10: Fluoresceina isotiocianato

(Figura 10) rappresentata da una molecola di fluoresceina funzionalizzata con un gruppo isotiocianato in grado di legare i gruppi amminici secondari dei residui di lisina delle proteine.

Il coniugato GlnBP-OTA è stato legato alla FTIC mediante un protocollo standard di marcatura. In seguito a purificazione, effettuata per gel filtrazione e successiva dialisi, allo scopo di rimuovere il fluoroforo in eccesso, sono stati effettuati degli spettri di assorbimento e emissione di fluorescenza del coniugato GlnBP-OTA marcato con la fluoresceina.

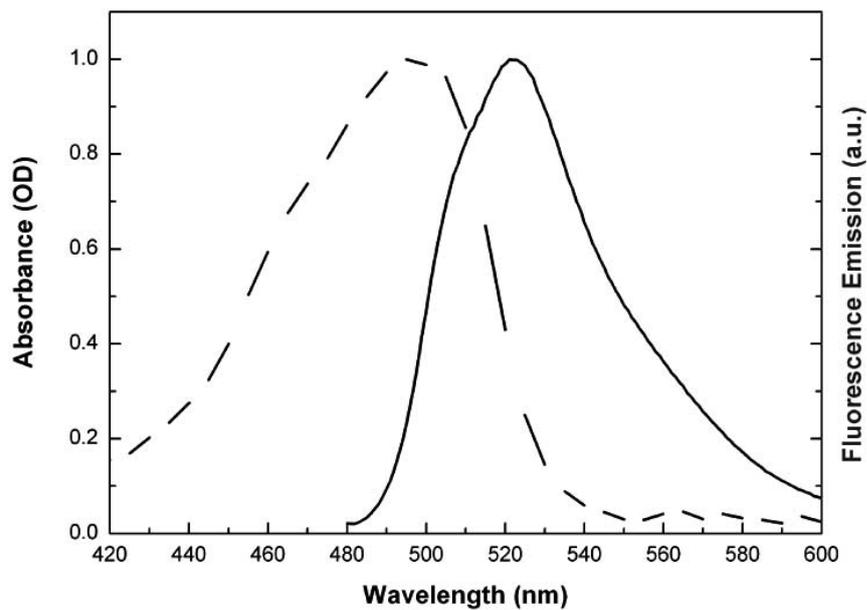


Figura 11: Spettri di assorbimento e di emissione del coniugato GlnBP-OTA-F

Lo spettro, normalizzato a 0,1 OD, (**Figura 11**) è stato registrato a temperatura ambiente. Come riportato ampiamente in letteratura è possibile osservare il classico assorbimento della fluoresceina isotiocianato a 488 nm e la sua emissione a 521 nm. Il rapporto della proteina marcata coniugata è stato calcolato dallo spettro di assorbimento e il suo valore era del 90%, indicando l'avvenuta marcatura della GlnBP coniugata all'ocratossina A.

### ***3.2.2. Rivelazione della ocratossina A mediante saggio competitivo basato sulla metodologia FCS.***

Il nuovo coniugato marcato con la fluoresceina (GlnBP-OTA-F) è stato utilizzato per sviluppare un saggio immunologico fluorescente per la rilevazione

dell'ocratossina A in matrici alimentari. Tale saggio è basato sul fenomeno della competizione: l'ocratossina A libera e quella legata alla GlnBP marcata con fluoresceina competono per il legame all'anticorpo anti-OTA.

I notevoli progressi riportati nel campo della spettroscopia di fluorescenza e delle nano/micro-tecnologie hanno portato alla diminuzione del limite di rilevamento di una sostanza fino al rilevamento di una singola molecola. Infatti l'FCS rappresenta un potente strumento in tale campo, grazie al fatto che un fascio di luce di eccitazione delimita otticamente un volume di campione di circa 1fL dal quale la fluorescenza e la luce diffusa vengono guidati al rivelatore. Sono state, dunque, monitorate le fluttuazioni di fluorescenza nel tempo mediante la diffusione delle singole molecole fluorescenti, in tale volume di rilevamento otticamente delimitato (confocale). Tali fluttuazioni sono processate mediante l'utilizzo di un computer, raccogliendo curve di autocorrelazione dalle quali è possibile derivare la mobilità delle molecole in soluzione, ovvero il coefficiente di diffusione (**Figura 12**) e i tempi di diffusione.

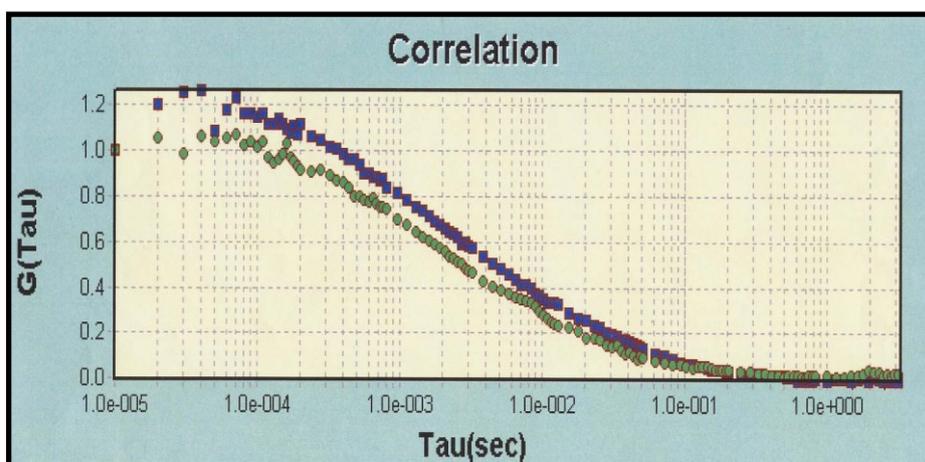
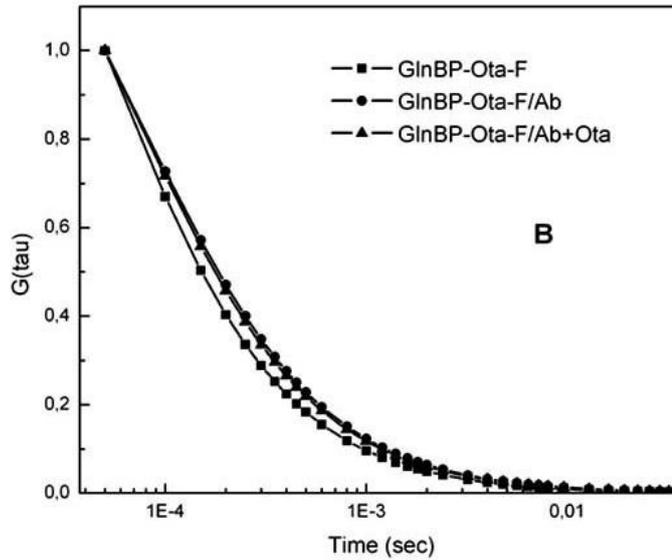


Figura12: Spettro di autocorrelazione

Lo studio dell'interazione tra la GlnBP-OTA-F e l'anticorpo non marcato anti-OTA, è stato eseguito in tre *step*. Primo, è stata studiata la diffusione della GlnBP-OTA-F da sola ed è stato registrato il coefficiente di diffusione che risulta essere  $128,71 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Secondo, è stata analizzata la formazione del complesso GlnBP-OTA-F/anticorpo anti-OTA non marcato. In questo caso la formazione del complesso è stata accompagnata da una drastica variazione del coefficiente di diffusione che è passato da un valore di  $128,71 \mu\text{m}^2/\text{s}$  del complesso da solo a  $74,42 \mu\text{m}^2/\text{s}$  del complesso legato. L'ultimo step è consistito nell'aggiunta di differenti concentrazioni di OTA non coniugata al complesso GlnBP-OTA-F/Ab-anti-OTA. Il risultato dell'aggiunta di un aumento di concentrazione dell'OTA non marcata è stata la variazione del coefficiente di diffusione del coniugato GlnBP-OTA-F. In particolare questo valore ritorna al valore di  $102,66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . In **Figura 13** sono riportate le curve di autocorrelazione del complesso GlnBP-OTA-F nelle tre fasi salienti dell'esperimento.



**Figura 13: Spettri di autocorrelazione dei campioni GlnBP-OTA-F da solo, in presenza di anticorpi anti-OTA, e di anticorpi e ocratossina A libera.**

I risultati ottenuti sono in accordo con i risultati attesi in quanto stanno ad indicare che in seguito all'aggiunta di anticorpi anti-OTA il complesso neoformato, più grande, diffonde più lentamente rispetto alla molecola originaria, presentando quindi valori più bassi del coefficiente di diffusione. Come riportato in **Tabella 3** in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di OTA libera il coefficiente di diffusione subisce un aumento graduale, fino a raggiungere in presenza di 12 ng di OTA libera, un valore vicino a quello del coniugato non legato.

**Tabella 3: Effetto dell'aggiunta dell'OTA sul coefficiente di diffusione (D)**

	<u>D(<math>\mu\text{m}^2/\text{s}</math>)</u>	W0( $\mu\text{m}$ )	Z0( $\mu\text{m}$ )	CPS	$\chi^2$
<b>GlnBP-OTA-F</b>	<u>128.71</u>	0.157723	5.64927	42373	1.03
<b>GlnBP-OTA-F + Ab</b>	<u>74.41</u>	0.157723	5.64927	54697	1.56
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 0.0078 ng OTA</b>	<u>88.55</u>	0.157723	5.64927	51182	1.42
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 0.0156 ng OTA</b>	<u>102.66</u>	0.157723	5.64927	50123	0.50
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 2.0 ng OTA</b>	<u>99.70</u>	0.157723	5.64927	54618	1.07
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 6.0 ng OTA</b>	<u>93.51</u>	0.157723	5.64927	56253	0.73
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 8.0 ng OTA</b>	<u>103.78</u>	0.157723	5.64927	56034	0.52
<b>GlnBP-OTA-F + Ab + 12 ng OTA</b>	<u>110.42</u>	0.157723	5.64927	57338	0,59

Tali risultati stanno ad indicare che l'anticorpo compete per il legame con l'OTA e si dissocia dal coniugato permettendo il monitoraggio dell'OTA presente nel campione in esame. Pertanto la combinazione di un anticorpo con una moderata affinità e l'utilizzo della metodologia della spettroscopia di correlazione di fluorescenza, risultante in un limite di *detection* di 0,0078 ng per l'OTA (considerando che ciascuna misura viene effettuata in 200 mL, la concentrazione di OTA in questo caso sarà di 0,039 ng/mL) suggerisce l'applicazione di questa strategia sperimentale per analiti per cui è richiesta un'alta sensibilità.

### **2.3. Saggio immunologico basato sulla Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR).**

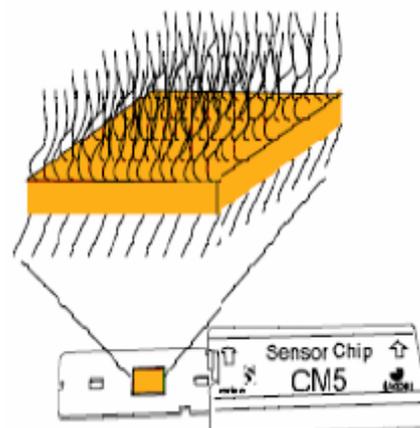
Come è noto l'ocratossina A è una molecola di piccole dimensioni, pertanto il cambiamento di massa in seguito al legame di essa alla superficie del sensore può essere troppo basso rispetto al significativo cambiamento nell'indice di rifrazione dovuto al legame di una molecola di grandi dimensioni. Di conseguenza, per la tecnologia BIAcore, nello sviluppo di un metodo quantitativo per la rilevazione dell'ocratossina A o di altri composti di piccole dimensioni, è necessario l'uso di un metodo di *sensing* indiretto. Questo può essere sia di tipo **competitivo** in cui un campione standard e un coniugato-aptene di massa maggiore compete per il sito di legame di un anticorpo immobilizzato sulla superficie del chip, oppure di tipo **inibitivo** in cui il campione è incubato con l'anticorpo e la miscela è passata sulla superficie, in cui è stato immobilizzato il coniugato-aptene, per permettere il legame dell'anticorpo rimasto libero al coniugato stesso. Molto spesso il legame antigene anticorpo è estremamente forte, non permettendo, quindi, una buona dissociazione e di conseguenza il riutilizzo del chip. Per questo motivo è stato sviluppato un saggio basato sul metodo inibitivo che si adatta meglio ai nostri scopi.

### ***2.3.1. Immobilizzazione del coniugato OVA-OTA alla superficie del chip e verifica del legame dell'anticorpo***

È stato analizzato il legame dell'anticorpo anti-OTA alla OTA alla superficie immobilizzata con il coniugato OTA-OVA (definito ligando).

Una soluzione di 35 µg/mL del coniugato OTA-OVA in 10 mM di tampone sodio acetato pH 4 è stata immobilizzata sulla superficie del sensore, in seguito ad attivazione dei gruppi carbossilici presenti sulla superficie, grazie all' utilizzo di una miscela di EDC/NHS.

La matrice del sensore (**Figura 14**) adoperata in questo esperimento (*CM5 chip*) è costituita da una superficie di destrano che mantiene un ambiente idrofilico intorno alle molecole immobilizzate e dona un alto grado di accessibilità alla superficie molecolare.



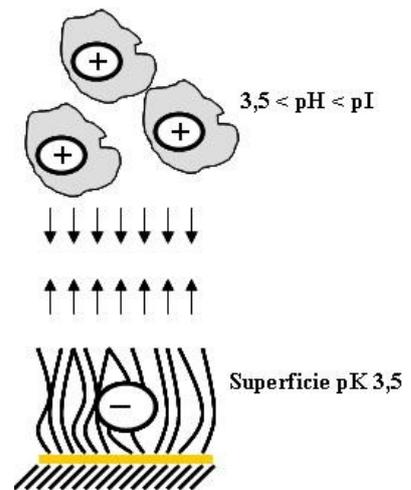
**Figura 14: Chip CM5**

L'immobilizzazione delle proteine su tale sensore è principalmente influenzata da alcune proprietà fisiche della matrice stessa, in particolare dal pH e dalla forza ionica. Di fatto a pH 3,5 i gruppi carbossilici della matrice di destrano hanno una carica netta negativa, di conseguenza per avere una efficace immobilizzazione è necessario utilizzare un tampone, all'interno del quale è contenuta la proteina, con un pH compreso tra 3,5 ed il punto isoelettrico (pI) della proteina stessa. In questo intervallo di pH la proteina ha una carica netta negativa grazie alla quale viene attratta elettrostaticamente dalla superficie di

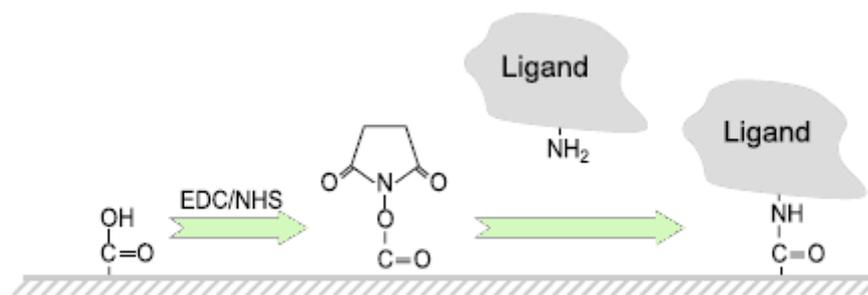
destano (effetto di pre-concentrazione) permettendo quindi l'effettiva immobilizzazione covalente (**Figura 15**).

Il coniugato OVA-OTA è stato immobilizzato mediante accoppiamento amminico. Come illustrato nello schema in **Figura 16** la matrice di destrano viene attivata

con una miscela di EDC/NHS portando alla formazione di un intermedio succinimidico estremamente reattivo che è in grado di reagire con i gruppi amminici delle proteine per formare dei legami covalenti stabili.



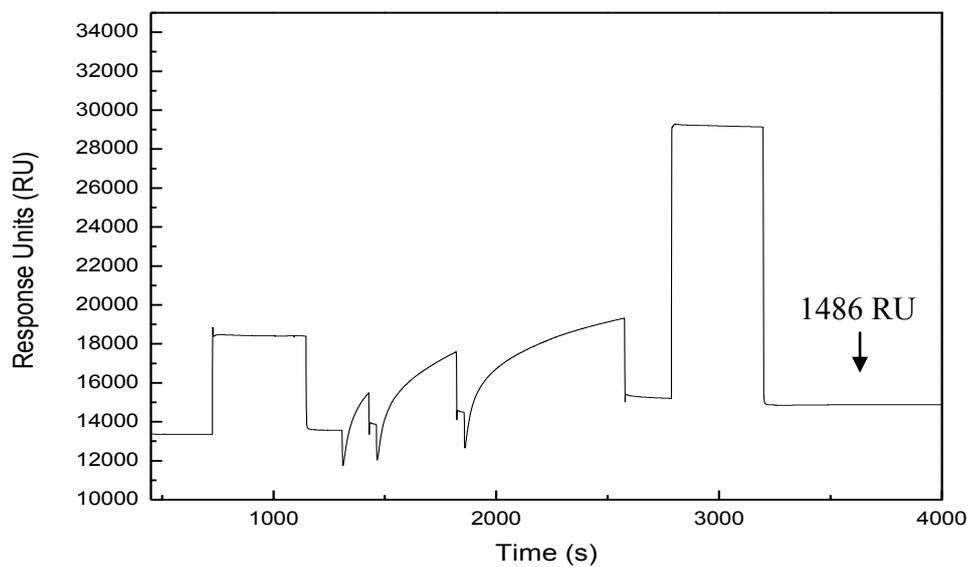
**Figura 15:** Effetto di pre-concentrazione



**Figura 16:** Schema di immobilizzazione mediante gruppi amminici

La **Figura 17** mostra il sensorgramma relativo all'immobilizzazione del coniugato OVA-OTA. Dopo una prima attivazione della matrice con EDC/NHS sulla superficie viene iniettato il coniugato OVA-OTA al valore di pH adatto per

stabilire l'effetto di pre-concentrazione e ottimizzare quindi il legame alla superficie. È possibile osservare che in seguito ad iniezione di etanolamina a pH 8 l'eccesso di coniugato non legato viene rimosso, ottenendo una risposta di circa 1500 RU che rappresenta la quantità di OVA-OTA legata covalentemente al sensore.



**Figura 17: Immobilizzazione del coniugato OVA-OTA**

Le unità di risonanza (RU) sono proporzionali alla concentrazione a livello della superficie, infatti 1000 RU corrispondono ad un cambiamento dell'angolo di risonanza di  $0,1^\circ$  che rappresenta approssimativamente  $1 \text{ ng/mm}^2$  di proteina sulla superficie del sensore. Assumendo che la superficie del chip sia di 100 nm, la concentrazione di ligando corrisponderebbe a circa 10 mg/ml. Pertanto è possibile

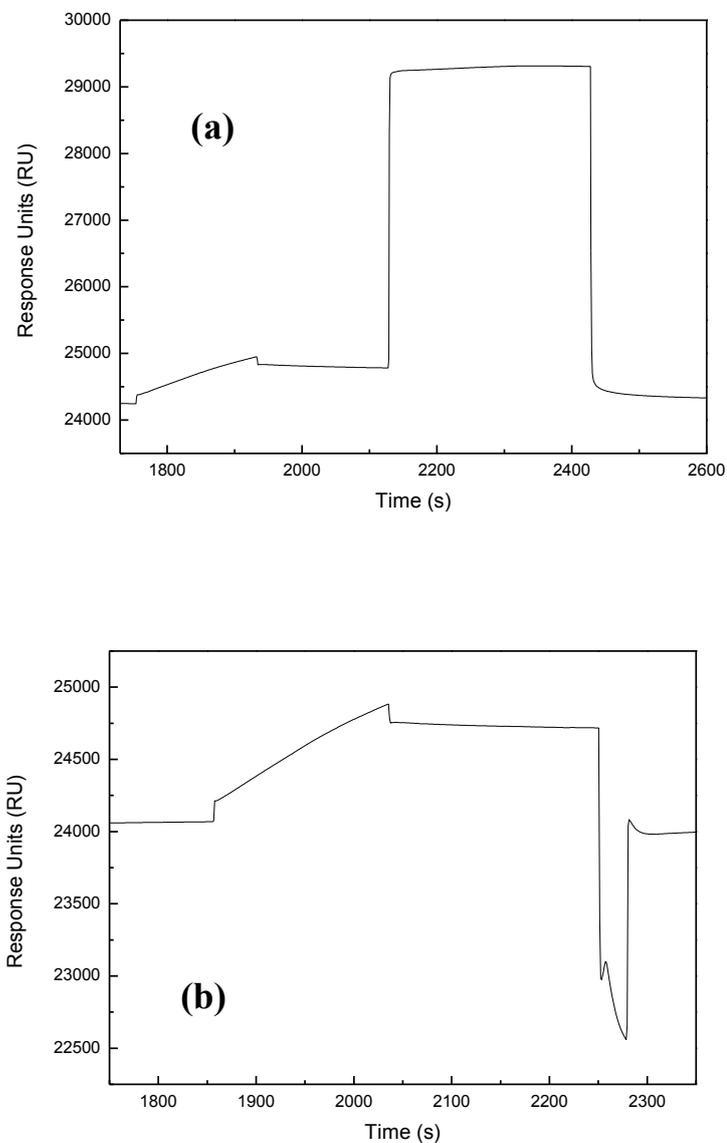
dire che, in maniera approssimativa, la concentrazione del coniugato OVA-OTA sulla superficie del sensore è di circa 15 mg/mL.

Una volta effettuata l'immobilizzazione sono state analizzate diverse diluizioni di anticorpo anti-OTA per poter scegliere la migliore diluizione in grado di dare una buona risposta nel minor tempo possibile. In **Figura 18b** è mostrato il sensorgramma relativo al legame dell'anticorpo anti-OTA al coniugato immobilizzato sul chip. È possibile osservare che una diluizione 1/10 di anticorpi anti-OTA, iniettata per un tempo di 3 min, è in grado di dare una risposta sufficiente per lo sviluppo del saggio.

### ***2.3.2. Efficienza della rigenerazione***

Un'efficiente rigenerazione della superficie del sensore è necessaria per un suo utilizzo nelle analisi di routine. Pertanto prima di procedere con la realizzazione del saggio sono state esaminate le condizioni ottimali per la rimozione dell'anticorpo legato al ligando immobilizzato sulla superficie. Le interazioni antigene-anticorpo sono molto forti, ed estremamente difficili da dissociare se non con l'utilizzo di reagenti caotropici. Una buona rigenerazione della superficie legante è un requisito essenziale ai fini del corretto funzionamento del saggio. Infatti condizioni di rigenerazione blande potrebbero portare ad un abbassamento delle prestazioni del saggio, in quanto non permetterebbero all'anticorpo di dissociarsi dal coniugato bloccando di conseguenza siti di legame necessari per

l'analisi successiva, viceversa l'utilizzo di reagenti caotropici troppo forti potrebbe invece portare al distacco del coniugato dalla superficie del sensore con conseguenze negative, anche in questo caso, sulle prestazioni del saggio. A tale scopo sono state utilizzate concentrazioni crescenti e tempi diversi di iniezione di alcuni reagenti caotropici; NaOH, etanolamina pH 12, tampone glicina a vari valori di pH.



**Figura 18: Sensorgrammi relativi al legame di anticorpo anti OTA: (a) effetto della rigenerazione con 10 mM tampone glicina pH 2,5, (b) effetto della rigenerazione con 100 mM NaOH**

Come mostrato nelle **Figure 18a e 18b** è possibile suddividere il sensorgramma in tre fasi: una prima fase di legame dell'anticorpo all'antigene immobilizzato sul sensore; una seconda fase in cui la risposta è stabilizzata grazie alla semplice iniezione di tampone di corsa che elimina l'eccesso di anticorpo legato aspecificamente, che rappresenta l'effettiva risposta in unità di risonanza (RU); e una terza fase di rigenerazione in cui viene iniettato il tampone di rigenerazione che permette il distacco dell'anticorpo legato e quindi il riutilizzo del chip.

Infatti in **Figura 18a** è mostrato un esempio di blanda rigenerazione. Di fatto dopo un iniezione di una soluzione 10 mM tampone glicina pH 2.5 per 5 minuti a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  il valore di RU non viene riportato al valore iniziale, ovvero al valore prima del legame con l'anticorpo anti-OTA. La rigenerazione in questo caso ha un'efficienza di circa il 70 %, non sufficiente per ottimizzare le prestazioni del saggio. È stato osservato, invece, che solo 100 mM NaOH iniettato per 1 min a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  è in grado di dare una completa rigenerazione senza ridurre la capacità di legame del coniugato OVA-OTA immobilizzato (**Figura 18b**). Pertanto è stato scelto come tampone di rigenerazione una soluzione di 100 mM NaOH per 1 min di iniezione a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Quindi una volta trovate le condizioni di rigenerazione è stato possibile costruire una curva standard grazie al fatto che in questo modo è stato possibile evitare l'alta variabilità della risposta dovuta alla presenza di anticorpi ancora legati alla superficie.

### ***2.3.3. Sviluppo del saggio quantitativo mediante la tecnologia SPR.***

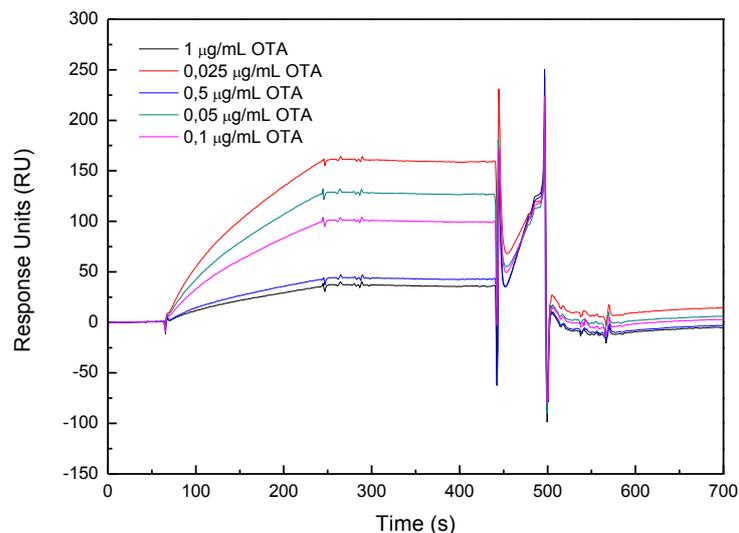
Lo sviluppo di un saggio quantitativo è stato il passo successivo per stimare la presenza di OTA libera in un dato campione.

Il principio di base di tale saggio è lo sviluppo di un sistema di tipo inibitorio che consiste, come precedentemente accennato, nell'immobilizzazione del coniugato OVA-OTA alla superficie di un chip commerciale CM5 e nell'iniezione successiva di una soluzione contenente una miscela di anticorpo anti-OTA e il campione da analizzare potenzialmente contaminato da ocratossina A. Quando tale miscela viene fatta passare a livello della superficie del sensore, se nel campione non è presente OTA, l'anticorpo si legherà all'antigene immobilizzato, in caso di positività tale legame sarà, invece, inibito in modo competitivo dalla presenza dell'ocratossina A libera.

Lo sviluppo di un sistema quantitativo ha richiesto la costruzione di una retta di taratura grazie alla quale è possibile confrontare, in caso di positività, la quantità di OTA presente nel campione in esame.

Come visto precedentemente una volta immobilizzato il coniugato OVA-OTA alla superficie del chip sono state trovate le condizioni ottimali per il legame dell'anticorpo anti-OTA alla ocratossina A legata all'ovalbumina immobilizzata sul sensore, e per la rigenerazione dello stesso. La retta di taratura è stata costruita utilizzando standard di ocratossina libera in un intervallo di concentrazioni tra 25 ng/mL a 1 µg/mL. Ciascun campione è stato miscelato e incubato nello stesso

volume di una diluizione 1/5 di anticorpo diluito in tampone di corsa (per assicurare una diluizione finale di 1/10). Dopo 10 min di incubazione la miscela è stata iniettata sul chip ed è stata misurata la risposta in RU relativa all'anticorpo anti-OTA legato alla superficie. È possibile osservare dalla sovrapposizione dei sensorgrammi mostrati in **Figura 19** come all'aumentare della concentrazione dell'ocratossina presente nella miscela la risposta relativa al legame dell'anticorpo diminuisce a causa della maggiore presenza di OTA libera che legherà l'anticorpo anti-OTA.



**Figura 19: Sensorgrammi relativi alla competizione a concentrazioni crescenti di OTA libera**

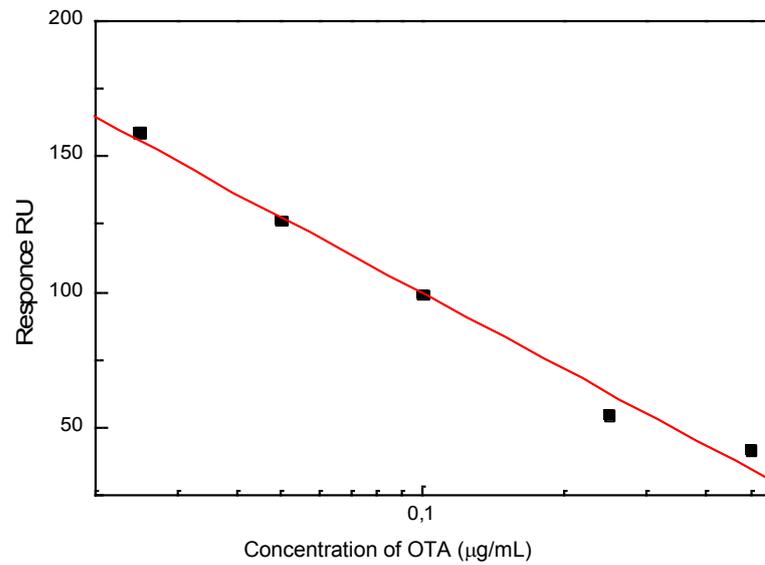
L'OTA, infatti compete per un numero limitato di siti di legame presenti sull'anticorpo comportando quindi un abbassamento del segnale registrato dallo

strumento rispetto alla risposta relativa all'assenza di OTA. Ciascun sensorgramma è stato effettuato in circa 10 min totali dove in soli 5 min è possibile osservare il legame dell'anticorpo sulla superficie del chip nonché la relativa risposta rappresentante la presenza di OTA nel campione in esame.

Ciascuna misura è stata effettuata in triplicato al fine di assicurare una certa riproducibilità a concentrazione nota di OTA. A questo punto sono stati riportati i valori di RU in funzione del logaritmo della concentrazione di OTA libera in soluzione al fine di creare una retta di taratura (**Figura 20**). Le risposte relative a ciascuna concentrazione utilizzata sono mostrate nella **Tabella 4**. Tale risposta è inversamente proporzionale alla quantità di ocratossina libera in soluzione.

**Tabella 4**

<b>Concentration OTA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Response (RU)</b>	<b>Base Shift</b>
0	229	/
1	35,2	-5,4
0,5	41,7	-3,7
0,25	54,2	-3,7
0,1	98,8	+5,3
0,05	126,1	-5,2
0,025	158,4	14



**Figura 20: Retta di taratura**

Il valore del coefficiente di correlazione calcolato è pari a 0,99 indice di una buona linearità tra la concentrazione di OTA libera e la risposta relativa.

I risultati ottenuti indicano che è possibile monitorare concentrazioni di OTA pari a 25 ng/mL, ovvero 2,5 ppb, che risulta essere al di sotto dei limiti di legge per tutti i prodotti derivati da cereali destinati all'alimentazione umana e animale.

## **4. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE**

Le “Tecniche di Sensing” rappresentano una valida alternativa ai convenzionali saggi immunologici e agli altri metodi chimico-fisici, quali ad esempio la spettroscopia di massa, in quanto possono essere usate come utile strumento nello screening dei campioni in larga scala grazie alla capacità di aumentare la sensibilità della rilevazione e alla eliminazione dei costi, dei tempi e delle procedure di incubazione.

I risultati ottenuti nella presente tesi di dottorato dimostrano la realizzazione di due semplici saggi immunologici basati su avanzate metodologie biosensoristiche (SPR ed FCS) per la rilevazione dell’ocratossina A.

In particolare l’utilizzo di anticorpi con una moderata affinità verso l’OTA è stato ampiamente compensato dall’elevata sensibilità delle due tecniche utilizzate, permettendo quindi la rivelazione di quantità di OTA al di sotto dei limiti di legge. Per quanto riguarda il saggio basato sulla Spettroscopia di Fluorescenza di Correlazione (FCS), infatti, è stato possibile monitorare fino a 0,039 ng/mL di OTA corrispondente a 39 ppt, mentre per quello basato sulla “Surface Plasmon Resonance” (SPR) è stato possibile rilevare fino a 2,5 ppb. Tali valori risultano nettamente al di sotto dei limiti di legge consentiti dal Reg. (CE) 683/2004 (Gazzetta ufficiale L 106 del 15.04.2004) e dal Reg. (CE) 472/2002 (Gazzetta ufficiale L 75 del 16.03.2002), soprattutto per quelli relativi alla prima metodica. È possibile concludere, per quanto riguarda la sensibilità di rilevazione dell’OTA, che entrambi i saggi sviluppati soddisfano uno dei requisiti chiave nella realizzazione di

un dispositivo analitico innovativo, ovvero la capacità di monitorare piccole quantità di OTA.

Un altro importante aspetto dell'utilizzo di biosensori ottici come alternativa ai convenzionali saggi immunochimici è la riduzione dei costi e dei tempi di analisi nonché la possibilità di utilizzare componenti miniaturizzabili adatti alla possibilità di effettuare misure *in situ* in tempo reale. In effetti in entrambi i saggi una singola misurazione di un campione contenente OTA porta alla produzione di un segnale misurabile dopo pochissimi minuti. In tale contesto, la positività del test (ovvero la presenza di OTA) basato sull' SPR viene seguita in tempo reale in meno di 10 min. Inoltre, gli esperimenti condotti al fine di rigenerare la superficie del sensore hanno permesso di trovare condizioni tali che il chip possa essere riutilizzato senza che le prestazioni del saggio vengano compromesse, portando quindi alla riduzione dei costi.

I risultati ottenuti fin'ora aprono le porte per lo sviluppo di una piattaforma a più ampio raggio che permetta di discriminare e analizzare diversi analiti contemporaneamente, ad esempio è possibile pensare all'utilizzo di diverse sonde fluorescenti che nel saggio basato sull'FCS permettano la rilevazione di più contaminanti contemporaneamente data la diversa lunghezza d'onda di eccitazione dei fluorofori.

Entrambe le metodiche utilizzate, potenzialmente, non necessitano dei laboriosi processi di estrazione e *clean up* normalmente richiesti dalle tecniche convenzionalmente utilizzate. A tal proposito, è possibile analizzare campioni

alimentari al fine di verificare la presenza dell'ocratossina A in matrici complesse, e la successiva verifica mediante confronto con le tecniche di rilevamento validate.

Per migliorare le prestazioni di tali saggi potrebbe essere utile incentrare le ricerche verso la produzione, grazie alle moderne tecniche di ingegneria proteica, di mutanti proteici con nuove funzioni (ovvero con la capacità di legare molecole diverse dal ligando naturale). L'ingegneria proteica è un campo emergente che utilizza *scaffold* proteici naturali allo scopo di creare nuove molecole che siano in grado di legare con maggiore o minore affinità l'analita di interesse, nonché ottenere elementi di riconoscimento con alta specificità, in modo tale da evitare i fenomeni di cross-reattività tipici nell'analisi delle micotossine con l'utilizzo di anticorpi. Tale strategia rappresenta una potente metodica in rapida espansione ed una valida alternativa all'utilizzo degli anticorpi (Arne Skerra, 2007).

Pertanto, è possibile concludere che la messa a punto di tali saggi rappresenta un ulteriore tassello alla realizzazione e alla successiva validazione di sistemi sempre più innovativi per la rilevazione e la quantificazione delle micotossine, come l'ocratossina A.

# *Bibliografia*

A F Collings and Frank Caruso. (1997) “Biosensors: recent advances” *Rep. Prog. Phys.* 60 1397–1445.

Abramson D., Mills J.T., Boycott B.R. (1983). “Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada”. *Can. J. Comp. Med.* 47, 23-26 .

Abrantes M, Magone, MT, Boyd, LF, Schuck, P (2001). “Adaptation of a Surface Plasmon Resonance Biosensor with Microfluidics for Use with Small Sample Volumes and Long Contact Times”. *Analytical Chemistry* 73(13): 2828-35.

Accensi F., Abarca M.L., Cano J., Figuera L., Cabanes F.J. (2001). “Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A.niger* aggregate”. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 79, 365-270.

Adebajo L.O., Bamgbelu O.A., Olowu R.A. (1994). “Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two aspergilli in melon seed”. *Nahrung* 38, 209-17.

Albassam M.A., Yong S.I., Bhatnagar R., Sharma A.K., Prior M.G. (1987) “Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats”. *Veterinary Pathology* 24,427-435.

Arne Skerra. (2007) “Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition” *Current Opinion in Biotechnology*, 18:295–304.

Atroshi F., Biese I., Saloniemi M. (2000). "Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice". *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3, 281-291

Bacia, K. and Schwille, P. (2003). "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy". *Methods* 29: 74-85.

Bacon C.W., Sweeney J.G., Robbins J.D., Burdick D. (1973). "Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements". *Appl. Microbiol.* 26, 155-160.

Barhoumi, A.H., Maaref, A., Rammah, M., Martelet, C., Jaffrezic, N., Mousty, C., Vial, S., and Forano, C. (2006). "Urea biosensor based on Zn<sub>3</sub>Al-Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures". *Materials Science and Engineering C.* 26, 328–33.

Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh P., Lillehoj E.B. (1985). "Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/65 X C3H) F1 mouse". *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 733-742.

Betina, V. (1984). *Developments in food science, vol. 8. Mycotoxins, production.*

Bigelis, R., and LL Lasure. (1987). "Fungal enzymes and primary metabolites used in food processing". In *Food and Beverage Mycology 2<sup>nd</sup>* pp. 473-516.

Boorman G.A. (1989). "NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (Cas No. 303-47-9) in F344/N rats (gavage studies)". *NIH Publications, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Research Triangle park No. 89, 2813.*

Boorman G.A., Hong H.L., Dieter M.P., Hayes H.T., Pohland A.E., Stack M., Luster M.I. (1984) "Mycotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A". *Toxicology Appl. Pharmacol.* 72, 304- 312.

Bu'Lock, J. D. (1980). "Mycotoxins as secondary metabolites." *Academic Press, Inc., New York, N.Y.*

Bullerman L.B. (1985). "Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production". *Lebensm. Wiss. Technol.* 18, 197-200.

Canela R., Viladrich R., Velazquez C.A., Sanchis V. (1994). "A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain". *Mycopathologia* 125, 29-32.

Castegnaro M., Michelon J., De Meo M., Laget M. (1991). "Destruction of ochratoxin A and citrinin using sodium hypochlorite". *IARC Sci. Publ.* 113, 9-13.

Cho YJ, Lee DH, Kim DO, Min WK, Bong KT, Lee GG, Seo JH. (2005) "Production of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application to immunochromatographic assay". *J Agric Food Chem.* Nov 2;53(22):8447-51.

chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary

Chu F.S., Butz M.E. (1970). "Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53, 1253- 1257.

Croft, W. A., B. B. Jarvis, and C. S. Yatawara. (1986). "Airborne outbreak of trichothecene toxicosis". *Atmos. Environ.* 20:549-552.

Curtui V., Gareis M., Usleber E., Märtlbauer E. (2001). "Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone". *Food Addit. Contam.* 18, 730-738.

Dakin J and Culshaw B (1989) *Optical Fiber Sensors, Volume 2: Principles and Components* (London: Artech)

Devegowda G., Radu M.V.L.N., Nazar A., Swamy H.V.L.M. (1998) "Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction". In: *Proceedings Alltech's 14th Annual Symposium. Biotechnology in the Feed Industry. Passport of the year 2000*. Edited by T.P. Lyon and K.A. Jacques, Nottingham: Nottingham University Press. pp 241-255.

Dhuley J.N. (1997). "Effect of some Indian herbs on macrophage functions in ochratoxin A treated mice". *Journal of Ethnopharmacology* 58, 15-20.

El-Halouat A., Debevere J.M. (1997). "Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes". *Int. J. Food Microbiol.* 35, 41-48.

Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2004). "Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli". *Microbiology* 155, 861-866.

Follmann W., Hillebrand I.E., Creppy E.E., Bold H.M. (1995). "Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated by OTA and  $\alpha$  OTA". *Archives of Toxicology* 69, 280-286

Frisvad J.C., Lund F. (1993). "Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals". In: Occurrence and significance of mycotoxins. Ed. Scudamore K.A. Central Science Laboratory, Londra. pp. 146-171.

Fukal L. (1990). "A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay". *Food Addit. Contam.* 7, 253-258

Fukayama, M., W. Winterlin, and D. P. Hsieh. (1980). "Rapid method for the analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63:927.

Galtier P., Boneu B., Charpentreau, J.L., Bodin G. (1979). "Physiopathology of hemorrhagic syndrome related to ochratoxin A intoxication in rats". *Food Cosmet. Toxicol.* 17, 49-53.

Gareis M., Scheuer R. (2000). "Ochratoxin A in meat and meat products". *Arch. Lebensmittelhyg* 51, 102-104.

Gareis M., Wolff J. (2000). "Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin". *Mycoses* 43, 79-83.

Gazzetta ufficiale L 75 del 16.03.2002

Gazzetta ufficiale L 106 del 15.04.2004

Hagblom P. E., Ghosh J. "Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels". *Appl. Environ. Microb.* 49, 787-790 (1985).

Halt M. (1998). "Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants". *Eur. J. Epidemiol.* 14, 269-74

Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I. (1998). "Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar". *J. Food Mycol.* 1, 67-72.

Heller, A. (1999). "Implanted electrochemical glucose sensors for the management of diabetes". *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1, 153-175.

Helrich, K. (Ed.). (1990). "Natural Poisons (15th Ed.)." Chap. 49. *Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, VA.

Heptinstall R.H. (1974). "Pathology of the kidney". *Little Brown & Co., Boston* 11, 828-836

Hesseltine C.W. (1969). "Mycotoxins". *Mycopathol.* *Mycol. Appl.* 39, 371-83

Hesseltine C.W., Vandergraft E.E., Fennell D.I., Smith M.L., Shotwell O.L (1972). "Aspergilli as ochratoxin producers". *Mycologia* 64, 539- 550 .

Hohler D. (1998). "Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action". *Z. Ernährungswiss.* 37, 2-12.

Holmberg T., Breitholtz-Emanuelsson A., Haggblom P., Schwan O., Hult K. (1991). "Penicillium verrucosum in feed of ochratoxin A positive swine herds". *Mycopathologia* 116, 169-176.

Holmberg T., Breitholtz-Emanuelsson A., Haggblom P., Schwan O., Hult K. (1991). "Penicillium verrucosum in feed of ochratoxin A positive swine herds". *Mycopathologia* 116, 169-176.

Hussein, S.H., Brasel, J.M., (2001). "Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals". *Toxicology*, 167, 101-134.

IARC. "Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic, aromatic amines and mycotoxins". *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon. vol.56 (1993).

J. J. Pestka, B. W. Steinert, and F. S. Chu. (1981) "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Ochratoxin A" *Appl Environ Microbiol*. June; 41(6): 1472–1474.

Jiménez A.M., Lopez de Cerain A., Gonzalez-Penas E., Bello J. (2001). "Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pates by highperformance liquid chromatography". *Food Addit. Contam.* 18, 559-63.

Jonsson, U., Fsgerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., LGf&s, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I., Sjolander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Gstlin, H. & Malmqvist, M. (1991). "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology". *Bio Techniques*, 11, 620-627

Jorgensen K., Rasmussen G., Thorup I. (1996). "Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the danish population". *Food Addit. Contam.* 13, 95-104.

Kanisawa M., Suzuki S. (1978). "Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin". *Gann*. 69, 599-600.

Kanisawa M., Suzuki S., Kozuka Y., Yamazaki M. (1977). "Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42, 55-64

Kozakiewicz Z., Paterson R.R.M., Bridge P.D. (1993). "Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species". In: *Occurrence and significance of mycotoxins*. Central Science Laboratory. Londra Scudamore (Ed.). pp. 64-75.

Krogh P. (1980). "Causal association of mycotoxic nephropathy". In: *Medical mycology*, Preusser H.J. (ed.) 8, 291-299.

Kuiper-Goodman T., Scott P.M. (1989). "Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A". *Biomed. Environ. Sci.* 2, 179-248 .

L. Richard, G. A. Bennett, P. F. Ross and P. E. Nelson. (1993) "Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food". *J. J Anim Sci.* 71:2563-2574.

Lai, C.L., Fuh, Y.M., Shih, D. Y.C., (2000). "Detection of mycotoxin patulin in apple juice", *J Food Drug Anal.* 8 (2), 85-96

Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. (2001) "Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*". *Appl. Environ. Microb.* 67, 3630-3635.

Lea T., Steien K., Stormer F.C. (1989). "Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression". *Mycopathologia* 107, 153-159

Lee H.B., Magan N. (1999). "Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi". *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 300-304.

Luster M.I., Germolec D.R., Burleson G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R., Hayes H.T. (1987). "Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A". *Cancer Res.* 47, 2259-2263.

Madou M and Tierney M J. (1993) "Required technology breakthroughs to assume widely accepted biosensors" *Appl. Biochem. Biotech.* 41 109.

Mascini, M. and Liberti, A. (1974) "An enzyme coupled cyanide solid state electrode". *Anal.chim.Acta* 68: 177.

Mascini, M. and Palleschi, G. (1983)."A flow-through detector for simultaneous determinations of glucose and urea in serum samples". *Anal.Chim.Acta* 145: 213.

Mascini, M. and Palleschi, G. (1982) "Determination of creatinine in clinical samples with a creatininase reactor and an ammonia probe". *Anal.Chim.Acta* 136: 62.

Mills J.T., Abramson D. (1982). "Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapessed and cereals in western Canada". *Canadian Journal of Plant Phatology* 4, 37-41.

Mills J.T., Abramson D., Frohlich A.A., Marquardt R.R. (1989). "Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. from stored durum wheat". *Canadian Journal of Plant Phatology* 11, 357-360.

Mills J.T., Seifert K.A., Frisvad J.C., Abramson D. (1995). "Nephrotoxicogenic Penicillium species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada". *Mycopathologia* 130, 23-28.

Neely W.C., West A.D. (1972). "Spectroanalytical parameters of fungal metabolites. 3. Ochratoxin A". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 55, 1305-1309.

Neshiem S. (1969). "Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 52, 975-983.

Northolt M.D., Van Egmond H.P., Paulsch W.E. (1979). "Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature". *J. Food Protect.* 42, 485-490.

Obrecht-Pflumio S., Chassat T., Dirheimer G., Marzin D. (1999). "Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes". *Mutat. Res.* 446, 95-102.

Osweiler G.D. (1992). "Mycotoxins". In : Disease of Swine. Seventh edition. Edited by A.D. Leman B.E., Straw W.L. Mengling S., D'Allaire and D.J. Taylor. London: Wolfe Publishing. pp735-743.

Pasteiner S. (1997). "Coping with mycotoxin contaminated feedstuffs". *Feed International* pp. 112-116.

Paster N., Lisker N., Chet I. (1983). "Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres". *Appl. Environ. Microb.* 45, 1136-1139.

Patterson M., Darnoglou A.P. (1986). "The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue". *Lett. Appl. Microbiol.* 3, 123-125.

Pitt J.I., Hocking A.D. (1997). "Fungi and food spoilage". 2° Ed. *Chapman and Hall*, Londra.

Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L. (1992). "Ochratoxin A: a review". *Pure Appl. Chem.* 64, 1029-1046.

Ramos A.J., Labernia N., Marin S., Sanchis V., Magan N. (1998). "Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains". *Int. J. Food Microbiol.* 44, 133-140.

Ramos A.J., Labernia N., Marin S., Sanchis V., Magan N. (1998). "Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains". *Int. J. Food Microbiol.* 44, 133-140.

Rich, R.L.; Myszka, D.G. (2007) "Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis". *Anal. Biochem.* 361, 1-6.

Rich, RL, Myszka, DG (2000) "Advances in Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis". *Current Opinion in Biotechnology* 11:54-61

Roe, J.N., and Smoller, B.R. (1998). "Bloodless glucose measurements". *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 15, 199-241.

Schultz JS. Mansouri S. Goldstein IJ. (1982) "Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites". *Diabetes Care.*;5:245–253.

Scott P.M. (1996). "Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing". *J. AOAC Int.* 79, 875-882.

Scott P.M. (1994). "Penicillium and Aspergillus toxins". In: J.D. Miller, *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin.* Trenholm, Eagan Press, 261

Scudamore K.A. Clarke J.H., Hetmanski M.T. (1993). "Isolation of Penicillium strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains". *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 82-87.

Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2006). "Recent avances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectroscopy" *Mass Spectr. Rev.*, 25 (1), 54-76.

Skaug M.A. (1999). "Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A". *Food Addit. Contam.* 16, 75-78

Smoragiewicz, W., B. Cossette, A. Boutard, and K. Krzystyniak. (1993). "Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings". *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65:113–117.

Speijers G.J.A., Van Egmond H.P. (1993). "Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds". *Human Ochratoxicosis and its Pathologies. Colloque INSERM* , edited by Creppy E.E., Castegnaro and Dirheimer G. 231, 85-100

Steele J.A., Davis N.D., Diener U.L. (1973). "Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production". *Appl. Microbiol.* 25, 847

Steyen, P.S., (1998). "The biosynthesis of mycotoxins". *Rev. Méd. Vét.* 149: 469-478.

Stubblefield, R. D., and H. P. van Egmond. (1989). "Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M1". In: H. P. van Egmond (Ed.) *Mycotoxin in Dairy Products*. pp 57-98. Elsevier Science, London.

Sweeney M.J., Dobson A.D.W. (1998). "Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species". *Int. J. Food Microbiol.* 43, 141-158.

Turner W.B. (1971). "Fungal Metabolites". *Academic Press*, New York.

Turner, A.P. (2000). "Biosensors – sense and sensitivity". *Science* 290, 1315–1317.

Ueno Y. (1998). "Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan". *Mycotoxins* 47, 25-32.

Urbano G.R., Taniwaki M.H., Leitao M.F., Vicentini M.C. (2001). "Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw brazilian coffee". *J. Food Protect.* 64, 1226-1230.

Valdes, J.J., Wall, J.G., Chambers, J.P. and Eldefrawi, M.E. (1988). "A receptor-based capacitive biosensor". *The Johns Hopkins University Applied Physics Laboratory Technical Digest* 9, 4–10.

Valenta H., Goll M. (1996). "Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany". *Food Addit. Contam.* 13, 669-676 .

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J. (1965). "Ochratoxin A, a toxic metabolite produced *Aspergillus ochraceus* Wilh". *Nature* 205, 1112-1113.

Van Der Stegen G., Jorissen U., Pittet A., Saccon M., Steiner W., Vincenzi M., Winkler M., Zapp J., Schlatter C. (1997). "Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA)". *Food Addit. Contam.* 14, 211-216

Van Walbeek W., Scott P.M., Harwing J., Lawrence J.W. (1969). "Penicillium viridicatum westling: a new source of ochratoxin A". *Can. J. Microbiol.* 15, 1281-1285.

Vazquez-Belda B., Fente-Sampayo C.A., Quinto-Fernandez E., Franco-Abuin C., Rodriguez-Otero J.L., Cepeda-Saez A. (1995). "Incidencia de hongos toxigenicos in queseria de la zona de Arzua (La Coruña España)". *Food Sci. Technol. Int.* 1, 91-95.

Vukelić M, Sostarić B, Belicza M (1992) "Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy". *Food Chem Toxicol.* Mar;30(3):193-200.

Wang, J., Chatrathi, M.P., Tian, B., and Polsky, R. (2000). "Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen". *Anal. Chem.* 72, 2514–2518.

Watanabe, M., Shimitzu, H. (2005). "Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku district, Japan". *J Food Protect.* 68 (3),610-612.

Xiao H., Madhyastha S., Marquardt R.R., Li S., Vodela J.K., Frohlich A.A., Kemppainen B.W. (1996). "Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and

several of its analogs: Structure-activity relationships". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 182-192.

Yamazaki, T., Kojima, K., and Sode, K. (2000). "Extendedrange glucose sensor employing engineered glucose dehydrogenases". *Anal. Chem.* 72, 4689–4693.

Zimmerli B., Dick R. (1996). "Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment". *Food Addit. Contam.* 13, 655-668.

Zingerle M., Silbernagl S., Gekle M. (1997). "Reabsortion of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 220-224.