



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente Corso di

Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

## Applicazioni dei LFA in ambito di controllo degli alimenti

Relatore

Prof. Simone Vincenzi

Laureando Damiano Cavaggioni

Matricola n.1201751

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# INDICE

## Riassunto – Abstract

1. Lateral Flow Assay	7
1.1. La storia dei LFA	7
1.2. Principio di funzionamento	9
1.2.1. Sviluppo di un LFA	10
1.2.2. LFA a base di anticorpi	10
1.2.3. LFA a base di acido nucleico	13
1.3. Principali campi applicativi	14
1.3.1. Vantaggi e svantaggi dei LFA	15
2. Identificazione allergeni	17
2.1. Allergia e allergeni	17
2.2. Kiwi	18
2.2.1. Metodo IMNPs-LFA	19
2.2.2. Sensibilità e specificità LFA	19
2.3. Arachidi	21
2.3.1. Purificazione di Ara h1 dalle arachidi e purificazione del campione	22
2.3.2. Sensibilità e specificità del saggio	22
2.4. Crostacei	24
2.4.1. Sensibilità e specificità dei LFA basato su QD	24
3. Identificazione patogeni	27
3.1. Patogeni e malattie di origine alimentare	27
3.2. Shiga toxin producing Eschericchia coli (STEC)	27
3.2.1. Selezione e recupero del filtro dalla membrana	28
3.2.2. Confronto dei limiti di rilevazione	29
3.3. <i>Clostridium botulinum</i>	30
3.3.1. Analisi dei LFA per il rilevamento di BoNT	31

4. Altre applicazioni	33
4.1. Micotossine	33
4.2. Ficotossine	34
4.3. Metalli pesanti	35
4.4. Inquinanti tossici	36
5. Conclusioni	37
6. Bibliografia	39



## **RIASSUNTO**

I saggi a flusso laterale (LFA) vengono ampiamente usati come mezzi diagnostici grazie ai tempi di analisi brevi, alle poche interferenze, ai costi bassi e alla facilità di utilizzo anche da parte di persone non specializzate. Questa tecnica si basa sull'interazione antigene-anticorpo o DNA sonda-antigene. La visualizzazione, dopo la corsa per capillarità del campione sulla striscia di nitrocellulosa, avviene in prossimità della TL e CL per mezzo di specifici marcatori. Esistono numerosi formati dei LFA utilizzati in ambito di controllo degli alimenti (ma non solo), sia per quanto riguarda il principio di funzionamento (es. sandwich o competitivo), sia per le molecole di bioriconoscimento (es. anticorpi o aptameri), sia per i marcatori molecolari coniugati (es. nanoparticelle d'oro, punti quantici, carbonio colloidale). Alcuni di questi formati, come ad esempio IMNP-LFA, LFA basato su punti quantici e LAMP-LFA sono stati utilizzati per il rilevamento di diversi analiti negli alimenti e dunque è stata discussa la loro sensibilità, specificità, l'interferenza che la matrice ha nella visualizzazione dei risultati, la modalità di estrazione e purificazione dell'analita e quindi confrontati con i metodi convenzionali come PCR o ELISA, mettendo in luce i vantaggi e i limiti che i LFA posseggono nei confronti di questi.

## **ABSTRACT**

Lateral Flow Assays (LFA) are widely used as diagnostic tools due to their short analysis time, limited amount of interference, contained costs and ease of use even by non-specialized staff. This technology works thanks to the antigen-antibody or the DNA probe-antigen interactions. The results, after the sample's run due to capillarity in the nitrocellulose strip, are observed on the TL and CL using specific labeled tags. There are many LFA types used in food control, which may differ for their operation principle (sandwich or competitive), for their biorecognition elements (antibodies or aptamers) or for their molecular conjugated labeled tags (ex. gold nanoparticles, quantic points, colloidal carbon). Some of these types, for example the IMNP-LFA, a LFA based on quantic points, and the LAMP-LFA, have been used to detect different analytes in food, therefore their sensibility, specificity, interference of the matrix on the results, extraction method and analyte's purification have been discussed and compared with more conventional technologies like PCR and ELISA, revealing LFA's relative benefits and limits.

## 1. Lateral Flow Assay

### 1.1 *La storia dei LFA*

La nascita del saggio a flusso laterale, basato su una striscia reattiva immunocromatografica rapida, è il risultato della convergenza di diverse ricerche che si possono far risalire già ai primi anni '50. Ciononostante, la necessità di metodi per una diagnosi rapida risale a tempi molto più antecedenti. Una delle prime testimonianze registrate, infatti, di test diagnostico per la gravidanza basato sulle urine può essere trovata in alcuni antichi documenti egizi. In questi viene descritta una credenza secondo cui una donna potenzialmente incinta avrebbe dovuto urinare su dei semi di grano ed orzo precedentemente piantati e se fosse cresciuto l'orzo la donna sarebbe stata in attesa di un figlio maschio, mentre se fosse cresciuto il grano sarebbe stata in attesa di una femmina; ancora, qualora nessuno dei due si fosse sviluppato la donna non era incinta (B. O'Farrell 2008). L'urina venne utilizzata come mezzo diagnostico rapido per una varietà di "disturbi" anche nel Medioevo, con l'avvento dei cosiddetti "pisci-profeti" che sostenevano di essere in grado di diagnosticare varie condizioni umane solo dal colore delle urine. Benché durante i secoli si cercò via via di migliorare l'attendibilità di tali test, è stato solo a partire dalla metà del XX secolo che i metodi diagnostici rapidi hanno acquisito un reale valore predittivo.

La teoria che sta alla base della tecnica del dosaggio a flusso laterale deriva dal test di agglutinazione al lattice, sviluppato da Plotz e Singer nel 1956 per l'identificazione del Fattore Reumatoide nel siero. Sempre intorno agli anni '50 sono stati sviluppati anche i test radioimmunologici (RIA), grazie a Yalow e Berson, e il decennio successivo i test immunoenzimatici (EIA). Questi ultimi hanno portato con sé numerosi vantaggi tra i quali: tempi di reazione più rapidi, sostituzione dei radioisotopi con enzimi, specificità elevata e durata di conservazione più lunga rispetto all'RIA. Per sviluppare però un test diagnostico a flusso laterale che desse risultati soddisfacenti erano necessarie altre tecnologie abilitanti, quali nello specifico: la produzione di membrane di nitrocellulosa, la produzione di anticorpi e di apparecchiature di elaborazione, nonché di una banca dati di conoscenze e di metodiche di sviluppo. Tali tecnologie sono state continuamente perfezionate, e sono state riunite insieme quando, nel 1984, Unipath, spin-off di Unilever a Colworth nel Regno Unito, lanciò per la prima volta sul mercato un test a flusso laterale per le donne in gravidanza basato sulle urine. Questo, dopo un breve periodo di titubanza, tipico dei prodotti pionieri nel campo diagnostico, diede un notevole impulso al perfezionamento di tali tecnologie, alle sue applicazioni e ampliò notevolmente i suoi settori di applicazione, tanto che, nel 2006, oltre 200 aziende facevano parte di tale mercato, creando un



giro d'affari per un valore di circa 2,1 miliardi di dollari (Brendan O'Farrell, 2008). I campi applicativi di tale test, infatti, spaziarono infine ben oltre quelli diagnostici, arrivando a toccare aree diverse come: veterinaria, cibo, salute, agricoltura, guerra biologica, test industriali e sicurezza ambientale come pure aree di "nuova generazione" quali la diagnostica molecolare e la teranostica (associazione di diagnosi e terapia).

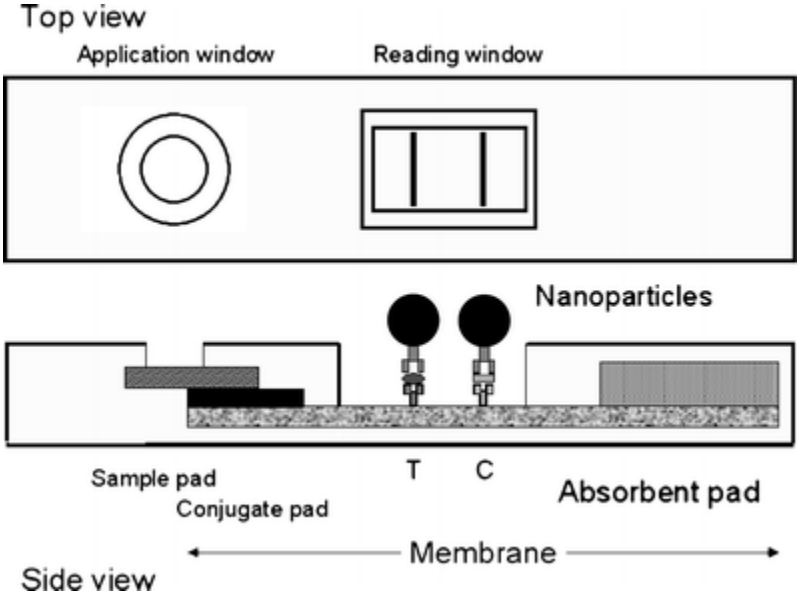


Fig. 1. Tipico lateral flow assay commerciale (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

## 1.2 Principi di funzionamento

Il saggio a flusso laterale è composto da un sistema cromatografico ossia una tecnica che permette la separazione dei componenti (analiti) da una miscela sulla base della differenza di movimento attraverso una matrice, e su una reazione immunochimica tra anticorpo-antigene o acido nucleico-analita bersaglio. Nello specifico questo saggio si basa sul principio secondo cui il campione è in grado di muoversi all'interno della membrana spinto dalla forza capillare. Generalmente un LFA standard consta di quattro componenti principali:

-sample pad (zona campione), cioè l'area sulla quale il campione viene fatto cadere per mezzo della finestra di applicazione; realizzata in cellulosa e/o fibra di vetro ha anche il compito essenziale di trasportare il campione alle altre componenti della striscia in maniera regolare, continua e omogenea;

-conjugate pad (zona coniugata), su cui sono depositati in forma essiccata i marcatori biomolecolari coniugati. Il materiale del tampone deve permettere il rilascio immediato del marcatore coniugato quando questo viene idratato dal campione. Il marcatore ha un'importanza estrema ai fini del corretto funzionamento del test. Qualsiasi variazione nella sua erogazione, nell'essiccamento, nel rilascio o una scarsa preparazione può influire negativamente sulla sensibilità del dosaggio;

-reaction membrane (o zona di lettura), comunemente di nitrocellulosa e altamente critica nella determinazione della sensibilità del LFA. Al suo interno sono tracciate le strisce per la visualizzazione, ossia la striscia test (T) e di controllo (C). Queste membrane offrono un'elevata praticità d'uso, prezzi bassi e alta affinità per proteine e altre biomolecole;

-absorbent pad (zona di deposito), zona terminale con il compito di trattenere l'eccesso di liquido sulla membrana e impedirne un suo reflusso.

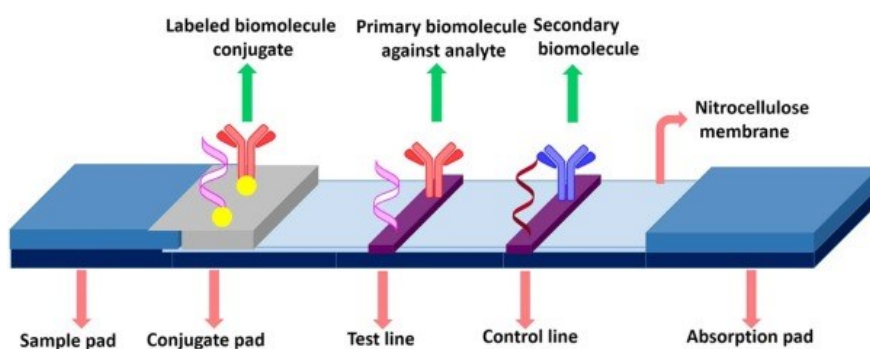


Fig.2. Struttura di base di un LFA (E. B. Bahadir et al. 2016)

### 1.2.1 *Sviluppo di un LFA*

Il materiale che gioca un ruolo essenziale nel saggio laterale è la membrana di nitrocellulosa (NC), estere nitrilico della cellulosa, deriva infatti dalla reazione tra le fibre di cellulosa e una soluzione di acido nitrico e, generalmente, acido solforico, dove i gruppi ossidrilici (-OH) presenti nella cellulosa vengono sostituiti da gruppi  $-\text{ONO}_2$ . I dipoli dell'estere nitrato determinano una forte interazione elettrostatica con i legami peptidici, per cui la nitrocellulosa ha in genere una forte affinità per le proteine. Nel caso specifico dell'LFA le proteine fissate sulla nitrocellulosa sono degli anticorpi. Dopo tale interazione sulla membrana del test, questa viene essiccata a temperatura ambiente in modo che gli anticorpi si fissino sulla membrana di nitrocellulosa. Viene però aggiunta prima dell'essiccamento una soluzione di saccarosio, utile per favorire la libera mobilità dell'anticorpo marcato, formando uno strato che si idrata facilmente e rapidamente quando viene inserito un campione acquoso. Quando il campione viene depositato sul sample pad si sposta per mezzo della forza capillare verso l'estremità opposta della striscia. La Zona campione è solitamente realizzata in acetato di cellulosa e/o fibra di vetro, in quanto la prima presenta una bassa affinità con le proteine, mentre la seconda non ne presenta affatto (Bangs Laboratories, 2013). Questa trasporta il campione al conjugate pad, dove sono presenti gli elementi di bioriconoscimento marcati con oro colloidale, nanotubi di carbonio o carbonio colloidale. Tale tampone è in grado di assorbire una grande quantità di campione ed è la zona dove gli elementi di bioriconoscimento marcati si legano al loro target e fluiscono poi verso la striscia cromatografica a velocità costante, incontrando le strisce di test e controllo, visibili dall'operatore per mezzo della finestra di lettura. Infine, il tampone assorbente ritiene il flusso di liquido e previene un suo reflusso sulla zona di lettura.

### 1.2.2 *LFA a base di anticorpi*

I principali elementi di bioriconoscimento utilizzati nelle regioni di test e controllo nei saggi a flusso laterale sono gli anticorpi, elementi in grado di realizzare immunocomplessi con il loro antigene. Un anticorpo che si lega in modo specifico ad un suo antigene specifico viene definito anticorpo primario, mentre un anticorpo in grado di legare un altro anticorpo viene definito anticorpo secondario. Generalmente nei test a flusso laterale gli anticorpi primari e secondari vengono utilizzati insieme. Gli anticorpi primari coniugati a nanoparticelle sono situati nella zona del conjugate pad, mentre nella linea Test e nella linea di Controllo sono ancorati rispettivamente gli anticorpi primari e secondari.

Esistono due principali LFA a base di anticorpi: in formato sandwich e in formato competitivo.

-Saggio di flusso laterale in formato sandwich: questo formato fa uso di tre diversi tipi di anticorpi. L'anticorpo 1, specifico per l'epitopo 1 dell'antigene di ricerca, viene coniugato a dei marcatori (nanoparticelle, come AuNP, e nanoparticelle di carbonio in grado di emettere radiazioni nello spettro del visibile quindi rilevabili, in concentrazioni adeguate, a occhio nudo) e quindi depositato sulla conjugate pad (quindi non immobilizzato). Tale anticorpo prende anche il nome di "anticorpo di reazione". Quando il campione viene aggiunto il bioriconoscitore viene reidratato, e non essendo immobilizzato, segue il flusso capillare e migra verso le linee di test e controllo. L'anticorpo 2, noto anche come "anticorpo di rilevamento" e specifico per il secondo sito antigenico (epitopo 2) dell'antigene di ricerca, viene invece immobilizzato sulla linea del test. L'anticorpo 3, anticorpo anti-immunoglobulina specie-specifico per l'anticorpo 1, è invece immobilizzato sulla linea di controllo. Quando la soluzione campione raggiunge la zona coniugata l'analita, se presente, formerà un complesso con l'anticorpo marcato. Il tutto continuerà ad avanzare per capillarità fino al tampone assorbente. Prima di terminare la corsa però, l'analita complessato all'anticorpo coniugato incontra l'anticorpo di rilevamento sulla linea del test formando così una sorta di sandwich (anticorpo 2 fissato alla linea – antigene – anticorpo 1 coniugato). L'anticorpo coniugato, invece, privo di analita eccedente la linea del test, si lega all'anticorpo 3. Ciò accade in quanto l'anticorpo di reazione è stato aggiunto nella carta assorbente a elevate concentrazioni, di modo che non tutti gli antigeni target formino un complesso con questi. Dunque, una certa quantità di anticorpo 1 rimarrà sempre libera di legarsi all'anticorpo 3. In definitiva, in presenza di analita nel campione sulla linea di test e controllo appariranno due linee colorate mentre in assenza di questo si colorerà soltanto la linea di controllo.

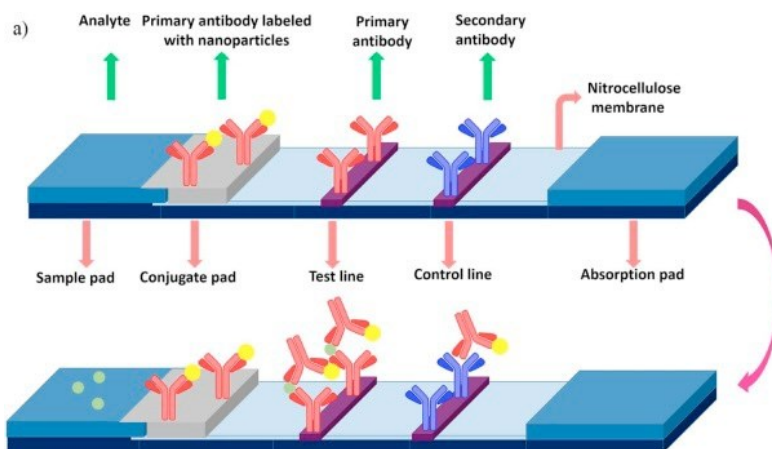


Fig 3. LFA formato sandwich (Bahadir et al. 2016).

-Saggio a flusso laterale in formato competitivo: per il test di piccoli analiti aventi peso molecolare relativamente basso (molecole ove non è possibile legare contemporaneamente due anticorpi) viene generalmente utilizzato il formato di tipo competitivo.

Ne esistono due possibili formati. Nel primo, la soluzione contenente l'analita target viene applicata nella finestra di applicazione; da qui passerà quindi per capillarità alla zona coniugata, ove sono presenti gli anticorpi coniugati al marcatore, formando quindi un complesso antigene-anticorpo marcato. La soluzione continuerà a fluire per capillarità nella zona di lettura; all'interno di questa è presente la linea test, contenente l'antigene pre-immobilizzato (lo stesso analita ricercato), anche lui in grado di legarsi specificatamente all'anticorpo coniugato. La linea di controllo contiene invece anticorpi secondari, aventi quindi la capacità di legare l'anticorpo marcato. L'assenza di colore sulla linea test (o una sua leggera colorazione) è un'indicazione della presenza dell'analita sul campione, in quanto tutti (o quasi) gli anticorpi coniugati saranno legati all'antigene sulla soluzione. Gli anticorpi coniugati, leganti l'antigene, vengono dunque bloccati dagli anticorpi secondari presenti sulla striscia di controllo, colorando quest'ultima. Per contro, il test risulta negativo all'analita se entrambe le linee si colorano, in quanto l'anticorpo coniugato marcato, non legando alcun antigene sul campione, sarà in grado di complessare con l'antigene immobilizzato sulla striscia colorandola e le eccedenze di anticorpo non legatisi sulla prima striscia vengono bloccati dagli anticorpi secondari.

Nel secondo formato quello che viene coniugato al marcatore non è l'anticorpo, bensì l'antigene che viene depositato sulla zona coniugata, mentre nella striscia test, al posto dell'antigene, ad essere immobilizzato è un anticorpo primario. Dopo l'applicazione del campione si verifica una competizione tra l'antigene e l'antigene coniugato per legarsi con l'anticorpo primario sulla linea del test. Per il campione negativo l'analita marcato si muoverà attraverso la striscia e si legherà sia l'anticorpo primario sulla linea del test (colorandola) che all'anticorpo presente sulla linea di controllo (colorando anche questa). Per il campione positivo, l'analita non marcato nel campione competerà con l'analita marcato presente sulla striscia e il primo, più veloce in quanto più leggero, si legherà alla striscia test (non colorandola) permettendo così all'antigene coniugato di legarsi solo alla striscia di controllo (colorandola).

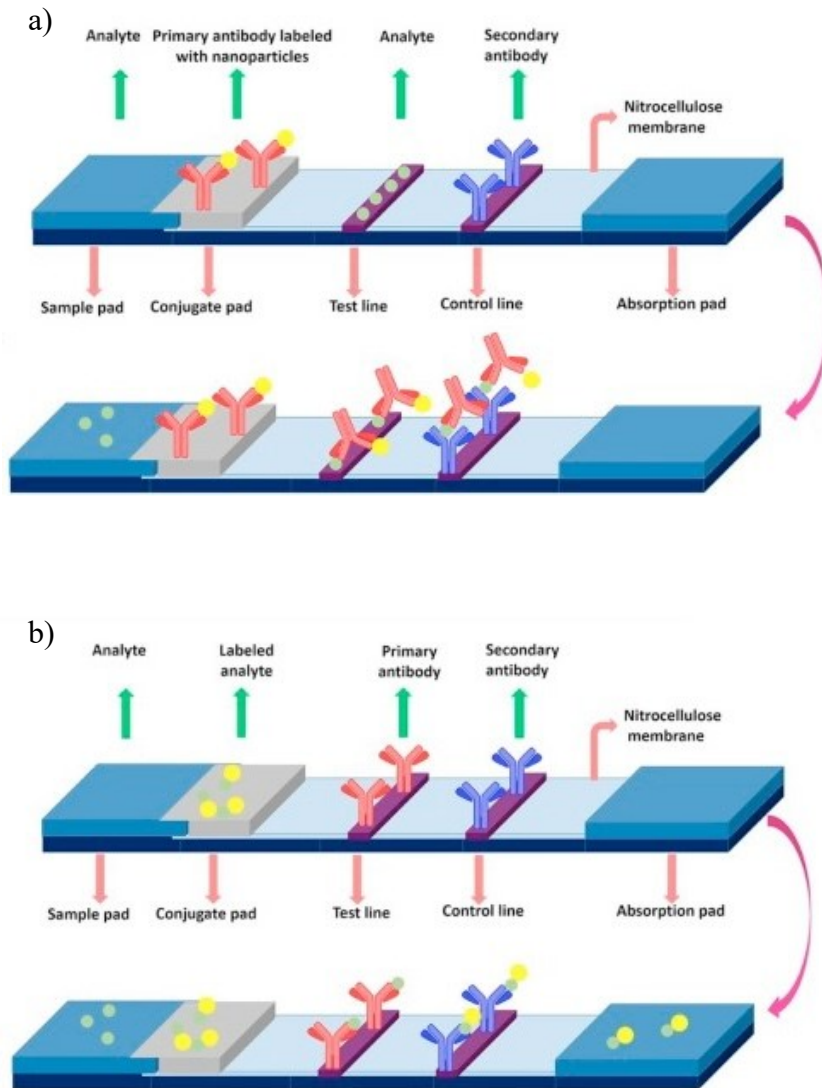


Fig. 4. LFA di tipo competitivo a) primo layout; b) secondo layout (E. B. Bahadir et al. 2016).

### 1.2.3 LFA a base di acido nucleico

Molto spesso nella preparazione di un saggio a flusso laterale come molecole di bioriconoscimento vengono utilizzati, al posto degli anticorpi, aptameri, ovvero acidi nucleici (RNA o DNA) costruiti artificialmente *in vitro* mediante un processo definito SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk et al., 1990). Questi possiedono costanti di associazione molto elevate e sono in grado di legarsi selettivamente con una varietà di analiti bersaglio, in particolare con tutte quelle molecole il cui peso molecolare ricade nell'intervallo 100-10000 Da. La loro preferenza rispetto agli anticorpi deriva da molte caratteristiche che includono un facile processo di produzione, l'amplificazione dopo la selezione, un facile processo di marcatura, stabilità elevata, modificazione strutturali semplici,

riproducibilità e versatilità delle applicazioni (S. D. Jayasena, 1999). Esistono anche dei saggi “misti” che includono sia anticorpi che aptameri, (NALFIA, Nucleic Acid Lateral Flow ImmunoAssay).

### 1.3. Principali campi applicativi

L'immunocromatografia, in particolar modo quella basata sull'utilizzo di nanoparticelle d'oro come marcatori, rappresenta uno dei test rapidi maggiormente diffusi nella ricerca di un analita anche in condizioni non di laboratorio. La sua presenza rientra in innumerevoli campi quali ad esempio nell'analisi alimentare, ambientale e clinica. Alcune delle sue applicazioni sono riassunte nella tabella seguente:

<b>Analita</b>	<b>Elemento di bioriconoscimento</b>	<b>Tipo LFA</b>	<b>Range di rilevabilità</b>	<b>Limite di rilevamento</b>	<b>Tempo di analisi</b>
Cellule staminali umane	Anticorpo	Sandwich	10 <sup>4</sup> -2x10 <sup>5</sup> cellule	104 cellule	20 min
Mg <sup>2+</sup>	Anticorpo	Sandwich	0.1-1000 ppm	0.1 ppm	15 min
Virus dell'influenza A	Anticorpo	Sandwich	10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup> copie	10 <sup>2</sup> copie	10 min
Acido okadaico	Anticorpo	Sandwich	10-50 ng/ml	10 ng/ml	10 min
<i>E. coli</i> O157-H7	Aptamero	Sandwich	0-10 <sup>8</sup> ufc/ml	10 ufc/ml	5 min
Indometacina	Anticorpo	Sandwich	0-100 ng/ml	0.1 ng/ml	10 min
Ocratossina A	Aptamero	Sandwich	0-0.25 ng/ml	0.18 ng/ml	10 min
Brevetossina	Anticorpo	Sandwich	10-4000 ng/ml	20 ng/ml	10 min
<i>Streptococcus suis</i>	Anticorpo	Sandwich	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> ufc/ml	10 <sup>4</sup> ufc/ml	15 min
Ig A	Anticorpo	Competitivo	1-270 ng/ml	5 ng/ml	10 min
Clenbuterolo	Anticorpo	Competitivo	0-10 ng/ml	0.08 ng/ml	6 min
Cronobatterio	DNA	Sandwich	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> ufc/ml	10 <sup>5</sup> ufc/ml	5 min
<i>Salmonella</i>	Aptamero	Sandwich	10-10 <sup>12</sup> ufc/ml	10 ufc/ml	5 min
DNA bersaglio	DNA	Sandwich	0-50 nmol	10 nmol	30 min
<i>Listeria monocytogenes</i>	RNA	Sandwich	0.5-500 pg/μl	0.5 pg/μl	5 min
Cr <sup>2+</sup>	Anticorpo	Competitivo	0-80 ng/ml	50 ng/ml	5 min
Nevirapidina	Anticorpo	Competitivo	3-10 μg/ml	1 μg/ml	10 min
Epatite B	Oligonucleotide	Sandwich	-	5 ng/ml	-
Neurotossina botulinica B	Anticorpo	Competitivo	5-100 ng/ml	5 ng/ml	10-15 min
Fosfatasi acida della prostata	Anticorpo	Sandwich	0-50 ng/ml	0.25 ng/ml	30 min
Proteina dei crostacei	Anticorpo	Sandwich	12.5-205 μg/L	25 μg/L	20 min
Gliadina	Anticorpo	Sandwich	10-100 μg/ml	10 μg/ml	-

Tab. 1. Applicazioni LFA basato su AuNP (E. B. Bahadir et al. 2016).

### 1.3.1 *Vantaggi e svantaggi dei LFA*

I LFA sono stati sviluppati in particolar modo per l'uso presso il punto di cura/bisogno: nel pronto soccorso degli ospedali, in azienda per alimenti o mangimi, dal medico curante per rilevare la presenza o l'assenza di malattie infettive. Possono essere utilizzati inoltre anche per test per le forze dell'ordine e per la scientifica forense, presentando quindi una versatilità che poche altre analisi riescono ad eguagliare. Le opportunità sono innumerevoli, legate principalmente alle applicazioni extra-laboratorio. Il successo del test di gravidanza ne è l'esempio più noto. Soprattutto nei paesi del terzo mondo questi test vengono utilizzati per scopi biomedici poiché non è necessario mantenere refrigerate le strisce preparate. Inoltre, l'interpretazione visiva dei risultati è piuttosto chiara ed intuitiva. Grazie alla loro durata di conservazione prolungata è possibile preparare lotti di grandi dimensioni, diminuendo così la variazione tra quest'ultimi. Gli LFA sono progettati per essere monouso e non si verificherà dunque alcuna contaminazione con il campione precedentemente testato. I test sono sviluppati mirando a risultati on/off. Quando è richiesto un risultato più semiquantitativo a volte è sufficiente una semplice variazione delle linee di reazione di modo che queste catturino l'analita a concentrazioni crescenti (formando una sorta di codice a barre). Un formato più esteso può far uso di un lettore di fluorescenza, richiedendo però in questo caso costi più elevati e tempi di analisi prolungati. I test sono generalmente venduti come kit, fornendo tutti gli elementi necessari per l'esecuzione del test, compreso di contagocce per prelevare una quantità fissa di campione. Tuttavia, quando un utente non addestrato esegue il test l'uso accurato del contagocce potrebbe essere un compito non così facile, con conseguenti errori nei test. Non è sempre possibile, inoltre, sviluppare un anticorpo con una buona selettività a causa della natura dell'analita in esame. La selezione dell'anticorpo avente le proprietà richieste dipende da diversi fattori che potrebbero non essere compatibili tra loro. Inoltre, il legame che questo attua con la carta di nitrocellulosa potrebbe diminuire l'affinità per l'antigene.

Un test rapido è vantaggioso quando non è necessario il pretrattamento del campione. Tuttavia, il campione deve essere allo stato liquido e il pretrattamento del campione è obbligatorio qualora vengano analizzati campioni solidi o particelle di polvere nell'atmosfera. Oltretutto quando l'analita ha una concentrazione molto bassa è obbligatoria una fase di concentrazione preliminare. Come vedremo in seguito, talvolta le componenti del campione (ad esempio amido) o i trattamenti che l'alimento subisce durante le fasi di produzione possono mascherare o mutare gli epitopi dell'antigene, non permettendo più all'anticorpo di complessare con questo, sviluppando pertanto falsi negativi. Di seguito vengono riassunti tutti i vantaggi che gli LFA presentano e tutte le insidie alle quali si va incontro nel momento del loro utilizzo.



## Vantaggi

- Facilità di preparazione del dispositivo
- A basso costo
- Stabilità in un'ampia gamma di condizioni ambientali e durata di conservazione molto lunga.
- Funzionamento semplice e facile da usare
- Richiesto piccolo volume del campione
- Il più delle volte consente l'applicazione del campione senza pretrattamento
- Versatilità di formati, molecole di bioriconoscimento, etichette e sistemi di rilevamento.
- Tempo di analisi relativamente breve
- Sensibilità e specificità comparabili o migliori rispetto ad altri metodi ben consolidati
- Elevato potenziale di commercializzazione
- Facile integrazione con l'elettronica
- Ampia gamma di applicazioni
- Consumo energetico nullo o minimo

## Insidie

- Prevalentemente qualitativo o semiquantitativo
- La maggior parte dei dispositivi può rilevare più di uno o due analiti contemporaneamente
- Talvolta bassa affinità biomolecolare verso gli analiti e tendenza alla reattività crociata
- A volte, è necessario il pretrattamento del campione che richiede tempo
- Una volta applicato il campione alla striscia, il movimento capillare non può essere ridotto o accelerato.
- Il tempo di analisi dipende anche dalla natura del campione stesso, cioè dalla viscosità e dalla tensione superficiale.
- Le componenti del campione possono influenzare sulle prestazioni

## 2. IDENTIFICAZIONE ALLERGENI

### 2.1. *Allergia e allergeni*

Le allergie consistono in una reazione anomala da parte del nostro sistema immunitario in riferimento a sostanze innocue, quali proteine, con la sintesi di immunoglobuline E (IgE) che, interagendo con l'allergene, innescano la cosiddetta reazione allergica, con la produzione di mediatori e quindi l'insorgenza dei sintomi. Non è ancora stata rilevata una caratteristica struttura comune che possa spiegare il perché alcune proteine diventano allergeni. Difatti, le circa 50 strutture allergeniche inserite nel Protein Data Bank, presentano una variabilità strutturale piuttosto ampia. Queste proteine, strutturalmente eterogenee, possono essere dunque di vario tipo, solo  $\alpha$ -eliche (Fel d 1, tropomiosine, acaro della polvere del gruppo 5), solo a  $\beta$ -foglietto (allergeni degli acari della polvere di gruppo 2) oppure, nella maggior parte dei casi, una combinazione di entrambe le strutture secondarie. Una vasta gamma di funzioni biologiche è stata attribuita agli allergeni, inclusi enzimi proteolitici e non proteolitici, inibitori enzimatici, proteine strutturali, di stoccaggio, di legame e proteine regolatrici. La maggior parte degli allergeni di origine animale, vegetale e da polline fanno parte di superfamiglie proteiche. Quelle animali sono classificate in tre famiglie principali: tropomiosine, proteine EF-hand (elica-ansa-elica) e caseine; quelle vegetali in quattro: prolamine, cupine, profiline e superfamiglia Bet v 1; quelle derivanti dal polline in tre: espansine, profiline e proteine leganti il calcio (A. Pomés, 2008). Nonostante ciò, sono stati rilevati alcuni aspetti proteici comuni che possono essere rilevanti per l'allergenicità, quali la solubilità, la stabilità, la dimensione e la compattezza generale dei ripiegamenti nella struttura proteica. Le dimensioni e la solubilità però sarebbero fattori rilevanti più per gli allergeni presenti nell'aria che negli alimenti, per i quali una proteolisi limitata potrebbe aumentarne il trasporto nella mucosa e quindi l'allergenicità. In riferimento a ciò, infatti, le modifiche post-traduzionali possono influenzare l'allergenicità in diversi modi, inducendo la formazione di nuovi epitopi e influenzandone la solubilità, la stabilità e la suscettibilità alle proteasi. Inoltre, si è notato che pure l'assorbimento e l'elaborazione delle cellule presentanti l'antigene influenzerebbero il potere allergenico delle stesse. È chiaro dunque, da questa breve panoramica, che, anche se raggruppati in superfamiglie, sono note poche, se non nessuna, caratteristica strutturale comune per gli allergeni in generale.

Le allergie alimentari possono causare sintomi respiratori (starnuti, asma, tosse, respiro affannoso-sibilante), cutanei (gonfiore di labbra, bocca, lingua, orticaria, eczemi) o gastrointestinali (crampi addominali, diarrea, nausea, vomito gonfiore addominale), arrivando

fino all'anafilassi e alla morte, riconducibili al momento dell'ingestione di un alimento, in rapporto al riconoscimento di uno o più allergeni da parte delle IgE. Secondo il CDC (Center for Disease Control), le allergie alimentari sono una preoccupazione crescente per la sicurezza alimentare e la salute pubblica in quanto colpiscono circa l'8% di bambini statunitensi, di cui più del 40% viene ospedalizzato (CDC, 2022). Le proteine allergeniche possono essere modificate dai processi di preparazione, come ad esempio dalla cottura, o conservazione degli alimenti, inducendo variazioni dell'allergenicità. Esistono certi alimenti più frequentemente responsabili dell'insorgenza di allergie quali latte, uova, arachidi, cereali, pesci, frutta e verdura. La prevalenza delle allergie alimentari varia in funzione dell'età e delle abitudini alimentari.

Di seguito verranno trattati alcuni alimenti ove la presenza dell'antigene responsabile dell'insorgenza dell'allergia può essere rilevato per mezzo di diversi LFA, utili dunque in ambito analitico per verificare la presenza di questi in una matrice alimentare.

## 2.2. *Kiwi*

Il kiwi, noto anche con il suo originario nome botanico *Actinidia chinensis*, è un frutto derivante dalla Cina, particolarmente prospero, almeno in origine, vicino alle sponde del fiume Yangtze, da dove è stato esportato in Nuova Zelanda nei primi anni del '900 (Aaron J. Fine, 1981). Le specie più comuni, quali il kiwi verde (*Actinidia deliciosa*) e il kiwi dorato (*Actinidia chinensis*) sono particolarmente diffuse oggi, a livello globale, per le loro proprietà benefiche sul sistema digestivo, metabolico e immunitario (Dolly, 2021). Gli allergeni di queste due specie presentano sequenze di amminoacidi simili, portando la cosiddetta reattività crociata (cross-reactivity) delle IgE; dunque, le persone allergiche al kiwi verde possono essere allergiche anche al kiwi dorato e viceversa. I kiwi possono indurre sintomi allergenici quali dermatite atopica, OAS (sindrome da allergia orale), edema laringeo o persino reazioni mortali in soggetti altamente suscettibili. Nell'ultimo decennio l'allergia al kiwi è diventata sempre più comune. In Portogallo è il frutto più allergenico; in Francia è il terzo alimento più allergenico per bambini, dopo latte e uova; in Spagna circa l'1,8% della popolazione ne è sensibile; in Taiwan e Giappone la percentuale della popolazione allergica al kiwi si stima essere rispettivamente del 2,7% e del 2,3% (T. Wen-Che et al., 2022). Sono stati registrati nel database dell'WHO/IUIS (International Union of Immunological Societies) ben tredici allergeni del kiwi verde, denominati da Act d1 a Act d13. L'Act d1, una cisteina proteasi di 30 kDa, chiamata anche actinidina, è considerato il principale allergene del kiwi in quanto in grado di reagire con quasi tutti i sieri di pazienti allergici al kiwi. Inoltre, costituisce quasi il 50% delle proteine solubili del kiwi verde, provocando sintomi gravi

nelle persone allergiche. Questa proteina, dunque, rappresenta un obiettivo ottimale nello sviluppo nei saggi rapidi per l'individuazione degli allergeni del kiwi.

### 2.2.1. Metodo IMNPs-LFA

In un lavoro recente per l'applicazione sull'allergene del kiwi (T. Wen-Che et al., 2022) il Lateral Flow Assay è stato associato all'utilizzo di nanoparticelle immunomagnetiche (IMNP). Come ben noto, la viscosità, il pH, l'eventuale presenza di sali o detergenti nel campione possono influire notevolmente sulle prestazioni di un LFA. Le IMNP sono anticorpi legati a molecole superparamagnetiche. Vengono ampiamente utilizzate nello sviluppo di saggi per l'efficacia, la convenienza e l'accuratezza che apportano nei test ai quali vengono applicati. Sono usate per isolare e concentrare le cellule bersaglio, favorendo la sensibilità del segnale.

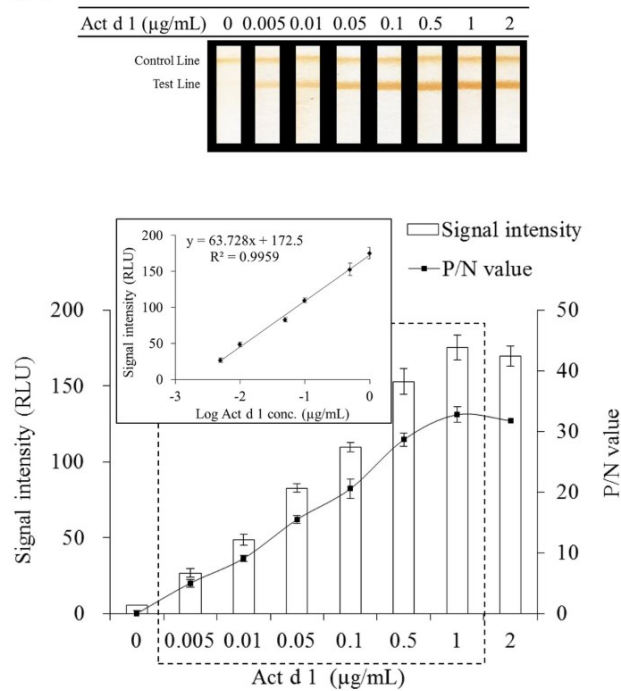
L'IMNPs-LFA consta di due fasi: la prima è una separazione immunomagnetica (IMS) e la seconda è il vero e proprio test a flusso laterale. Le IMNP vengono aggiunte al campione dove, grazie alla loro specificità si legano all'allergene Act d1, e poi vengono recuperate mediante applicazione di un campo magnetico. Dopo che si è conclusa la fase di purificazione con IMNP e dunque l'allontanamento delle impurezze e la relativa concentrazione dell'analita, una goccia del campione così concentrato viene depositata sul LFA dove inizierà a scorrere all'interno della striscia per capillarità. I risultati positivi si osservano quando i complessi "IMNP-Act d1" e IMNP vengono catturati rispettivamente dagli anticorpi dall'anti-Act d1 sulla linea del test e dall'anticorpo anti-IMNP sulla linea di controllo, per sviluppare due linee marroni. Il risultato è negativo se sulla linea di controllo si è formata una sola linea marrone. È possibile infine calcolare l'intensità della linea del test, per ricavare la concentrazione dell'analita, utilizzando un lettore cromogenico.

### 2.2.2. Sensibilità e specificità LFA

La sensibilità del test sviluppato con questa tecnologia è stata valutata utilizzando varie concentrazioni di Act d1 (da 0 a 2 µg/ml) precedentemente purificato in modo da poter costruire una curva dose-risposta. Si può notare infatti, nella Fig. 5a, che l'intensità del segnale aumenta proporzionalmente all'aumentare della concentrazione dell'analita nell'intervallo che va da 0,005 a 1 µg/ml di Act d1. Dalle immagini delle strisce, il limite visivo di rilevamento (vLOD) è di 5 ng/ml.

La specificità del test è stata, invece, valutata analizzando 12 estratti di frutta o verdura quali kiwi, banana, carota, mango, sedano, arancia, pera, guava, pesca, pomodoro, ciliegia e frutto del drago. Diversi studi hanno dimostrato che mango, banana, pomodoro, ciliegie, pesca e carota hanno una potenziale reazione crociata con il kiwi. Nella Fig. 5b è ben evidente che non si è verificata alcuna reazione positiva nell'analisi di questi estratti ad eccezione del kiwi, indicando che l'IMNP-LFA sviluppato presenta buona specificità nel rilevamento di Act d1.

(A)



(B)

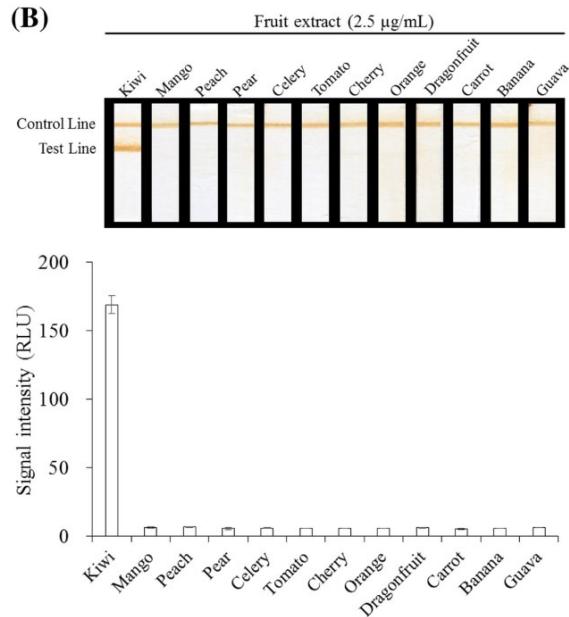


Fig. 5. A) sensibilità, sviluppata dopo purificazione di Act d1; B) specificità dei IMPN-LFA (T. Wen-Che et al., 2022).

Il metodo è stato infine testato su ventotto campioni di alimenti molto diversi tra loro, inclusi biscotti, gelatine, succhi misti e alimenti per l'infanzia. Su di questi, l'Act d1 è stato rilevato dal saggio in 12 dei 14 prodotti alimentari che contenevano kiwi come ingrediente, con una sensibilità dunque dell'85,7% (12/14). La non rilevabilità dell'analita nei due campioni risultati negativi potrebbe essere stata causata dalle procedure di trasformazione dell'alimento, che potrebbero aver dunque alterato o scomposto gli epitopi dell'Act d1. I restanti 14 prodotti che non contenevano il kiwi come ingrediente sono risultati negativi a tale test, indicandone una specificità del 100% (14/14) nell'analisi dei prodotti alimentari.

### 2.3 *Arachidi*

L'arachide è uno degli alimenti allergenici più importanti, arrivando addirittura ad indurre shock anafilattico, causando dai 100 ai 200 morti all'anno (C. W. Lee, 2003). I sintomi dell'allergia alle arachidi vanno da lievi (prurito, gonfiore delle labbra, vomito, dolori addominali e diarrea) a gravi (dispnea, ipotensione, shock e persino morte) e possono addirittura comparire non soltanto in seguito ad ingestione ma anche per contatto o inalazione delle sue polveri.

Ben diciassette allergeni di arachidi sono stati identificati dal sottocomitato per la nomenclatura degli allergeni dell'WHO/IUIS (World Health Organization/ International Union of Immunological Societies). L'Ara h1, una glicoproteina, è stata riconosciuta come uno dei principali allergeni dell'arachide. Questa costituisce dal 12 al 16% delle proteine totali del legume e si presenta generalmente sotto forma di trimero. All'interno di Ara h1 sono stati identificati 23 epitopi di cui la maggior parte si trova nell'area di connessione del trimero. La struttura sovrapposta di Ara h1 protegge gli epitopi dall'idrolisi delle proteasi, con conseguente elevata probabilità di indurre reazioni allergiche anche dopo la digestione. Di particolare interesse in questo caso è l'elevata relazione che vi è tra il trattamento che l'arachide subisce e la risposta delle IgE all'antigene. Le arachidi fritte o bollite presentano una quantità inferiore di Ara h1 rispetto alle arachidi tostate che anzi hanno aumentato la capacità di Ara h1 di legarsi alle IgE, forse come risultato della reazione di Maillard (S. J. Maleki et al., 2000). Ara h1, pertanto, rappresenta un bersaglio interessante quanto adatto per rilevare gli allergeni delle arachidi negli alimenti trasformati. Per il rilevamento specifico e sensibile di Ara h1 negli alimenti è stato sviluppato ancora una volta un IMNP-LFA (Yin et al., 2000), utilizzato poi per analizzare 42 alimenti trasformati per verificare l'affidabilità nel rilevamento dei residui di Ara h1.

### 2.3.1. Purificazione di Ara h1 dalle arachidi e preparazione del campione

Con questo test sono stati analizzati 11 campioni di frutta secca (arachidi, anacardi, semi di pino, sesamo, mandorle, semi di girasole, semi di soia, semi di lino, semi di carota, noci e macadamia) e vari prodotti alimentari commerciali, che sono stati tritati separatamente in un mulino fino ad ottenere una farina fine e poi conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Un grammo di polvere di ciascun campione è stato miscelato con 10 ml del tampone di estrazione con un rapporto peso/volume di 1:10 ed estratto a temperatura ambiente per 2,5 ore. Dopo centrifugazione per 10 minuti è stato raccolto e successivamente analizzato mediante trattamento di concentrazione-purificazione con IMNP e successivo test LFA.

### 2.3.2. Sensibilità e specificità del saggio

Il LOD (Limit Of Detection) è stato determinato alla concentrazione di 0,01 µg/ml di Ara h1. Inoltre, i segnali sono stati misurati per tracciare una curva dose-risposte dell'intensità del segnale rispetto alla concentrazione di Ara h1. L'intervallo lineare della curva dose-risposta è stato identificato nell'intervallo compreso tra 0,01 e 5 µg/ml di Ara h1 con un valore  $R^2$  di 0,9914. I risultati ottenuti con l'LFA basato su IMNP sono stati confrontati con diversi test immunologici per il rilevamento di Ara h1, come un ELISA di tipo sandwich con limite di rilevamento di 0,34 ng/ml, un test immunosensoriale elettrochimico con sensibilità di 3,8 ng/ml e con un electrochemical magnetoimmunosensing assay con limite 6,3 ng/ml. Sebbene l'analisi con LFA sia meno sensibile di quest'ultimi test, la sua rapidità e la sua facilità di utilizzo la rendono comunque una valida alternativa per l'analisi *in loco*. La determinazione della specificità è stata valutata in seguito ad analisi sulla frutta secca precedentemente descritta. Come mostrato in Fig 6B, nessun campione ha generato una linea osservabile sulla TL ad eccezione dell'arachide.

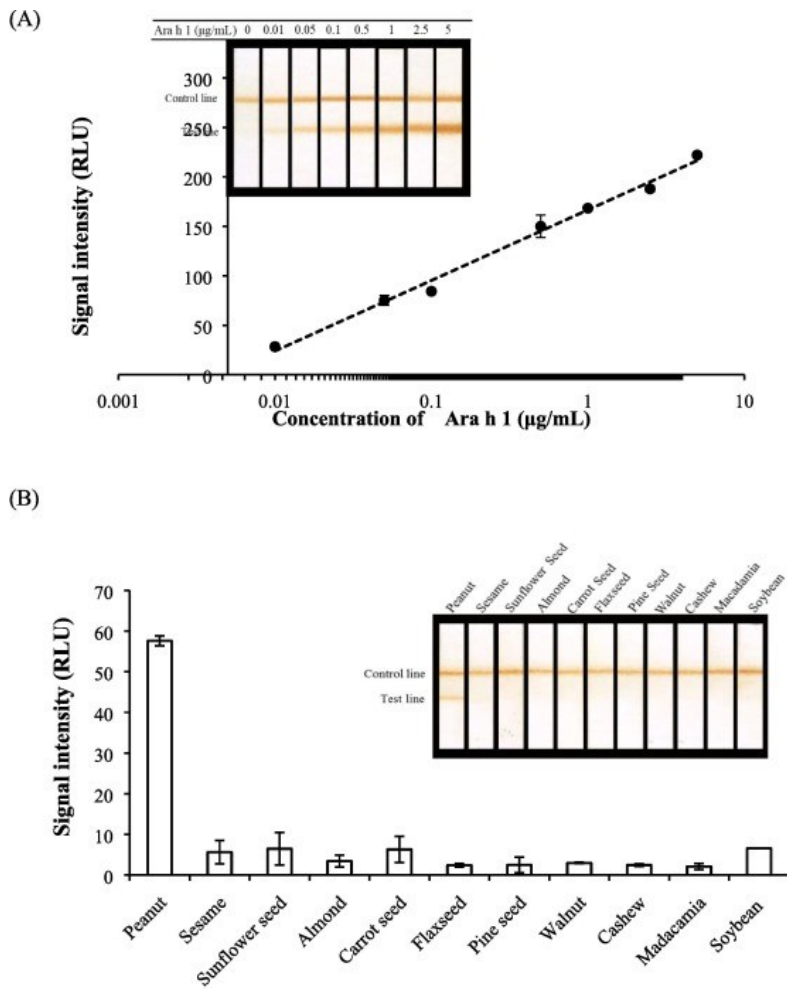


Fig. 6 A) sensibilità; B) specificità dell'IMNP-LFA per Ara h1 (H. Y. Yin et al., 2000).

Al fine di verificare la fattibilità dell'applicazione dei IMNP-LFA nell'analisi degli alimenti trasformati, sono stati testati 42 prodotti alimentari tra cui: 10 di cioccolato, 15 biscotti e altri 17 prodotti vari (Yin et al., 2000). I risultati dell'IMNP-LFA sono stati verificati utilizzando Western blot e un kit ELISA approvato AOAC. I tre metodi analitici hanno generato risultati negativi in tutti i 22 prodotti che non contenevano arachidi. Per quanto riguarda la positività i test LFA e Western blot hanno sviluppato 19 risultati positivi su 20 prodotti che contenevano arachidi non rilevandole nel latte di riso alle arachidi, a differenza dell'ELISA il quale ha prodotto risultati positivi con tutti e venti gli alimenti contenenti arachidi. Durante le fasi produttive del suddetto succedaneo del latte, in particolar modo durante la gelatinizzazione della miscela di riso, gli epitopi di Ara h1 vengono probabilmente ostruiti o coperti dalle molecole di amido, sviluppando perciò un falso negativo nei test LFA e Western blot. La positività invece dimostrata col test ELISA anche a tale prodotto potrebbe essere il risultato di diversi fattori: gli anticorpi utilizzati nel test ELISA potrebbero aver riconosciuto diversi epitopi di Ara h1 o mostrare una maggiore immunoreattività verso le arachidi trasformate, oppure la fase di estrazione per questo kit potrebbe



aver isolato Ara h1 in maniera più efficace. La sensibilità e la specificità, dunque, del IMNP-LFA sviluppato per tali analisi sono rispettivamente del 95 e 100%.

#### 2.4. *Crostacei*

I crostacei rappresentano uno degli otto principali allergeni secondo quanto dichiarato dalla FAO e dal WHO (Fernandes et al., 2015), con una prevalenza di 0,5% nei bambini e 2,5% negli adulti (La Grutta et al., 2011). Gli studi hanno dimostrato che il principale allergene dei crostacei è la tropomiosina (TM), una proteina con peso molecolare di circa 34-39 kDa. La TM è composta da due catene polipeptidiche e nei crostacei, insieme alla miosina e all'actina, contribuisce alla contrazione muscolare, al trasporto di mRNA e al supporto meccanico della cellula. La somiglianza strutturale di tale proteina è elevata tra le diverse specie di crostacei e pertanto non sono rari i casi di cross-reattività. La reazione allergica ai crostacei, che comprende in realtà anche i molluschi, può produrre sintomi clinici che vanno da lieve orticaria, gastroenteriti e, nei casi più gravi, ad anafilassi o morte. Per un rilevamento semplice, sensibile e specifico dell'allergene principale dei crostacei è stato sviluppato un LFIA di tipo competitivo a fluorescenza basato su punti quantici (QD) come coniugato degli anticorpi (Wang et al., 2019). Il punto quantico è un tipo di nanoparticella fluorescente semiconduttore avente eccellenti prestazioni ottiche ed elevata stabilità. Rispetto ad altri materiali fluorescenti può inoltre essere eccitato facilmente con un'ampia gamma di lunghezze d'onda UV.

##### 2.4.1. *Sensibilità e specificità dei LFIA basato su QD*

La sensibilità di tale metodo è stata valutata utilizzando una serie di campioni di TM a concentrazione crescente, che vanno specificatamente da 0,0 a 100 µg/ml, dunque prelevati 100 µl di campione ed inseriti nella finestra di applicazione. Dopo 30 minuti, i segnali di fluorescenza sono stati osservati sotto eccitazione ultravioletta a 365 nm e misurati mediante un lettore di fluorescenza, i cui valori sono stati calcolati facendo riferimento alla seguente formula:  $\%P = (F/F_0) \times 100$ , dove %P è la percentuale dell'intensità del segnale,  $F_0$  l'intensità media della fluorescenza sulla linea T del bianco e F l'intensità media della fluorescenza sulla linea T del campione. I risultati, riportati in figura 7B, dimostrano che all'aumentare della concentrazione di TM nel campione la luminosità della TL diventa più chiara e la sua fluorescenza diminuisce. L'intensità della linea T diventa debole a TM di 0,05 µg/ml e scompare visivamente a 0,5 µg/ml, pertanto il limite qualitativo visivo del sistema LFIA viene fissato a 0,5 µg/ml. Per quanto

riguarda l'analisi strumentale, come si evince anche dalla fig. 7A, il valore di %P continua a diminuire con l'aumentare della concentrazione di TM. Il valore di cut-off per il rilevatore del lettore è stato definito come la concentrazione di TM quando la %P scende sotto l'80%. Pertanto l'LOD da parte del lettore di fluorescenza è stato determinato a 0,05 µg/ml (%P = 78,72%). Se paragonato ad un kit ELISA di tipo competitivo entrambe le curve mostrano una tendenza al ribasso all'aumentare della concentrazione di TM.

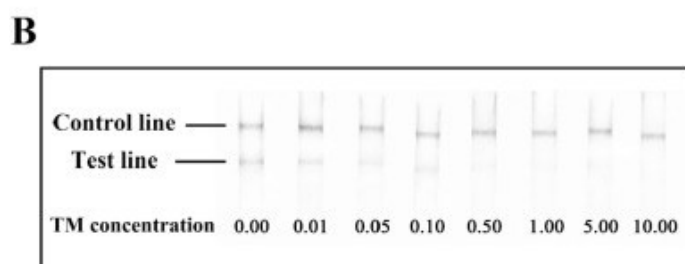
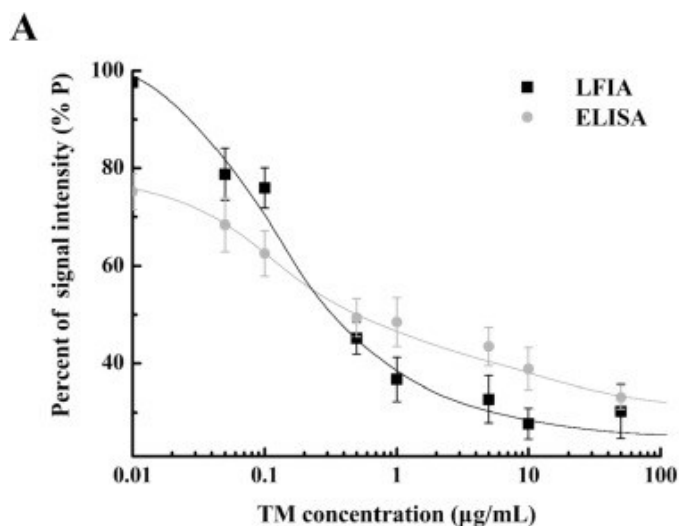


Fig. 7 A) percentuale dell'intensità del segnale rilevata dall'LFIA sviluppato e dall'ELISA competitivo. B) Risultati visivi dell'LFIA sotto luce ultravioletta (Wang et al., 2019).

Per valutare la sensibilità e l'accuratezza di tale metodo sono stati testati campioni di alimenti mediante LFIA e un kit ELISA convalidato per il confronto. Come mostrato nella tabella 2, gnocchi di gambero e gamberetti croccanti sono risultati positivi sia all'LFIA che all'ELISA con concentrazione di 2,17-4,8 mg/kg. Il campione di cracker di gamberi di due diversi produttori è risultato debolmente positivo (ossa con un %P compreso fra 50% e 80%). Tuttavia, la salsa di gamberi ha mostrato un risultato negativo sia in LFIA che in ELISA, dovuto probabilmente alle alterazioni strutturali degli epitopi di TM causati dal processo di fermentazione durante la produzione. Per i prodotti non contenenti crostacei entrambi i test sono risultati negativi.

<b>Campioni</b>	<b>ELISA (n = 3) (<math>\mu\text{g/mL}</math>, <math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>LFIA (n = 3)</b>
Gnocchi di gamberi	4,87 $\pm$ 0,01	+
Gamberetti croccanti	2,17 $\pm$ 0,01	+
Cracker di gamberi A	0,48 $\pm$ 0,01	$\pm$
Cracker di gamberi B	0,16 $\pm$ 0,01	-
Noci al gusto di granchio	0,32 $\pm$ 0,01	$\pm$
Biscotti al gusto di gamberi	0,11 $\pm$ 0,01	-
Fagioli al gusto di granchio	0,09 $\pm$ 0,01	-
Prosciutto di capesante	0,05 $\pm$ 0,01	-
Salsa di gamberi	ND	-
Polpette di pesce	ND	-
Zuppa di uova di spinaci liofilizzati	ND	-
Zuppa di uova di alghe liofilizzate	ND	-

<sup>a</sup> ND: non rilevabile.

<sup>b</sup> (-) “Negativo”; ( $\pm$ ) “debolmente positivo”; (+) risultato “positivo”. Il giudizio è stato formulato secondo il valore di %P.

Tabella 2. Analisi e confronto del contenuto TM di campioni alimentari mediante LFIA ed ELISA (Wang et al., 2019).

### 3. IDENTIFICAZIONE PATOGENI

#### 3.1. *Patogeni e malattie di origine alimentare*

La sicurezza alimentare è una priorità importante per la salute pubblica. Le malattie di origine alimentari sono un grave problema globale e impongono oneri significativi non solo all'economia ma anche ai singoli individui infetti. Sebbene la maggior parte dei casi siano di lieve entità, non sono poi così rari episodi in cui tali malattie evolvono in problemi gravi anche a lungo termine o addirittura mortali. Secondo il CDC (Center for Disease Control and Prevention) ogni anno circa un americano su sei (o 48 milioni di statunitensi) viene colpito da malattie di origine alimentare, 128000 vengono ricoverate in ospedale e 3000 muoiono (NCEZID, 2019). Il WHO (World Health Organisation) stima invece che ogni anno le malattie trasmesse con gli alimenti colpiscano 600 milioni di persone al mondo e 420000 muoiano di conseguenza. I bambini compresi tra i 0 e i 5 anni di età rappresentano quasi il 30% dei decessi, nonostante siano soltanto il 9% della popolazione mondiale, con un totale di circa 125000 bambini deceduti in seguito a malattie alimentari (WHO, 2015).

I batteri sono la causa più comune di malattie di origine alimentare ed esistono in una varietà di forme, tipi e caratteristiche estremamente elevata. Alcuni batteri patogeni, ad esempio, sono in grado di formare spore, resistendo dunque ai trattamenti termici (es. *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* e *Bacillus cereus*); altri ancora invece sono produttori di tossine estremamente termoresistenti (es. *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*). La maggior parte dei patogeni sono mesofili, con un range di temperatura ottimale tra circa 25 e 45 °C, tuttavia non mancano i casi di patogeni alimentari psicrotrofi (come *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*) in grado di crescere a temperature di refrigerazione.

#### 3.2. *Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC)*

Gli *Escherichia coli* fanno parte della normale flora del tratto gastrointestinale dei mammiferi e si presentano nella maggior parte dei casi sotto forma di non patogeni. Tuttavia, alcuni ceppi, come Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) sono in grado di recare danno agli esseri umani, evolvendo in patologie anche piuttosto gravi. La STEC più comunemente riscontrata è *E. coli* O157:H7. Il CDC stima che ogni anno negli Stati Uniti si verificano 265000 infezioni da STEC, di cui 3600 ricoveri e 300 decessi all'anno. È interessante sottolineare che *E. coli* O157:H7 causa più del 35% di queste infezioni (Heiman et al., 2012). Il letame dei ruminanti è una delle fonti principali di *E. coli* O157:H7, contaminando l'ambiente e le fonti di cibo, inclusi carne, latte, verdura e frutta. *E. coli* O157:H7 è l'agente eziologico della diarrea e della colite emorragica, che

può evolvere nella sindrome emolitica-uremica (SEU). Queste complicazioni rappresentano un grave problema di salute pubblica globale che richiede numerosi interventi e misure di controllo della sicurezza per combattere epidemie ricorrenti in tutto il mondo. Oggigiorno per il rilevamento di *E. coli* O157:H7 negli alimenti si fa affidamento sulla tecnica della PCR in quanto metodo più sensibile e specifico nella diagnosi di routine per STEC. Tuttavia, le reazioni basate sulla PCR richiedono l'uso di protocolli complicati e dispositivi costosi nel laboratorio dedicato per l'analisi. È stato sviluppato un test immunologico di amplificazione isomerica a flusso laterale basata su filtro (LAMP-LFA) per il rilevamento di *E. coli* O157:H7 nelle matrici alimentari (Kim et al., 2019). L'amplificazione isoterma mediata da loop (LAMP) è un metodo per l'amplificazione dell'acido nucleico noto per essere veloce, accurato e facile da eseguire. Questa tecnica non dissocia il DNA (come accade nella PCR) quanto piuttosto lo amplifica in 60 minuti in condizioni isoterme di 60-65°C utilizzando la proprietà della *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA polimerasi di spostare il filamento per poterlo amplificare. La LAMP è 10-100 volte più sensibile della PCR a causa del basso effetto che gli inibitori presenti sugli alimenti hanno sulla *Bst* DNA polimerasi rispetto agli enzimi della PCR. In genere per un'analisi microbiologica viene utilizzata un'unità analitica di 25 g che deve essere pre-arricchita con un rapporto campione/brodo di 1:9. Pertanto, se i microrganismi devono essere rilevati da un campione di cibo di 25 g, lo stesso verrebbe diluito in 225 ml di brodo, con conseguente perdita di sensibilità di 10 volte. Questa operazione richiede più di 10 ore, tuttavia sono stati sviluppati metodi alternativi per l'arricchimento della coltura microbica, tra cui quelli basati su filtri. I metodi basati su filtri difatti hanno il vantaggio non solo di concentrare i batteri ma anche di rimuovere gli inibitori della reazione di amplificazione del DNA provenienti dagli alimenti.

### 3.2.1. Selezione e recupero del filtrato dalla membrana

Per selezionare il filtro più adatto per la determinazione rapida dei patogeni di origine alimentare, 1-2 CFU/ml di *E. coli* O157:H7 sono stati diluiti in 225 ml di soluzione fisiologica e filtrati attraverso cinque filtri differenti e poi incubati in piastra; dopo 24 ore sono state enumerate le caratteristiche colonie nere formatesi e calcolato il rapporto di recupero mediante la formula:

$$\text{Tasso di recupero} = \frac{\text{Numero di batteri recuperati dal filtro}}{\text{Inoculo iniziale dei batteri (CFU/ml)}} \times 100$$

Il filtro al nitrato di cellulosa ha mostrato le migliori prestazioni, con un recupero del 96% e il processo di filtrazione ha richiesto 100 s per essere completato. Pure il filtro di acetato di cellulosa ha mostrato un recupero elevato, del 95%, ma ha fallito in un test poiché il filtro si è intasato. Per rilevare *E. coli* O157:H7 mediante LAMP-LFA, il DNA deve essere isolato da *E. coli*. La

preparazione del DNA nel filtro è molto difficile, pertanto è più conveniente separare i batteri dal filtro e quindi isolarne il DNA. Sono stati testati tre metodi per la separazione del microrganismo dal filtro quali vortex, sonicazione e stomaching, con percentuali di recupero rispettivamente del 41, 85 e 96%.

### 3.2.2. Confronto dei limiti di rilevazione

Come matrice alimentare per sostenere tale test è stata utilizzata carne bovina inoculata con *E. coli* O157:H7. Nell'analisi PCR, la sensibilità della carne bovina non filtrata è di  $10^3$  CFU/g mentre quella filtrata è 10 volte superiore. Anche con LAMP-LFA la sensibilità della carne bovina non filtrata è di  $10^3$  UFC/g mentre per quella filtrata  $10^1$  UFC/g. La LAMP-LFA mostra pertanto una sensibilità 10 volte superiore rispetto alla PCR.

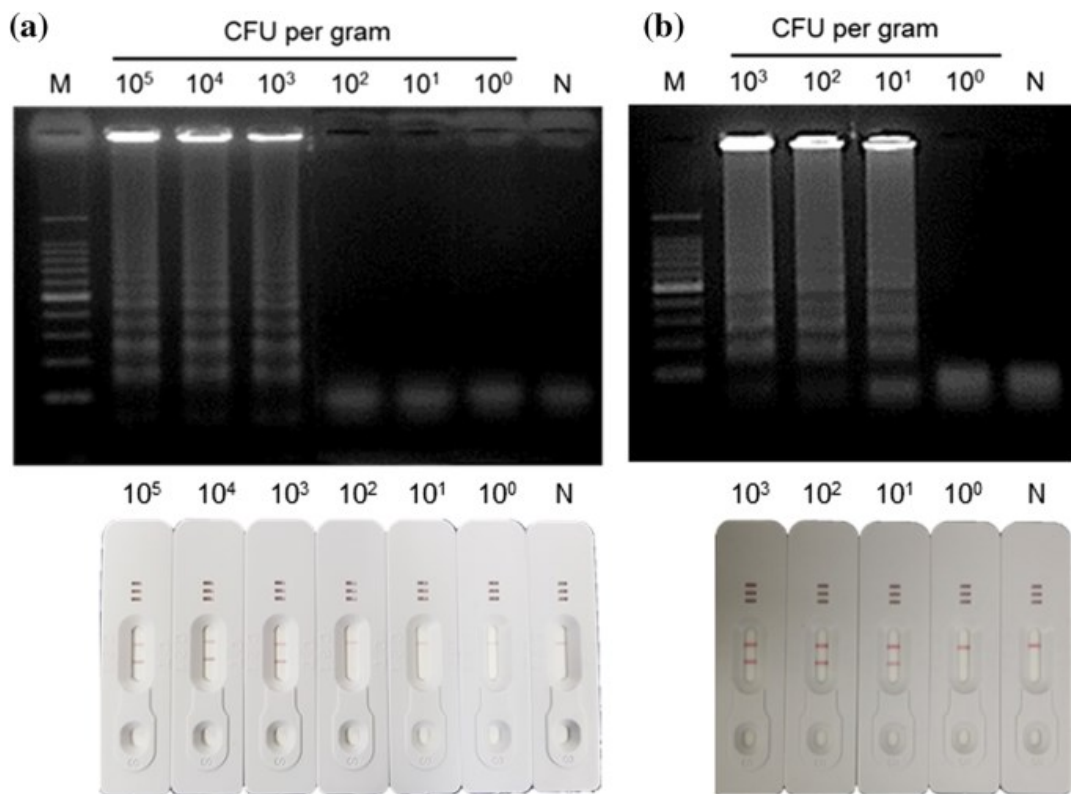


Fig. 8. Analisi di un campione di carne bovina mediante elettroforesi (pannello superiore) e LFA (pannello inferiore). A) campioni non filtrati; B) campioni filtrati (J.H. Kim et al., 2019).

Si ritiene che la maggior sensibilità sia dovuta a tre principali motivi. In primo luogo, la LAMP ha una specificità maggiore per il DNA bersaglio rispetto alla PCR convenzionale e amplifica rapidamente il DNA. LAMP ha un grande potenziale come metodo molecolare rapido e sensibile per rilevare il DNA da varie matrici, compresi gli alimenti. Sebbene gli enzimi utilizzati nella

PCR possano essere inibiti da varie componenti alimentari, tali inibitori non influiscono sul test LAMP. In secondo luogo, il metodo di filtrazione su membrana concentra fisicamente *E. coli* O157:H7 permettendo dunque una sua più semplificata risoluzione. Infine, la filtrazione migliora la sensibilità rimuovendo gli eventuali inibitori presenti. L'uso della filtrazione in combinazione con LAMP-LFA non richiede competenze specialistiche e la fase di arricchimento aumenta la sensibilità del test. L'intero processo per la rilevazione di *E. coli* O157:H7 comprende fasi sequenziali quali filtrazione, LAMP e LFA; il tempo totale di rilevamento può essere ridotto a  $\leq 3$  ore.

### 3.3. *Clostridium botulinum*

Il *Clostridium botulinum* è l'agente eziologico del botulismo, chiamata anche "paralisi flaccida", una malattia rara ma estremamente grave causata dalla produzione di una neurotossina, introdotta attraverso l'ingestione di alimenti contaminati e in seguito assorbita a livello intestinale o penetrazioni da ferite di *C. botulinum*. Il batterio produce 7 neurotossine botuliniche (BoNT) dalla A alla G suddivise in quattro gruppi. I sintomi possono variare da lievi gastroenteriti, sintomi neurologici (difficoltà di parola, movimento autonomo delle pupille, formicolio) fino a paralisi muscolare e persino morte. Essendo microrganismi sporigeni sono abbastanza diffusi nell'ambiente ma in tali condizioni non sono in grado di produrre la tossina. Per germinare le spore difatti necessitano di particolari condizioni quali: pH superiori a 4,6; Aw superiori a 0,94; ambiente strettamente anaerobio e condizioni di temperatura adeguate. L'industria alimentare ha compiuto molti sforzi per garantire che i processi di trattamento degli alimenti prevengano la germinazione delle spore di *C. botulinum* e la formazione dunque della tossina. Allo stato attuale il saggio biologico sui topi è l'unico metodo che può essere utilizzato con sicurezza per il rilevamento di BoNT. Sebbene il test sui topi sia estremamente sensibile, con limite di rilevamento di una dose letale nel topo che equivale a circa 10 pg/ml di neurotossina, presenta una serie d'inconvenienti: è costoso da eseguire, richiede topi vivi, non è specifico per il sierotipo della tossina e il completamento del test richiede fino a 4 giorni. A causa degli svantaggi appena descritti, negli ultimi anni ci sono stati numerosi tentativi di sostituzione di tale test con metodi *in vitro*. Pertanto, le analisi basate su LFA sembrerebbero un'ottima alternativa al metodo convenzionale per l'identificazione di BoNT negli alimenti.

### 3.3.1. *Analisi dei LFA per il rilevamento di BoNT*

In uno studio condotto da Shashi K. Sharma et al. (2005) sono stati analizzati diversi campioni inoculati con BoNT per verificare la sensibilità e la specificità dei LFA commerciali basati su nanoparticelle d'oro. Per campioni di alimenti liquidi come succo d'arancia, acqua in bottiglia, bibite, estratto di vaniglia e succo di mela, un campione di cibo da 5 ml è stato addizionato con 100 ng/ml di neurotossina A o B o con 200 ng/ml di neurotossina E, dunque incubato per 30 minuti a temperatura di 25 °C. I campioni sono stati quindi centrifugati per 30 minuti a 4°C per rimuovere le particelle solide. Successivamente 500 µl di surnatante sono stati accuratamente miscelati con 500 µl di tampone in una provetta di vetro e utilizzati per il test.

Alimenti ad alto contenuto di grassi o viscosi come latte, gelato e miele sono stati addizionati con 100 ng/ml di BoNT A-B ed E dunque incubati per 30 minuti a temperatura ambiente (25°C). I campioni, in seguito, sono stati diluiti in un tampone fosfato con un rapporto di 1:5 e quindi centrifugati per rimuovere le particelle solide e/o lo stato lipidico. Anche in questo caso 500 µl di surnatante sono stati miscelati con 500 µl di tampone.

Per i campioni di cibo semisolido 10 g di alimento sono stati addizionati con 200 ng/ml di neurotossina botulinica A o B o 400 ng/ml di neurotossina E. In seguito a incubazione i campioni sono stati miscelati con 10 ml di campione e omogenizzati con uno stomacher da banco per ottenere una sospensione omogenea. Per il cibo solido una porzione di 10 g del campione è stata addizionata con 200 ng/ml di tossina A, B o E. In seguito a incubazione la porzione è stata tagliata a pezzetti, miscelata con 10 ml di tampone e omogenizzati con uno stomacher per ottenere una sospensione omogenea. Sia la sospensione derivante dal cibo semisolido che da quello solido è stata centrifugata per rimuovere le particelle solide e infine 500 µl di surnatante miscelati con 500 µl di tampone.

Per determinare la sensibilità del test sono stati analizzati campioni contenenti diverse concentrazioni di tossina, specificatamente da 0,2 a 100 ng/ml. Per campioni contenenti da 0,2 a 9 ng/ml di BoNT/A e -/ B o per campioni contenenti da 0,2 a 19 ng/ml di BoNT/E non è stata osservata nessuna colorazione della TL. La positività del test si è sviluppata per i campioni contenenti 10 ng/ml di BoNT/A e -/ B, mentre nel caso di BoNT/E la TL è apparsa con i campioni contenenti 20 ng/ml di tossina. La sensibilità, dunque, dei test commerciali per il rilevamento della neurotossina botulinica di tipo A e B negli alimenti è stata definita a 10 ng/ml, per quella di tipo E invece a 20 ng/ml.



Anche per la specificità è stata testata un'ampia gamma di campioni alimentari. La maggior parte degli alimenti liquidi non diluiti come succo d'arancia, acqua in bottiglia, Coca-Cola ed estratto di vaniglia hanno mostrato risultati positivi entro 15 minuti (tempo di rilevamento minimo necessario indicato dal produttore del kit LFA). Anche gli alimenti solidi come broccoli, cannella e salmone atlantico hanno mostrato reazione positiva entro 15 minuti. I campioni alimentari di miele e latte artificiale invece non sono stati in grado di raggiungere la finestra di lettura e hanno mostrato quindi risultati negativi. Nel caso di succo di mela, sebbene il campione sia migrato nella carta di nitrocellulosa senza alcuna difficoltà, la membrana è diventata leggermente rossa, rendendo difficoltosa la lettura del risultato. Tuttavia, dopo la diluizione dei campioni che sono risultati negativi, i campioni di miele e latte artificiale sono stati in grado di raggiungere la finestra di lettura portando a colorazione la TL, o per quanto riguarda il succo di mela, seppur la carta risultava ancora leggermente colorata, le strisce di test e controllo in questo caso sono risultate chiaramente visibili e leggibili.

La dose letale di tossina botulinica per l'uomo non è nota con precisione: si stima che la quantità letale di tossina di tipo A per un essere umano di 70 kg si aggiri approssimativamente tra 0,09 e 0,15  $\mu\text{g}$  per via endovenosa o intramuscolare, da 0,70 a 0,90  $\mu\text{g}$  per via inalatoria e 70  $\mu\text{g}$  per via orale (S.S. Aron et al., 2001). Come definito nel paragrafo precedente, il limite di rilevamento del saggio su topi è 10 pg/ml di BoNT/A. Sebbene i LFA appena descritti abbiano mostrato sensibilità inferiore rispetto alle prove biologiche su topi, sono comunque in grado di rilevare la tossina a concentrazioni inferiori rispetto alla sua dose letale in tempi molto più brevi e comunque con una specificità elevata. Pertanto, possono essere presi in considerazione per l'uso *in loco* per il rilevamento di BoNT.

## 4. ALTRE APPLICAZIONI

### 4.1. Micotossine

Le micotossine sono metaboliti naturali prodotte da funghi principalmente del genere *Aspergillus* (aflatossina, ocratossina, patulina), *Fusarium* (fumonisine, tricoteceni, zearalenone) e *Penicillium* (ocratossina e patulina). Le colture possono essere infettate prima, durante o dopo la raccolta. Un elenco non esaustivo di prodotti potenzialmente interessati da questi funghi include cereali, noci, arachidi, spezie, caffè, tè, mele, uva e semi di soia. A causa della relativa stabilità delle tossine fungine allo stress termico e chimico, si ritrovano nelle merci nonostante l'eliminazione della muffa, dopo lunghi periodi di stoccaggio e anche dopo la trasformazione della materia prima.

Un ampio elenco della misurazione delle micotossine negli alimenti e nei mangimi mediante LFIA convalidati è riportato in tabella 3.

<b>Obiettivo</b>	<b>Rilevamento</b>	<b>LOD</b>	<b>Campione</b>
AFB1	Visivo	5µg/kg	Mangime per suini
AFB1	Visivo	0,5-1µg/kg	Latte
DON	Visivo	1500µg/kg	Grano
FMB	Strumentale	200µg/kg	Mais
ZEA	Visivo	1000µg/kg	Grano
OTA	Visivo	5µg/kg	Mais
OTA	Strumentale	1,5µg/kg	Grano
AFB1	Visivo	2,5µg/kg	Farina di frumento
AFB1	Visivo	0,5µg/kg	Riso, orzo
AFB2	Visivo	0,9µg/kg	Arachidi, pistacchio
AFB1	Visivo	0,1µg/kg	Cereali, noci
OTA	Visivo	5-10µg/kg	Caffè
OTA	Visivo	1µg/kg	Uvetta, birra
ZEA	Visivo	2,5µg/kg	Mais
OTA	Visivo	5µg/kg	Vino rosso

Tab. 3. Rilevamento di aflatossine mediante LFA in diversi campioni con relativo limite di rilevazione (Anfossiet al., 2010).

Recentemente Wang et al. (2011) hanno descritto per la prima volta un LFA per il rilevamento di AFB1 con cut-off di 0.5-1µg/L. Per il completamento di tale test sono stati richiesti solo 10 minuti

poiché non è stato necessario alcun trattamento del campione. Sono stati ottenuti meno del 5% dei risultati falsi negativi (su 83 campioni) e nessun risultato falso positivo inferiori a 300 ng/L. Per contaminazioni comprese tra 350 e 450 ng/L la falsa positività è aumentata dal 21 al 93%. Oltre alle aflatossine, la rapida individuazione dell'OTA ha attirato molta attenzione a causa della sua tossicità e della presenza diffusa di questo contaminante in diversi tipi di alimenti. L'applicazione dei LFA che sfruttano AuNP come marcatori è stata dimostrata per una varietà di cereali (Anfossi et al., 2010), bevande (Wang et al., 2007) e caffè (Liu et al., 2007). Inoltre, un'analisi strumentale ha consentito di ottenere un'elevata sensibilità mediante l'uso del dispositivo sviluppato da Ursov et al. (2011). Nel lavoro di Wang et al. (2011) per il rilevamento dell'OTA è stato utilizzato un colorante fluorescente come marcatore, mentre gli anticorpi specifici sono stati sostituiti con aptameri in grado di riconoscere selettivamente la tossina bersaglio.

#### 4.2. Ficotossine

Le ficotossine appartengono a molti gruppi differenti di composti di piccole o medie dimensioni (circa 30-3000 Da). Le alghe responsabili della produzione ed escrezione di ficotossine appartengono ai gruppi dei cianobatteri (saxitossina, microcistine, nodularine) e dei dinoflagellati (saxitossina, acido okadaico, brevetossina, acido domoico). Il rischio rappresentato da questi contaminanti è rappresentato dal loro accumulo, e concentrazione dunque della tossina, in diversi organismi acquatici, inclusi bivalvi, crostacei e pesci erbivori. I test immunologici a flusso laterale per le principali ficotossine hanno iniziato a essere pubblicati nel 2003 quando J.M. Kim et al. (2003) per la prima volta hanno riportato un test quantitativo per microcistine (MC) in acqua sfruttando un marcatore fluorescente. I lavori successivi di D. Pyo (2007) e N. Khreich et al. (2010) hanno studiato, oltre che l'uso di marcatori fluorescenti, anche l'uso di punti quantici per il rilevamento di MC con i LFA. In un ulteriore lavoro di N. Triptokker et al. (2009) hanno ampiamente studiato l'interazione tra anticorpi e nanoparticelle d'oro per determinare l'effetto del tempo, della concentrazione di anticorpi e del pH sul raggiungimento di una stabilizzazione ottimale del LFA. L'LFA ottimizzato aveva un cut-off visivo di 5 µg/L in acqua e la misurazione delle intensità delle linee mediante una telecamera CCD ha consentito un miglioramento della sensibilità di cinque volte. Finora è stato descritto un solo LFA per il rilevamento qualitativo della brevetossina (PbTx) basato su AuNP (Zhou et al., 2009) applicato per il rilevamento della tossina sui molluschi. Il cut-off visivo è stato fissato a 10 ng/ml in soluzione tampone e 20 ng/ml negli estratti alimentari. La corsa sulla striscia è durata 10 minuti. Gli autori hanno anche valutato la

stabilità della striscia (sei settimane a 4°C) e la cross-reattività verso altre tossine marine. Il saggio aveva buone proprietà di riconoscimento verso la maggior parte delle Neurotoxic Shellfish poisoning (NSP) e nessuna interferenza da ficotossine appartenenti a classi diverse (MC, Diarrhetic Shellfish poisoning e Amnesic Shellfish poisoning). Inoltre, le prestazioni dei LFA concordavano con i risultati ottenuti mediante l'uso parallelo del metodo ELISA.

I sistemi commerciali per la misurazione di Paralytic Shellfish poisoning (PSP), DSP e ASP sono disponibili dall'inizio degli anni 2000 e sono stati oggetto di numerose valutazioni. L'accuratezza dei dispositivi è stata valutata per confronto con metodi di analisi strumentali o con altri metodi di screening, come nel lavoro di M.V. Laycock et al. (2010) in cui la concentrazione di tossina rilevata attraverso un LFA è stata paragonata a quella rilevata dal metodo di screening più utilizzato, ossia un saggio biologico, sottolineando lo stretto accordo tra i due metodi, dimostrando così il valore dei LFA come strumento d'indagine per il monitoraggio di PSP, DSP e ASP. Inoltre, Tsao et al. (2007) hanno descritto la produzione di un anticorpo monoclonale per l'acido domoico (DA) e il suo sfruttamento nello sviluppo di un test immunologico qualitativo a flusso laterale per rilevare la tossina ASP nei mirtilli. Tale test ha richiesto per il suo completamento solo 10 minuti di analisi fornendo un intervallo di rilevazione compreso tra 1 e 5 ng/ml, limite ben al di sotto del livello massimo ammissibile legale per DA nel tessuto delle cozze.

#### 4.3. *Metalli pesanti*

L'inquinamento da metalli pesanti è una delle principali preoccupazioni per la sicurezza della salute umana. Varie agenzie ambientali e sanitarie hanno regolamentato i limiti massimi consentiti dei metalli nelle acque, nell'aria e negli alimenti. Le tecniche analitiche utilizzate per il rilevamento dei metalli pesanti sono la spettroscopia di assorbimento atomico, la spettroscopia di massa a plasma accoppiato induttivamente e la spettroscopia di emissione ottica al plasma accoppiata induttivamente. Queste tecniche non possono essere utilizzate come point-of-care a causa delle loro grandi dimensioni, necessità di personale esperto e preparazione complessa del campione. Un rilevamento visivo semplice, sensibile e rapido di ioni  $Hg^{2+}$  in soluzione acquosa è stato ottenuto utilizzando un LFA basato su AuNP coniugate a sonde di DNA ricche in timina (T) in grado di complessare  $Hg^{2+}$  (Y. He et al., 2011). Un LFA è stato utilizzato per rilevare e quantificare gli ioni cromo in campioni di acqua e siero utilizzando ancora una volta nanoparticelle d'oro come traccianti in un formato competitivo. Il limite di rilevabilità molto basso è stato ottenuto mediante ispezione visiva; inoltre, la striscia è rimasta stabile per 12 settimane a 37 °C senza subire una sostanziale perdita di prestazioni (X. Liu et al., 2012). LFA

basato su Cd-EDTA-BSA-AuNP è stato utilizzato per rilevare Cd<sup>2+</sup> nelle acque potabili e di rubinetto e ha portato un limite di rilevamento di 0,1 ppm, limite di gran lunga migliore di qualsiasi sensore metallico a base di carta.

#### 4.4 *Inquinanti tossici*

Il bisfenolo A (BPA) ha ampie applicazioni nell'industria per la preparazione di resina epossidica e bottiglie di policarbonato ma è in grado di alterare, come sostengono numerosi studi, il sistema endocrino. È stato progettato un metodo semplice e rapido basato su LFA per il rilevamento di BPA nell'acqua. I risultati di tali test hanno evidenziato una miglior sensibilità rispetto a GC-MS e LC-MS. Inoltre, rispetto a questi due metodi LFA presenta tempi di analisi inferiori, un unico passaggio e la possibilità del rilevamento in loco (Z. Mei et al., 2013). Per analizzare il TNT, simbolo anche d'inquinamento ambientale, è stato usato un LFA basato su AuNP come marcatore che è stato in grado di rilevare addirittura 1 mg/ml di TNT sul campione (S. Girotti et al., 2010). La ractopamina, utilizzata come additivo per i mangimi del bestiame, può essere tossica per l'uomo. Questa è stata identificata con successo dalle urine dei suini mediante LFA (M.L. Ren et al., 2014).

## 5. CONCLUSIONI

Il saggio a flusso laterale combina fundamentalmente una serie di varianti, molecole di bioriconoscimento, marcatori, sistemi di rilevamento e applicazioni. I LFA classici constano di una striscia fissata all'interno di un supporto di plastica. All'interno di tale striscia sono presenti tutte le componenti necessarie per il rilevamento dell'analita, quale tampone di applicazione, coniugato, carta di nitrocellulosa e tampone assorbente. Nella striscia di nitrocellulosa sono presenti le linee di controllo e test utili per la visualizzazione del risultato. Per il corretto funzionamento dei LFA sono fondamentali proprio queste componenti, i marcatori utilizzati e le molecole di bioriconoscimento. In questo elaborato sono stati sottolineati i principi dei LFA nella determinazione dei contaminanti tossici nei prodotti agricoli e alimentari ed esaminati diversi suoi formati utilizzati in differenti matrici alimentari. I IMNP-LFA per l'individuazione degli allergeni quali Ara h1 e Act d1 su diversi prodotti alimentari hanno mostrato elevatissima sensibilità e specificità, rispettivamente del 95 e 100%. I *lateral flow assay* invece basati su punti quantici sono stati esaminati per l'identificazione della tropomiosina, principale allergene dei crostacei, sviluppando ancora una volta elevata specificità e sensibilità (LOD=10<sup>1</sup> CFU/g) addirittura dieci volte superiore rispetto alla PCR convenzionale. Pure nell'identificazione di STEC e BoNT i LFA hanno dimostrato estrema versatilità e applicabilità, permettendo inoltre la diminuzione dei tempi d'analisi dalle 10 alle 3 ore, dimostrandosi ancora una volta una valida alternativa ai metodi convenzionali, molto più costosi, laboriosi e lunghi. Come dimostrato l'impiego dei LFA non è circoscritto solo ad una nicchia di analiti quali allergeni e patogeni, bensì è in grado di raggiungere un'ampia gamma di applicazioni, come riconoscimento di ficotossine, micotossine, metalli pesanti, inquinanti tossici e molto altro.

I saggi a flusso laterale presentano dunque innumerevoli vantaggi, i principali dei quali sono la semplicità procedurale, possibilità di analisi in un'unica fase, bassi costi operativi, alta specificità, talvolta migliore sensibilità, stabilità a lungo termine in condizioni ambientali differenti e maneggiabilità del dispositivo. Seppur con diversi limiti, come l'impossibilità di effettuare analisi quantitative senza il supporto di strumentalizzazione aggiuntiva, la sensibilità delle molecole di bioriconoscimento a diverse componenti alimentari o l'interferenza della matrice sugli analiti, gli enormi vantaggi che i LFA vantano li possono far entrare a pieno diritto tra le analisi per il controllo degli alimenti.



## 6. BIBLIOGRAFIA

A.E. Urusov, S.N. Kostenko, P.G. Sveshnikov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev (2011). Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *Journal of Analytical Chemistry*, 66, article number 770.

Aaron J. Fine, M.D. (1981). Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J allergy Clin Immunol* V.68: pp. 235-237.

Anna Pomés (2008). Allergen Structures and Biologic Functions: The Cutting Edge of Allergy Research. *Current Allergy and Asthma Reports*. V.8: pp. 452 – 432.

Bangs Laboratories, Inc. (2013). Lateral Flow Tests. TechNote 303, 1–6.

Berson, S.A. and Yalow, R.S. (1959) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. *J. Clin. Invest.* V.38:1996–2016.

Brendan O'Farrell (2008). Evolution in Lateral Flow – Based Immunoassay System.

C. Tuerk, L. Gold (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, pp. 505-510 .

C.W. Lee, A.L. Sheffer (2003). Peanut allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 24 (4). pp. 259-264.

Center for disease Control and Prevention (CDC). Food Allergies. Ultimo aggiornamento 23 Agosto 2022 sul sito <https://www.cdc.gov>.

Dolly Satpal, Jaspreet Kaur, Vishesh Bhadariya, Kartik Sharma (2021). *Actinidia deliciosa* (Kiwi fruit): A comprehensive review on the national composition, health benefits, traditional utilization, and commercialization. *J. of Food Processing and Preservation*. V. 46, Issue 6.

Dongjin Pyo (2006). Comparison of Fluorescence Immunochromatographic Assay Strip and Gold Colloidal Immunochromatographic Assay Strip for Detection of Microcystin. *Analytical Letters*, 40 (5), pp. 907-919.

Elif Burcu Bahadir, Mustafa Kemal Sezginurk (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, pp. 286-306.

Geertruida A. Posthuma-Trumpie, Jakob Korf, Aart van Amerongen (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, pp. 569-582.

Hsin-Yi Yin, Yi-Ting Li, Wen-Che Tsai, Hong-Yu Dai, Hsiao-Wei Wen (2000). An immunochromatographic assay utilizing magnetic nanoparticles to detect major peanut allergen Ara h 1 in processed foods. *Food Chemistry*, 375.

Jacques M. Singer, Charles M. Plotz (1956). The latex fixation test: Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J. Med.* Volume 21. pp. 888-889.

Jing-Jhih Wang, Biing-Hui Liu, Yu-Tien Hsu, Feng-Yih Yu (2011). Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk. *Food Control*, 22 (6), pp. 964-969.



Jin-Hee Kim, Se-Wook Oh (2019). Development of a filtration-based LAMP–LFA method as sensitive and rapid detection of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Science and Technology*, 56, pp. 2576-2583.

Katherine Heiman, Katie Fullerton, Rajal Mody, Nancy Strockbine. DCD Fact Sheet National Enteric Disease Surveillance: STEC Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2012.

Laura Anfossi, Gilda D’Arco, Marianna Calderara, Claudio Baggiani, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi (2010). Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28 (2), pp.226-234.

Libing Wang, Wei Chen,, Wenwei Ma, Liqinag Liu, Wei Ma, Yuan Zhao, Yingyue Zhu, liguang Xu, Hua Kuang, Chuanlai Xu (2011). Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins. *Chemical Communications* (5).

Maurice V. Laycock, Mary Anne Donovan, Dorothy J. Easy (2010). Sensitivity of lateral flow tests to mixtures of saxitoxins and applications to shellfish and phytoplankton monitoring. *Toxicon*, 55 (2-3), pp.597-605.

Mei Ling Ren, Xue Lan Chen, Chao Hui Li, Bo Xu, Wen Juan Liu, Heng Yi Xu, Yong Hua Xiong (2014). Lateral Flow Immunoassay for Quantitative Detection of Ractopamine in Swine Urine. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27 (2), pp.134-137.

Nathalie Khreich, Patricia Lamourette, Bernard Lagoutte, Cyril Ronco, Xavier Franck, Christophe Créminon, Hervé Volland (2010). A fluorescent immunochromatographic test using immunoliposomes for detecting microcystins and nodularins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, pp. 1733-1742.

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID): Foodborne Disease (Food Poisoning). Center for Disease Control and Prevention. Ultima revisione 2019, sul sito <https://www.cdc.gov/ncezid/what-we-do/our-topics/foodborne-disease.html>

Nils Tippkötter, Henning Stückmann, Stephen Kroll, Gunda Winkelmann, Udo Noack, Thomas Scheper, Roland Ulber (2009). A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, pp. 863-869.

Renrong Liu, Zhou Yu, Qinghua He, Yang Xu (2007). An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin. *Food Control*, 18 (7), pp. 872-877.

S. Girotti, S. Eremin, A. Montoya, M.J. Moreno, P. Caputo, M. D’Elia, L. Ripani, F.S. Romolo, E. Maiolini (2010). Development of a chemiluminescent ELISA and a colloidal gold-based LFIA for TNT detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, pp. 686-695.

S.D. Jayasena (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, 45, pp. 1628-1650.

S.J. Maleki, S.Y. Chung, E.T. Champagne, J.P. Raufman (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106 (4), pp. 763-768.

S.S. Arnon, R. Schechter, T.V. Inglesby, D.A. Henderson, J.G. Bartlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A.D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M.T. Osterholm, T. O’Toole, G. Parker, T.M. Perl, P.K.

Russell, D.L. Swerdlow, K. Tonat, Working Group on Civilian Biodefense (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *National Library of Medicine*, 285 (8), pp. 1059-70.

Shashi K. Sharma, Brian S. Eblen, Robert L. Bull, Donald H. Burr, Richard C. Whiting (2005). Evaluation of Lateral-Flow Clostridium botulinum Neurotoxin Detection Kits for Food Analysis. *American Society for Microbiology Journals*, 71 (7).

Stefania La Grutta, Mauro Calvani, Marcello Bergamini, Neri Pucci, Riccardo Asero (2011). Allergia alla Tropomiosina: dalla diagnosi molecolare alla pratica clinica. *Immunologia e Allergia Pediatrica*, pp. 20-38.

T.J.R. Fernandes, J. Costa, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra (2015). An overview on fish and shellfish allergens and current methods of detection. *Food and Agricultural Immunology*, 26 (6), pp. 848 – 869.

Wen-Che Tsai, Hsin-Yi Yin, Weng-Tong Leong, Cheng-Yen Tseng & Hsiao-Wei Wen (2022). Development of an immunomagnetic nanoparticle – based lateral flow assay for detecting major kiwi allergen Act d1 in processed foods. *European Food Research and Technology* 248, pp. 1601-1613.

World Health Organisation (2015). WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. Sul sito [www.who.int](http://www.who.int).

Xi Liu, Jun-Jian Xiang, Yong Tang, Xiao-Li Zhang, Qiang-Qiang Fu, Jun-Hui Zou, YueHe Lin (2012). Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum sample. *Analytica Chimica Acta*, 745, pp.99-105.

Xiang-Hong Wang, Tao Liu, Na Xu, Yan Zhang, Shuo Wang (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, pp. 903-911.

Yaqing Wang, Zhenxing Li, Hong Lin, Pramod N. Siddanakoppalu, Jing Zhou, Guanzhi Chen, Zhiwen Yu (2019). Quantum-dot-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of crustacean major allergen tropomyosin. *Food Control*, 106.

Young Min Kim, Sang Wook Oh, So Young Jeong, Dong Jin Pyo, and Eui Yul Choi (2003). Development of an Ultrarapid One-Step Fluorescence Immunochromatographic Assay System for the Quantification of Microcystins. *Environmental Science & Technology*, 37 (9), pp. 1899-1904.

Yu Zhou, Feng-Guang Pan, Yan-Song Li, Yuan-Yuan Zhang, Jun-Hui Zhang, Shi-Ying Lu, Hong-Lin Ren, Zeng-Shan Liu (2009). Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (8), pp. 2744-2747.

Yuqing He, Xibao Zhang, Kang Zeng, Sanquan Zhang, Meenu Baloda, Anant S. Gurung, Guodong Liu (2011). Visual detection of Hg<sup>2+</sup> in aqueous solution using gold nanoparticles and thymine-rich hairpin DNA probes. *Biosensor and Bioelectronics*, 26 (11), pp.4464-4470.

Zhanlong Mei, Wei Qu, Yi Deng, Huaqin Chu, Jinxuan Cao, Feng Xue, Lei Zheng, Hani Said El-Nezamic, Yucheng Wu, Wei Chen (2013). One-step signal amplified lateral flow strip biosensor for ultrasensitive and on-site detection of bisphenol A (BPA) in aqueous samples. *Biosensor and Bioelectronics*, 49, pp. 457-461.

Zih-Jay Tsao, Yi-Chun Liao, Biing-Hui Liu, Ching-Chyuan Su, and Feng-Yih Yu (2007). Development of a Monoclonal Antibody against Domoic Acid and Its Application in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunostrip. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55 (13), pp. 4921-4927.