

Anticorpi “verdi” contro le aflatossine per la tutela dei consumatori

C. Capodicasa, M. Catellani

Fra le tossine naturali che possono contaminare prodotti alimentari o mangimi destinati all'alimentazione animale, una particolare preoccupazione è destata dalle micotossine. Esse sono sostanze tossiche prodotte come metaboliti secondari, in opportune condizioni microclimatiche, da funghi appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. L'attenzione rivolta verso questi contaminanti è giustificata dai gravi effetti (teratogeni, cancerogeni, estrogeni, neurotossici e di immunosoppressione) sulla salute dell'uomo e degli animali conseguenti alla loro assunzione attraverso il cibo.

In particolare le aflatossine, che comprendono diverse molecole molto simili tra loro (B1, B2, G1, G2) e che sono prodotte da due specie del fungo *Aspergillus*, (Figura 1) sono fra le tossine più diffuse nei prodotti alimentari (<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/aflatoxins.htm>). Basti pensare che, ogni anno, circa un quarto delle notifiche emesse a livello comunitario dal RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) riguarda contaminazioni da micotossine, che in

più del 90% dei casi appartengono al gruppo delle aflatossine (http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm). Queste tossine, infatti, possono contaminare, non solo una vasta gamma di prodotti, quali cereali in genere, frutta secca e a guscio, sui quali i funghi crescono direttamente, ma possono anche compromettere l'intera filiera del latte e dei suoi derivati in maniera indiretta, dal momento che l'aflatossina M1 è un metabolita della B1 che può essere presente nel latte di animali nutriti con mangimi contaminati.

Migliori pratiche agricole ed una corretta conservazione dei prodotti vegetali possono aiutare a limitare le contaminazioni da micotossine, ma non ad eliminarle completamente dalla filiera agroalimentare. Inoltre, in un contesto produttivo sempre più globalizzato, l'approvvigionamento delle materie prime spesso coinvolge Paesi terzi con standard qualitativi e di controllo non sempre rispondenti alle normative comunitarie.

Al fine di tutelare la salute del consumatore, l'Unione Europea ha, pertanto, stabilito dei limiti massimi per la contaminazione ammessa e regolamentato i metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale delle aflatossine (regolamento (CE) n. 1881/2006 e n. 401/2006 http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxins_en.htm).

La diagnostica, quindi, rappresenta uno strumento di controllo fondamentale e strategico per la minimizzazione del rischio correlato alla potenziale assunzione di queste tossine attraverso il cibo. Le tecniche diagnostiche più affidabili e ufficialmente validate per la rivelazione delle contaminazioni di aflatossina sono quelle basate su metodi analitici (*HPLC*, *High-performance liquid chromatography*) e saggi immunoenzimatici (*ELISA*, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Oltre a queste, sono state messe a punto e si stanno ancora sviluppando tecniche più rapide, economiche e che non richiedano sofisticate strumentazioni da laboratorio, quali, ad esempio, i test basati su sensori ottici o “lateral flow” (tipo test di gravidanza) (Figura 2). Ad eccezione dell'analisi HPLC, tutte le altre sono tecniche immunodiagnostiche, ovvero che si basano sull'uso di anticorpi in grado di riconoscere con alta

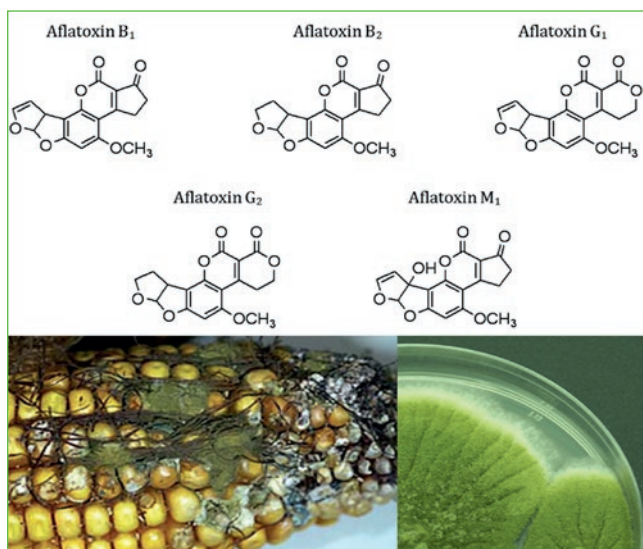


Figura 1
Struttura chimica delle aflatossine (in alto). Coltura in vitro di *Aspergillus flavus* (in basso a destra) e mais infettato dal fungo (in basso a sinistra)

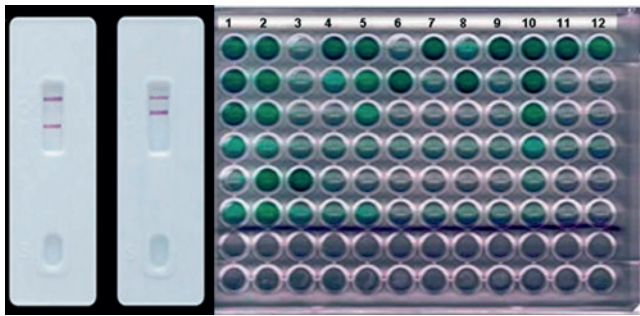


Figura 2
Dispositivi di immunodiagnostica: dispositivo *lateral flow* (a sinistra) e piastra ELISA (a destra)

efficienza le aflatoxine. Gli anticorpi sono proteine complesse prodotte da cellule del sistema immunitario degli animali e deputate al riconoscimento di molecole estranee e pericolose per l'organismo, per neutralizzarle direttamente o facilitare la loro eliminazione. Da sempre gli anticorpi sono sfruttati nella diagnostica per la loro capacità di riconoscere e legare con alta affinità molecole di ogni natura: proteine, zuccheri e molecole organiche di piccole dimensioni (quali sono le aflatoxine).

Il Laboratorio di Biotecnologie della Divisione Biotecnologie e agroindustria, presso il Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA, è impegnato da anni nella produzione di anticorpi in sistemi alternativi alle cellule animali, quali le piante per diverse applicazioni, dal campo biomedico a quello agroalimentare. Nell'ambito del progetto Me.Di.T.A. (Metodologie Diagnostiche e Tecnologie Avanzate per la qualità e la sicurezza di prodotti alimentari del Mezzogiorno d'Italia), in particolare, sono stati isolati degli anticorpi per sviluppare un saggio diagnostico per la quantificazione delle aflatoxine in matrici alimentari. Per isolare gli anticorpi è stato necessario sfruttare il sistema immunitario animale, ovvero somministrare l'aflatoxina B1 a topi di laboratorio e, attraverso la tecnologia dell'ibridoma, selezionare le cellule che producevano l'anticorpo specifico e con alta affinità per la tossina. In questo modo è stato possibile ottenere due anticorpi, detti monoclonali, di cui uno più specifico per l'aflatoxina B1 ed uno a più ampio spettro, in grado di riconoscere tutte le aflatoxine (B1, B2, G1, G2). Entrambi gli anticorpi hanno mostrato una elevata affinità per la tossina necessaria per il loro utilizzo in diagnostica, considerando che, in base alla normativa CE, bisogna poter rilevare contaminazioni di aflatoxina nel range di 2-10 µg/kg. Questi anticorpi sono stati prodotti in

pianta, sfruttando un batterio del suolo, e impiegati per lo sviluppo di un saggio ELISA e di un dispositivo per la rilevazione simultanea di più tossine (*protein chip*) in matrici alimentari, uno degli obiettivi principali del progetto. Entrambi i sistemi si basano sull'immobilizzazione degli anticorpi su un supporto e l'incubazione del campione in presenza di quantità note di aflatoxina coniugata ad un tracciante (un enzima che permette una reazione colorimetrica o una molecola fluorescente); sulla base dei segnali rilevati dopo l'incubazione, si deduce se e quanta tossina è presente nel campione. Con questi saggi sono state quantificate delle farine "naturalmente" contaminate con più micotossine, ottenendo risultati perfettamente in linea con le analisi chimiche mediante HPLC degli stessi campioni.

Più recentemente, in collaborazione con Euroclone, uno dei partner ENEA nel progetto "SAFE&SMART-Nuove tecnologie abilitanti per la *food safety* e l'integrità delle filiere agroalimentari in uno scenario globale" stiamo mettendo a punto dei saggi per la rivelazione dell'aflatoxina M1 che, come già detto, può contaminare il latte e tutta la sua filiera. Questa è una sfida ancora più ambiziosa, dal momento che la normativa è più stringente per questa tossina: il limite massimo di contaminazione è di 50 ng/kg. In questo caso, per ottenere anticorpi contro l'aflatoxina M1, si è tentato di utilizzare una tecnologia più avanzata, quale la selezione da librerie di anticorpi sintetici ricombinanti, ottenuti mediante modificazioni casuali dell'anticorpo monoclonale anti-B1. Tuttavia, mediante questa tecnica, non è stato possibile isolare anticorpi con un'affinità sufficiente e si è passati nuovamente per la tecnologia dell'ibridoma. Con gli anticorpi anti-M1 isolati si stanno sviluppando dei kit diagnostici basati sia sul saggio ELISA che sul saggio rapido *lateral flow*. Uno dei vantaggi di questi kit è l'utilizzo di anticorpi monoclonali che garantiscono performance costanti e un'estrema ripetibilità dei saggi, ma il vero valore aggiunto è la produzione degli anticorpi in pianta, che consente di svincolarsi da costosi impianti a contenimento atti a garantire la necessaria sterilità per la crescita delle colture cellulari animali. Si spera così di poter ottenere dei kit "verdi" per la diagnostica agroalimentare, utilizzando la pianta come biofabbrica e valida alternativa ai classici sistemi di produzione di anticorpi monoclonali, garantendo elevate rese, costi ridotti e uno scale-up produttivo rapido e flessibile.

Per approfondimenti: cristina.capodicasa@enea.it

Cristina Capodicasa, Marcello Catellani
ENEA, Divisione Biotecnologie e agroindustria