

Le biotecnologie al servizio della diagnostica alimentare

Con l'aumento delle esigenze di sicurezza alimentare, emergono soluzioni diagnostiche sempre più rapide, sostenibili e versatili per identificare contaminanti come le aflatossine. Approcci biotecnologici innovativi permettono di estendere la rilevazione a qualsiasi molecola bersaglio.

DOI 10.12910/EAI2025-065

di Cristina Capodicasa e Marcello Catellani – Dipartimento Sostenibilità, circolarità e adattamento al cambiamento climatico dei Sistemi Produttivi e Territoriali, Laboratorio Biotecnologie Green - ENEA

Le analisi diagnostiche, non solo in campo medico ma anche in quello agroalimentare, sono sempre più richieste per la tutela della salute pubblica. Nel settore dell'agro-food, oltre ai test per identificare allergie e intolleranze alimentari, molte analisi sono effettuate dall'industria e dai produttori per il controllo della qualità e sicurezza degli alimenti, come ad esempio la ricerca di contaminazioni. Fra queste, le contaminazioni da micotossine sono molto diffuse e determinano più di un quinto delle azioni di allerta attivate nel mercato comunitario a carico dei prodotti alimentari di origine vegetale^[1]. Le aflatossine sono molecole cancerogene prodotte da funghi (micotossine), che contaminano una vasta gamma di prodotti agroalimentari (cereali, spezie, frutta secca) e mangimi, e nell'Unione Europea i limiti di contaminazione nelle derrate interessate sono normati (Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione^[2]) imponendo analisi di controllo a tutela del consumatore. Ad oggi, le tecnologie usate per la rilevazione delle micotossine ed in generale di contaminanti alimentari sono basate su cromatografia e spettroscopia

(HPLC e spettrometria di massa) o basate sull'uso di anticorpi, quali saggi immunoenzimatici (ELISA) e *Lateral Flow ImmunoAssay* (LFIA). Sebbene le prime siano tecniche accurate, affidabili ed utilizzate come metodi ufficiali di conferma del dato analitico, gli immunotest offrono diversi vantaggi quali: elevata sensibilità e selettività, economicità, ma soprattutto la possibilità di processare molti campioni in parallelo ed in tempi rapidissimi. Proprio la rapidità di esecuzione di questi test diagnostici (classificati come test di *screening*) determina ancora oggi il loro successo applicativo, consentendo agli operatori del settore di intervenire tempestivamente in caso di non conformità delle materie prime. Fra le applicazioni sviluppate negli ultimi anni in ENEA possiamo annoverare un kit diagnostico per la rilevazione e quantificazione della aflatossina M1 (AFM1), contaminante della filiera latte e derivati, basato su ELISA (TRL 8) ed un secondo kit per la diagnostica delle aflatossine totali, contaminanti di mais, frutta secca e mangimi, che è attualmente in fase di sviluppo (TRL 3/4).

Il primo saggio diagnostico è stato sviluppato in collaborazione con una

azienda italiana che ha consentito di validare il sistema in un ambiente operativo, elevando il TRL e rendendo il sistema pronto per la commercializzazione^[3]. Il secondo saggio, invece, è stato oggetto di un progetto finanziato con fondi ENEA nell'ambito dell'iniziativa Proof of Concept. Il progetto, denominato AflaGreen - Immunotest "verdi" ed innovativi per la quantificazione delle aflatossine in matrici alimentari, ha previsto la messa a punto di un nuovo dispositivo diagnostico utilizzando un anticorpo monoclonale murino (mAb), in grado di rilevare le aflatossine B1 e totali a concentrazioni molto basse (secondo normativa UE) (Figura 1).

In entrambi i casi gli anticorpi monoclonali, di origine murina e generati in ENEA con la tecnologia dell'ibridoma, sono stati prodotti sfruttando la piattaforma del *Plant Molecular Farming*



Figura 1 - Dispositivo diagnostico.

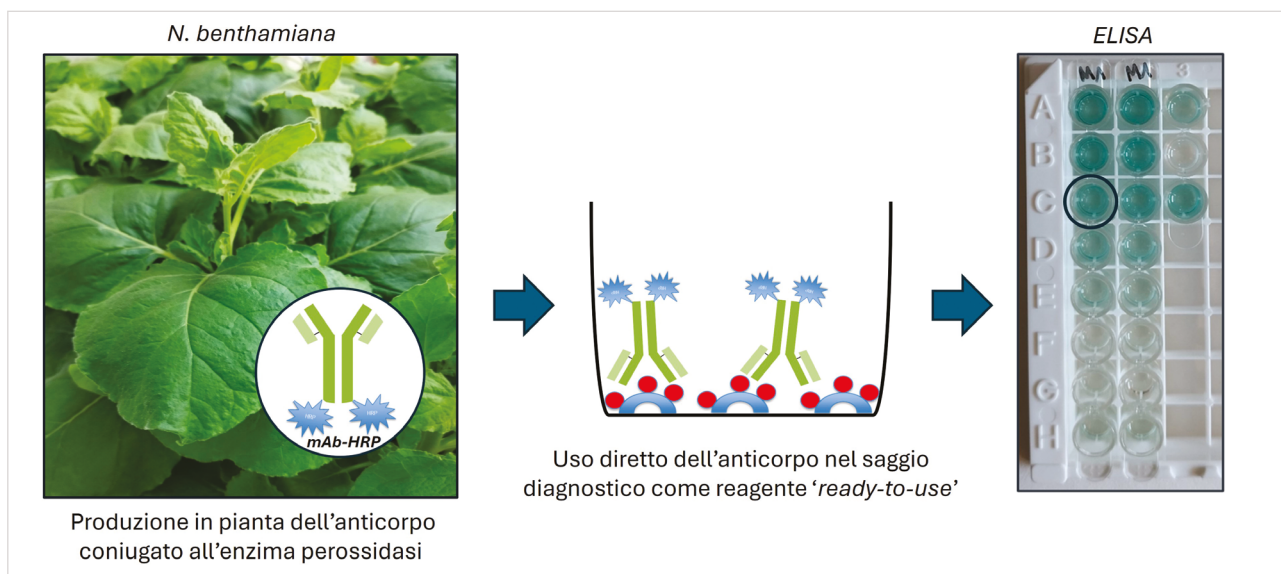


Figura 2 - Rappresentazione schematica della produzione in pianta di anticorpi fusi all'enzima perossidasi e del loro utilizzo in saggi ELISA diretti come reagenti pronti all'uso.

(PMF), ovvero l'uso della pianta come 'biofabbrica' per la produzione di biomolecole complesse (proteine) per uso terapeutico o diagnostico. In particolare, sono stati ottenuti in maniera transiente mediante agroinfiltrazione in piante di *Nicotiana benthamiana* e caratterizzati confrontandoli con i rispettivi anticorpi monoclonali prodotti in cellule di mammifero.

Sono stati quindi messi a punto due saggi rapidi competitivi definendo tempi e cinetiche di reazione e range di quantificazione (linearità) utilizzando standards a concentrazione nota delle due tossine bersaglio. I sistemi diagnostici sviluppati sono stati in parte validati analizzando materiali di controllo (naturalmente contaminati) e materiali di riferimento certificati di farine di mais e latte (validazione statistica dei valori di quantificazione e dei recuperi ottenuti) e determinando i relativi limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ).

Successivamente, sempre all'interno del progetto AflaGreen è stato svi-

luppato un approccio biotecnologico innovativo per la realizzazione di anticorpi funzionalizzati mediante la fusione biologica con un enzima (la perossidasi C di rafano, HRP). L'obiettivo che è stato raggiunto, e che ha anche consentito la realizzazione di un brevetto [4], è stato quello di riuscire ad ottenere la fusione di molecole differenti mantenendone però invariate le specifiche funzioni biologiche. **Gli anticorpi ingegnerizzati hanno infatti mostrato di mantenere la specificità per il loro bersaglio biologico e al contempo di produrre una reazione colorimetrica, mediata dalla presenza dell'enzima perossidasi (Figura 2). Questa nuova metodologia è inoltre versatile e sarà esportabile su qualsiasi anticorpo ad uso diagnostico, indipendentemente dallo specifico settore applicativo.**

Anticorpi fluorescenti per la diagnostica

Sebbene l'ELISA rappresenti un buon compromesso tra accuratezza anali-

tica e rapidità di esecuzione, sono anche necessari nuovi sistemi più rapidi, economici, portatili e facili da usare per lo screening in loco. Fra questi ci sono LFIA (immunosaggio a flusso laterale) e biosensori, che tipicamente usano gli anticorpi come biorecettori per una molecola bersaglio e che, in questi sistemi diagnostici, richiedono ulteriori e costose modificazioni chimico/fisiche per la trasduzione del segnale. A questo scopo sono stati generati anticorpi anti-AFM1 fluorescenti, prodotti sempre sfruttando la tecnologia del *Plant Molecular Farming*. In particolare, sono state ottenute immunoglobuline G ricombinanti mediante fusione biotecnologica con una proteina fluorescente verde (GFP) o una proteina fluorescente arancione (CyOFP1). Anche in questo caso le biomolecole ricombinanti hanno mantenuto la loro funzionalità: legare la molecola bersaglio dell'anticorpo (l'aflatossina M1) ed emettere fluorescenza di luce verde o arancione. Per valutarne l'applicazione

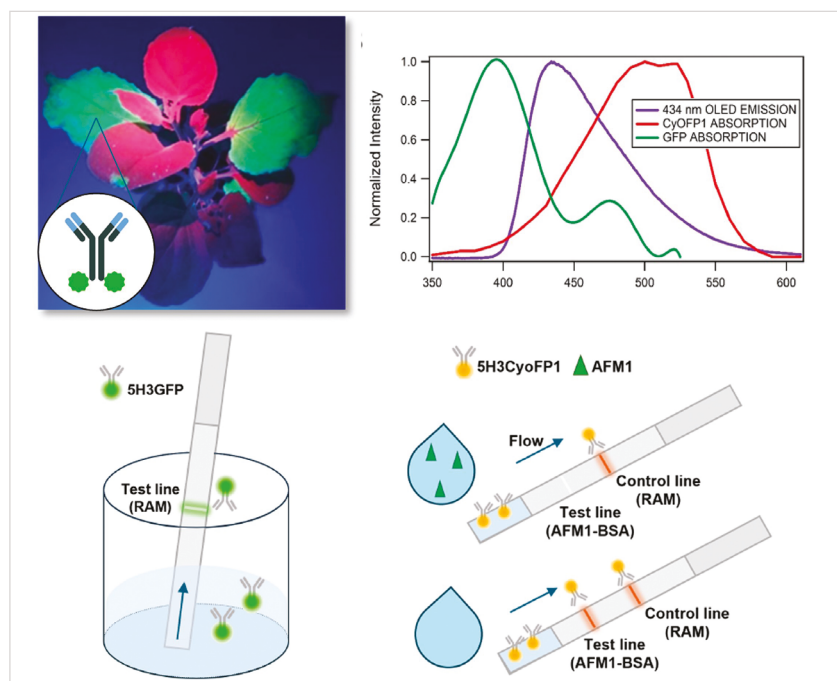


Figura 3 - Produzione in pianta di anticorpi fusi a proteine fluorescenti e loro utilizzo in dispositivi diagnostici quali LFIA (rappresentazione schematica) e biosensore OLED. A: pianta di *N. benthamiana* esprime un anticorpo fuso alla proteina GFP ed illuminata con luce ultravioletta per ottenere l'emissione di luce fluorescente verde; B: grafico degli spettri di emissione dell'OLED e di assorbimento delle due proteine fluorescenti fuse all'anticorpo (GFP e CyOFP1); C e D: rappresentazione schematica dei sistemi LFIA realizzati con gli anticorpi fusi alle due proteine fluorescenti (con e senza competizione con la molecola d'interesse diagnostico, aflatossina M1).

pratica in campo diagnostico, gli anticorpi fluorescenti sono stati utilizzati per mettere a punto due sistemi di screening rapido per la rilevazione dell'aflatossina M1: un immunotest LFIA e un dispositivo basato su OLED. Per entrambi i sistemi diagnostici, sono stati ottenuti segnali di fluorescenza antigene-specifici ed è stato testato un preliminare saggio competitivo con la tossina (Figura 3). Questo studio di approccio multidisciplinare (con competenze di biologia, biochimica, chimica e fisica), coordinato da ENEA è stato pubblicato sulla prestigiosa rivista internazionale *Plant Biotechnology Journal*^[5]. Naturalmente questi saggi necessitano di ulteriore implementazione, ma i risultati ottenuti dimostrano una concreta possibilità di sviluppare nuovi e rapidi sistemi analitici basati su anticorpi ricombinanti prodotti in un sistema sostenibile come la pianta.

per info: cristina.capodicasa@enea.it

Bibliografia

1. European Commission: Directorate-General for Health and Food Safety, Alert and Cooperation Network – 2024 annual report, Publications Office of the European Union, 2025. <https://data.europa.eu/doi/10.2875/0397221>
2. Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione, del 25 aprile 2023, relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006 (GU L 119 del 5.5.2023, pag. 103).
3. Capodicasa, C.; Bastiani, E.; Serra, T.; Anfossi, L.; Catellani, M. Design of a Diagnostic Immunoassay for Aflatoxin M1 Based on a Plant-Produced Antibody. *Toxins* 2022, 14, 851. <https://doi.org/10.3390/toxins14120851>
4. Capodicasa C. & Catellani M. (2023). Immunoglobuline G fuse biotecnologicamente all'enzima perossidasi (Brevetto italiano n. 102023000016701 – Titolare: ENEA). Ufficio Italiano Brevetti e Marchi.
5. Sterpa R, Catellani M, Melpignano P, Serra T, Anfossi L, Capodicasa C. Generation and plant production of recombinant fluorescent immunoglobulin G as innovative immunodiagnostic reagents. *Plant Biotechnol J.* 2025 Jul 1. doi: 10.1111/pbi.70235.