



**Relazione scientifica sull'attività di ricerca svolta dal Prof. Sergei A. EREMIN  
nell'ambito del programma Short-Term Mobility anno 2007**

Il Prof. Sergei A. Eremin (Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia), nell'ambito del programma Short-Term Mobility 2007, ha frequentato i laboratori dell'ISPA-CNR di Bari dal 20 al 30 settembre 2007. In tale periodo il Prof. Eremin ha svolto attività di ricerca nell'ambito del programma di ricerca dal titolo "Sviluppo di un metodo immunochimico per la determinazione di ocratossina A in mosto e vino".

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina che produce effetti nefrotossici, epatotossici, teratogenici, immunotossici e cancerogeni su molte specie animali. La Commissione Europea (Regolamento CE N. 1881/2006) ha stabilito i tenori massimi ammissibili di OTA nel vino e bevande a base di mosto d'uva e succo d'uva destinati al consumo umano diretto fissandoli a 2 ppb ( $\mu\text{g/mL}$ ). La disponibilità di metodi analitici affidabili, accurati, sensibili e rapidi per la determinazione di OTA nel vino è di fondamentale importanza al fine di valutare correttamente i livelli di contaminazione e salvaguardare il consumatore dal rischio derivante all'esposizione a tale micotossina.

L'obiettivo del programma è stato quello di sviluppare un immunosaggio rapido, basato sulla tecnica della Polarizzazione di Fluorescenza (FP), per la determinazione di OTA in campioni di mosto e vino. La FP è una tecnica analitica che consente di studiare in tempo reale le interazioni molecolari in soluzione che coinvolgono molecole fluorescenti mediante il monitoraggio della loro mobilità. L'immunosaggio FP si basa sulla competizione in soluzione tra l'analita e un derivato fluorescente dell'analita (tracciante) nei confronti di un anticorpo monoclonale specifico. La polarizzazione di fluorescenza dipende dalla velocità di rotazione della molecola fluorescente in soluzione che a sua volta dipende dalla sua dimensione molecolare. Il tracciante in soluzione ha un'elevata velocità di rotazione ed una bassa polarizzazione invece l'associazione con l'anticorpo conduce a valori di polarizzazione elevati. La presenza di analita libero riduce la quantità di anticorpo che lega il tracciante e riduce quindi la polarizzazione. Il valore di

polarizzazione, espresso in termini di unità di millipolarizzazione (mP), è quindi inversamente proporzionale al contenuto di analita in soluzione e ne consente la quantificazione.

La prima parte dell'attività di ricerca svolta presso l'ISPA-CNR ha riguardato l'isolamento e caratterizzazione di due immunoreagenti fluorescenti dell'OTA (traccianti) sintetizzati dal Prof. Eremin presso i laboratori della Moscow State University. I traccianti utilizzati sono addotti dell'OTA con la fluoresceina, la fluoresceintiocarbamiletildiammin-OTA (OTA-EDF) e la fluoresceintiocarbamilglicinetildiammin-OTA (OTA-Gly-EDF). L'isolamento dei traccianti è stato realizzato mediante TLC (Thin Layer Chromatography). In particolare le miscele di reazione sono state purificate mediante TLC utilizzando come eluente in primo luogo il cloroformio e successivamente la miscela cloroformio:metanolo (4:1, v/v). Le bande prevalenti sono state raccolte e solubilizzate in metanolo. Le diverse aliquote ottenute sono state testate mediante l'utilizzo di tre diversi anticorpi monoclonali specifici per l'OTA (MAb OTA-2 e OTA-3 forniti dalla Moscow State University e MAb OTA-BV fornito dall'ISPA-CNR) mediante la tecnica FP. In particolare sono state valutate le diluizioni ottimali dei traccianti corrispondenti alle concentrazioni che forniscono un segnale di fluorescenza di circa due volte il segnale del tampone BB (tampone borato 50 mM contenente lo 0,1% di sodio azide, pH=8,6) utilizzato come solvente di lettura. Il lettore di polarizzazione di fluorescenza utilizzato è stato il Sentry FP100 (Diachemix Corporation, ILL, USA). Sono state inoltre valutate le diluizioni ottimali di anticorpo, ottenute in tampone BB, che producono un incremento di segnale FP pari al 80% del valore massimo rispetto al valore ottenuto con il rispettivo tracciante libero in soluzione. I migliori risultati, in termini di differenza di mP tra le soluzioni di MAb-tracciante e tracciante libero, sono stati ottenuti dall'interazione dell'anticorpo OTA-BV con i traccianti OTA-EDF e OTA-Gly-EDF. Al fine di incrementare la purezza dei traccianti ottenuti e di verificare l'effetto sulla relativa affinità nei confronti dell'anticorpo è stata realizzata una ulteriore purificazione delle aliquote dei traccianti analizzati. E' stata condotta un'ulteriore analisi TLC utilizzando la miscela cloroformio:metanolo (4:1, v/v) come eluente. Le frazioni ulteriormente purificate di ogni singolo tracciante sono state testate, attraverso analisi FP, nei confronti dell'anticorpo OTA-BV mostrando un notevole incremento di differenza di polarizzazione tra le soluzioni di MAb-tracciante e tracciante libero.

E' stato messo a punto l'immunosaggio competitivo con soluzioni standard di OTA in metanolo nell'intervallo di concentrazione 0,1-100 ng/ml. Sono state osservate apprezzabili differenze nel

valore di polarizzazione di fluorescenza ottenuto a concentrazioni di OTA di circa 10 ng/mL. Dall'analisi diretta, mediante immunosaggio FP, di un campione di vino, varietà Primitivo, naturalmente contaminato con OTA a 5 µg/mL (valore determinato con metodo HPLC) è stata osservata la presenza di un notevole effetto matrice che impedisce la determinazione di un corretto valore di polarizzazione. Tale effetto matrice è stato attribuito alla presenza nel vino di specie interferenti, probabilmente polifenoli e pigmenti, che alterano sia l'interazione antigene-anticorpo che direttamente la lettura della polarizzazione. In tal senso sono stati testati differenti processi di pre-trattamento del vino al fine di eliminare questi interferenti sia mediante l'uso di enzimi del tipo perossidasi (Horseradish Peroxidase) che attraverso purificazione su colonnine SPE (Solid Phase Extraction). Sebbene i migliori risultati in termini di purificazione e di valori di recupero di OTA sono stati ottenuti utilizzando la purificazione SPE con colonnine del tipo Strata™ X-C (Phenomenex, CA, USA), l'immunosaggio FP non ha consentito la corretta quantificazione del contenuto di OTA nel vino.

Ulteriori indagini sono necessarie sia al fine di incrementare la sensibilità dell'immunosaggio FP, sia per eliminare l'effetto matrice. In tal senso sono state pianificate le attività di ricerca per l'ottimizzazione e validazione dell'immunosaggio per l'analisi di campioni di mosto e di vino da svolgere sia presso i laboratori dell'ISPA che quelli della Moscow State University. L'attività di ricerca svolta in questo breve periodo ha tuttavia consentito l'avvio di una collaborazione scientifica tra l'ISPA e la Moscow State University con il trasferimento delle conoscenze di tecniche altamente specialistiche nel settore analitico delle micotossine.

Bari, 09 Ottobre 2007

Il proponente del Programma

Dr. Angelo Visconti