

## PRODUZIONE DI ANTICORPI ALTAMENTE SPECIFICI DIRETTI CONTRO L' AFLATOSSINA B1

### PRODUCTION OF HIGH SPECIFICITY ANTIBODIES AGAINST AFLATOXIN B1

ALESSANDRA GUIDI <sup>(1)</sup>, GIORGIO IANNONE <sup>(2)</sup>, LORENZO CASTIGLIEGO <sup>(1)</sup>,  
DANIELA GIANFALDONI <sup>(1)</sup>

#### RIASSUNTO

Le Aflatossine, appartenenti al più ampio gruppo delle micotossine, sono metaboliti tossici prodotti da *Aspergillus spp.*, la cui importanza ispettiva è legata alla contaminazione di alcune derrate alimentari e mangimi animali. Tali molecole sono responsabili di molti effetti biologici pericolosi per l'uomo e per gli animali. Si capisce quindi l'importanza di un controllo efficace e costante e la necessità di un continuo miglioramento delle metodologie di rilevamento grazie anche agli avanzamenti della ricerca biotecnologica. In questo lavoro sono riportate le fasi preliminari della messa a punto di un metodo immunologico, eventualmente applicabile al settore biosensoristico, per il rilevamento della Aflatossina B1 in vari tipi di substrati. In particolare, sono stati prodotti anticorpi policlonali di coniglio e di topo e monoclonali di topo che, dai test effettuati, hanno rivelato una buona affinità ed un'elevata specificità nei confronti di tale antigene, caratteristiche fondamentali per un possibile utilizzo su immuno-biosensori, oltre che per lo sviluppo di metodiche classiche.

Parole chiave: aflatossine, anticorpi monoclonali, contaminazione, alimenti.

#### SUMMARY

Mycotoxins are a structurally diverse group of secondary metabolites produced by different genera of fungi. They include Aflatoxins derived from *Aspergillus spp.* Such toxins are found world-wide in food and feed and exhibit a wide array of biological effects (genotoxic, carcinogenic, embryotoxic and teratogenic) in humans and animals. From here the importance of a continuous and efficient survey. In this work, with the aim to set up a rapid and sensitive immunological method, suitable for biosensors, we present the results obtained from the production and the characterization of anti-Aflatoxin

---

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa - Direttore Prof. Giovanni Braca.

<sup>(2)</sup> Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Pisa - Direttore Prof. Alberto Albertini.

B1 antibodies. Polyclonal antibodies against Aflatoxin B1 were produced in rabbits and mice by immunisation with Aflatoxin B1 covalently bound to Bovine Serum Albumin (BSA). Monoclonal antibodies specific for Aflatoxin B1, were obtained after fusion of mouse myeloma cells with splenocytes of immunised mice. In order to characterise our antibodies we have performed classical immunoenzymatic test (ELISA). Results shows that both polyclonal and monoclonal antibodies are able to bind the antigen with high selectivity and specificity. Particularly, our monoclonal antibodies are capable to discriminate Aflatoxin B1 from its hydroxylated form (M1), with a very good repeatability and then showing all the essential features to set up immunological analysis either classical or implying the use of immunosensors.

Key words: aflatoxins; monoclonal antibodies; contamination; toodstuff.

## INTRODUZIONE

Le Aflatossine e, più in generale, le micotossine, sono metaboliti secondari con attività tossica prodotti in opportune condizioni microclimatiche da alcune specie fungine. L'interesse ispettivo di queste tossine è legato al fatto che alcune derrate alimentari ed i mangimi costituiscono un substrato ideale per l'accrescimento dei funghi che le producono. Queste molecole, oltre ad essere molto diverse tra loro dal punto di vista chimico, presentano una vasta gamma di effetti biologici dovuta alla loro capacità di interagire con diversi organi e sistemi bersaglio (Hsiesh, 1987).

Le Aflatossine, in particolare, derivano dal metabolismo di funghi appartenenti al genere *Aspergillus spp.* e quelle che più frequentemente si rintracciano come contaminanti naturali sono i sottotipi B1, B2, G1, G2, M1 ed M2; le prime quattro si trovano soprattutto nei prodotti di origine vegetale mentre le ultime due si ritrovano nel latte. Queste molecole sono da anni oggetto di studio per il potenziale rischio legato alla loro presenza in alcuni substrati alimentari; com'è noto, infatti, hanno un elevato potere carcinogenico, teratogenico e mutageno sia negli animali che nell'uomo. In particolare, l'Aflatossina M1 (AM1), prodotta per idrossilazione metabolica a livello epatico della B1, è ritenuta uno dei maggiori carcinogeni epatici presenti in natura (Smith e coll., 1995). L'AM1 è conosciuta anche come "tossina del latte" per la sua documentata presenza nei prodotti lattiero caseari (latte e derivati). Essa viene escreta nel latte di bovine alimentate con mangimi inquinati da AB1; pertanto, l'esposizione

umana può avvenire attraverso il consumo di latte e prodotti caseari contaminati (Galvano e coll., 1996). Il rischio associato all'ingestione di AM1 è particolarmente elevato se si considera che il latte ed alcuni derivati hanno un largo impiego in una fascia di consumatori ad alto rischio (anziani, bambini ed immunodepressi). È chiara quindi l'esigenza di un costante controllo degli alimenti a rischio per questo tipo di contaminazione.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre anticorpi altamente specifici che garantiscano, tuttavia, un elevato grado di sensibilità e ripetibilità dei test, caratteristiche non facilmente riscontrabili nei prodotti commerciali che sono stati da noi utilizzati come campioni di controllo. Tali anticorpi verranno impiegati per la messa a punto di test immunologici rapidi, sia classici che associati all'utilizzo di biosensori (Hall, 2002), che consentano il rilevamento delle tossine nei substrati alimentari o nei fluidi biologici. Questo lavoro ci ha permesso di produrre anticorpi policlonali di topo e di coniglio contro l'AB1 e l'AM1 e anticorpi monoclonali di topo diretti specificamente verso l'AB1, con l'importante caratteristica di poter discriminare quest'ultima dall'isoforma AM1.

## MATERIALI E METODI

### *Antigeni*

Le Aflatossine, a causa del loro basso peso molecolare (c.a. 300 d), non sono in grado da sole di stimolare una risposta immunitaria adeguata. Per essere riconosciute dal sistema immunitario devono essere associate a proteine *carriers*; è stato quindi necessario l'utilizzo di coniugati per l'immunizzazione degli animali.

Gli immunogeni coniugati AB1-BSA e AM1-BSA sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich, così come le forme libere AB1 e AM1. Inoltre, al fine di valutare il titolo anticorpale specifico nei sieri degli animali immunizzati, abbiamo coniugato l'AB1 all'ovalbumina (AB1-OVA), *carrier* proteico diverso da quello commerciale, utilizzato per l'immunizzazione (Fun Chu e coll., 1977; Xiao e coll., 1995). Questo antigene si rende necessario nei test immunobiologici per evitare falsi positivi dovuti agli anticorpi diretti contro la BSA.

### *Animali*

Allo scopo di ottenere anticorpi diretti contro le isoforme AB1 e AM1, sono stati immunizzati sei topi Balb-C e due conigli New Zealand. Da questi animali sono stati prodotti degli anti-sieri utilizzando come antigene le preparazioni commerciali di AB1 e AM1 coniugate alla BSA (AB1-BSA e AM1-BSA).

I topi sono stati immunizzati con AB1-BSA tramite quattro iniezioni sottocutanee da 50 µg ciascuna, a distanza di due settimane una dall'altra; dopo quattro giorni dall'ultimo *boost* si è proceduto al salasso e al prelievo delle milze e dei timi. I due conigli sono stati immunizzati rispettivamente con AB1-BSA e con AM1-BSA, seguendo la medesima procedura utilizzata per i topi, aumentando la dose di immunogeno a 250 µg.

### *Metodiche*

#### *ELISA*

I test ELISA sono stati eseguiti su piastre per microtitolazione in PVC flessibile (Falcon 3911). Il substrato utilizzato per la reazione colorimetrica è una soluzione di PNPP (Para-Nitro-Phenil-Phosphate) in dietanolamina (4 mg/ml). I valori di assorbanza ottenuti vengono letti ad uno spettrofotometro per piastre da microtitolazione alla lunghezza d'onda di 405 nm.

#### *Purificazione degli anticorpi*

Al fine di selezionare e separare gli anticorpi anti-Aflatossina dagli altri anticorpi presenti nel siero, l'AB1 è stata legata covalentemente a microsferi magnetiche preattivate (Dynabeads M270 amine). La purificazione di tali anticorpi è stata eseguita incubando i sieri interi degli animali immunizzati con le microsferi ricoperte da AB1, le quali, in seguito, sono state raccolte per mezzo di magneti e lavate con tampone MES (Acido N-morpholin-Ethan-sulfonico) 0,1 M, pH 5. La dissociazione finale degli anticorpi specifici è stata effettuata tramite eluizione in soluzione di acido citrico 0,1 M, pH 2.

#### *Produzione e selezione di anticorpi monoclonali*

Al termine dei cicli di immunizzazione, il topo con il più alto titolo anticorpale specifico è stato sacrificato al fine di prelevare le cellule spleniche. I linfociti contenuti nella milza sono stati fusi con cellu-

le immortalizzate di plasmocitoma (P3X63), derivanti da una linea murina singenica. Dopo un intervallo di coltura di 2-3 settimane (in pozzetti da 300  $\mu$ l), necessario alla proliferazione degli ibridomi ottenuti, si è proceduto all'analisi dei terreni di coltura per selezionare i cloni secernenti gli anticorpi anti-AB1. A tale scopo abbiamo eseguito ELISA ed immunoblottings di conferma. I cloni positivi sono stati subclonati ed espansi (Coligan e coll., 1997).

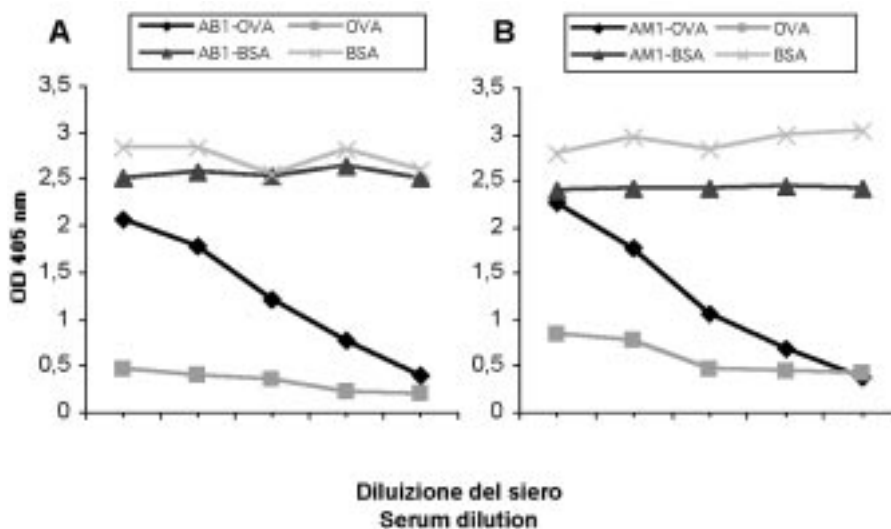
## RISULTATI

### *Anticorpi policlonali*

I sieri ottenuti dai conigli sono stati dapprima testati con ELISA diretti, utilizzando come antigeni preadsorbiti sulla fase solida di una piastra per microtitolazione sia i coniugati AB1-BSA (utilizzato per l'immunizzazione) e AB1-OVA sia i rispettivi antigeni di controllo rappresentati dalla porzione proteica di entrambi i coniugati (BSA e OVA).

I risultati dei test indicano un plateau di reazione degli antisieri a diluizioni non elevate sia nei confronti del coniugato AB1-BSA sia con la sola BSA, ad indicare un buon titolo di anticorpi diretti contro l'antigene di immunizzazione. Al contrario, la curva di reazione con il coniugato AB1-OVA risulta essere proporzionale alla diluizione del siero, mentre non si è osservata cross-reazione con la sola OVA, a dimostrazione del fatto che nella reazione immunitaria si sono sviluppati anticorpi contro l'aptene AB1 e AM1 (Fig. 1). La differenza fra le curve dei due coniugati è dovuta alla elevata quantità di anticorpi che si sviluppano contro la proteina *carrier* in seguito ad immunizzazione.

La specificità del riconoscimento antigene-anticorpo è stata confermata tramite ELISA in competizione: i sieri ottenuti dai conigli sono stati pre-incubati con soluzioni di AB1 o di AM1 a concentrazioni variabili ed, in seguito, fatti reagire con i complessi AB1-BSA o AM1-BSA (e altri antigeni di controllo, fra i quali la BSA e l'OVA). I risultati ottenuti hanno evidenziato che le Aflatossine esercitano una fortissima inibizione sul legame fra anticorpi serici e antigeni adsorbiti alla piastra (AB1-OVA), dimostrando un'inequivocabile presenza nei sieri di anticorpi specifici contro AB1 e AM1 (Fig. 2). Osservando

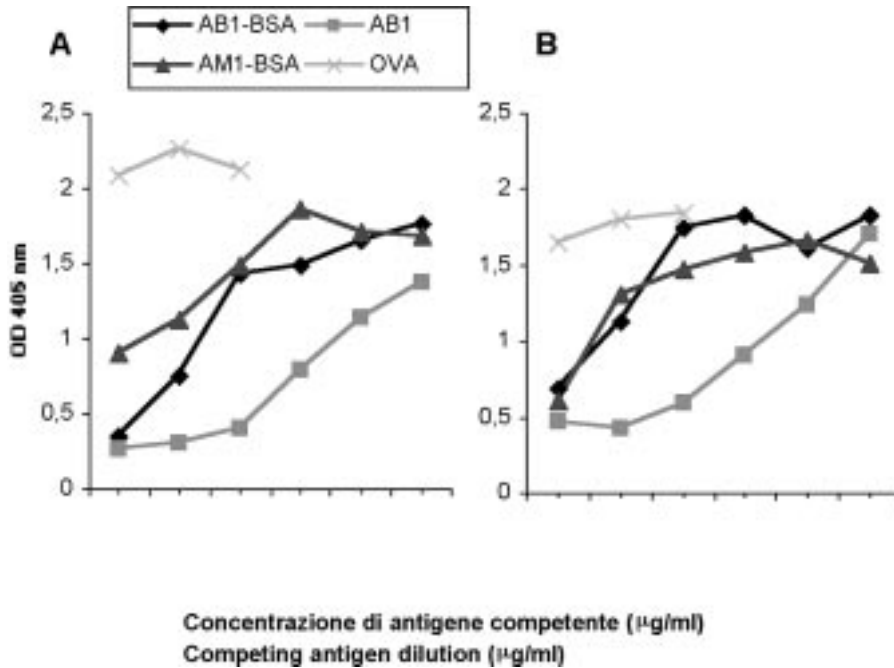


**Fig. 1.** (A) Curva di *binding* dell'antisiero anti-AB1-BSA di coniglio (*Anti-AB1-BSA rabbit antiserum binding curve*). (B) Curva di *binding* dell'antisiero anti-AM1-BSA di coniglio (*Anti-AM1-BSA rabbit antiserum binding curve*).

il grafico si può notare come gli anticorpi sviluppati contro l'aptene siano estremamente sensibili anche a concentrazioni molto basse di Aflatossina libera: infatti, il legame degli anticorpi serici all'antigene adsorbito alla piastra comincia ad essere rilevabile solo quando la concentrazione di Aflatossina nelle miscele di preincubazione scende sino a 0,6 ng/ml.

I risultati ottenuti con i sieri dei topi immunizzati con gli stessi antigeni sono paragonabili. È stata più volte riportata in letteratura una cross-reattività degli anticorpi diretti contro l'AB1 verso l'AM1 e viceversa, data l'estrema somiglianza delle due molecole. Questo inconveniente è quasi sempre riscontrabile anche negli anticorpi commerciali. Anche nel nostro caso è da sottolineare l'evidente cross-reattività dei sieri policlonali sulle due Aflatossine (AB1 e AM1).

L'inevitabile presenza di anticorpi anti-BSA ha reso necessaria una purificazione dei sieri, al fine di isolare gli anticorpi specifici diretti contro l'aptene target. La purificazione, eseguita come descritto brevemente in precedenza, non ha consentito un recupero pienamente soddisfacente. Tuttavia, test effettuati sulle soluzioni purificate hanno dimostrato la perdita della quasi totalità degli anticorpi anti-

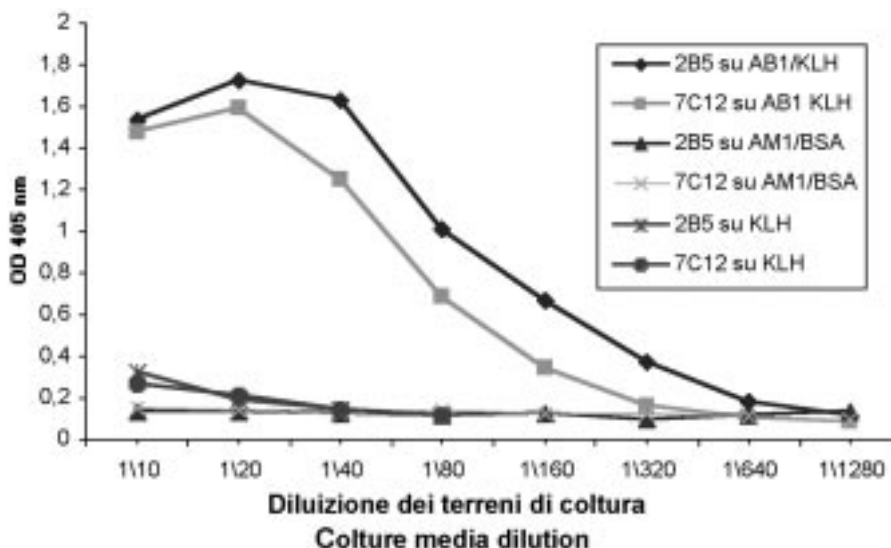


**Fig. 2.** (A) Curva d'inibizione dell'antisero di coniglio anti-AB1-BSA. Diluizione: 1/1000. Antigene legato alla piastra: AB1-OVA (*Anti-AB1-BSA rabbit antiserum inhibition curve. Dilution: 1/1000. Antigen on the plate: AB1-OVA*). (B) Curva d'inibizione dell'antisero di coniglio anti-AM1-BSA. Diluizione: 1/1000. Antigene legato alla piastra: AM1-OVA (*Anti-AM1-BSA rabbit antiserum inhibition curve. Dilution: 1/1000. Antigen on the plate: AM1-OVA*).

BSA. Inoltre, negli antisieri anti-AB1 è stata osservata una diminuzione nell'intensità della cross-reattività con l'AM1, a dimostrazione che negli animali immunizzati sono stati sviluppati cloni di anticorpi con maggiore affinità nei confronti della forma non idrossilata dell'Aflatossina.

#### *Anticorpi monoclonali*

In totale sono stati sottoposti a *screening* tramite ELISA i terreni di coltura di circa 300 cloni differenti, dei quali solo poche decine sono risultati positivi. I cloni con le migliori caratteristiche di specificità verso l'AB1 sono stati subclonati, selezionando ulteriormente le cellule con la più alta capacità proliferativa e secernente. Per l'esecuzione di questi *screening* è stato utilizzato un ulteriore coniugato com-



**Fig. 3.** Curva di *binding* dei terreni di coltura di ibridomi subclonati (2B5 e 7C12) su AB1-KLH. *Binding curve of subcloned hybridomas (2B5 e 7C12) culture media.*

posto dall'AB1 e dalla KLH; la scelta di questo *carrier* per gli esperimenti di *screening* è stata dettata dalla volontà di confermare ulteriormente la specificità degli anticorpi selezionati. Nella Figura 3 sono riportati i risultati finali di tipizzazione dei due subcloni più specifici tramite ELISA diretti.

Le curve di *binding* assumono il classico andamento sigmoidale e dimostrano una positività di legame antigene-anticorpo anche ad elevate diluizioni, con un rapporto ottimale terreno/tampone di circa 1/40. Da evidenziare l'assoluta mancanza di cross-reattività di tali monoclonali con l'AM1.

Ulteriori tests di caratterizzazione hanno rivelato che gli anticorpi selezionati appartengono alla classe delle IgM.

## DISCUSSIONE

Il notevole interesse ispettivo rivolto alle aflatosine ed, in generale, alle micotossine, è senza dubbio giustificato dal loro alto potenziale di rischio in ambito di sanità pubblica ed animale. Da qui l'impor-



tanza di un monitoraggio costante ed efficace di alimenti e mangimi soggetti a contaminazioni dirette ed indirette. Attualmente, nei laboratori Ufficiali, l'analisi delle Aflatossine viene effettuata mediante sistemi di cromatografia gassosa o liquida associata o meno alla spettrofotometria di massa, tecniche che richiedono, oltre ad una lunga preparazione del campione, strumentazioni molto costose e sofisticate (Sharma e coll., 2001; Elizalde-Gonzalez e coll., 1998; Holcomb e coll., 1992). La complessità di questo tipo di analisi ha spinto la ricerca verso la messa a punto di sistemi alternativi basati su metodi immunologici, anche ai fini di un controllo di tipo routinario, difficilmente effettuabile con i metodi cromatografici (Sibanda e coll., 1999). Tuttavia, i sistemi di rilevamento immunologico si sono dimostrati talvolta poco affidabili, presentando problemi di cross-reattività anticorpale e una non sempre adeguata affinità nei confronti dell'antigene.

Il nostro lavoro, in questa fase preliminare, ci ha permesso di ottenere anticorpi che sembrano meglio rispondere alle caratteristiche di specificità e sensibilità, fondamentali ai fini della diagnostica immunologica. Questi risultati rappresentano il punto di partenza per future applicazioni nell'ambito di tradizionali metodologie immunobiologiche e nel più recente settore della biosensoristica, la cui versatilità costituisce un valido supporto nel campo dell'ispezione alimentare.

## BIBLIOGRAFIA

- COLIGAN J.E., KRUISBEEK A.M., MARGULIES D.H., SHEVACH E.M., STROBER W. (1997). Current protocols in immunology. Vol. 1, cap 2.5; John Wiley & Sons editions, New York.
- ELIZALDE-GONZALEZ M.P., MATTUSCH J., WENNRICH R. (1998). Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography*, 828: 439-444.
- FUN CHU S., STEPHEN HSIA M.T., PIERA SUN S. (1977). Preparation and characterization of aflatoxin B1-1-(O-carboxy-methyl) Oxime. *Journal of AOAC*, 60: 791-794
- GALVANO F., GALOFARO V., GALVANO G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- HALL R.H., (2002). Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. *Microbes Infect.*, 4 (4): 425-432.
- HOLCOMB M., WILSON D.M., TRUKSESS M.W., TOMPSON H.C. (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *Journal of Chromatography*, 624: 341-352

- HSIEH D.P.H. (1987). Modes of action of mycotoxin. *Mycotoxin in food* (ed. P. Krogh): 149-176. Academic Press, London.
- SHARMA M., MÀRQUEZ C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology*, 93: 109-114.
- SIBANDA L, DE SAEGER S, VAN PETEGHEM C. (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Int J Food Microbiol*, 48 (3): 203-209.
- SMITH J.E., SOLOMONS G., LEWIS C., ANDERSON J.C. (1995). Role of mycotoxin in human animal nutrition and health. *Natural Toxin*, 3: 187-192.
- XIAO H., CLARKE J.R., MARQUARDT R.R., FROHLICH A.A. (1995). Improved Methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2092-2097.