



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA

"TOR VERGATA"

Macroarea di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

*"Sviluppo e Applicazione del Saggio ELIME per la determinazione di HAV
nelle acque di lavaggio di alimenti destinati al consumo umano"*

RELATORE:

Prof.ssa Laura Micheli

Prof.ssa Danila Moscone

LAUREANDO:

Cristine D'Agostino

RELATORE ESTERNO:

Dott.ssa Elisabetta Suffredini

Contro-RELATORE:

Prof. Giorgio Ricci

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1: Virus dell'Epatite A (HAV)	
1.1 Epatite A (HA) – Generalità	2
1.2 Virologia	4
1.3 Patogenesi	6
1.4 Diagnosi	7
1.5 Approccio al paziente – Profilassi	8
1.6 Epidemiologia	8
1.7 Acque contaminate – Veicolo d'infezione	12
CAPITOLO 2: Tecniche per il rilevamento di HAV	
2.1 Acque potabili e destinate al consumo umano	14
2.2 Metodi microbiologici per l'analisi delle acque	15
2.3 Tecniche per il rilevamento di HAV nelle acque	17
2.4 Tecniche immunoenzimatiche	19
2.4.1 Anticorpi	20
2.4.2 Interazione Antigene-Anticorpo	22
2.4.3 Saggio ELISA(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	24
2.4.3.1 Saggio ELIME (Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical)	26
2.4.3.2 Traccianti enzimatici	28
2.5 Tecniche molecolari	29
2.5.1 Sonde molecolari e PCR (Polymerase Chain Reaction)	29
2.5.2 Sistemi integrati colture-PCR	31
2.5.3 PCR "Real-Time"	32
SCOPO DEL LAVORO	34

CAPITOLO 3: Materiali e Metodi

3.1	Reagenti e tamponi	35
3.2	Particelle magnetiche	37
3.3	Protocollo saggio ELIME per HAV	40
3.3.1	Protocollo preparazione MNPs-pDa	40
3.3.2	Protocollo preparazione Dynabeads® M-280 Tosilattivate	42
3.3.3	Protocollo preparazione particelle magnetiche Goat Anti-Mouse IgG	44
3.4	Inattivazione del virus	46
3.5	Protocollo di estrazione del virus da campioni fortificati di acqua da rubinetto	46
3.6	Protocollo Real-time RT-PCR ISO 15216-1:2017	48
3.7	Elettrodi Screen Printed (SPE)	51
3.7.1	Pretrattamento degli elettrodi	53
3.8	Strumentazione	53
3.9	Tecniche elettrochimiche	57
3.9.1	Amperometria	58
3.9.2	Voltammetria ad impulsi differenziali (Differential Pulse Voltammetry - DPV)	59
3.10	Analisi dei dati	60

CAPITOLO 4: Risultati e Discussioni

4.1	Premessa	62
4.2	Nanoparticelle paramagnetiche ricoperte di polidopamina (MNPs-pDa)	63
4.3	Microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate (Goat Anti-Mouse IgG Magnetic Beads) – Ottimizzazione del saggio ELIME per la determinazione di HAV	67
4.3.1	Curva di binding – Effetto della concentrazione di MAb _i sulla risposta del segnale	67
4.3.2	Studio dell'agente bloccante a diverse concentrazioni dell'anticorpo di labelling MAb _i -AP	68
4.3.3	Curva di calibrazione del saggio ELIME non competitivo per HAV	70
4.3.4	Analisi dei campioni di virus in coltura	71

4.3.5	Estrazione di HAV da acqua potabile contaminata sperimentalmente	74
4.3.6	Prova di confronto – Contaminazione sperimentale di acqua potabile	78
4.4	Microparticelle superparamagnetiche tosilattivate (Dynabeads® M280 Tosylactivated)	82
Conclusioni		84
Bibliografia		85
Ringraziamenti		89

*“Niente nella vita va temuto,
dev'essere solamente compreso.
Ora è tempo di comprendere di più,
così possiamo temere di meno.”*

Marie Curie

*Con Immenso Affetto
alla Mia Famiglia ed Alessandro*

INTRODUZIONE

Le malattie virali idrotrasmesse sono patologie infettive dell'uomo e degli animali associate all'uso diretto o indiretto di acqua. Tra di esse l'Epatite A (HA) ricopre una particolare rilevanza per l'elevato numero di individui che ogni anno, a livello globale, contraggono l'infezione (1.4 milioni di casi sintomatici), e per le recenti *outbreaks* sviluppatesi in Europa a seguito di consumo di vegetali e frutti rossi contaminati secondariamente (1.589 casi nel biennio 2013-2014). Attualmente il controllo delle contaminazioni virali nelle acque e negli alimenti viene effettuato tramite misura diretta di campioni sottoposti ad analisi mediante real-time RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), dopo centrifugazione per la matrice acqua e precipitazione per gli alimenti di origine non animale.

Scopo di questo lavoro è stato la realizzazione di un metodo di monitoraggio innovativo che permetta la rivelazione del virus dell'Epatite A in acque di lavaggio di alimenti destinati al consumo umano. Il metodo sviluppato non richiede la necessità di specifiche strumentazioni di laboratorio, consentendone idealmente, attraverso l'uso di una strumentazione portatile e poco costosa, uno screening della presenza di HAV nella materia prima direttamente nelle linee di produzione. Tale approccio consentirebbe una riduzione dei tempi di analisi e dei costi, con necessità di invio al laboratorio per analisi via PCR dei soli campioni sospetti.

CAPITOLO 1

Virus dell'Epatite A (HAV)

1.1 Epatite A (HAV) – Generalità

L'epatite virale è un processo infiammatorio che interessa il fegato e può essere causato da diversi fattori, quali farmaci, malattie autoimmuni, esposizione a tossine e virus. Tra i virus identificati e riconosciuti come responsabili della maggior parte delle epatiti virali acute e croniche vi sono il virus dell'Epatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), Delta (HDV) ed E (HEV), i quali differiscono tra loro per dimensione, peso molecolare, ciclo replicativo, vie di trasmissione ed evoluzione clinica dell'infezione (Tab.1).

L'HAV è altamente trasmissibile e rappresenta una causa significativa fra le infezioni trasmesse da alimenti. Si verifica in tutto il mondo, sia sporadicamente sia in forma di epidemie, con tendenza alle recidive cicliche nel tempo. Ogni anno si stimano circa 1.4 milioni di casi di Epatite A in tutto il globo [1]. Il periodo di incubazione dell'Epatite A (HA) è tra 28 e 30 giorni, con un intervallo massimo di 15-50 giorni; la malattia è spesso asintomatica in bambini sotto i cinque anni e la sua gravità aumenta negli adulti oltre la maggiore età [2]. L'HAV è stabile nell'ambiente per diversi mesi, in grado di sopravvivere al congelamento e trasmissibile attraverso acqua e cibo contaminati, oltre che da persona a persona per via oro-fecale.

In Italia, il contagio o la presenza di Epatite A devono obbligatoriamente essere segnalati al Sistema Informativo delle Malattie Infettive (SIMI), secondo Decreto Ministeriale (DM) del 15/12/90, che si basa sulle notifiche dei medici curanti e prevede segnalazioni immediate per allertare gli operatori della sanità pubblica. Il flusso informativo previsto si svolge attraverso il medico ospedaliero o di base che diagnostica la malattia infettiva ed effettua la segnalazione agli Organismi Centrali (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità) ed alle Aziende Sanitarie Locali

(ASL) di competenza, incaricate della adozione di eventuali misure di profilassi a tutela della salute pubblica [3].

Tab.1 Caratteristiche cliniche e virologiche dei principali virus epatici.

Virus	HAV	HBV	HCV	HEV
Classificazione	<i>Picornavirus</i>	<i>Hepadnavirus</i>	<i>Flavivirus</i>	<i>Calicivirus</i>
Genoma	RNA	DNA	RNA	RNA
Trasmissione				
Oro-fecale	Sì	No	No	Sì
Sessuale	Possibile	Sì	Possibile	Possibile
Sangue	Possibile	Sì	Sì	Possibile
Incubazione	15-50 gg	30-180 gg	15-150 gg	15-60 gg
Cronicizzazione	No	Sì	Sì	No

1.2 Virologia

Il virus dell'Epatite A (HAV) è un virus a RNA appartenente agli *Hepatovirus*, un genere della famiglia dei *Picornaviridae*. L'HAV è privo di pericapside ed è costituito da un capsid icosaedrico dal diametro di 27 nm. L'insieme delle tre proteine del capsid (VP1, VP2, VP3) forma un protomero; cinque protomeri formano un capsomero caratterizzato da una parte centrale costituita da cinque proteine VP1 e da una fessura che le separa dalla parte restante dei protomeri costituita da VP2, VP3, VP4 e VP5 [4]. (**Fig.1**)

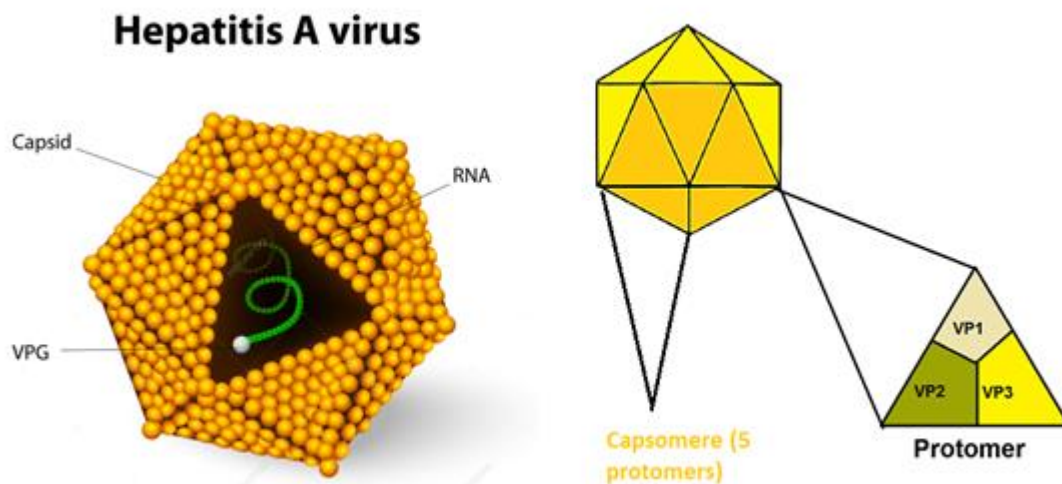


Fig.1 Schematizzazione della struttura del virus dell'Epatite A.

Le proteine del capsid VP1 e VP3 sono i principali siti leganti gli anticorpi. Il genoma consiste in un singolo filamento di RNA a polarità positiva lungo 7.5 kilobasi, a cui è legata una proteina (VPg), comprendente una regione 5' non tradotta con funzioni regolatorie, un ORF (*Open Reading Frame*) che codifica per proteine strutturali e non strutturali, ed una regione 3' non tradotta con una breve coda poliadenilata. L'ORF è suddiviso in tre regioni funzionali denominate P1, P2 e P3. La regione genomica P1 codifica i polipeptidi capsidici (VP1, VP2, VP3, VP4) mentre le regioni P2 e P3 codificano i polipeptidi non strutturali necessari per la replicazione virale [5] (**Fig. 2**).

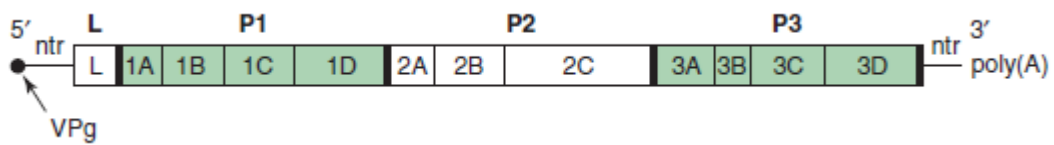


Fig.2 Struttura dell'RNA di picornavirus ed organizzazione genetica della sua poliproteina (barra aperta). *Ntr* si riferisce alle regioni non tradotte che stanno ai lati del genoma. *L* indica una proteina leader. *P1*, *P2*, *P3* si riferiscono alle proteine precursore scisse dalle proteinasi codificate dal virus rispettivamente in tre, quattro e tre prodotti terminali.

Gli anticorpi contro l'HAV umano provocati da una infezione naturale o sperimentale non distinguono i diversi ceppi di HAV, cioè non sono in grado di differenziare più di un tipo antigenico; esiste quindi un singolo sierotipo di HAV umano [4]. Morfologicamente (**Fig.3**) l'HAV non è distinguibile da altri virus appartenenti alla stessa famiglia, tuttavia possiede una caratteristica di maggiore resistenza all'inattivazione.

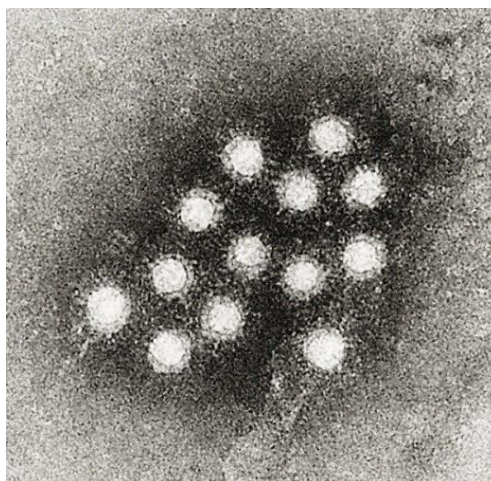


Fig.3 Virus dell'Epatite A visti al microscopio elettronico.

L'infettività è mantenuta anche dopo la permanenza di oltre due mesi in cibi, nelle acque e su molte superfici in ambiente umido o essiccato e per diversi anni a -20 °C. L'HAV risulta resistente alla maggior parte dei disinfettanti usati comunemente in agricoltura, in ambienti acidi e può sopravvivere sulla pelle più a lungo di molti altri patogeni umani virus e batteri [6]. Viene completamente inattivato in autoclave a 120°C dopo 20 minuti. Si ottiene inoltre una efficace inattivazione con formalina 3% e con composti contenenti cloro. Il virus cresce quasi esclusivamente nel fegato, ma sono stati rilevate altre sedi di replicazione quali l'orofaringe e l'intestino tenue [7].

1.3 Patogenesi

Una volta ingerito, l'HAV penetra attraverso l'epitelio orofaringeo o intestinale nella circolazione sanguigna. Il sangue lo trasporta nel fegato, dove si lega agli epatociti e penetra nel loro citoplasma. I virioni prodotti in seguito a replicazione sono espulsi dall'epatocita nella bile per esocitosi, per poi essere eliminati con le feci. Il virus è riscontrabile nelle feci da cinque giorni prima della comparsa dei sintomi e fino a dieci giorni dopo l'esordio [8].

Il periodo di incubazione dell'Epatite A (HAV) è tra 28 e 30 giorni, con un intervallo massimo di 15-50 giorni. I sintomi dell'infezione possono includere nausea, vomito, diarrea, urine scure, itterizia, febbre, mal di testa, perdita di peso e dolori addominali, accompagnati dalla perdita del desiderio di fumare sigarette e bere alcool. L'itterizia compare in più del 70% degli adulti infetti da HAV. Solitamente il decorso della patologia non ha durata maggiore di due mesi ma possono presentarsi casi di epatite acuta fulminante ed altre gravi complicazioni [9].

1.4 Diagnosi

L'infezione da Epatite A non può essere diagnosticata unicamente osservando i sintomi, i quali sono molto simili a quelli di molte altre patologie gastrointestinali. È necessario effettuare un prelievo di sangue e dapprima verificare l'aumento della concentrazione plasmatica di bilirubina (dovuto alla condizione di ittero) e delle transaminasi (dovuto ad un danno epatico). Quando l'infezione è in atto, il livello dell'alanina aminotransferasi (ALT-GTP) risulta molto più alto di quello dell'aspartato aminotransferasi (AST-GOT). Tale aumento è un indice abbastanza specifico di un danno epatico e precede l'aumento della bilirubina, coincidendo solitamente con l'inizio della manifestazione clinica.

Una diagnosi più accurata prevede la ricerca di anticorpi *IgG* e *IgM anti-HAV*, tramite saggio ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) o test radioimmunologici in campioni ematici di pazienti che hanno già contratto l'infezione. Gli anticorpi *IgG anti-HAV* appaiono nel sangue solamente dopo settimane o addirittura mesi dal contagio; un monitoraggio precoce delle immunoglobuline anti-HAV quindi comporterebbe un elevato numero di falsi negativi. I test per la ricerca di anticorpi *IgM anti-HAV* hanno una specificità maggiore del 95% e sono in grado di discriminare l'Epatite A acuta dalle altre forme di epatite. Non è da sottovalutare il rischio di falsi positivi dal momento che gli anticorpi continuano ad essere presenti nel circolo ematico anche quando l'infezione si è risolta. Gli anticorpi *IgM* rappresentano quindi un marker di infezione acuta mentre gli anticorpi *IgG* testimoniano una pregressa esposizione al virus dell'Epatite A [9]. (**Tab.2**)

Tab.2 Decorso temporale a partire dalla contrazione del virus.

- *Incubazione*: 2-7 settimane
- *Prodromi*: 3-5 settimane
- *Virus nel sangue*: 3-6 settimane
- *Virus nelle feci*: 2-8 settimane
- *Ittero*: 4-8 settimane
- *Aumento enzimi epatici*: 4-9 settimane
- *IgM anti-HAV*: a partire dalla 2° settimana, massimi dopo 4-5 settimane, decrescono lentamente
- *IgG anti-HAV*: a partire dalla 4°/5° settimana, superano il livello di IgM anti-HAV, massimi dopo 9-10 settimane

1.5 Approccio al paziente – Profilassi

Generalmente ai pazienti che hanno contratto il virus dell'Epatite A si consiglia di stare a riposo evitando sforzi fisici e di assumere molti liquidi, adottando una dieta equilibrata onde evitare di affaticare il fegato già compromesso dalla patologia. Nel caso di Epatite A fulminante è richiesto inoltre un trapianto di fegato di emergenza. Per le donne in stato interessante solitamente viene programmato un parto pretermine in quanto la patologia potrebbe comportare complicanze gestazionali e quindi gravi conseguenze per il futuro nascituro. La profilassi si basa sulla *vaccinazione* e sull'*immunizzazione passiva* tramite immunoglobuline [9].

1.6 Epidemiologia

L'Epatite A (HAV) diffusa in tutto il mondo (**Fig.4**), sia in forma sporadica sia epidemica, è strettamente correlata alle condizioni igienico-sanitarie della popolazione. Tradizionalmente vengono descritte tre aree geografiche di endemicità [10], correlate alla presenza di HAV:

1. le aree ad *ALTA* endemicità, che includono paesi in via di sviluppo quali Africa, America del Sud, Cina ed India con scarse condizioni igienico-sanitarie, nelle quali la maggior parte delle infezioni si hanno nei bambini di età inferiore ai 10 anni e sono spesso asintomatiche. In queste zone solitamente l'infezione non si presenta in forma epidemica, poiché adolescenti e adulti risultano immuni, costituendo quindi una barriera alla diffusione dell'infezione;
2. le aree ad endemicità *INTERMEDIA*, che includono i paesi in via di sviluppo con condizioni igienico-sanitarie variabili come Romania, Russia e Turchia. In queste zone l'infezione si manifesta soprattutto negli adulti e si possono verificare importanti epidemie;
3. le aree a *BASSA* endemicità, che comprendono i paesi industrializzati con buone condizioni igienico-sanitarie, come America del Nord, Australia, Francia e Spagna. In queste aree l'infezione colpisce maggiormente gli adolescenti e gli adulti. I principali fattori di rischio sono rappresentati da viaggi in zone endemiche e da consumo di alimenti (soprattutto frutti di mare e frutti di bosco congelati) o acque contaminate.

Geographic Distribution of HAV Infection

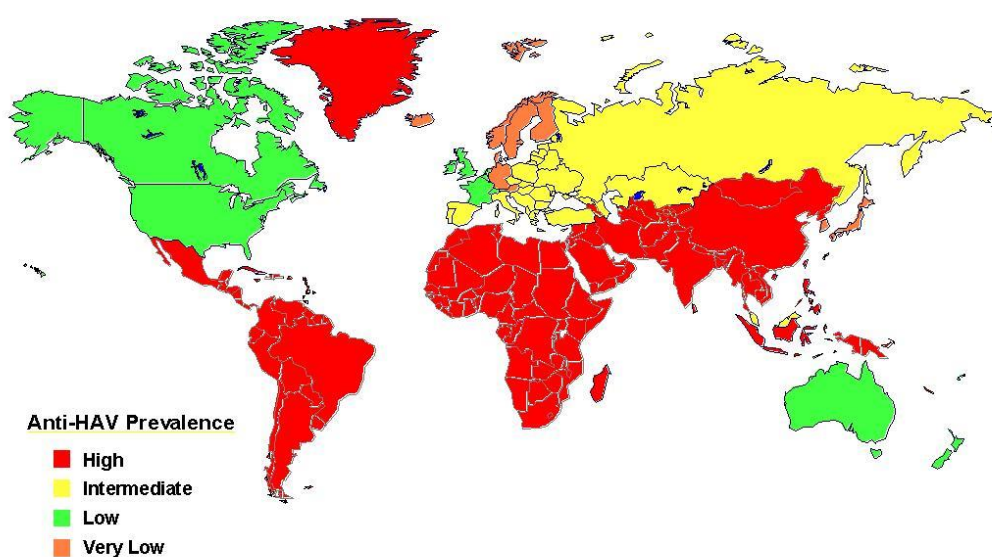


Fig.4 Distribuzione geografica dell'infezione da HAV.

L'Italia è una nazione che presenta endemicità *MEDIO-BASSA*. Negli ultimi decenni si è assistito ad un profondo mutamento dell'epidemiologia delle epatiti virali, dovuto a diversi determinanti quali il miglioramento delle condizioni igieniche e socio-economiche, la riduzione della dimensione dei nuclei familiari e la maggiore conoscenza e consapevolezza del rischio di trasmissione.

Attraverso il Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) è stato possibile documentare questa evoluzione (**Fig.5**) e continuare a monitorare lo scenario epidemiologico. Il SEIEVA è stato implementato nel 1985 presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ad integrazione della sorveglianza routinaria affidata al Sistema Informativo delle Malattie Infettive (SIMI) del Ministero della Salute, al fine di una più approfondita conoscenza dell'epidemiologia dell'epatite virale a livello nazionale [11]. Nell'ambito della SEIEVA l'integrazione delle informazioni, raccolte con i questionari epidemiologici, permette la stima dell'incidenza di malattia e del contributo relativo dei diversi fattori di rischio. Ciò consente di definire misure preventive da adottare al fine di una massima collaborazione tra l'ISS e le ASL.

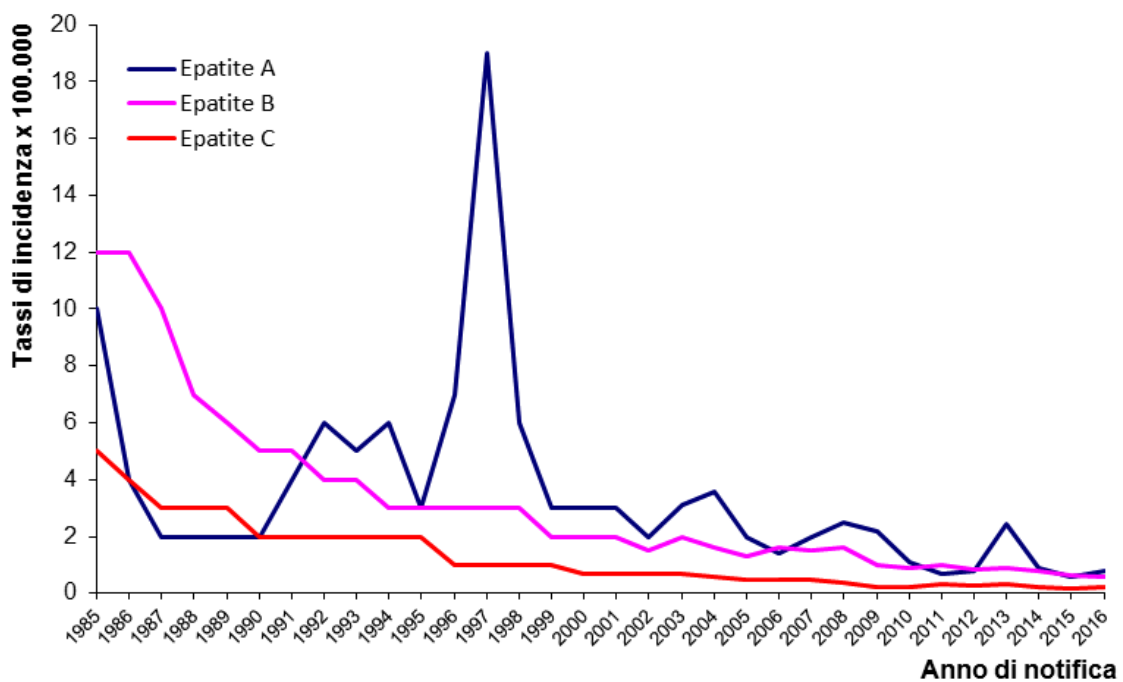


Fig.5 Scenario epidemiologico in Italia dal 1985 al 2016.

Negli ultimi trent'anni si è assistito ad un calo progressivo dell'incidenza dell'Epatite A, da 4/100000 casi nel 1991 a 2.2/100000 nel 2009, scendendo poi al di sotto dell'1/100000 casi negli ultimi due anni precedenti i nuovi outbreaks. Tuttavia, dopo le epidemie che si sono verificate negli anni tra il 1990 e il 2000, con un picco significativo in Puglia negli anni 1996-1998 in seguito al consumo di frutti di mare crudi [12], nel 2004 è esploso un nuovo focolaio in Campania e nel biennio 2013-2014 si è assistito ad una nuova epidemia nel nord di Italia (Bolzano, Emilia Romagna, Friuli Venezia Giulia e Trento) causata dal consumo di frutti di bosco surgelati contaminati da HAV [13].

Studi epidemiologici, condotti negli anni 2001-2006, hanno dimostrato come il consumo di frutti di mare crudi in Italia rappresenti la fonte più rischiosa di infezione da HAV [14]. Nell'Unione Europea (UE), la normativa che regola la vendita di molluschi (*Reg. CE 2073/2005 e s.m.i.*) valuta l'idoneità alla commercializzazione mediante l'utilizzo di indicatori batterici di contaminazione fecale, ma l'assenza di tali batteri non implica necessariamente l'assenza di virus [15]. Infatti, sebbene la depurazione dei molluschi bivalvi sia il metodo comunemente utilizzato per ottenere molluschi conformi ai criteri della normativa, tale pratica risulta inadeguata per la completa eliminazione di virus che permangono per diversi giorni anche dopo aver trasferito i frutti di mare in acqua pulita. La seconda fonte di infezione è poi rappresentata dal consumo di frutti di bosco congelati o blandamente cotti. Studi scientifici dimostrano infatti che attraverso l'acqua contaminata, utilizzata per l'irrigazione, i virus si depositano sulla superficie esterna dei vegetali e che esista un meccanismo di internalizzazione e di trasporto degli stessi tramite le radici [16]. Nel 2014 a fronte di poche decine di casi in Europa, in Italia sono stati registrati circa 2000 casi di Epatite A dovuti a tale alimento, che rappresentano oltre il 95% del totale (**Fig.6**) [12-15].

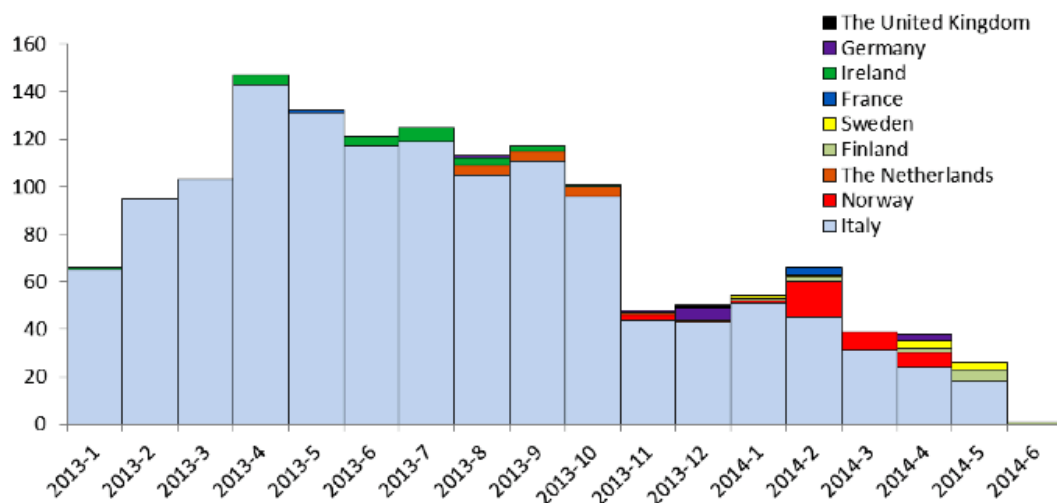


Fig.6 Casi di Epatite A in Italia e Europa causati dal consumo di frutti di bosco da Gennaio 2013 a Giugno 2014. Fonte EFSA (*Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare*).

1.7 Acque contaminate – veicolo d’infezione

Le epidemie di Epatite A sono quindi frequentemente associate all’ingestione di cibo contaminato. In Italia, la fonte principale di infezione è rappresentata dai molluschi provenienti da allevamenti oggetto di contaminazione da parte del virus e consumati crudi o poco cotti [17]. I molluschi filtrano giornalmente grandi quantità di acqua per ricavare ossigeno e cibo e durante tale processo possono concentrare il virus fino a 60 volte. Poiché le acque superficiali di laghi, fiumi e mari accolgono i liquami urbani e dal momento che la depurazione non è sempre ottimale, l’acqua può costituire un veicolo d’infezione [18]. Il problema della contaminazione di campioni ambientali (acque destinate ad uso potabile, alla coltivazione di molluschi o all’irrigazione) da parte del virus dell’Epatite A, è rilevante a livello sanitario.

Da molti anni la potabilità delle acque o della qualità di frutti di mare e vegetali freschi viene determinata in base alla presenza di batteri coliformi o diversi tipi di fagi. Tuttavia il virus dell’Epatite A (e in generale i virus enterici) mostra una maggiore resistenza nell’ambiente e ciò rende necessario effettuare una rilevazione

diretta, dal momento che i comuni organismi indicatori non rappresentano uno standard adatto [19].

Fino ad ora sono state adottate differenti metodiche per la determinazione dell'HAV, sia tradizionali (*colture cellulari, ELISA o RIA*) che molecolari (*sonde molecolari e RT-PCR*) ma l'elevata variabilità nella *sensibilità* richiede la necessità di un nuovo metodo di monitoraggio innovativo, sensibile, pratico e poco costoso.

CAPITOLO 2

Tecniche per il rilevamento di HAV

2.1 Acque potabili e destinate al consumo umano

A partire dagli anni '70-'80 l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta prevalentemente al controllo delle sostanze chimiche potenzialmente pericolose presenti nelle acque destinate al consumo umano. In questo ambito sono state effettuate molte indagini riguardanti il rischio chimico associato alle acque potabilizzate, mentre è stato trascurato il rischio legato alla componente microbiologica. Il riscontro di un aumento del numero di epidemie, correlate al consumo di acqua potabile e di alimenti rinfrescati con acqua potabile contaminata da reflui, ha portato ad una maggiore attenzione verso le problematiche connesse alla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche [20].

L'Acqua potabile, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), "non deve dare effetto lesivo per la salute dell'uomo per l'intera durata della sua vita", deve essere gradevole, non deve determinare rischi sanitari imputabili alla presenza di sostanze chimiche e deve essere povera di germi e priva di agenti patogeni. Inoltre deve essere incolore, limpida, fresca, inodore e di buon sapore. Con acqua destinata al consumo umano si intende invece non solo quella potabile ma anche l'acqua necessaria a predisporre e lavare gli alimenti da consumarsi crudi o cotti. Essa deve pertanto rispondere a criteri sanitari ben precisi e possedere caratteristiche chimiche, fisiche e chimico-fisiche tali da consentirne tutti gli usi oltre quello potabile. Ogni normativa elenca quindi i parametri intesi a caratterizzarla, in particolare le Concentrazioni Massime Ammissibili (CMA) volte a scongiurare effetti rischiosi o indesiderabili per la salute, ed i Valori Guida (VG), volti a migliorarne la qualità [21]. Le normative finora in uso mirano a contenere l'inquinamento fecale, misurato attraverso standard che tengono conto di indicatori di inquinamento fecale (coliformi totali e fecali, streptococchi fecali, colifagi) e patogeni enterici (Salmonella ed enterovirus). Tuttavia questo approccio microbiologico risulta spesso

carente e superato e non basta a scongiurare il pericolo di epidemie idrotrasmissibili.

2.2 Metodi microbiologici per l'analisi delle acque

Per la ricerca di microrganismi di natura batterica (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Legionella*, etc.) l'esame si basa generalmente sulla possibilità di coltivare, su idonei substrati, i batteri contenuti nell'acqua in esame, usando particolari metodologie finalizzate all'individuazione differenziale di specie o di gruppi microbici che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e di qualità dell'acqua. I metodi batteriologici tradizionali sono basati sulla semina in terreni di coltura e sulla incubazione in specifiche condizioni, di aliquote di acqua da esaminare.

Dopo l'incubazione, la presenza/assenza del microrganismo viene messa in evidenza sulla base della variazione subita dal terreno come intorbidamento o cambiamento del colore. Successivamente si eseguono saggi specifici sulla coltura iniziale per individuare i microrganismi ricercati e, quindi, confermarne la presenza. Usando terreni differenti e variando la temperatura di incubazione è possibile rendere selettivo il metodo per specifici gruppi microbici.

Si può, inoltre, applicare il metodo del numero più probabile (*MPN*), o anche detto metodo dei tubi multipli, effettuando una semina di quantità scalari del campione di acqua al fine di realizzare una stima probabilistica del numero di microrganismi presenti, ovvero, in alternativa, determinare la carica microbica mediante semina su terreni agarizzati e conta del numero di colonie sviluppate, che permette di risalire al numero dei batteri presenti per unità di volume del campione, partendo dall'assunto che ogni colonia abbia avuto origine da un solo microrganismo [22]. Alternativamente con una filtrazione su membrana si possono esaminare elevati volumi di acqua e rilevare direttamente (per conteggio) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato.

Diversamente, la ricerca di organismi di altra natura come virus e parassiti (Epatite A, Enterovirus, Adenovirus, Poliovirus, etc.) comporta l'uso di metodologie più complesse, generalmente costose, specifiche per l'organismo ricercato ed applicabili da personale specializzato. Inoltre, queste tecniche richiedono tempi analitici più lunghi e necessitano di diverse fasi di preparazione del campione stesso, legate all'esigenza di concentrare grandi volumi di acqua.

Dalla difficoltà di usare tecniche di routine per la determinazione di tutti i possibili organismi patogeni presenti nelle acque, deriva la necessità di focalizzare quali siano i microrganismi *indicatori di contaminazione* più indicativi. I microrganismi storicamente proposti come indicatori di inquinamento fecale nell'ambiente, per poter definire la qualità e la diversa destinazione d'uso dell'acqua, sono:

- *coliformi totali* (coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica);
- *coliformi fecali* (batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*);
- *streptococchi/enterococchi* (batteri appartenenti al genere *Streptococcus*, *Ent. faecium*, *durans*, *pseudoavium*, *malodoratus*, *faecalis*, *colombae*, *saccharolyticus*);

La ricerca dei *patogeni* viene effettuata, rispetto agli indicatori, su quantitativi elevati di acqua. I microrganismi considerati *indicatori* di inquinamento fecale sono invece più uniformemente diffusi e presenti nell'ambiente idrico. Le loro concentrazioni nelle acque sono variabili a seconda del grado di contaminazione cui è soggetto il corpo idrico (**Tab 3**). Pertanto, i volumi di acqua da analizzare per il rilevamento di microrganismi indicatori nei diversi casi possono variare da 1 mL di una diluizione del campione a 100 mL del campione tal quale, in base alla qualità dell'acqua che si va ad esaminare ed al gruppo di microrganismi che si va ricercando. In ogni caso, il valore numerico ottenuto dall'analisi deve essere riportato al volume di 100 mL.

Tab.3 Concentrazioni indicative del numero di microrganismi in acque reflue per 100 mL di acqua.

Coliformi totali	10^7 - 10^9
Coliformi fecali	10^5 - 10^7
Streptococchi fecali	10^4 - 10^6
Enterobatteri patogeni	10^2 - 10^3
Enterovirus	10 - 10^3

I protocolli operativi adottati per la ricerca dei parametri microbiologici sono stati proposti da enti ed organizzazioni internazionali quali *ISO* (Organizzazione Internazionale per la Normazione), *APHA* (Agenzia per la Protezione dell'Ambiente), *USEPA* (Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti), *AOAC* (Associazione dei Chimici Analitici Ufficiali), *WHO* (Organizzazione Mondiale della Sanità). Alcuni di essi fanno inoltre parte di una serie di metodi proposti a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità (*ISS*) e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (*MiPAAF*) [23].

2.3 Tecniche per il rilevamento di HAV nelle acque

Analogamente alla ricerca di altri virus enterici, la messa in evidenza dell'HAV da campioni ambientali è piuttosto complessa e legata a diverse problematiche:

- 1 *la quantità di virus nel campione di acqua/cibo è spesso bassa (il virus è veicolato dal cibo ma in esso non si replica);*
- 2 *il campione deve essere concentrato (con possibile perdita o inattivazione durante il trattamento);*
- 3 *vi è la possibilità di interferenza da parte di altri microrganismi, o di sostanze organiche o inorganiche presenti nell'acqua che possono costringere ad ulteriori trattamenti del campione prima dell'analisi.*

Un altro fattore che rende difficoltosa la determinazione di HAV è l'elevata variabilità nella *sensibilità* delle differenti metodiche, sia tradizionali (colture cellulari, ELISA o RIA) [24]; sia molecolari (sonde molecolari o probes a DNA/RNA o RT-PCR)[25] (**Tab.4**).

Tab.4 Limiti di sensibilità per il rilevamento di HAV.

Metodo	Sensibilità (particelle virali)
Colture cellulari	1
ELISA	10^5
RIA	10^5
Sonde molecolari	10^2
Nested PCR	3 – 30
RT-PCR	1 – 10

L'isolamento in coltura cellulare rappresenta un ottimo mezzo di rilevamento di enterovirus e adenovirus. Tuttavia l'Epatite A, proveniente dall'ambiente, si adatta difficilmente alla crescita in coltura, cresce molto lentamente e con bassissime rese. Le tecniche immunologiche, quali ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e RIA (*Radio Immuno Assay*), permettono l'identificazione del virus e possono essere utilizzate direttamente sul materiale da esaminare, ma la loro sensibilità è piuttosto bassa. La sensibilità può essere migliorata usando tecniche di biologia molecolare quali la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e la RT-PCR (*Reverse Transcription – PCR*). La PCR consente l'amplificazione di specifiche sequenze di DNA di un fattore 2^n (n =numero di cicli di amplificazione) in campioni di diversa provenienza. Può essere utilizzata anche per l'analisi di campioni contenenti RNA, facendola precedere da una reazione di trascrizione inversa (*RT*) per sintetizzare molecole di DNA a singola elica complementari all'RNA da esaminare. L'applicazione di tecniche di biologia molecolare offre il vantaggio di ridurre il tempo di esame del campione da molte settimane ad ore e di aumentare la sensibilità. Sebbene la PCR permetta di ipotizzare l'eventuale patogenicità di un campione ambientale, essa non ne

dimostra l'effettiva capacità infettante dal momento che il virus può avere l'involucro danneggiato o nel campione possono essere presenti solo frammenti del genoma [22].

Attualmente la norma *ISO 15216* indica una metodica standardizzata solo per la concentrazione delle acque in bottiglia e per l'estrazione del genoma dell'HAV da alcune matrici alimentari. Inoltre non è stato ancora stabilito il volume di acqua da analizzare, che solitamente è un migliaio di litri per le acque di rete, qualche centinaia di litri per le acque superficiali provenienti da zone infette e alcuni litri per le acque raccolte a valle dei depuratori. La maggior parte dei protocolli prevedere comunque la concentrazione del virus presente nel campione mediante adsorbimento su membrane elettropositive ed eluizione con estratto di carne al 3%. Il concentrato viene poi successivamente trattato con cloroformio al fine di eliminare batteri e virus interferenti [26].

2.4 Tecniche Immunoenzimatiche

Tutte le tecniche immunoenzimatiche si basano sull'interazione antigene-anticorpo (*Ag-Ab*) e la loro efficacia dipende essenzialmente dalla natura dell'anticorpo usato. La natura dell'anticorpo influenza sia la *specificità* dei metodi (ossia la capacità di discriminare tra la sostanza desiderata e altre sostanze presenti) sia la *sensibilità* (ossia la capacità di discriminare e misurare basse concentrazioni delle sostanze da analizzare).

2.4.1 Anticorpi

Gli anticorpi (*Ab*) sono un gruppo di proteine globulari, dette immunoglobuline (*Ig*), costituite da monomeri o multimeri di una struttura a simmetria bilaterale composta da quattro catene polipeptidiche, due catene leggere identiche (*catene L*) e due catene pesanti identiche (*catene F*) (**Fig. 7**). Le catene sono legate tra loro in maniera covalente da ponti disolfuro (-S-S-) ed interazioni non covalenti, generando una struttura a forma di Y. Esistono cinque tipi di catene pesanti (γ , μ , α , δ , ϵ) che definiscono le rispettive classi di immunoglobuline (*IgG*, *IgM*, *IgA*, *IgD*, *IgE*).

Tutte le classi possono legare l'antigene (*Ag*) anche se le funzioni immunobiologiche mediate da esse sono molto diverse. Le catene leggere (λ, κ), comuni a tutte le classi di immunoglobuline, non mediano una significativa attività biologica, ma contribuiscono al legame dell'antigene ed alla stabilità della struttura molecolare delle immunoglobuline. Le *IgG*, *IgE* e *IgD* sono perlopiù monomeri; le *IgA* sono spesso dimeriche e le *IgM* pentameriche.

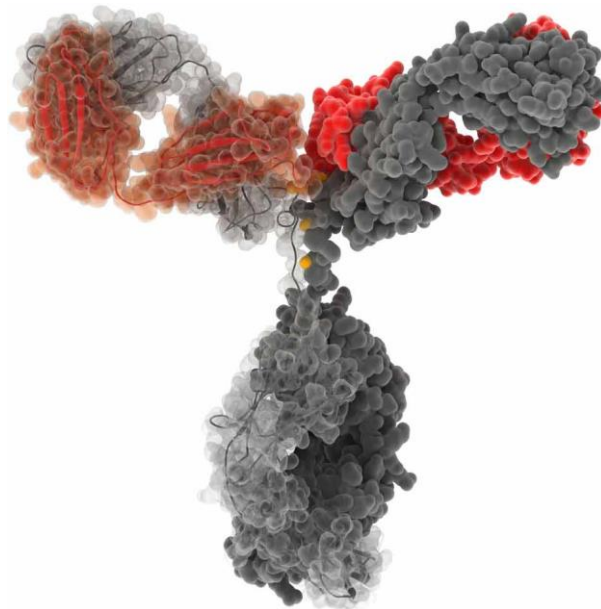


Fig.7 Struttura a simmetria bilaterale di una immunoglobulina.

Ciascuna catena è costituita poi da una *regione costante* (C_H e C_L) ed una *regione variabile* (V_H e V_L). Le regioni variabili sono quelle che conferiscono agli anticorpi i diversi tipi di specificità. Le IgG umane sono suddivisibili in tre frammenti. Due sono identici tra loro ed hanno la capacità di legare l'antigene in modo monovalente e sono detti *Fab* (fragment antigen binding); il terzo frammento non lega l'antigene e cristallizza più facilmente, per questo è detto *Fc* (fragment crystallizable) (**Fig.8**).

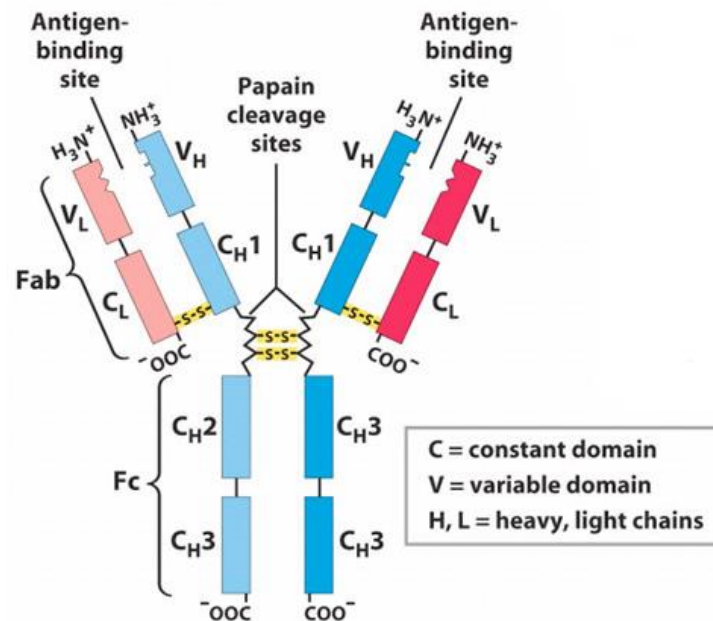


Fig.8 Struttura generale delle IgG con i siti di taglio della papaina ed i frammenti risultanti Fab e Fc .

La maggior parte degli anticorpi usati nelle tecniche immunochimiche sono prodotti in seguito ad immunizzazione di un animale da laboratorio per iniezione sottocutanea, intramuscolare o endovenosa di una soluzione dell'antigene appropriato. La risposta umorale all'antigene comporta l'attivazione di una popolazione eterogena di cellule B che producono immunoglobuline diverse. La maturazione della risposta consiste nell'espansione clonale di queste cellule inizialmente esposte, producendo popolazioni di plasmacellule che secernono una serie di immunoglobuline di diverse classi/sottoclassi leganti l'antigene. Questi anticorpi vengono detti policlonali (*PAb*) poiché, originando da diversi cloni linfocitari, sono diretti verso differenti *determinanti antigenici* (o anche *epitopi*), ossia le porzioni di molecola di antigene chimicamente e spazialmente limitate, coinvolte nel legame con i siti specifici (o *paratopi*) dell'anticorpo a formare

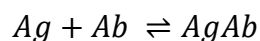
l'immunocomplesso antigene-anticorpo. È tuttavia possibile ottenere in coltura anticorpi monoclonali (MAb), derivati da un unico clone di cellula B e quindi specifici per un singolo epitopo. Quest'ultimi richiedono tempi e costi di produzione più elevati dei precedenti ma sono altamente riproducibili.

2.4.2 Interazione Antigene-Anticorpo

Nella maggior parte degli anticorpi, il sito di legame per l'antigene è costituito da una superficie planare che può alloggiare gli epitopi conformazionali delle macromolecole. Il legame dell'antigene all'anticorpo consiste di vari tipi di interazioni non covalenti reversibili, quali *interazioni elettrostatiche*, *legami a idrogeno*, *forze di Van der Waals* e *interazioni idrofobe* [27].

La determinazione dell'affinità di un anticorpo è importante per predire le sue caratteristiche immunochimiche. L'*affinità* si definisce come la costante di equilibrio di un anticorpo in uno specifico determinante antigenico. Solitamente gli anticorpi sono divalenti o multivalenti e gli antigeni hanno più di un determinante antigenico a seconda del peso molecolare. Per questo motivo si preferisce usare l'*avidità* per descrivere la costante di equilibrio applicabile alle interazioni totali tra anticorpo e antigene, compresa la componente di affinità tra più fattori additivi dovuti alla multivalenza del legame. Talvolta i termini "*affinità*" e "*avidità*" possono essere sostituiti dai sinonimi "*affinità intrinseca*" e "*affinità funzionale*" [28].

L'*affinità* di un anticorpo monovalente per il suo epitopo può essere espressa matematicamente come la costante di associazione all'equilibrio:



$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AgAb]}{[Ag] \cdot [Ab]}$$

con K_{eq} la costante di associazione all'equilibrio in soluzione omogenea, k_a la costante di velocità di associazione, k_d la costante di velocità di dissociazione, $[Ag]$ la concentrazione di antigene, $[Ab]$ la concentrazione di anticorpo e $[AgAb]$ la concentrazione del complesso antigene-anticorpo.

Per aumentare il *limite di rilevabilità (LOD)* si può agire aumentando il rapporto antigene legato/antigene libero:

$$\frac{[AgAb]}{[Ag]} = K_{eq} \cdot [Ab]$$

cioè aumentando la costante di equilibrio o la concentrazione dell'anticorpo. Quando per una determinata concentrazione di $[Ag]$ si verifica che i siti antigenici dell'anticorpo sono saturati per metà con l'anticorpo, allora il valore del reciproco della concentrazione di $[Ag]$ libero sarà uguale alla *costante di affinità K*:

$$[AgAb] = [Ag]$$

$$K = \frac{1}{[Ag]}$$

La costante K è definita come la concentrazione di epitopo libero necessario affinché venga raggiunto il 50% di saturazione dei siti anticorpali ed è una misura dell'affinità intrinseca o della stabilità del legame Ag-Ab. Gli anticorpi usati nelle tecniche immunometriche hanno solitamente valori della costante di affinità compresi tra 10^8 e 10^{10} M^{-1} .

2.4.3 Saggio ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Il saggio ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) è un *saggio immunoenzimatico* in *fase eterogenea* che abbina la *specificità* della reazione antigene-anticorpo e la *sensibilità* di marcatori enzimatici alla *semplicità* della rivelazione spettrofotometrica. Utilizzando un anticorpo o un antigene, legato ad un enzima facilmente dosabile, è possibile quantificare antigeni, anticorpi, proteine e glicoproteine mediante una semplice misura di attività enzimatica.

Sono generalmente eseguiti in piastre da 96 pozzetti (**Fig.9**) e consentono la misura di più campioni simultaneamente. Il complesso antigene-anticorpo è quindi immobilizzato e può essere evidenziato mediante l'aggiunta del substrato che, reagendo con l'enzima, produce una colorazione osservabile e quantificabile con uno spettrofotometro.

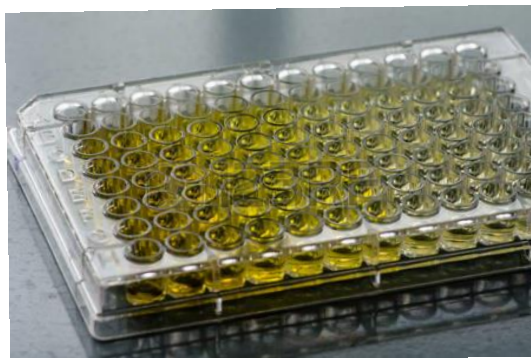


Fig.9 Piastra a 96 pozzetti per saggi immunologici quantitativi e qualitativi in fase solida.

Esistono diverse varianti del saggio ELISA che si differenziano a seconda del componente che si vuole rilevare. Il saggio può essere *competitivo* o *non competitivo* a seconda del peso molecolare della sostanza che si vuole determinare.

Nei *metodi competitivi* l'analita (Ag) viene dosato grazie alla sua capacità di competere con un tracciante costituito da un antigene marcato (Ag*) per formare un immunocomplesso con un Ab specifico presente in quantità limitata (**Fig.10**).

La misura del segnale ($AbAg^*$) è in genere *inversamente proporzionale* all'analita presente nel campione. Nei metodi competitivi ad una fase l'analita (Ag) del campione e l'antigene marcato (Ag^*) competono simultaneamente per una quantità limitata di anticorpi; nei metodi competitivi a due fasi, in una prima fase l'anticorpo (Ab) è incubato con il campione (Ag), mentre il tracciante (Ag^*) viene aggiunto in una seconda fase. Questi metodi possono essere usati per aumentare la sensibilità e sono quasi sempre limitati al dosaggio di apteni, i quali non avendo un numero di epitopi sufficienti ad essere legati da due Ab, presentano difficoltà tecniche all'applicazione di metodi non competitivi.

Nei *metodi non competitivi*, l'analita (Ag) viene dosato mediante l'utilizzo di due anticorpi specifici per due diversi epitopi dello stesso antigene (**Fig.11**). Un anticorpo è marcato (Ab^*) e l'altro (Ab) è legato ad una fase solida. La misura del segnale è *direttamente proporzionale* all'analita presente nel campione. Tali metodi sono anche chiamati "a sandwich" perché l'antigene è legato fra due anticorpi [29].

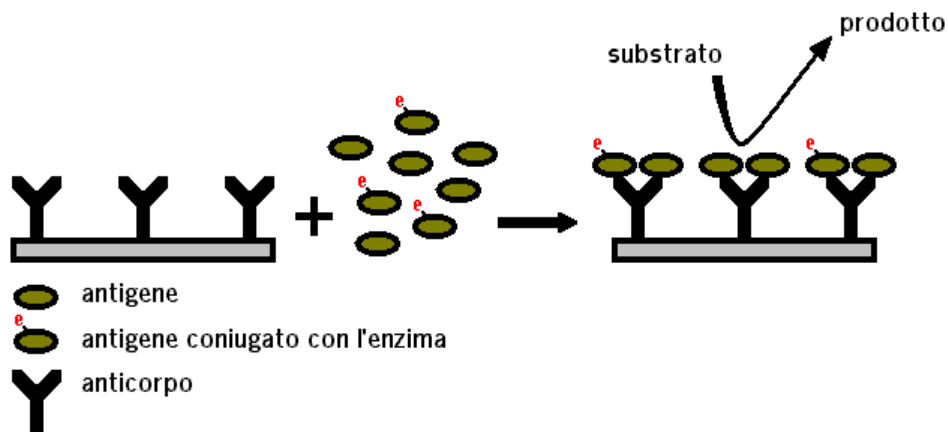


Fig.10 Schema del saggio ELISA competitivo diretto.

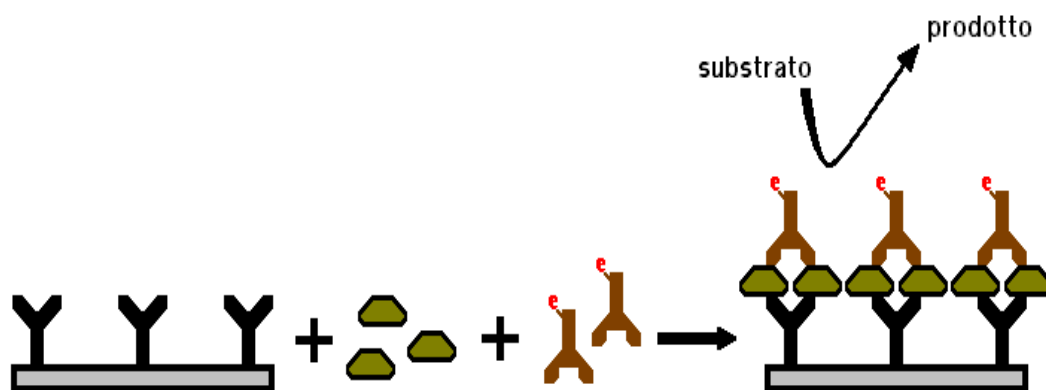


Fig.11 Schema del saggio ELISA non competitivo “a sandwich”.

I metodi non competitivi sono più sensibili dei metodi competitivi, poiché in prossimità dello zero un piccolo *incremento* di segnale è più rilevabile rispetto ad un piccolo *decremento*. Quello utilizzato in questo lavoro sperimentale è un saggio ELISA di tipo non competitivo “a sandwich” in cui la piastra da 96 pozzetti è stata però sostituita da particelle magnetiche come supporto alla catena immunologica.

2.4.3.1 Saggio ELIME (Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical)

Il saggio ELIME (*Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical*) è una evoluzione del saggio ELISA che introduce l'uso di particelle magnetiche come supporto solido per l'immobilizzazione della catena immunologica. Le particelle magnetiche (*Mps*) sono costituite da una dispersione di materiale paramagnetico, ossido ferrico [Fe_2O_3] o ossido ferroso-ferrico [Fe_3O_4] e vengono funzionalizzate in modo differente a seconda dell'utilizzo (**Fig.12**).

Le particelle vengono mantenute in sospensione durante le varie fasi del saggio e vengono recuperate quantitativamente con l'ausilio di un magnete. Le reazioni della catena immunologica avvengono quindi all'interno di provette eppendorf e le varie

aggiunte vengono effettuate grazie all'utilizzo di un rack magnetico che permette di concentrare le particelle lungo la parete per rimuovere facilmente la soluzione.

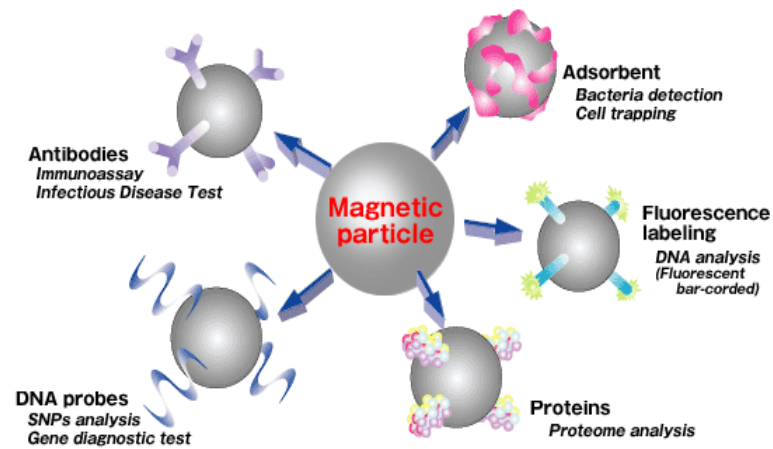


Fig.12 Funzionalizzazione di particelle magnetiche.

Le particelle paramagnetiche possono essere usate in analisi elettrochimica e concentrate mediante un piccolo magnete posto sotto l'elettrodo di lavoro di un elettrodo stampato SPE (*Screen Printed Electrode*) (**Fig.13**).

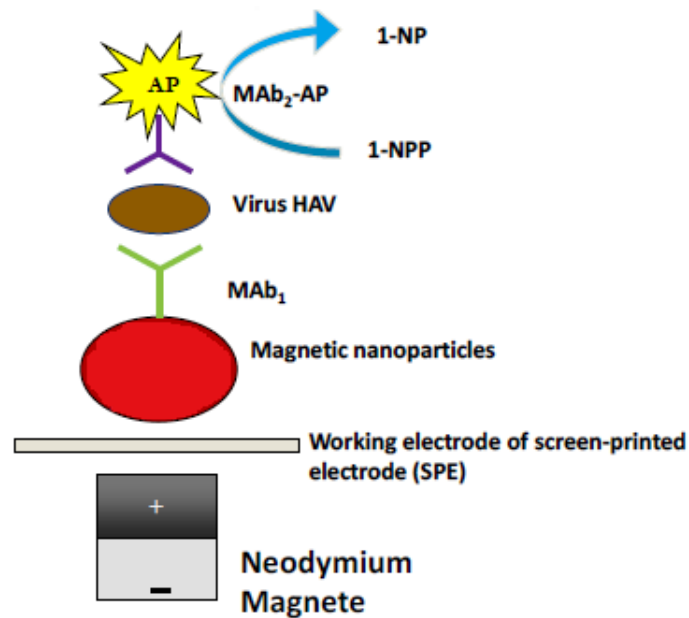


Fig.13 Schema del saggio ELIME "a sandwich" per il rilevamento di HAV.

2.4.3.2 Traccianti enzimatici

L'enzima coniugato all'anticorpo secondario in un saggio ELISA deve avere un elevato numero di turnover, deve essere stabile in un intervallo di temperatura compreso tra i 25°C e i 37°C e deve avere un tempo di vita maggiore di 6 mesi alla temperatura di 4°C. Gli enzimi maggiormente utilizzati per l'applicazione di saggi ELISA con rivelazione sia spettrofotometrica sia elettrochimica sono:

- la *perossidasi da rafano* (HRP Horse Radish Peroxidase);
- la *β-galattosidasi* (β-Gal);
- la *fosfatasi alcalina* (AP Alkaline Phosphatase).

In questo lavoro sperimentale è stata utilizzata la fosfatasi alcalina (AP) che catalizza la riduzione dell'1-naftilfosfato (1-NPP), con rottura del legame estereo del gruppo fosfato e produzione del composto elettroattivo 1-naftolo in grado di ossidarsi all'elettrodo, producendo una corrente direttamente proporzionale alla quantità di analita presente (**Fig.14**).

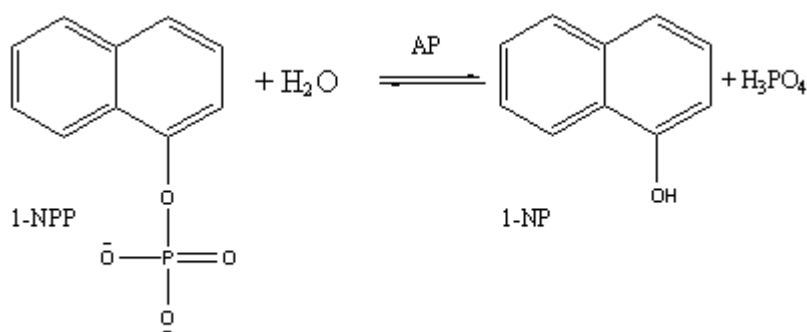


Fig.14 Reazione di riduzione dell'1-NPP catalizzata dalla AP.

2.5 Tecniche molecolari

In anni recenti sono state messe a punto tecniche di biologia molecolare molto sensibili e specifiche per la determinazione della presenza di materiale genetico in vari tipi di campioni. In particolare, la metodica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) può essere usata per amplificare, a livelli rilevabili, specifiche sequenze di DNA presenti in un basso numero di copie in campioni di diversa origine. La reazione PCR può essere utilizzata anche per l'analisi di campioni contenenti RNA, facendola precedere da una reazione di trascrizione inversa (*RT*) per sintetizzare molecole di DNA a singola elica complementari all'RNA da esaminare. Pertanto la RT-PCR può essere applicata con successo alla ricerca dell'HAV in campioni ambientali di diversa provenienza, ad esempio acque contaminate [30].

2.5.1 Sonde molecolari e PCR (Polymerase Chain Reaction)

I metodi di biologia molecolare quale l'utilizzo delle sonde molecolari e della tecnica di reazione a catena della *polimerasi* (PCR) hanno suscitato un notevole interesse per la *rapidità* delle risposte. Le *sonde molecolari* sono costituite da sequenze note di DNA, RNA od oligonucleotidi di sintesi che possono riconoscere specifiche sequenze bersaglio complementari ed evidenziarle mediante opportuna marcatura. Tuttavia l'uso di sonde molecolari si è rilevato di scarso interesse a causa del limite di sensibilità troppo elevato.

La *reazione a catena della polimerasi* (PCR) consente l'amplificazione di sequenze specifiche e selettive del genoma virale secondo la relazione 2^n (con n = numero di cicli di amplificazione). La reazione prevede l'amplificazione di un segmento di DNA, che si trova tra due regioni con sequenza nota, mediante l'utilizzo di due *primers* oligonucleotidici che danno luogo ad una serie di reazioni sintetiche catalizzate da una DNA polimerasi. Questi *primers* tipicamente hanno differenti sequenze che si trovano su opposti filamenti del DNA stampo e che delimitano il segmento da

amplificare. Le due catene del DNA stampo sono prima divise per riscaldamento (fase di *denaturazione*) in presenza dei due oligonucleotidi e dei quattro gruppi deossinucleotidtrifosfato, che legandosi formeranno il filamento copia. La miscela è poi raffreddata ad una temperatura di 50-70°C che permetta agli oligonucleotidi-primers di legarsi con le loro specifiche sequenze complementari (*fase di annelling*) e di dare quindi inizio alla polimerizzazione (*fase di allungamento*). La procedura prevede l'utilizzo di una Taq-polimerasi, ossia una DNA polimerasi termostabile estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, resistente fino a temperature di 95°C (Fig.15).

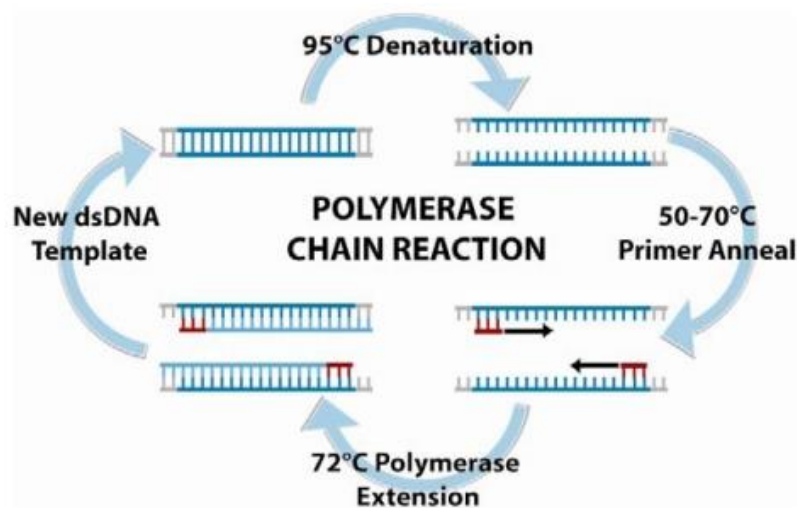


Fig.15 Schema di reazione a catena della polimerasi (PCR).

Tra le limitazioni principali di questa metodica ci sono:

- l'impossibilità di discriminare tra virus infettante e non infettante;
- la difficoltà di quantificare l'amplificato;
- la presenza di molte sostanze inibenti della reazione di PCR.

La prima riveste un ruolo importante dal momento che solo le particelle infettanti rappresentano un rischio per la salute pubblica. Tuttavia la presenza di genomi virali è comunque un indice di avvenuta contaminazione, la quale deve essere attentamente valutata. Le sostanze interferenti possono essere rimosse riducendo quanto più possibile il volume dell'estratto del campione.

La reazione della PCR deve essere associata ad una reazione di trascrizione inversa RT-PCR (*Reverse Transcriptase – PCR*) allo scopo di ottenere DNA dall'RNA virale. Si può anche effettuare una seconda fase di amplificazione utilizzando uno (*semi-nested*) o due primers (*nested*) interni alla regione precedentemente amplificata, allo scopo di rendere la reazione più *specific*a e *sensibile* [31].

2.5.2 Sistemi integrati colture-PCR

La tecnica integrata *colture cellulari-PCR* consiste nell'inoculazione di un estratto concentrato del campione su un monostrato cellulare che permetta la crescita di eventuali virus presenti (**Fig.16**). Il monostrato infettato è incubato per un tempo minimo da permettere la crescita virale in modo che nel lisato cellulare, ottenuto per cicli di congelamento/scongelamento, ci sia una concentrazione del virus tale da poter essere determinata mediante PCR. Questo sistema integrato è molto più sensibile e rapido del solo utilizzo delle colture [31].

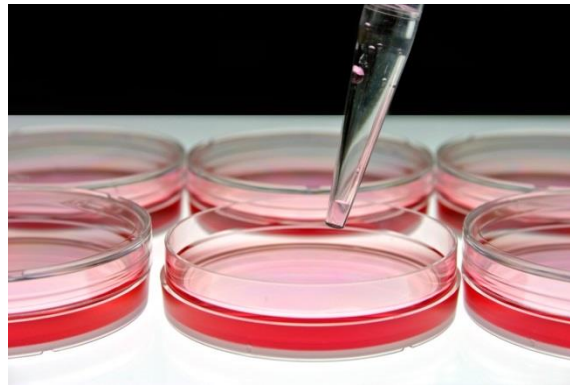


Fig.16 Colture cellulari per sistema integrato con PCR.

2.5.3 PCR “Real Time”

I sistemi di PCR quantitativa in “Real Time” utilizzano principalmente due procedimenti di rilevazione dell’accumulo dei prodotti in PCR:

- *intercalanti* si che si legano specificamente ai filamenti di DNA;
- *sonde* legate a molecole fluorescenti.

Il primo sistema utilizza intercalanti fluorescenti che devono avere la caratteristica di legarsi specificamente alle doppie catene di DNA (**Fig.17**) incrementando il segnale emesso e non devono interferire con la reazione di PCR. Ad esempio si può usare il *SYBRGreen* che è in grado di intercalarsi tra i due filamenti di DNA e di emettere fluorescenza quando irradiato ($\lambda=488$ nm). Lo *svantaggio* di questo sistema è che i coloranti si legano indiscriminatamente a qualunque doppio filamento di DNA, perdendo la specificità. Al tempo stesso il *vantaggio* è che tale specificità colorante-DNA permette al sistema di poter essere utilizzato per qualunque tipo di amplificazione. Ad un doppio filamento di DNA possono legarsi più molecole di colorante: amplificati lunghi generano una colorazione più intensa di quelli corti.

Utilizzando sonde fluorescenti è possibile incrementare la *specificità* del sistema: le sonde si legano ai filamenti in fase di sintesi durante l’amplificazione fornendo alla reazione un sistema di rilevazione dell’accumulo dei prodotti. Esistono diverse tipologie di sonde. Nelle più comuni, quelle di tipo TaqMan, la sonda è legata a due sostanze fluorescenti chiamate *reporter* e *quencher*. Nella sonda integra il quencher blocca l’emissione del reporter; dopo che la sonda si lega alla specifica sequenza del DNA, viene degradata dall’attività della Taq-polimerasi (*attività DNAsica*) ed il reporter viene separato dal quencher con emissione di fluorescenza ad una lunghezza d’onda specifica. Il vantaggio di questa tecnica è la specificità della reazione e la possibilità di distinguere contemporaneamente amplificati generati da diverse reazioni grazie all’utilizzo di sonde che emettono fluorescenza a diverse lunghezze d’onda [31].

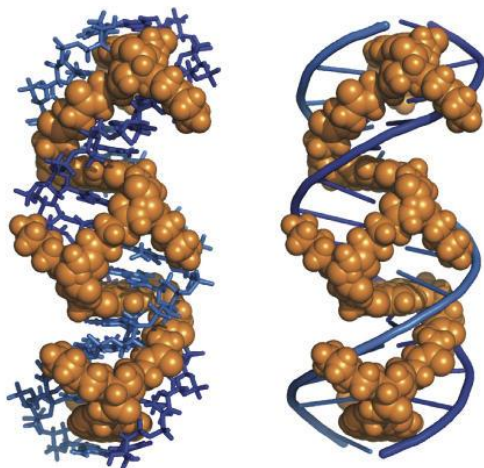


Fig.17 Modello di una molecola intercalante la doppia elica del DNA.

SCOPO DELLA TESI

Gli studi condotti durante questo lavoro sperimentale hanno avuto l'obiettivo di approfondire uno studio già in corso inerente l'ottimizzazione di un saggio ELIME (*Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical*) per il monitoraggio della presenza del virus dell'Epatite A (HAV) in acque di lavaggio di alimenti destinati al consumo umano o animale.

Al fine di poter determinare la presenza del virus HAV in differenti matrici (alimentari e non), è stato messo a punto un metodo di estrazione del virus utilizzando filtri elettropositivi, venduti commercialmente per gli impianti di depurazione delle acque reflue. Durante il lavoro è stato inoltre stabilito un fattore di correlazione tra *copie genomiche/mL*, unità di misura utilizzata nella PCR, e UI/mL con la quale si indica la concentrazione di HAV negli standard commerciali.

Il metodo studiato non richiede specifiche strumentazioni da laboratorio, consentendo idealmente, attraverso l'uso di una apparecchiatura portatile e di elettrodi monouso stampati SPE (*Screen Printed Electrode*), prodotti nei laboratori di Chimica Analitica dell'Università di Roma Tor Vergata, l'applicazione per lo screening della presenza del virus direttamente nella linea di produzione. Tale approccio comporterebbe una riduzione dei tempi di analisi e dei costi, con necessità di invio al laboratorio dei soli campioni sospetti.

I vantaggi del metodo ELIME rispetto all'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) convenzionale sono il maggiore *rapporto superficie/volume* delle particelle magnetiche e la migliore *sensibilità* della rivelazione elettrochimica rispetto all'analisi spettrofotometrica.

L'efficienza del metodo sviluppato è stata confrontata con i sistemi classici di rilevazione molecolare del virus (*real-time RT-PCR*) mediante prove effettuate presso il laboratorio del "Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria" dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

CAPITOLO 3

3.1 Reagenti e tamponi

- *Acido borico*, H_3BO_3 (Sigma-Aldrich, USA)
- *Alcool polivinilico* (PVA) (Sigma-Aldrich, USA)
- *Azoturo di sodio*, NaN_3 (Carlo Erba, Italia)
- *Bicarbonato di sodio*, $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, USA)
- *Carbonato di sodio*, Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, USA)
- *Cloruro di magnesio*, $MgCl_2$ (Carlo Erba, Italia)
- *Cloruro di potassio*, KCl (Carlo Erba, Italia)
- *Dietanolammina* (DEA) (Fluka, USA)
- *Fosfato di sodio bibasico*, Na_2HPO_4 (Carlo Erba, Italia)
- *Fosfato di sodio monobasico*, NaH_2PO_4 (Carlo Erba, Italia)
- *Latte in polvere* (Dry Milk – DM) (Bio-Rad Company, Kidlington, UK)
- *1-Naftilfosfato disodico*, 1-NPP (Sigma-Aldrich, USA)
- *4-Nitrofenilfosfato disodico*, 4-NPP (Fluka, USA)
- *Poliossietilene sorbitan monolaurato*, Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- *Sieroalbumina bovina* (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- *Solfato di ammonio*, $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma-Aldrich, USA)
- *Anticorpo primario monoclonale Anti-HAV*,
MAb₁ (clone M5112922; 1000 µg/mL; Fitzgerald, USA)
- *Anticorpo primario monoclonale anti-HAV marcato con la fosfatasi alcalina*,
MAb₁-AP (clone 7E7; Pantec, Italia)

- *Standard di Epatite A*, HAV ST
(100 UI/mL; $4.8 \cdot 10^6$ cop. gen./mL; 88 µg/mL)
- *Epatite A dell'Istituto Superiore di Sanità*, HAV ISS
(365 UI/mL; $7.5 \cdot 10^8$ cop. gen./mL)

- *Microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate*,
Goat Anti-Mouse IgG Magnetic-Beads
(20 mg/mL; New England BioLabs, USA)
- *Microparticelle superparamagnetiche tosilattivate*,
Dynabeads® M-280 Tosylactivated
(30 mg/mL; Life Technologies, Italia)
- *Nanoparticelle magnetiche ricoperte di polidopamina*, MNPs-pDA
(Dr P. Salazar, Università di Tenerife “La Laguna”, Spagna)

- *Tampone carbonato* (CB) 50 mM pH 9.6
- *Tampone fosfato salino* (PBS) 50 mM pH 7.4
- PBS 50 mM pH 7.4 + PVA 1% (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + DM 3% (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + BSA 3% (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + Tween 0.05 % (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + PVA 0.1% (p/v) + NaN₃ 0.02% (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + DM 0.1% (p/v) + NaN₃ 0.02% (p/v)
- PBS 50 mM pH 7.4 + BSA 0.1% (p/v) + NaN₃ 0.02% (p/v)
- DEA 0.97 M + MgCl₂ 1 mM + KCl 0.1 M pH 9.8

- Buffer A: H₃BO₃ 0.1 M pH 9.5
- Buffer B: PBS 100 mM pH 7.4
- Buffer C: (NH₄)₂SO₄ 3M in Buffer A oppure B
- Buffer D: PBS 100 mM + BSA 0.5%
- Buffer E: PBS 100 mM + BSA 0.1%
- *Tampone Tris-Glicina-Estratto di carne* (TGBE) Tris 100 mM + Gly 50 mM + 0.1% Beef Extract pH 9.5

3.2 Particelle magnetiche

In questo lavoro sono state utilizzate tre diverse tipologie di particelle magnetiche (MPs) come supporto solido per la costruzione della catena immunologica per lo sviluppo del saggio Enzyme Linked Immunomagnetic Electrode (ELIME):

- *Nanoparticelle paramagnetiche ricoperte di polidopamina (MNPs-pDA)*, sintetizzate presso i laboratori dell'Università di Tenerife "La Laguna" in Spagna e gentilmente fornite dal Dottor Pedro Salazar (**Fig.18**). Sono costituite da una dispersione di materiale paramagnetico, ossido ferrico $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$ e ossido ferroso-ferrico $\text{Fe}^{2+}[\text{Fe}^{3+}\text{O}_2]_2$, ricoperto da un sottile strato polimerico di polidopamina (pDa);
- *Microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate (Goat Anti-Mouse IgG Magnetic-Beads)*, acquistate presso la New England BioLabs in USA (**Fig.19**). Sono costituite da immunoglobuline Anti-IgG legate covalentemente alla superficie non porosa di particelle paramagnetiche dal diametro di 1 μm . Questo anticorpo secondario lega la catena pesante dell'immunoglobulina IgG di topo ed è adatta per immunodosaggi che usano un anticorpo primario monoclonale IgG di topo.
- *Microparticelle superparamagnetiche tosilattivate (Dynabeads® M-280 Tosylactivated)*, acquistate presso la Life Technologies in Italia (**Fig.20**). Sono costituite da microsfere uniformi di polistirene dal diametro di 2.8 μm ricoperte da uno strato di poliuretano, attivate con gruppi p-toluen-solfonici in grado di legare anticorpi, proteine, peptidi o glicoproteine aventi gruppi ammino o sulfidrilici con un numero crescente di legami covalenti aumentando temperatura e pH.

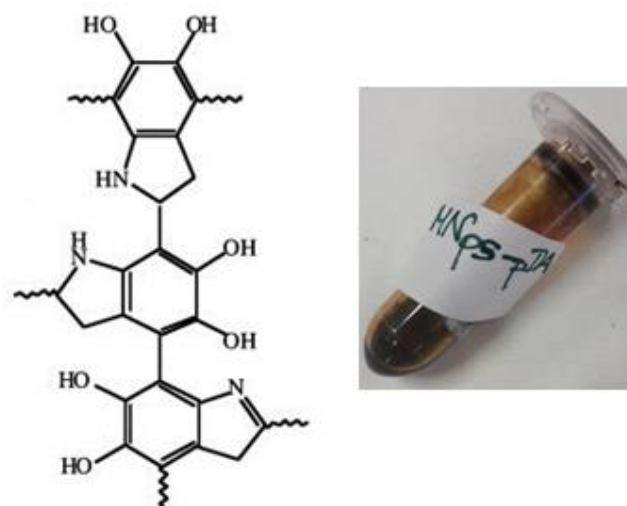


Fig.18 Nanoparticelle paramagnetiche ricoperte di polidopamina (MNPs-pDA).

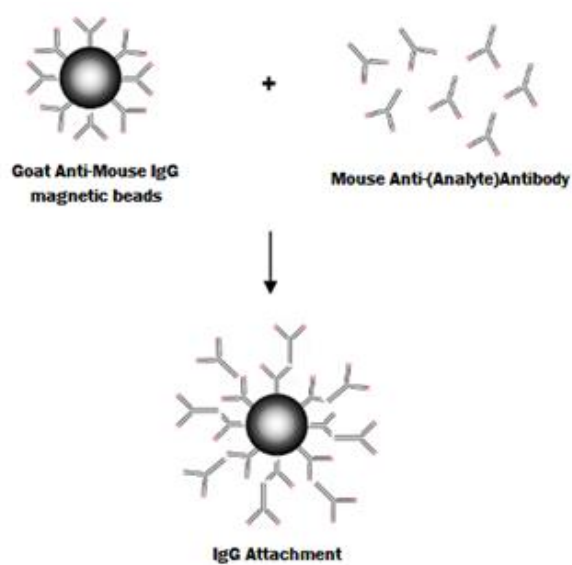


Fig.19 Microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate (Goat Anti-Mouse magnetic Beads, BioLabs, USA).

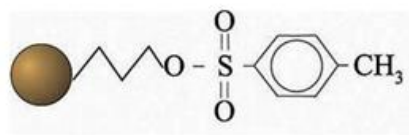


Fig.20 Microparticelle superparamagnetiche tosillattivate (Dynabeads®M-280 Tosylactivated).

3.3 Protocollo Saggio Elime per HAV

3.3.1 Protocollo preparazione MNPs-pDA:

1. Prelevare dalla soluzione madre 10 μ L delle MNPs-pDA e trasferirle in una vial da 2mL;
2. lavare due volte con 200 μ L di tampone carbonato 50 mM pH 9.6 (centrifugare ogni volta per 10 min a 7500 rpm a temperatura ambiente) separando le particelle dal supernatante con l'ausilio di un magnete 30x50 mm aderenza 65 Kg;
3. risospendere le MNPs-pDA in 100 μ L di tampone carbonato 50 mM pH 9.6 contenente 15 μ g/mL di MAb;
4. incubare per 45 min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
5. lavare due volte con 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
6. aggiungere 200 μ L di DM 3% in tampone carbonato 50 mM pH 9.6;
7. incubare per 45 min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
8. rimuovere il supernatante;
9. lavare due volte con 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
10. risospendere in 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + DM 0.1% + NaN₃ 0.02% e conservare in frigo overnight.

Saggio a sandwich o non competitivo:

1. Rimuovere il supernatante;
2. lavare due volte con 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
3. aggiungere 200 μ L di HAV in PBS 50 mM pH 7.4 + DM 0.1%;
4. incubare per 45 min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
5. lavare due volte con 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
6. rimuovere il supernatante;
7. aggiungere 200 μ L di MAb-AP 1:10000 (v/v) in PBS;
8. incubare per 45 min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
9. rimuovere il supernatante;
10. lavare due volte con 200 μ L di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
11. risospendere in 45 μ L di PBS 50 mM pH 7.4;
12. depositare 20 μ L delle MNPs-pDA così ottenute sull'elettrodo di lavoro del SPE;
13. aggiungere 60 μ L di substrato 1-NPP 5 mg/mL preparato in DEA 0.97 M + MgCl_2 1mM + KCl 0.1 M pH 9.8 coprendo interamente l'elettrodo;
14. aspettare 5 min (tempo di reazione);
15. eseguire la misura in voltammetria differenziale ad impulsi DVP.

3.3.2 Protocollo preparazione Dynabeads® M-280 Tosilattivate

1. Prelevare dalla soluzione madre 100 μ L delle particelle tosilattivate e trasferirle in una vial da 2mL;
2. rimuovere il supernatante con l'ausilio di un rack magnetico;
3. risospendere in 60.6 μ L di MAb 1000 μ g/mL;
4. aggiungere 89.4 μ L di Buffer A e spipettare;
5. aggiungere 100 μ L di Buffer C;
6. incubare per 18 h in stufa a 37 °C in agitatore rotante;
7. rimuovere il supernatante;
8. addizionare 1 mL di Buffer D;
9. incubare per 1 h in stufa a 37 °C in agitatore rotante;
10. rimuovere il supernatante;
11. addizionare 1 mL di Buffer E, spipettare, concentrare con rack magnetico e rimuovere il supernatante (ripetere il passaggio due volte);
12. risospendere in 145.45 μ L di Buffer E.

Saggio a sandwich o non competitivo:

1. Prelevare dalla soluzione 10 μL delle particelle risospese e trasferirle in una vial da 2mL;
2. aggiungere 500 μL di BSA 3%;
3. incubare per 1 h in stufa a 37 °C in agitatore rotante;
4. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
5. aggiungere 500 μL di HAV in PBS 50 mM pH 7.4 + BSA 0.1%;
6. incubare per 1 h a temperatura ambiente in agitatore rotante;
7. rimuovere il supernatante;
8. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
9. aggiungere 500 μL di MAb-AP 1:10000 (v/v) in PBS;
10. incubare per 1 h a temperatura ambiente in agitatore rotante;
11. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
12. risospendere in 45 μL di PBS 50 mM pH 7.4;
13. depositare 20 μL delle particelle tosilate così ottenute sull'elettrodo di lavoro del SPE;
14. aggiungere 60 μL di substrato 1-NPP 5 mg/mL preparato in DEA 0.97 M + MgCl_2 1mM + KCl 0.1 M pH 9.8 coprendo interamente l'elettrodo;
15. aspettare 5 min (tempo di reazione);
16. eseguire la misura in voltammetria differenziale ad impulsi DVP.

3.3.3 Protocollo preparazione delle particelle magnetiche Goat Anti-Mouse IgG:

1. Prelevare dalla soluzione madre 10 μ L delle particelle Anti-IgG e trasferirle in una eppendorf da 2mL;
2. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4, separando le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
3. aggiungere 100 μ L di MAb 10 μ g/mL in tampone carbonato 50 mM pH 9.6;
4. incubare per 45min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
5. rimuovere il supernatante;
6. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
7. addizione 1 mL di BSA al 3% in tampone carbonato 50 mM a pH 9.6;
8. incubare per 45min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
9. rimuovere il supernatante;
10. lavare due volte con 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
11. risospendere in 1 mL di PBS 50 mM a pH 7.4 + BSA 0.1% + NaN₃ 0.02% e conservare in frigo overnight.

Saggio a sandwich o non competitivo:

1. Rimuovere il supernatante;
2. lavare per due volte con 1 mL PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
3. aggiungere 1 mL di HAV in PBS 50 mM pH 7.4 + BSA 0.1%;
4. incubare per 45min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
5. rimuovere il supernatante;
6. lavare per due volte con 1 mL PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
7. aggiungere 1 mL di MAb-AP 1:25000 (v/v) in PBS;
8. incubare per 45min a temperatura ambiente in agitatore rotante;
9. rimuovere il supernatante;
10. lavare per due volte con 1 mL PBS 50 mM a pH 7.4 + Tween 0.05%, separando ogni volta le particelle dal supernatante con un rack magnetico;
11. risospendere in 45 μ L di PBS 50 mM pH 7.4;
12. depositare 20 μ L di particelle Anti-IgG così ottenute sull'elettrodo di lavoro del SPE;
13. aggiungere 60 μ L di substrato 1-NPP 5 mg/mL preparato in DEA 0.97 M + MgCl_2 1mM + KCl 0.1 M pH 9.8 coprendo interamente l'elettrodo;
14. aspettare 5 minuti (tempo di reazione);
15. eseguire la misura in voltammetria differenziale ad impulsi DVP.

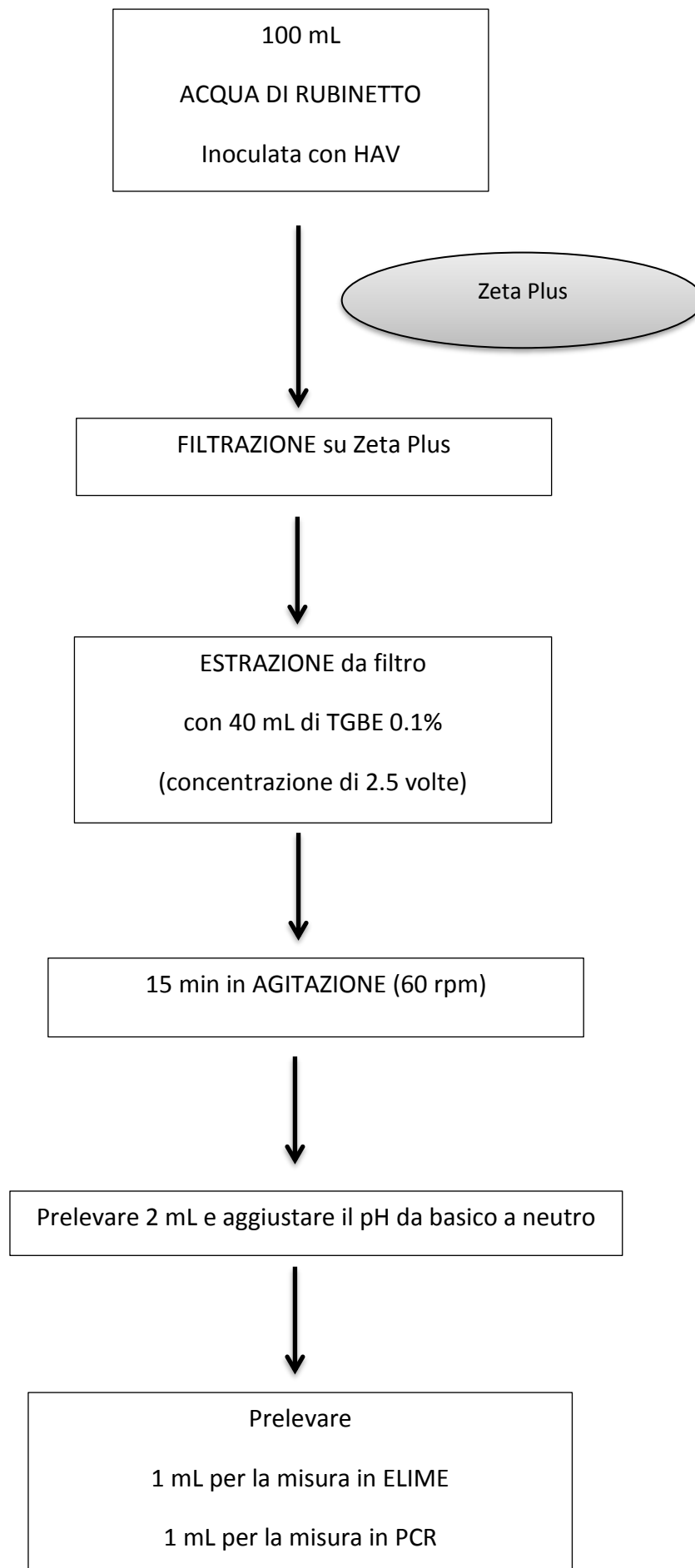
3.4 Inattivazione del virus

Il virus HAV, cresciuto in coltura ed utilizzato in questo lavoro, è stato fornito dal laboratorio del “*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*” dell’Istituto Superiore di Sanità (ISS), in terreno di coltura contenente una concentrazione di $7.5 \cdot 10^8$ cop. gen./mL (determinata dallo stesso Istituto via RT-PCR).

L’inattivazione del virus è stata eseguita, secondo procedura da letteratura [6], con una diluizione 1:0.5 v/v di una soluzione di formaldeide 0.02%. Il virus così trattato è stato tenuto in incubazione a 4°C al buio per 24 h, successivamente aliquotato e conservato a -20°C.

3.5 Protocollo di estrazione del virus HAV da campioni fortificati di acqua di rubinetto

1. Preparare 100 mL di acqua di rubinetto contaminata con HAV a concentrazioni note;
2. filtrare con pompa da vuoto su filtro *Zeta PlusTM 1MDS* (con la parte rugosa rivolta verso l’alto);
3. estrazione del virus dal filtro con 40 mL di Buffer TGBE (Tris 100 mM + Gly 50 mM + 0.1% di Beef Extract pH 9.5) in provetta da 50 mL, per 15 min in agitazione (60 rpm);
4. prelevare 2 mL da ciascuna provetta e metterli in altrettante vial;
5. aggiustare il pH da basico a neutro (circa pH 7) con HCl 1 M (3-5 gocce);
6. prelevare 1 mL e metterlo nelle varie eppendorf con le particelle magnetiche;
7. incubare per 45 min in agitatore rotante;
8. infine, seguire il protocollo standard del saggio a sandwich.



3.6 Protocollo Real-Time RT-PCR ISO 15216-1:2017 - Quantificazione del virus dell'Epatite A in campioni di prodotti alimentari (frutti di bosco, ortaggi, acqua in bottiglia) utilizzando la reazione di polimerizzazione a catena in tempo reale (RT-PCR)

Questa parte del lavoro è stata eseguita presso i laboratori del “Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria” dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Fase di concentrazione:

Per la fase di concentrazione è stato utilizzato lo stesso protocollo riportato nel *paragrafo 3.5*, ripetendo la procedura di estrazione sia con 4 mL di eluente TGBE (come riportato nella ISO 15216) sia con 40 mL.

Estrazione degli acidi nucleici:

l'intero volume ottenuto alla fine del processo di concentrazione (0.5 mL di sospensione in PBS) viene sottoposto ad estrazione degli acidi nucleici mediante sistema MiniMag (bioMerieux) secondo le istruzioni del produttore.

1. Aggiungere 2 mL del tampone di lisi a 0.5 mL del campione da analizzare;
2. incubare per 10 min a temperatura ambiente;
3. aggiungere 50 µL di silica;
4. incubare per 10 min a temperatura ambiente
5. centrifugare per 120 sec a 500 g per lasciar sedimentare la silica e aspirare il supernatante;
6. risospendere con 400 µL del tampone di lavaggio;
7. lavare due volte per 30 sec con il primo tampone di lavaggio separando la silica dal supernatante con un sistema rack magnetico semiautomatico;
8. lavare due volte per 30 sec con il secondo tampone di lavaggio con le modalità descritte al punto 7;

9. lavare una volta per 15 sec con il terzo tampone di lavaggio con le modalità descritte al punto 7;
10. eluire con 100 µL della soluzione di eluizione e lasciare in agitazione per 5 min a 60 °C a 1400 rpm;
11. recuperare il supernatante.

Analisi mediante real-time RT-(q)PCR:

L'analisi mediante real-time RT-(q)PCR è a come dettagliato nel §8.4.2.1, 8.4.2.3, 8.4.2.4, 9.1, 9.2, 9.3, 9.5, Annex C e Annex D.1 della ISO 15216-1:2017.

Ogni campione è stato analizzato in duplice reazione e per ogni campione è stata altresì allestita una reazione per verificare l'assenza di inibizione della reazione di PCR. Sono state inoltre allestite due reazioni di controllo negativo di PCR (per escludere eventuali contaminazioni nei reattivi di PCR) e due reazioni di controllo negativo di estrazione (campione negativo i.e. acqua per biologia molecolare, sottoposto ad estrazione degli acidi nucleici e a PCR per escludere eventuali contaminazioni ambientali). Per la quantificazione del target virale viene inoltre inserita in PCR una curva standard (5 diluizioni, due repliche per diluizione) allestita utilizzando un plasmide quantizzato contenente la sequenza target.

La PCR è effettuata utilizzando il kit Invitrogen "RNA UltraSense one-step qRT-PCR system" con il seguente mix di reazione:

Reagente	Concentrazione
5x UltraSense reaction mix	1x
Primer F (forward)	500 nM
Primer R (reverse)	900 nM
Probe	250 nM
ROX reference dye (50x)	1x
RNA UltraSense enzyme mix	1.25 µL
Water for molecular biology	q.b.
Volume totale	20 µL

Le reazioni sono condotte su una piattaforma di real-time PCR “Applied Biosystem 7700”. Il profilo termico utilizzato è il seguente:

Step		Temperatura e tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione		55°C per 1 h	1
Pre-riscaldamento		95°C per 5 min	1
Amplificazione	Denaturazione	95°C per 15 sec	45
	Annealing-extension	60°C per 1 min	
		65°C per 1 min	

Infine, le combinazioni di primer/probe usate per la determinazione di HAV sono le seguenti:

Primer F (HAV 68)	5' – TCA CCG CCG TTT GCC TAG – 3'
Primer R (HAV 240)	5' – GGA GAG CCC TGG AAG AAA G – 3'
Probe (HAV 150 -)	5' – CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA – 3'

Il probe è marcato in 5' con 6-carboxyfluorescein (*FAM*) e in 3' MGBNFQ (minor groove binder/non-fluorescent quencher).

3.7 Elettrodi Screen Printed (SPE)

Gli elettrodi stampati (*Screen Printed Electrode - SPE*) sono degli elettrodi realizzati via stampa serigrafica ed utilizzando vari inchiostri contenenti materiali elettrodisci su differenti tipologie di plastica come PVC (cloruro di polivinile), Plexiglass (metacrilato), poliestere e di materiali ceramici (a base di argilla e silice). Il processo di deposizione consiste nel forzare meccanicamente l'inchiostro attraverso uno stampo su di un supporto planare. La composizione chimica degli inchiostri e quindi il materiale attivo del sensore influenza la *selettività* e la *sensibilità* delle analisi elettrochimiche [32]. Gli elettrodi SPE utilizzati in questo lavoro sperimentale sono stati stampati presso i laboratori di Chimica Analitica dell'Università di Roma Tor Vergata ed hanno un diametro di 3 mm. Ogni sensore è costituito da tre elettrodi (**Fig.21**):

- *l'elettrodo di lavoro*, realizzato in grafite, sul quale avviene la reazione e direttamente responsabile della misura;
- *l'elettrodo di pseudo-riferimento* in argento ad un potenziale elettrodico ben determinato indipendente dall'intensità di corrente che attraversa la cella elettrochimica;
- *l'elettrodo ausiliario* in grafite, chiamato anche *controelettrodo*, che garantisce il flusso di corrente attraverso la cella.

Gli elettrodi fanno da tramite tra la soluzione ed il circuito esterno costituendo, insieme alla soluzione stessa, la cella elettrochimica.



Fig.21 Elettrodi stampati (SPE) presso i Laboratori di Chimica Analitica dell'Università di Roma Tor Vergata.

Le misure elettrochimiche sono state eseguite con un array di 8 sensori (**Fig.22**) al di sotto del quale è posta una base contenente dei magneti (**Fig.23**), che per favorire la concentrazione delle particelle magnetiche su l'elettrodo di lavoro prima della misura elettrochimica.



Fig.22 Connettore Mux-8 con striscia composta da 8 SPE.

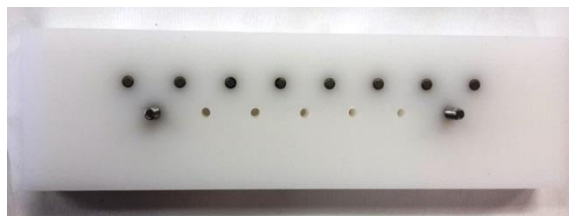


Fig.23 Base magnetica posta al di sotto degli SPE.

3.7.1 Pretrattamento degli elettrodi

Prima di utilizzare gli elettrodi stampati è necessario effettuare un trattamento ossidativo che elimini eventuali impurità sulla superficie (polvere, residui di lavorazione o grassi derivati da una non corretta manipolazione) che potrebbero condizionare le misure. Questa operazione migliora la cinetica di reazione e quindi la prestazione analitica del dispositivo.

Il pretrattamento viene eseguito con 100 μL di tampone fosfato salino (*PBS*), depositati in goccia sulla superficie dell'elettrodo (**Fig.24**), in misura amperometrica. Ad ogni SPE è applicato un potenziale di +1.7 V per 3 minuti per un totale di 24 minuti per array. Si ottiene così un profilo caratteristico corrente vs tempo. Gli elettrodi vengono poi risciacquati con acqua distillata e conservati al riparo dalla luce.

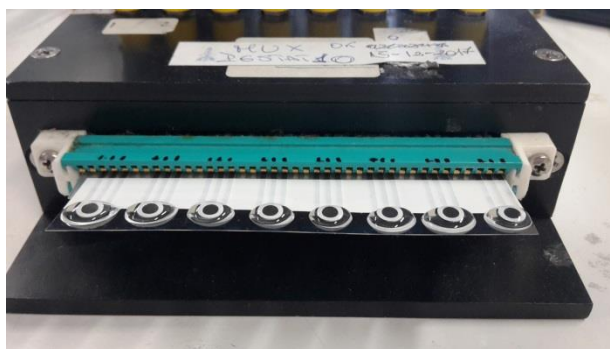


Fig.24 Pretrattamento degli SPE con PBS depositato in goccia.

3.8 Strumentazione

In questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti strumenti:

- *Potenziostato/Galvanostato Autolab* con software GPES (General Purpose Electrochemical System) (Ecochemie, Utrecht, Paesi Bassi) (**Fig.25**);



Fig.25 Potenziostato/Galvanostato Autolab.

- *Potenziostato PalmSens4* con intervallo di potenziale da -5V a +5V e intervallo di corrente da 100 pA a 10 mA, con elevata risoluzione e basso rumore (**Fig.26**): usato per le misure direttamente in campo;



Fig.26 Potenziostato PalmSens4.

- *Rack con un magnete estraibile* (Invitrogen Dynal AS, Svezia) (**Fig.27**): può contenere fino ad un massimo di 6 eppendorf;

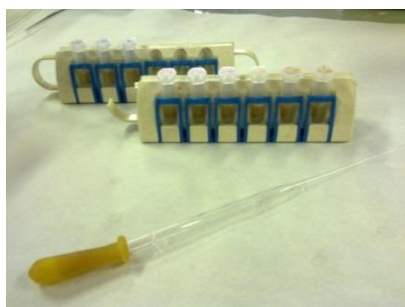


Fig.27 Rack magnetico Invitrogen per eppendorf.

- *Stufa High Performance Oven* modello 2100 (Nuova Criotecnica AMCOTA, Italia) con temperatura regolabile da 0 °C a 300 °C (**Fig.28**);



Fig.28 Stufa High Performance Oven.

- *pH-metro* modello 334-B (AMEL S.r.l., Italy) (**Fig.29**);



Fig.29 pH-metro AMEL.

- *Agitatore rotante* (Invitrogen Dynal AS, Svezia) (**Fig.30**): può alloggiare fino ad un massimo di 50 eppendorf ed ha diverse velocità di rotazione;

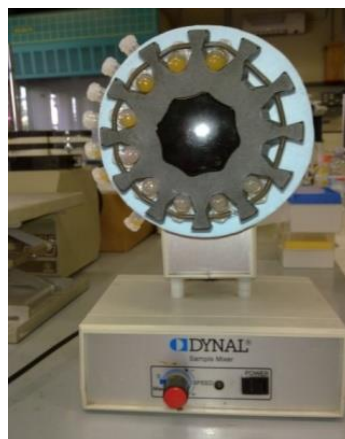


Fig.30 Agitatore rotante Invitrogen.

- *Magnete* con forza di attrazione di 65 Kg (magnets4you GmbH, Germania) (**Fig.31**): 30x50 mm, N50 Nichel, STM 30x50-N;

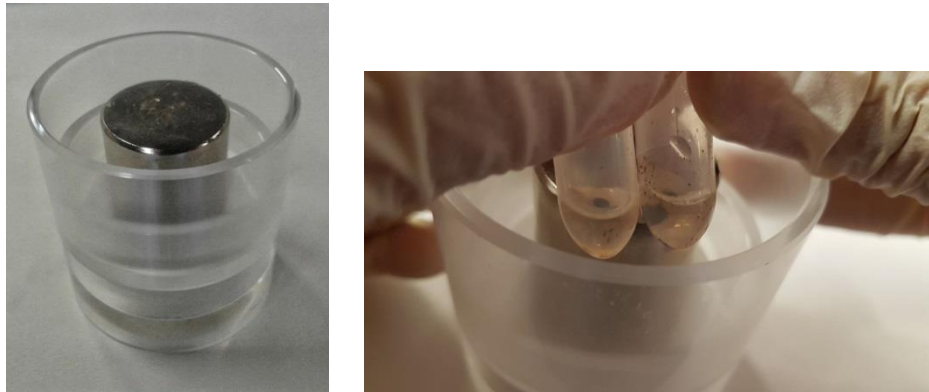


Fig.31 Magnete con forza di attrazione di 65 Kg.

- *Filtri Zeta PlusTM 1MDS* (CUNO, 3M Company, USA) elettropositivi in nitrile, con diametro di 47 mm, dotati di un lato rugoso ed uno liscio: sono in grado di catturare e concentrare virus da mezzi acquosi mediante assorbimento elettrocinetico (**Fig.32**).



Fig.32 Filtri Zeta PlusTM 1MDS.

3.9 Tecniche elettrochimiche

Le tecniche elettrochimiche possono essere classificate in diverse categorie (**Fig.33**), suddivise principalmente tra tecniche statiche e tecniche dinamiche.

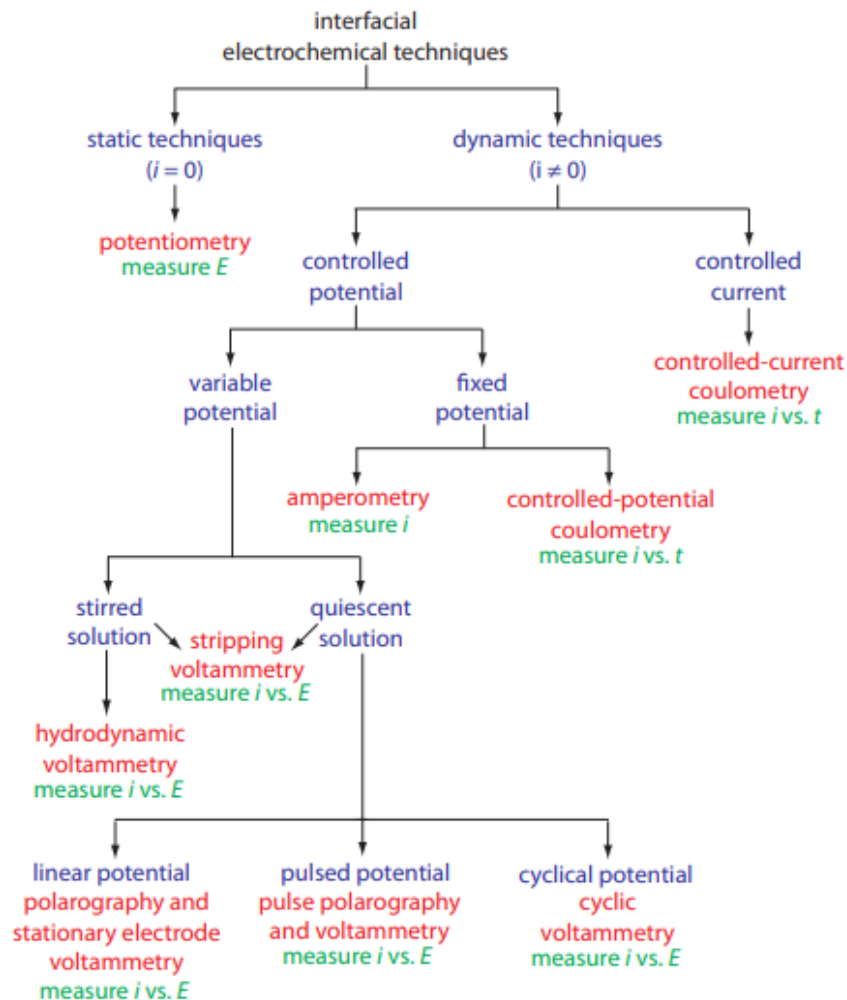


Fig.33 Tecniche elettrochimiche all'interfaccia.

Tra le tecniche dinamiche, le tecniche a potenziale controllato rappresentano le più utilizzate per i diversi vantaggi che offrono:

- elevata sensibilità;
- buona selettività per la specie elettroattiva;
- ampio intervallo di linearità.

Esse prevedono l'applicazione di un potenziale controllato e la misura della corrente risultante dalla reazione di ossidoriduzione [33]. In questo lavoro sperimentale sono state utilizzate l'*amperometria* (per il pretrattamento degli elettrodi di lavoro) e la *voltammetria differenziale ad impulsi DPV* (per la misura dell'analita).

3.9.1 Amperometria

L'amperometria si basa sull'applicazione, all'elettrodo di lavoro, di un potenziale costante nel tempo a cui la specie elettroattiva considerata si ossida o riduce, causando una corrente proporzionale alla sua concentrazione. Il segnale di corrente generato ha una forma caratteristica "a gradino" e raggiunge uno stato stazionario, cui altezza è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione. La corrente è legata alla concentrazione dalla relazione matematica:

$$i = nFADC/\delta$$

con

n = numero di elettroni scambiati

F = costante di Faraday

A = area superficiale dell'elettrodo di lavoro

D = coefficiente di diffusione dell'analita

C = concentrazione dell'analita

δ = spessore dello strato di diffusione

Questa tecnica è stata utilizzata per il pretrattamento degli elettrodi SPE con 100 μ L di tampone fosfato salino (PBS), depositati in goccia sulla superficie dell'elettrodo. Ad ogni SPE è applicato un potenziale di +1.7 V per 3 minuti per un totale di 24 minuti per array.

3.9.2 Voltammetria ad impulsi differenziali (Differential Pulse Voltammetry - DPV)

In questo lavoro sperimentale è stata utilizzata la tecnica della Voltammetria Differenziale ad Impulsi (DPV) per l'applicazione del saggio ELIME e determinazione dell'1-naftolo, prodotto per defosforilazione dall'1-naftil-fosfato (1-NPP) mediante l'enzima fosfatasi alcalina (AP).

La DPV consiste nell'applicazione, ad una rampa di voltaggio lineare, di un breve impulso di potenziale elettrico di 5-100 mV per 60 ms. La corrente risultante non è misurata continuamente, ma solo prima e immediatamente dopo ciascun impulso. Lo strumento sottrae il primo valore di corrente misurato a quello successivo l'impulso e grafica questa differenza in funzione del potenziale applicato. L'altezza massima del picco è assegnata rispetto alla tangente ed è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione in esame (**Fig.34**) [34].

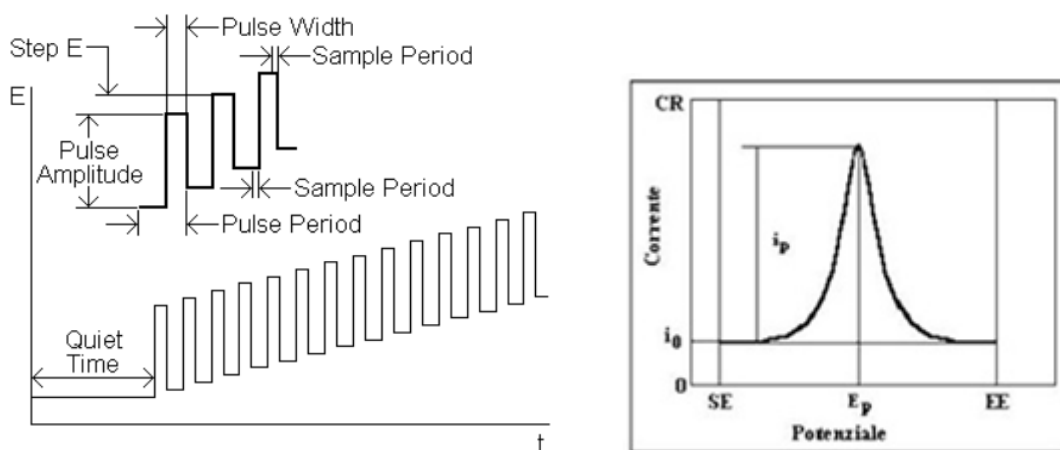


Fig.34 Voltammetria Differenziale ad Impulsi (SE potenziale iniziale, EE potenziale finale, i_0 corrente iniziale, i_p corrente di picco, E_p potenziale di picco).

3.10 Analisi dei dati

La risposta ottenuta per una determinata concentrazione di analita tende a variare con il tempo per una serie di ragioni, legate per lo più a condizioni ambientali (temperatura, umidità) che influiscono sullo stato di aggregazione delle particelle magnetiche, utilizzate nel saggio ELIME, e alla praticità dell'operatore. Questo implica la necessità di ripetere la standardizzazione prima della misura del campione reale; solitamente si esegue una calibrazione al giorno con almeno 5-6 punti.

I saggi immunologici sono generalmente caratterizzati da una relazione non lineare tra la risposta e la concentrazione dell'analita; tale relazione dipende ovviamente dalla tipologia del saggio usato. In questo lavoro sperimentale è stata usata come funzione di calibrazione una *“funzione sigmoidale logistica a 4 parametri”* che nonostante non abbia una interpretazione fisica, ma puramente matematica ci permette di analizzare tutti i dati analitici in possesso, senza dover ripetere numerose volte la curva di calibrazione, evitando così uno spreco eccessivo dei reagenti impiegati dal costo piuttosto elevato.

La funzione di calibrazione usata è la seguente:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

con

a = valore asintotico del massimo

y_0 = valore asintotico del minimo

b = pendenza del tratto rettilineo della sigmoide

x_0 = punto di flesso (IC_{50})

I quattro parametri sono stimati mediante il trattamento dei dati con il programma SigmaPlot 11.0. Inoltre per confrontare le curve di calibrazione è necessaria la seguente normalizzazione di ciascun valore di corrente I_x :

$$\frac{I_x - \bar{I}_{min}}{\bar{I}_{max} - \bar{I}_{min}} \cdot 100 \%$$

con

$\bar{I}_{min}$ = *valor medio della corrente al minimo di concentrazione*

$\bar{I}_{max}$ = *valor medio della corrente a concentrazione saturante*

Successivamente, si è calcolato il limite di rilevabilità (*LOD, limite of detection*), definito come la minima concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco (dove l'analita è assente), ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo. Quando durante una misura si ottiene un segnale prodotto dall'analita pari o superiore al LOD, allora si può dire che tale analita è presente nel campione, bisogna, però, tener conto che il LOD dipende dall'apparecchio utilizzato oltre che dalla metodica analitica.

Da un punto di vista matematico, il LOD è definito come la concentrazione a cui corrisponde un valore di y pari al valore medio dello standard zero $\langle x \rangle$ più tre volte la sua deviazione standard:

$$LOD = \langle x \rangle + 3\sigma$$

con

$\langle x \rangle$ = *valor medio dello standard zero*

σ = *deviazione standard*

CAPITOLO 4

Risultati e Discussione

4.1 Premessa

La prima fase di questo lavoro sperimentale ha riguardato il proseguimento di uno studio già avviato in precedenza sull'utilizzo di particelle magnetiche come supporto solido per la realizzazione di un sistema immunoenzimatico a "sandwich", con rivelazione elettrochimica, che sia in grado di valutare qualitativamente e quantitativamente la presenza del virus dell'Epatite A in acque contaminate destinate ad uso umano od animale.

Allo scopo di realizzare un sistema di "allarme" efficace per l'HAV, sono state utilizzate come supporto per la catena immunologica diverse tipologie di particelle magnetiche, differentemente funzionalizzate. I risultati ottenuti sono stati messi a confronto al fine di trovare il sistema più sensibile in termini di concentrazione minima di HAV determinata. Tutti i parametri operativi sono stati ottimizzati a tal fine prima in tampone e poi in acqua di rubinetto, contaminata artificialmente.

È stato studiato e messo a punto, anche, il metodo di estrazione dell'HAV da campioni di acqua fortificata artificialmente. Sugli stessi campioni sono state condotte misure di ELIME e, in parallelo, misure con sistemi di rilevazione molecolare presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS). È stato così definito un protocollo di estrazione che rappresenti un buon compromesso tra quello ufficiale dettato dall'Organizzazione Internazionale per la Normazione (ISO) e quello sperimentale messo a punto nei Laboratori di Chimica Analitica dell'Università di Roma Tor Vergata.

4.2 Nanoparticelle paramagnetiche ricoperte di polidopamina (MNPs-pDA)

Il saggio ELIME (*Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical*) permette la determinazione di una molecola *target* mediante la realizzazione di uno schema immunoenzimatico a “sandwich” in cui due *anticorpi monoclonali* sono in grado di riconoscere epitopi diversi dell’analita, legandovisi non covalentemente. L’anticorpo di *coating* (MAb_I) è fissato sul supporto di particelle magnetiche, mentre l’anticorpo di *labelling* (MAb_I-AP), marcato con l’enzima *fosfatasi alcalina* (AP), è usato per il riconoscimento.

Negli studi precedenti, svolti presso il Laboratorio di Chimica Analitica, sono stati ottimizzati i parametri per la realizzazione del saggio ELIME su nanoparticelle magnetiche ricoperte di polidopamina (MNPs-pDA), sintetizzate nei Laboratori dell’Università di Tenerife “La Laguna”. Queste particelle sono costituite da una dispersione di materiale paramagnetico, ossido ferrico [Fe₂O₃] e ossido ferroso-ferrico Fe²⁺[Fe³⁺O₂]₂, ricoperto da un sottile strato polimerico di polidopamina (pDA) [35]. È stato caratterizzato il MAb_I definendo la quantità da immobilizzare, pari a 15 µg/mL, e stabilito il tempo di incubazione (45 minuti). Inoltre è stato selezionato un anticorpo di *labelling* capace di riconoscere un epitopo diverso da quello legante l’anticorpo di *coating* (come dichiarato dalla ditta produttrice *Pantec*, Italia) e determinata la quantità da utilizzare nel saggio ELIME non competitivo pari a una diluizione 1:10000 (v/v) della soluzione madre MAb_I-AP (clone 7E7, *Pantec*, Italia) contenente l’anticorpo in tampone PBS.

È stata quindi costruita una curva di calibrazione con soluzioni standard di *HAV commerciale*, preparate a concentrazione crescente 0, 10⁻¹⁴, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, 10⁻⁶ UI/mL, ottenendo un andamento sigmoidale (**Fig.35**).

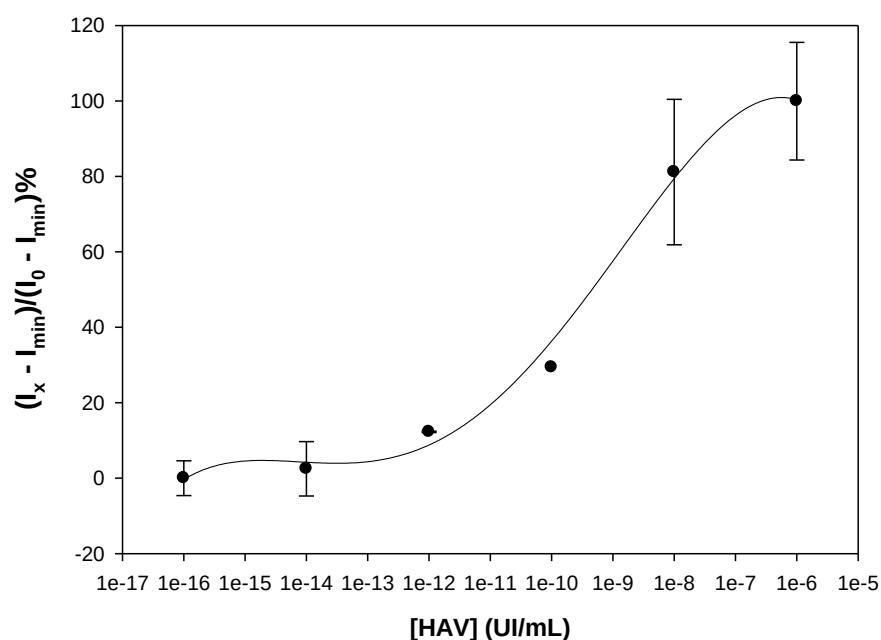


Fig.35 Curva di calibrazione per il Saggio ELIME su MNPs-pDA, MAb_i 15 µg/mL, Dry Milk (DM) al 3%, [HAV] 0, 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} UI/mL, MAb_i-AP 1:10000 (V/V); misura in DPV scan rate 0.1 V/s. Parametri: $a=7.83 \times 10^{-2}$ $b=-4.58 \times 10^{-1}$ $x_0=7.93 \times 10^{-10}$ $y_0=7.44 \times 10^{-2}$.

I dati sono stati elaborati con la “funzione logistica a 4 parametri” (come riportato nel paragrafo 3.10), ottenendo un LOD di 8×10^{-12} UI/mL, un $RSD\%$ del 5% e un intervallo di linearità tra 10^{-12} e 10^{-8} UI/mL.

I precedenti risultati hanno quindi indirizzato la prima fase di questo lavoro sperimentale all'utilizzo di particelle MNPs-pDA come supporto solido per il saggio ELIME. È sicuramente più vantaggioso, in termini di riproducibilità e limite di rilevabilità, rispetto all'immobilizzazione diretta sull'elettrodo stampato. Purtroppo, durante questo lavoro, sono state utilizzate le MNPs-pDA di una sintesi successiva, con scarsi risultati di riproducibilità (come si potrà osservare dai risultati riportati successivamente), oltre che ad avere le particelle aggregate.

Le prime prove effettuate miravano alla costruzione di una curva di *concentrazione/risposta*, come espressione grafica dell'andamento della corrente registrata al variare della concentrazione dell'analita, da utilizzare come calibrazione

per estrapolare la concentrazione di campioni di acqua a concentrazione incognita di HAV.

Sono state utilizzate le condizioni operative ottimizzate in precedenza per la stessa tipologia di particelle MNPs-pDA, quindi *MAB*_i 15 µg/mL per la fase di coating, Dry Milk (*DM*) 3% per la fase di bloccaggio, [*HAV*] standard 0, 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} (UI/mL), *MAB*_i-AP 1:10000 (v/v) per la fase di *labelling*, con tempi di incubazione di 45 minuti e l'*1-NPP* 5 mg/mL come substrato della reazione enzimatica.

Purtroppo nonostante il ripetersi delle prove è stato impossibile ottenere risultati analoghi a quelli degli studi precedenti. La curva concentrazione/risposta del saggio segue infatti un andamento random non riconducibile ad alcuna funzione sigmoideale né riproducibile (**Fig.36**).

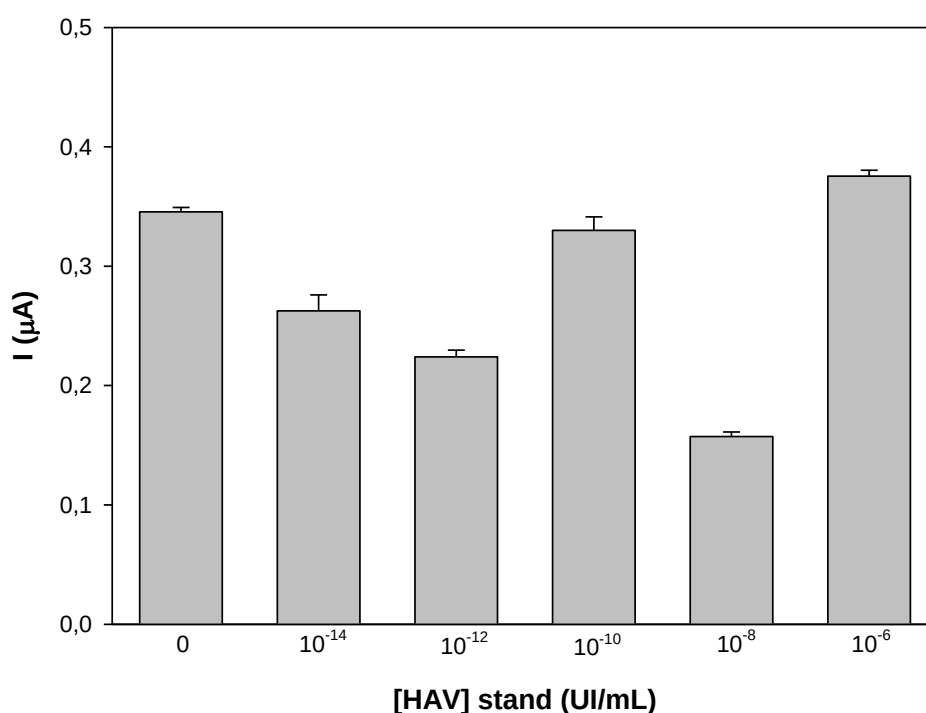


Fig.36 Curva di concentrazione/risposta del Saggio ELIME su MNPs-pDA, *MAB*_i 15 µg/mL, Dry Milk (*DM*) al 3%, [*HAV*] 0, 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} UI/mL, *MAB*_i-AP 1:10000 (v/v), substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0.1 V/s.

Un andamento di questo tipo può essere ricondotto a diverse motivazioni. Infatti, un saggio ELIME è notevolmente influenzato dallo *stato* delle particelle magnetiche usate come supporto solido, dalla *stabilità* degli immunoreagenti, da *binding aspecifici* ed infine da *interferenti* in grado di modificare o inibire l'attività del tracciante enzimatico. Le nanoparticelle utilizzate provenivano da un'altra sintesi, rispetto al lavoro precedente. Normalmente le particelle appaiono come una soluzione omogenea dispersa, mentre nel nostro caso risultavano aggregate, formando due fasi; inoltre le particelle mostravano difficoltà a depositarsi rapidamente, creando uno stadio intermedio tra la soluzione e la sospensione. Questo fenomeno può essere influenzato da fattori ambientali quali temperatura, umidità, dalla presenza di sostanze che ostacolano/favoriscono l'aggregazione o anche dalla sintesi stessa non propriamente riuscita.

La realizzazione di un saggio ELISA su piastra ci ha permesso di escludere possibili problematiche legate agli immunoreagenti usati e di confermare, come sospettato, che la causa principale della non riuscita del saggio ELIME fosse riconducibile al nuovo lotto di particelle prese in consegna. Un meticoloso controllo dei parametri della reazione di sintesi (*tempo, temperatura, velocità di mescolamento e concentrazione* dei reagenti e degli additivi) purtroppo non ha contribuito sufficientemente alla riduzione di questa dispersione [36].

Così onde evitare problematiche future legate a particelle prodotte "artigianalmente", è stata presa la decisione di passare all'utilizzo di particelle commerciali che presentino, quindi, una certa garanzia di riproducibilità. Tra quelle proposte sul mercato, per il proseguimento di questo lavoro sperimentale, sono state scelte le microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate (Goat Anti-Mouse IgG Magnetic-Beads, New England BioLabs, USA) e le microparticelle superparamagnetiche tosilattivate (Dynabeads® M-280 Tosylactivated, Life Technologies, Italia).

4.3 Microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate (Goat Anti-Mouse IgG Magnetic-Beads) – Ottimizzazione del Saggio ELIME per la determinazione di HAV

Le microparticelle paramagnetiche Anti-IgG attivate sono state acquistate dalla New England BioLabs - USA e sono costituite da particelle magnetiche dal diametro di 1 μm con immunoglobuline Anti-IgG legate covalentemente alla superficie non porosa. Questo anticorpo secondario lega la catena pesante dell'immunoglobulina IgG di topo ed è quindi adatto per immunodosaggi che usano un anticorpo primario monoclonale IgG di topo.

4.3.1 Curva di binding – Effetto della concentrazione di MAB_I sulla risposta del segnale

Tutti i parametri operativi sono stati studiati con queste nuove particelle magnetiche, al fine di avere un buon segnale elettrochimico che permetta di discriminare tra piccole variazioni di concentrazione dell'analita in esame.

Per definire la concentrazione di anticorpo primario ottimale da utilizzare nel saggio ELIME a "sandwich", è stata costruita una curva di *binding* (**Fig.37**), usando *DM* 3% come agente bloccante, una concentrazione di *HAV standard* immobilizzato pari a 10^{-8} UI/mL, diverse concentrazioni di MAB_I (0, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$), una diluizione di $\text{MAB}_\text{I-AP}$ 1:10000 (v/v) con tempi di incubazione di 45 minuti. La scelta dell'agente bloccante da utilizzare (*DM* 3%), delle concentrazioni di *HAV* (10^{-8} UI/mL) e del $\text{MAB}_\text{I-AP}$ (1:10000 v/v) rispecchia quelle usate nello studio precedente; tali concentrazioni sono state ottimizzate nelle misure immediatamente successive al fine di migliorare la *qualità* del segnale e la *sensibilità* del metodo.

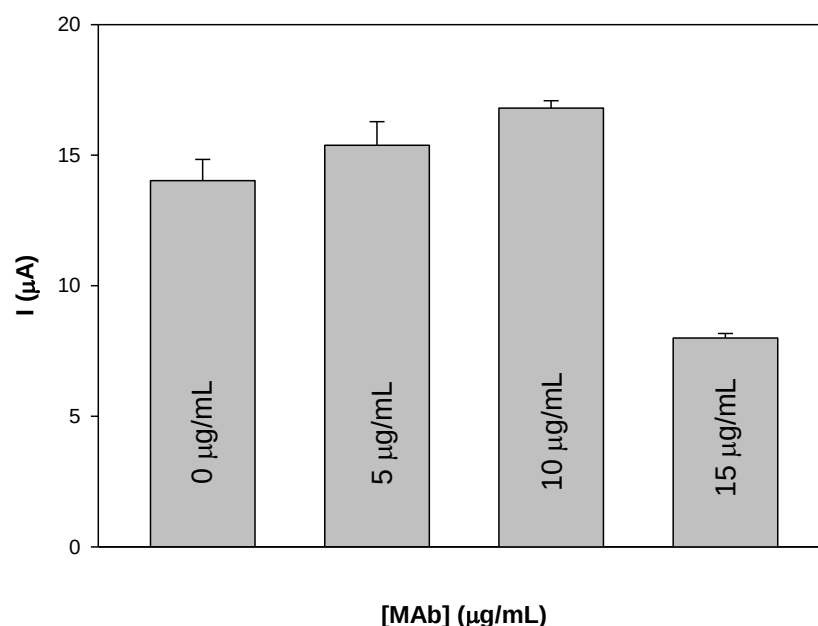


Fig.37 Curva di binding. Effetto della concentrazione di MAb_i sulla risposta del segnale. Dry Milk (DM) al 3%, [MAb_i] 0, 5, 10, 15 μg/mL, [HAV] 10⁻⁸ UI/mL, MAb_i-AP 1:10000 (v/v), substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0.1 V/s.

È considerata ottimale una concentrazione di anticorpo primario cui corrisponde la massima intensità del segnale; ad essa si può stimare, nella formazione dell'immunocomplesso, la massima capacità di discriminare fra diverse concentrazioni del virus da parte dell'anticorpo. Per questo motivo, per il MAb_i è stata scelta una concentrazione di 10 μg/mL.

4.3.2 Studio dell'agente bloccante a diverse concentrazioni dell'anticorpo di labelling MAb_i-AP

Biocomponenti liberi possono adsorbirsi *aspecificamente* nelle fasi successive al *coating* creando dei falsi positivi o andamenti errati dell'analisi. Questo inconveniente è minimizzato tramite l'aggiunta di proteine o sostanze inerti che rivestono la superficie del supporto, costituita dalle particelle magnetiche, rimasta libera (fase di *bloccaggio*).

Solitamente si impiegano l'albumina siero bovina (*BSA*), il latte in polvere (*DM*) o il polivinilaccol (*PVA*). Si aggiungono anche delle soluzioni di lavaggio detergenti non ionici (Tween®20), che evitano che si instaurino nuove interazioni idrofobe con la fase solida, quando si lavora in condizioni di eccesso di reagente, salvaguardando quelle create durante l'immobilizzazione [37].

Allo scopo di stabilire il miglior *bloccante* e ottimizzare anche la diluizione dell'anticorpo di *labelling* da impiegare nel saggio ELIME a "sandwich", è stata eseguita una prova (**Fig.38**) impiegando *BSA* 3%, *DM* 3% e *PVA* 1% come bloccanti e aggiungendo diverse diluizioni di *MAb_I-AP* (1:5000, 1:10000, 1:25000 v/v) in assenza di altri bioreagenti.

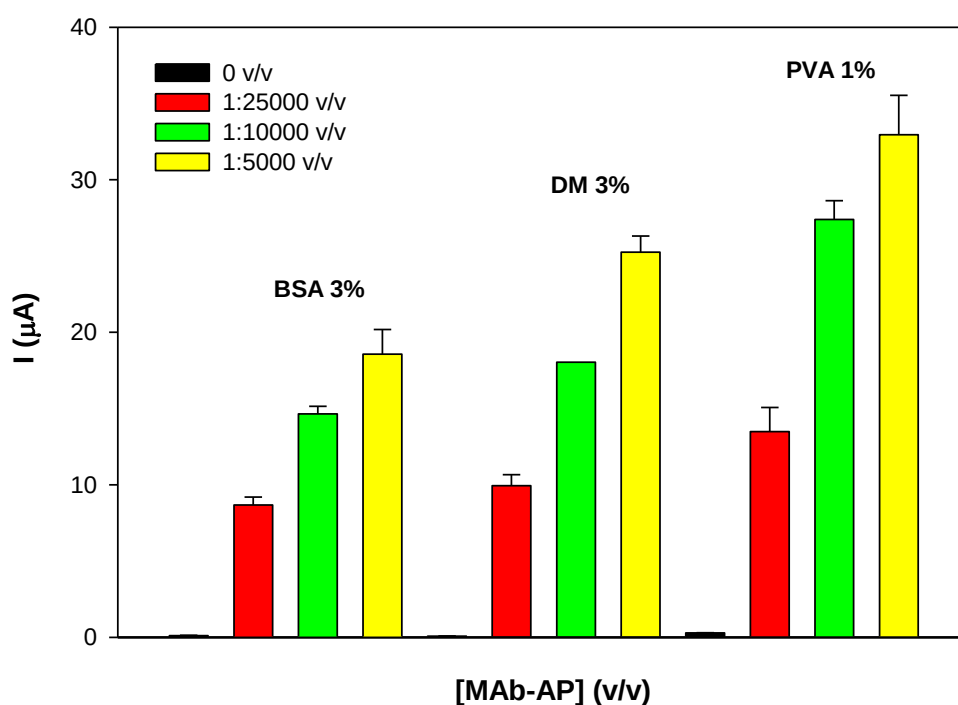


Fig.38 Studio dell'agente bloccante a diverse concentrazioni dell'anticorpo di labelling *MAB_I-AP*. *BSA* 3%, *DM* 3%, *PVA* 1%, [*MAB-AP*] 1:5000, 1:10000, 1:25000 (v/v), substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0,1 V/s.

Dai risultati della prova è stato possibile concludere che l'albumina siero bovina (*BSA*) risulta il miglior bloccante e che la quantità di *MAB_I-AP* da utilizzare nel saggio ELIME non competitivo corrisponde ad una diluizione 1:25000 (v/v) della soluzione madre contenente l'anticorpo in tampone PBS.

4.3.3 Curva di calibrazione del Saggio ELIME non competitivo per HAV

Ottimizzati i parametri del metodo, in termini di concentrazione dei reagenti e del bloccante impiegato, è stata realizzata la curva di calibrazione con soluzioni standard di virus commerciale (**Fig.39**). Sono state preparate soluzioni a concentrazione crescente di HAV pari a 0, 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} e 10^{-8} UI/mL. Per il MAb_i è stata usata una concentrazione di 10 µg/mL mentre per il MAb_i-AP quella di 1:25000 (v/v).

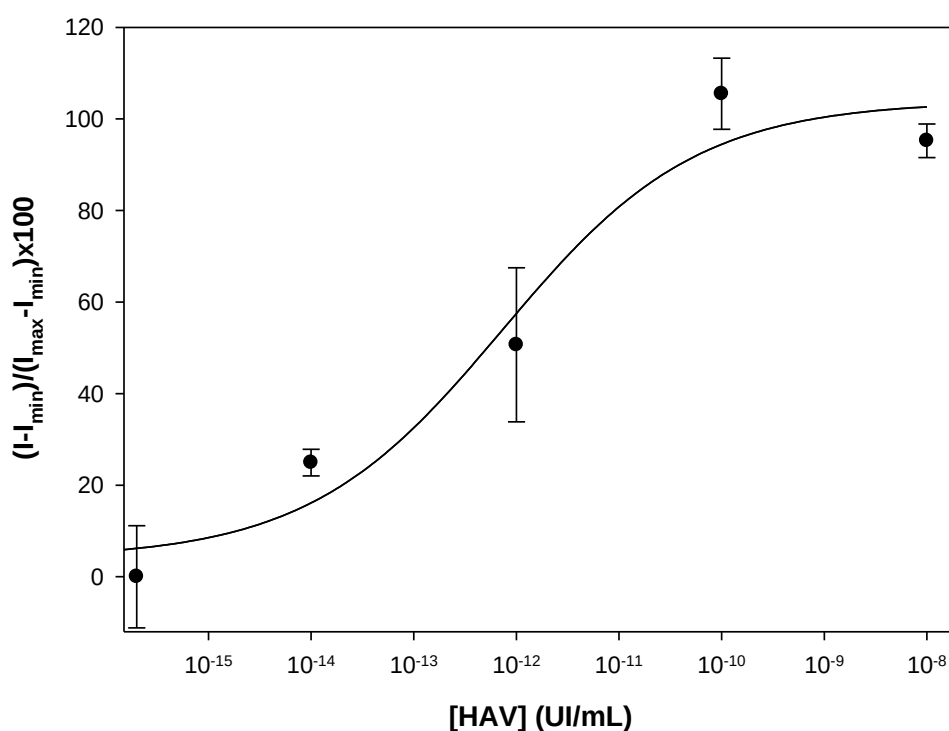


Fig.39 Curva di calibrazione per il Saggio ELIME su particelle magnetiche Goat Anti-Mouse IgG, MAb_i 10 µg/mL, Dry Milk (DM) al 3%, [HAV] 0, 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} UI/mL, MAb_i-AP 1:25000 (v/v); substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0.1 V/s. Parametri: $a=102.63$ $b=-5.18 \times 10^{-12}$ $x_0=-1.04 \times 10^{-12}$ $y_0=5.59$.

I dati sono stati elaborati secondo la funzione logistica a 4 parametri (come riportato nel paragrafo 3.10). Il LOD risulta pari a 4×10^{-14} UI/mL con un RSD% del 6%, l'intervallo di lavoro è compreso tra 10^{-14} e 10^{-10} UI/mL.

LOD	4×10^{-14} UI/mL
RSD %	6%

4.3.4 Analisi dei campioni di virus in coltura

Le misure effettuate fino ad ora sono state realizzate con standard di HAV commerciale (inattivo), la cui concentrazione è definita in *UI/mL*. Tuttavia in PCR, metodo ufficiale per determinare l'HAV in campioni reali, la quantità di HAV presente è definita in *copie genomiche/mL*. Da ricerca bibliografica [38] si è visto che non esiste un fattore di conversione universale tra le due unità utilizzate. Pertanto, in collaborazione con il Laboratorio del “*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*” dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), si è deciso di passare a misure su HAV cresciuto in coltura, in modo da riprodurre il più possibile quanto trovato in realtà e di ricavare, inoltre, il fattore di conversione attraverso il metodo ELIME sviluppato.

L'inattivazione del virus è stata eseguita seguendo una procedura ricavata dalla letteratura [6], con formaldeide e successiva incubazione a 4 °C al buio per 24h. Il virus è stato poi aliquotato e conservato a -20°C. Lo stock virale utilizzato (HAV stock ISS del 9.6.17) ha una concentrazione, definita via PCR dallo stesso Istituto, pari a 7.5×10^8 *copie genomiche/mL*.

È stato quindi ricavato il fattore di conversione (**Fig.40**):

$$1 \text{ UI/mL} = 2 \times 10^6 \text{ copie genomiche/mL.}$$

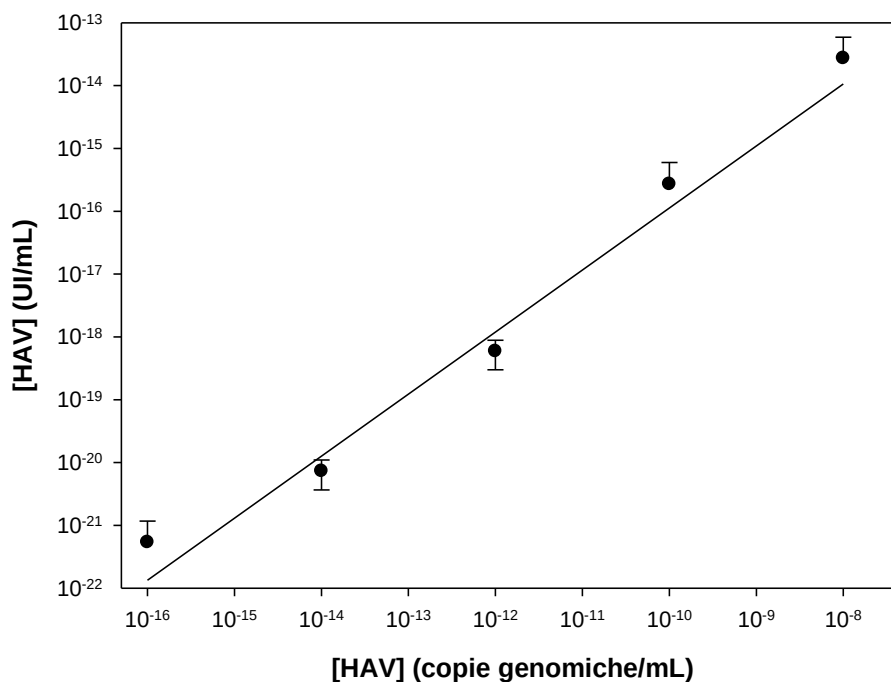


Fig.40 Curva di correlazione tra [HAV] (UI/mL) e [HAV] (copie genomiche/mL) per HAV ISS stock del 9.6.17.

Tutte le prove, che verranno condotte da questo momento in poi, saranno realizzate sempre con HAV in cultura in modo da simulare le condizioni di analisi di campioni realmente contaminati da questo virus.

Si è lavorato in un intervallo di concentrazione di HAV di 0-10 copie genomiche/mL. Per il MAb_I è stata usata una concentrazione di 10 µg/mL mentre per il MAb_I-AP quella di 1:25000 (v/v) (**Fig.41**).

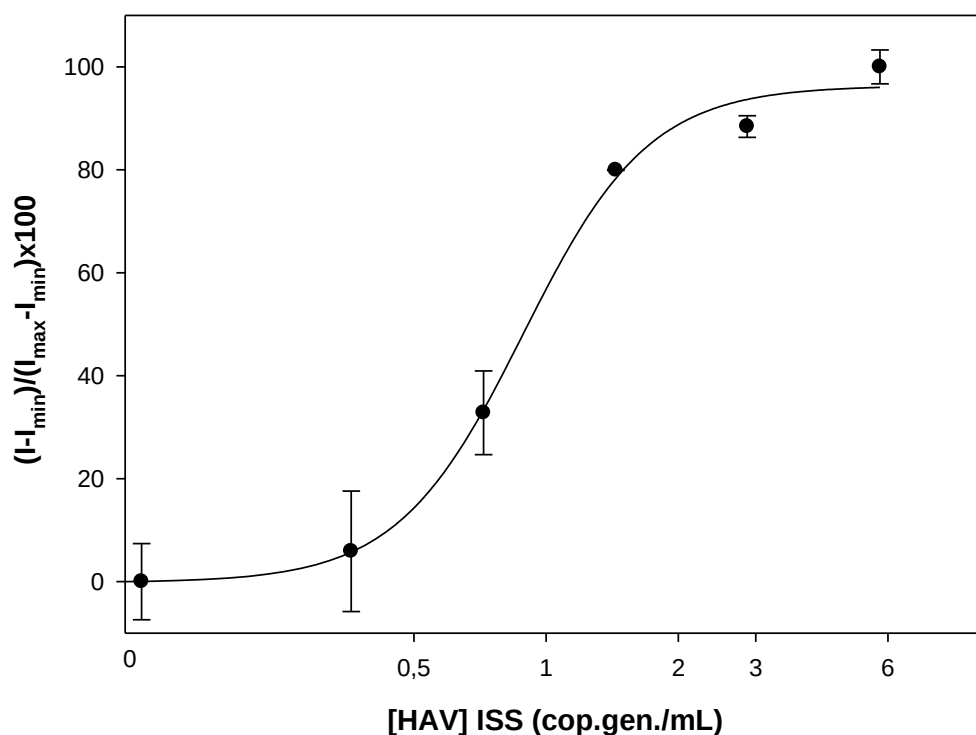


Fig.41 Curva di calibrazione per il Saggio ELIME su particelle magnetiche Goat Anti-Mouse IgG, MAb_i 10 µg/mL, Dry Milk (DM) al 3%, [HAV] 0-10 copie genomiche/mL, MAb_i-AP 1:25000 (v/v); substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0.1 V/s.
Parametri: **a**=96.53 **b**=-3.03 **x₀**=0.89 **y₀**=-0.18.

I dati sono stati elaborati secondo la funzione sigmoideale logistica a 4 parametri (come riportato nel paragrafo 3.10). Il LOD risulta pari a 0.5 copie genomiche/mL con un RSD% del 7 %, l'intervallo di lavoro è compreso tra 0.4 e 6 copie genomiche/mL.

LOD	0.5 cop.gen./mL
RSD %	7 %

4.3.5 Estrazione di HAV da acqua potabile contaminata sperimentalmente

Dopo aver valutato l'applicabilità del Saggio ELIME alla determinazione di HAV in coltura, sono stati fortificati dei campioni di acqua di rubinetto dei nostri laboratori con concentrazioni note di virus e quindi analizzati.

Tuttavia la determinazione di HAV in campioni di acqua contaminati non può essere eseguita semplicemente prelevandola e analizzandola; la misura potrebbe essere falsata per la presenza di interferenti nella matrice che potrebbero competere per il sito di legame con il MAb_i ostacolando la costruzione della catena immunologica. Quindi, si è pensato di simulare le stesse procedure utilizzate negli impianti di depurazione dell'acqua potabile, filtrando il campione d'acqua con particolari filtri e successivamente estraendo l'HAV dal filtro usato. Solitamente la concentrazione di HAV in un campione reale è molto bassa, ma vista la buona *sensibilità* del metodo sviluppato non è necessaria un'ulteriore fase di concentrazione, dopo la filtrazione, come invece viene richiesto dalle procedure adottate negli impianti di depurazione.

Al fine di estrarre il virus sono stati utilizzati dei filtri elettropositivi *Zeta PlusTM 1MDS* (CUNO, 3M Company, USA) in nitrile, aventi un diametro di 47 mm. Questa tipologia di filtro, raccomandata dall'Agenzia Americana del Governo per la Protezione dell'Ambiente (EPA) nell'Aprile 1996, è comunemente utilizzata per determinare la concentrazione di virus enterici in acque di laghi, fiumi, piscine e acque destinate al lavaggio e alla surgelazione di prodotti alimentari quali frutta ed ortaggi [39].

La cattura del virus avviene per adsorbimento fisico dell'analita sulla membrana, mediato da interazioni elettrostatiche, con successiva eluizione utilizzando una soluzione proteica alcalina, come ad esempio estratto di carne 1.5% in soluzione acquosa di Tris-glicina ad un pH 9.5 (*TGBE*). I filtri usati sono generalmente prodotti in cartucce contenenti più filtri impaccati in colonna. Tuttavia, in questo lavoro sperimentale, sono stati usati singoli filtri (opportunamente resi disponibili dalla

casa produttrice), facili da manipolare e molto efficaci nella cattura; il virus è mantenuto integro fino ad un massimo di 300 ore dall'adsorbimento.

Il metodo di estrazione è stato messo a punto modificando, opportunamente, i protocolli riportati dal venditore dei filtri, tenendo conto di ciò che era riportato in letteratura [39] [40], e quello ufficiale ISO per l'estrazione di virus enterici.

Inizialmente è stata eseguita una prova presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), applicando il protocollo ISO per l'estrazione e concentrazione di HAV da campioni di acqua potabile contaminata sperimentalmente, con successiva estrazione degli acidi nucleici e RT-(q)PCR. Sono stati preparati 5 campioni di acqua potabile contaminati con HAV, in diverse concentrazioni (**Tab.3**), scelte in modo che fossero comprese nella curva di calibrazione del saggio ELIME sviluppato.

Tab.3 Concentrazioni di HAV basati sulla titolazione dello stock virale mediante PCR.

Livello	[HAV] (cop.gen./mL)
L0	0
L1	0.2
L2	2
L3	20
L4	200

I campioni sono stati filtrati su membrane elettropositive Zeta Plus™ 1MDS con un sistema di rampe di filtrazione multiposizione, in grado di alloggiare più beute di raccolta e collegato ad una pompa da vuoto. Successivamente il virus, trattenuto dai filtri, viene eluito con 4 mL di TGBE 0.1% pH 9.5. In seguito l'eluato è stato ultracentrifugato, e, quindi, concentrato, come da protocollo ISO riportato (*paragrafo 3.6*). Dopo ogni passaggio di concentrazione ed eluizione, è stata effettuata l'estrazione degli acidi nucleici. Per ultimo, sono stati sottoposti a PCR 10 µL dei 100 µL ottenuti alla fine del processo di estrazione degli acidi nucleici (**Tab.4-A/B**).

Tab.4-A Risultati quantitativi riportati per mL di acqua sperimentale contaminata; *basato sulla titolazione dello stock virale mediante PCR; **determinazione dell'inoculo estraendo gli acidi nucleici da ciascuna diluizione virale usata per l'inoculo.

Livello	Inoculo [HAV] (cop.gen./mL)*	Inoculo [HAV] (cop.gen./mL)**
L0	0	0
L1	0.2	0.02
L2	2	0.2
L3	20	3
L4	200	52

Tab.4-B Risultati quantitativi riportati per mL di acqua sperimentale contaminata; n.d non determinabile.

Livello	Acqua inoculata con HAV (cop.gen./mL)	Eluato in TGBE (cop.gen./mL)	Concentrato Amicon (cop.gen./mL)
L0	0	0	0
L1	n.d	n.d	n.d
L2	n.d	n.d	n.d
L3	n.d	n.d	n.d
L4	16	0.5	0.1

Come si evince dai dati sperimentali riportati nelle tabelle **4-A/B**, vi è stata una elevata perdita nella fase di estrazione (L1, L2 e L3 sono risultati al di sotto del limite di rilevabilità del sistema), dimostrando la necessità di migliorare il protocollo, rendendo più efficace il distacco del virus dalla membrana e limitando il più possibile i passaggi.

A tal proposito, prima di proseguire con la validazione del metodo ELIME proposto, sono state eseguite delle prove mettendo a confronto l'eluizione con 4 mL di TGBE 0.1% del virus dalla membrana, come da protocollo ISO, contro i 40 mL di TGBE 0.1%, utilizzati in prove sperimentali eseguite in precedenza presso il laboratorio di Chimica Analitica. Inoltre è stato eliminato il secondo passaggio di concentrazione, quello nel sistema di ultracentrifugazione, per limitare la perdita del virus che può rimanere adeso nella cartuccia Amicon, usata in questa fase.

Sono state eseguite due prove di estrazione del virus da un campione di acqua potabile contaminata sperimentalmente, ottenendo recuperi del 45% e dell'84% per l'estrazione con 4 mL e 40 mL di eluente TGBE 0.1%, rispettivamente. La prova è stata ripetuta anche per differenti concentrazioni ricadenti nell'intervallo di rilevabilità del metodo, ottenendo sempre dei recuperi più alti per una estrazione con 40 mL di eluente TGBE 0.1%, confermando che, aumentando il volume di eluente di un fattore 10, l'estrazione possa risultare più efficace.

Durante queste prove di recupero, si è giunti ad una importante conclusione. La preparazione degli inoculi di HAV, necessari alla contaminazione dei campioni di acqua potabile, deve rispettare necessariamente lo stesso volume di pescata iniziale e di volume finale delle soluzioni preparate. Questo perché non possiamo considerare che la soluzione del virus sia completamente omogenea e di prelevare un'uguale concentrazione da essa (in termini di particelle di virus), qualunque sia il volume di pescata dalla soluzione madre di HAV (stock ISS del 9.6.17). Difatti, a seconda del volume di pescata si ha un differente numero di particelle virali prelevate; un volume di pescata maggiore probabilmente garantisce un maggior numero di particelle virali prelevate. Onde minimizzare l'errore dovuto a tale

problematica, è necessario quindi rispettare uno stesso volume di pescata in uno stesso volume finale di soluzione per preparare gli inoculi di HAV, a partire dalla soluzione madre, necessari per la contaminazione dell'acqua. Così facendo sono state ripetute diverse prove di recupero filtrando ed estraendo l'HAV da campioni di acqua potabile contaminata, ottenendo una percentuale media di recupero pari al 33%.

4.3.6 Prova di confronto – Contaminazione sperimentale di acqua potabile

Dopo aver quindi stabilito la procedura di estrazione dell'HAV da campioni di acqua potabile contaminata sperimentalmente, è stata eseguita una prova di confronto al fine di validare il metodo sviluppato.

Sono stati preparati 7 campioni di acqua potabile contaminati con HAV, in diverse concentrazioni (**Tab.5**), alcune scelte in modo che fossero comprese nella curva di calibrazione del saggio ELIME sviluppato (0-10 copie genomiche/mL), altre più alte in modo che fossero sicuramente rilevabili alla PCR.

Tab.5 Concentrazioni di HAV basati sulla titolazione dello stock virale mediante PCR.

Livello	[HAV] (cop.gen./mL)
L0	0
L1	0.2
L2	2
L3	20
L4	200
L5	2000
L6	20000

I campioni sono stati filtrati su membrane elettropositive Zeta Plus™ 1MDS. Successivamente il virus, trattenuto dai filtri, viene eluito con 40 mL di TGBE 0.1% pH 9.5. Parte della soluzione di estrazione è stata utilizzata per l'analisi ELIME, mentre il rimanente per l'applicazione della RT-(q)PCR. In seguito l'eluato è stato ultracentrifugato e, quindi, concentrato, come da protocollo ISO riportato. Dopo ogni passaggio di concentrazione ed eluizione, è stata eseguita l'estrazione degli acidi nucleici. Per ultimo, sono stati sottoposti a PCR 10 µL dei 100 µL ottenuti alla fine del processo di estrazione degli acidi nucleici (**Tab.6-A/B**).

Tab.6-A Risultati quantitativi riportati per mL di acqua sperimentale contaminata. *basato sulla titolazione dello stock virale mediante PCR; **determinazione dell'inoculo estraendo gli acidi nucleici da ciascuna diluizione virale usata per l'inoculo.

Livello	Inoculo [HAV] calcolato * (cop.gen./mL)	Inoculo [HAV] determinato ** (cop.gen./mL)
L0	0	0
L1	0.2	0.02
L2	2	0.08
L3	20	1.00
L4	200	5.00
L5	2000	84.00
L6	20000	1127.00

Tab.6-B Risultati quantitativi riportati per mL di acqua sperimentale contaminata. n.d non determinabile

Livello	Acqua inoculata con HAV (cop.gen./mL)	Eluato in TGBE (cop.gen./mL)	Concentrato Amicon (cop.gen./mL)
L0	0	0	0
L1	n.d.	n.d.	n.d.
L2	n.d.	n.d.	n.d.
L3	n.d.	n.d.	n.d.
L4	8	28	126
L5	126	68	260
L6	1172	1876	4072

Gli stessi campioni sono stati analizzati anche con il saggio ELIME in modo da poter confrontare i risultati sperimentali ottenuti con entrambe le tecniche (**Tab.7**).

Tab.7 Risultati ottenuti per i campioni analizzati con il saggio ELIME. * i livelli L4, L5, L6 di acqua inoculata sono stati analizzati diluendo 1:2, 1:20, 1:200 (v/v) rispettivamente; ** i livelli L4, L5, L6 di eluato in TGBE sono stati analizzati diluendo 1:10, 1:100, 1:1000 (v/v) rispettivamente; ***i valori sono stati corretti per una perdita del 67%; n.d. non determinabile.

Livello	Acqua inoculata con HAV* 100 mL (cop.gen./mL)	Eluato in TGBE ** (cop.gen./mL)	Eluato in TGBE corretto *** (cop.gen./mL)
L0	0	0	0
L1	1.00	n.d.	n.d.
L2	1.40	0.50	0.80
L3	3.00	2.00	3.00
L4	4.00	6.00	10.00
L5	15.00	49.00	82.00
L6	131.00	265.00	443.00

Come si evince dai risultati riportati (**Tab.6-7**), la determinazione PCR non permette di rilevare il virus in basse concentrazioni (livelli L1, L2, L3); bisogna infatti considerare che si ha una notevole perdita durante le fasi di concentrazione e che solo 1/10 del campione estratto viene poi effettivamente analizzato in PCR. D'altro canto bisogna anche tener conto del fatto che le cartucce Amicon usate nella fase di ultracentrifugazione tendono a saturarsi per concentrazioni più alte (maggiori di 500 particelle virali/mL) sebbene aiutino a rilevare il virus a concentrazioni più basse.

Al contrario la determinazione con il saggio ELIME permette la rilevazione del virus in basse concentrazioni (da L0 a L4) ma risulta meno efficace per la quantificazione di alte concentrazioni del virus (vedasi il campione L6). Tuttavia il metodo soddisfa i nostri scopi, ovvero la possibilità di avere un metodo in grado di funzionare come un sistema di "allarme", che permetta una rapida identificazione di campioni

sospetti direttamente nelle linee di produzione, riducendo tempi, il trasporto di campioni e costi di analisi.

Come si può osservare (colonna 100 mL acqua inoculata con HAV), è strettamente necessaria la fase di filtrazione su membrane elettropositive Zeta Plus™ 1MDS e di estrazione del virus dall'acqua. Infatti, si può notare un certo effetto "matrice", dovuta alla torbidità e alla presenza di sospensioni nei campioni di acqua analizzati. Il ruolo del filtro è, quindi, non sono quello di trattenere il virus per adsorbimento fisico, mediato da interazioni elettrostatiche, ma anche di filtrare via interferenti eventualmente presenti nei campioni da analizzare.

Il saggio ELIME sviluppato può, quindi, rappresentare un'arma efficace per la rivelazione rapida del virus HAV in acque di lavaggio di alimenti destinati al consumo umano od animale, anche quando il virus è presente in concentrazioni non rilevabili dal sistema PCR.

4.4 Microparticelle superparamagnetiche tosilattivate (Dynabeads® M280 Tosylactivated)

In parallelo allo sviluppo del saggio ELIME con microparticelle Anti-IgG attivate, è stato effettuato uno studio preliminare su l'applicabilità del metodo con microparticelle superparamagnetiche tosilattivate (Dynabeads® M280 Tosylactivated), già utilizzate in precedenza ma per la rilevazione di batteri patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari [41]. Inizialmente, è stato valutato il miglior bloccante da utilizzare con queste particelle; difatti esso cambia al variare del materiale con cui sono prodotte le particelle (e.s. il tipo di polimero), in quanto il materiale bloccante vi aderisce via interazione elettrostatica.

Sono state eseguite due prove, usando come bloccanti BSA 3% e DM 3%, anticorpo di *coating* MAb₁ 100 µg/5 mg di particelle magnetiche, HAV standard in concentrazioni crescenti 0, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ UI/mL, anticorpo di *labelling* MAb₁-AP 1:10000 (v/v), tempi di incubazione di 1 ora e l'1-NPP 5 mg/mL come substrato della

reazione enzimatica. Infine è stata quindi eseguita la misura in voltammetria ad impulsi differenziali (**Fig.42**)

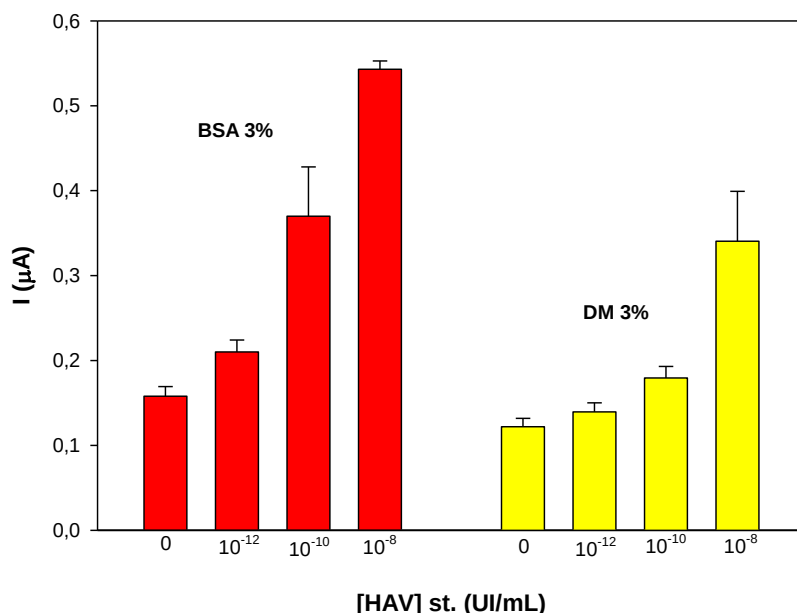


Fig.42 Studio dell'agente bloccante (BSA 3%, DM 3%) a diverse concentrazioni di HAV standard 0, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ UI/mL, [MAb-AP] 1:10000 (v/v), substrato 1-NPP 5 mg/mL; misura in DPV scan rate 0,1 V/s.

Come si evince dal grafico, il latte in polvere DM al 3% rappresenta il miglior bloccante tra i due, permettendoci di ottenere un bianco più basso. Il passo successivo sarebbe stato realizzare una curva di *binding*, usando come bloccante DM 3%, MAb_i 100 μg/5 mg di particelle magnetiche (come da protocollo fornito dalla casa produttrice), una concentrazione fissa di HAV 10⁻⁸ UI/mL e definire la migliore diluizione dell'anticorpo di labelling MAb_i-AP. Tuttavia abbiamo dovuto fare una scelta prettamente economica. Per l'attivazione di queste particelle occorre, infatti, una quantità di MAb_i (100 μg/5 mg) di particelle magnetiche utilizzate, che comporta ogni volta un alto dispendio del reagente che è venduto in stock da 100 μL ed è molto costoso. Visto i buoni risultati ottenuti con le microparticelle Anti-IgG attivate, si è deciso di sospendere lo studio con le microparticelle tosilattivate auspicando di riprenderlo in futuro.

Conclusioni

Gli studi condotti durante questo lavoro sperimentale hanno avuto l'obiettivo di approfondire uno studio già in corso inerente l'ottimizzazione di un saggio ELIME (*Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical*) per il monitoraggio della presenza del virus dell'Epatite A (HAV) in acque di lavaggio di alimenti destinati al consumo umano ed animale.

Il sistema sviluppato, basato sull'utilizzo di particelle magnetiche Anti-Mouse IgG, è in grado di rilevare il virus HAV con un LOD di 0.5 copie genomiche/mL in un intervallo di lavoro compreso tra 0.4 e 6 copie genomiche/mL (si osservano anche concentrazioni più alte ma non sono quantificabili; per la loro quantificazione è necessaria la diluizione dei campioni).

Al fine di poter determinare la presenza del virus HAV in differenti matrici (alimentari e non), è stato messo a punto un metodo di estrazione del virus utilizzando filtri elettropositivi Filtri Zeta Plus™ 1MDS, venduti commercialmente per gli impianti di depurazione delle acque reflue. Tale metodo è stato sviluppato modificando opportunamente i protocolli riportati dal venditore dei filtri, tenendo conto di ciò che è riportato in letteratura e del protocollo ufficiale ISO per l'estrazione di virus enterici.

La validazione del metodo è stata eseguita mediante una prova di confronto su campioni di acqua di rubinetto, contaminati sperimentalmente, analizzati sia con il saggio ELIME sviluppato sia con la Real Time RT-(q)PCR. Da tale prova si può concludere che il saggio ELIME sviluppato è in grado di funzionare come un sistema di "allarme" che permetta la rapida identificazione di campioni sospetti direttamente nelle linee di produzione, anche quando l'HAV è presente in concentrazioni non rilevabili dal sistema PCR, riducendo così i tempi, il trasporto di campioni ed i costi di analisi.

Bibliografia

- [1] J. V. Lazarus, K. Safreed-Harmon, and I. Sperle, "Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis: In WHO Member States," *Glob. Alert Response*, p. 208, 2013.
- [2] Hyman DL, *Clinical Infectious Diseases*, American P. 2008.
- [3] "http://www.salute.gov.it/portale/salute/Malattie_infettive"
- [4] B. H. Robertson, R. W. Jansen, B. Khanna, A. Totsuka, O. V. Nainan, G. Siegl, A. Widell, H. S. Margolis, S. Isomura, K. Ito, T. Ishizu, Y. Moritsugo, S. M. Lemon, "Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions," *J. Gen. Virol.*, vol. 73, pp. 1365–1377, 1992.
- [5] C. Coudray-Meunier, A. Fraisse, C. Mokhtari, S. Martin-Latil, A. M. Roque-Afonso, and S. Perelle, "Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays," *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, 2014.
- [6] S. A. Sattar, T. Jason, S. Bidawid, and J. Farber, "Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation.," *Can. J. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 3, pp. 159–63, 2000.
- [7] F. X. Abad, R. M. Pinto, and A. Bosch, "Survival of enteric viruses on environmental fomites," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 10, pp. 3704–3710, 1994.
- [8] D. L. Kasper, A. S. Fauci, *Harrison - Principi di Medicina Interna*, 19th ed. 2016.
- [9] S. C. Matheny and J. E. Kingery, "Hepatitis A," *Am. Fam. Physician*, vol. 86, no. 11, pp. 1027–1034, 2012.
- [10] K. H. Jacobsen and S. T. Wiersma, "Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005," *Vaccine*, vol. 28, no. 41, pp. 6653–6657, 2010.
- [11] A. Mele, T. Stroffolini, F. Palumbo, G. Gallo, P. Ragni, E. Balocchini, M. E. Tosti, R. Corona, A. Marzolini, A. Moiraghi and the SEIVA Collaborating Group, "Incidence of and risk factors for hepatitis A in Italy: public health indications from a 10 year surveillance," *J. Hepatol.*, vol. 26, pp. 743–747, 1991.
- [12] M. Chironna, R. Prato, A. Sallustio, D. Martinelli, S. Tafuri, M. Quarto and C. Germinario, "Hepatitis A in Puglia (South Italy) after 10 years of universal vaccination: Need for strict monitoring and catch-up vaccination," *BMC Infect. Dis.*,

vol. 12, 2012.

- [13] L. Ricotta, V. Alfonsi, A. Bella, M. E. Tosti, A. R. Ciccaglione, R. Bruni, S. Taffon, M. Equestre, M. N. Losio, V. Carraro, S. Franchini, B. Natter, M. Augschiller, A. Foppa, C. Gualanduzzi, E. Massimiliani, A. C. Finarelli, B. M. Borrini, T. Gallo, V. Cozza, M. Chironna, R. Prato, C. Rizzo, "Hepatitis A outbreak in Italy, 2013 : a matched case – control study," *Eurosurveillance*, vol. 19, no. 37, pp. 1–7, 2013.
- [14] M. E. Tosti, E. Spada, L. Romano, A. Zanetti, and A. Mele, "Acute hepatitis A in Italy: incidence, risk factors and preventive measures," *J. Viral Hepat.*, vol. 15, Suppl 2, pp. 26–32, 2008.
- [15] S. M. Goyal, C. P. Gerba, and J. L. Melnick, "Human enteroviruses in oysters and their overlying waters," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 37, no. 3, pp. 572–581, 1979.
- [16] "<http://prevenzione.ulss20.verona.it>
- [17] C. N. Shapiro and H. S. Margolis, "Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection," *J. Hepatol.*, vol. 18 Suppl 2, no. 3, pp. S11–S14, 1993.
- [18] L. Croci, D. De Medici, G. Morace, A. Fiore, C. Scalfaro, F. Beneduce, L. Toti, "Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 67–71, 1999.
- [19] D. L. Croci, D. De Medici, C. Scalfaro, A. Fiore, M. Divizia, D. Donia, A. M. Cosentino, P. Moretti and G. Costantini, "Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in Adriatic Sea mussels," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 293–298, 2000.
- [20] L. Croci, D. De Medici, "Epatite A trasmessa con gli alimenti," *Rapporti ISTISAN 00/2*.
- [21] F. Anna, L. Volterra, "Microbiologia delle acque di diversa derivazione," *Rapporti ISTISAN 04/2014*.
- [22] P. Sequi, "Collana di Metodi di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico," 1th ed., a cura di G. Picci, 2002 .
- [23] APAT-IRSA/CNR, "Metodologie analitiche per il controllo della qualità delle acque," *Poligr. e Zecca dello Stato Roma, Ital.*, vol. 29, pp. 575–581, 2003.
- [24] A. Voller, A. Bartlett, and D. E. Bidwell, "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques," *J. Clin. Pathol.*, vol. 31, pp. 507–520, 1978.
- [25] M. Tefvik Dorak, "*Real-time PCR*," Taylor & Francis; 1th ed. 2007.
- [26] R. Morace, G. Rapicetta, "Epidemie di epatite in Italia e possibili indagini su matrici

ambientali," *Rapporti ISTISAN* 04/2014.

- [27] R. Reverberi and L. Reverberi, "Factors affecting the antigen-antibody reaction," *Blood Transfus.*, vol. 5, no. 4, pp. 227–240, 2007.
- [28] J. W. Keith Wilson, "Metodologia biochimica," Raffaello Cortino editore, 1th ed., 1995.
- [29] M. G. Mazzarello, R. Brunetti, M. Perfumo, A. M. Torriglia, and C. Microbiologiche, "Caleidoscopio Principali Tecniche Analitiche in uso.," *Medical Systems* ed., no. 209, 2007.
- [30] G. Morace, "Epidemie di Epatite A," *Rapporti ISTISAN* 04/2014.
- [31] D. De Medici, "Tecniche classiche ed innovative per la determinazione dei virus enterici negli alimenti," *Rapporti ISTISAN* 04/2014.
- [32] O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, and M. J. A. Martínez, "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications," *Talanta*, vol. 73, no. 2, pp. 202–219, 2007.
- [33] D. Harvay, "Analytical Chemistry 2.0," *J. Anal. Bioanal. Chem.*, no. 399, pp. 149-152, 2011.
- [34] M. Lovrić and J. Osteryoung, "Theory of differential normal pulse voltammetry," *Electrochim. Acta*, vol. 27, no. 7, pp. 963–968, 1982.
- [35] P. Salazar, M. Martín, and J. L. González-Mora, "Polydopamine-modified surfaces in biosensor applications," *Polym. Sci. Res. Adv. Prat. Appl. Educ. Asp.*, vol. 1, pp. 385–396, 2007.
- [36] Y. Wang, S. Wang, H. Niu, Y. Ma, T. Zeng, Y. Cai, Z. Meng, "Preparation of polydopamine coated Fe₃O₄nanoparticles and their application for enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1283, pp. 20–26, 2013.
- [37] D. Romanazzo, D. De Medici, L. Toti, "ELIME (Enzyme Linked Immuno Magnetic Electrochemical) Method for Mycotoxin Detection," *J. Vis. Exp.*, no. 32, pp. 1–4, 2009.
- [38] R. M. Madej, J. Davis, M. J. Holden, S. Kwang, E. Labourier, and G. J. Schneider, "International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing," *J. Mol. Diagnostics*, vol. 12, no. 2, pp. 133–143, 2010.
- [39] A. D. Schlindwein, C. M. O. Simões, and C. R. M. Barardi, "Comparative study of two

- extraction methods for enteric virus recovery from sewage sludge by molecular methods," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 4, pp. 576–579, 2009.
- [40] M. R. Karim, E. R. Rhodes, N. Brinkman, L. Wymer, and G. S. Fout, "New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 8, pp. 2393–2399, 2009.
- [41] G. Volpe, E. Delibato, L. Fabiani, E. Pucci, S. Piermarini, A. D'Angelo, F. Capuano, D. De Medici, G. Palleschi, "Talanta Development and evaluation of an ELIME assay to reveal the presence of Salmonella in irrigation water : Comparison with Real-Time PCR and the Standard Culture Method," *Talanta*, vol. 149, pp. 202–210, 2016.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Professoressa Laura Micheli, relatore di questa tesi, per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi, per l'aiuto che mi ha dato durante tutto il periodo di tesi e per tutto quello che mi ha insegnato con entusiasmo e senza mai perdere la pazienza.

Un sentito ringraziamento ai miei genitori Antonio e Martine per il loro incrollabile sostegno che mi ha permesso di raggiungere questo importante traguardo della mia vita e a Veronica e Andrea per aver creduto fermamente in me senza mai dubitare delle mie capacità.

Un ringraziamento ai compagni di studio e a tutti gli amici, ma soprattutto alle amiche di sempre Noemi, Rossella e Simona che mi sono state vicine nei momenti difficili donandomi sempre il loro affetto ed il loro sostegno ed ai miei maestri di ballo, nonché amici Valentina e Gustavo, per aver sopportato ogni mio nervosismo e avermi dato la forza di affrontare situazioni stressanti con il sorriso in volto.

Infine ringrazio Alessandro per avermi sempre sostenuto e spronato a dare il meglio di me in qualsiasi momento; il suo aiuto e la sua presenza sono stati davvero fondamentali per me.

Roma, 29 Maggio 2018

Cristine D'Agostino