



FABIO DI NARDO
LABORATORIO DI CHIMICA BIOANALITICA
UNIVERSITÀ DI TORINO
FABIO.DINARDO@UNITO.IT

TEST MULTIANALITA COLORIMETRICI A FLUSSO LATERALE

I saggi immunochimici a flusso laterale (LFIA) rappresentano una delle tecniche di spicco per applicazioni di tipo “point-of-need” test. Tuttavia, i LFIA tradizionali consentono di rivelare un singolo analita alla volta. La nuova frontiera dei LFIA è rappresentata dalla possibilità di effettuare analisi multianalita. In tale ambito, l'utilizzo di colloidali di metalli nobili, caratterizzati da colori differenti, consente di semplificare la valutazione dei risultati.

I metalli nobili, grazie alle loro proprietà ottiche ed elettroniche, hanno trovato vasto impiego nelle moderne tecnologie, con applicazioni che vanno dall'elettronica alla sensoristica, dalla catalisi alla diagnostica, alla veicolazione di farmaci e molte altre [1]. Tra questi, le nanoparticelle d'oro sono tra le più utilizzate nello sviluppo di saggi colorimetrici grazie ai loro elevati coefficienti di estinzione e al fatto che la banda di risonanza plasmonica superficiale (SPR) che le caratterizza sia fortemente sensibile, tra gli altri fattori, allo stato di dispersione delle nanoparticelle. La maggior parte di questi saggi si basa sulla variazione di colorazione che si verifica passando da particelle monodisperse a particelle aggregate.

Tra i saggi colorimetrici che vedono l'uso delle nanoparticelle d'oro, i *Lateral Flow Immunoassays* (LFIA) hanno avuto particolare successo grazie ai loro bassi costi di sviluppo, facilità d'uso, rapidità, portabilità ed al non utilizzo di strumentazione per effettuare l'analisi. Tali peculiarità hanno contribuito a rendere i LFIA una delle più promettenti tecniche per i “point-of-need” test, ossia quei test per cui è fondamentale ottenere risultati in tempi rapidi utilizzando dispositivi per analisi *in situ*. Inoltre, risultano essenziali nei Paesi in via di sviluppo ed in zone caratterizzate da scarse risorse, laddove

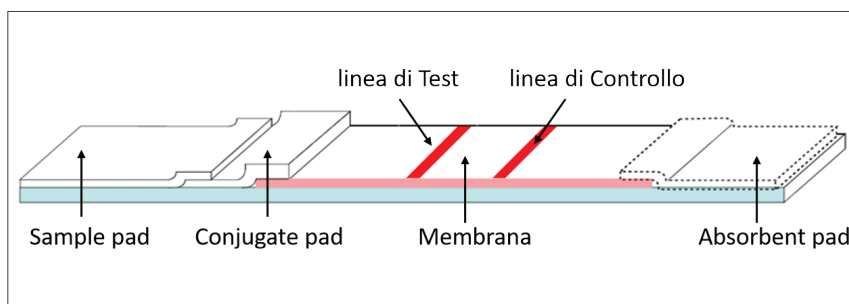


Fig. 1 - Schema delle componenti di una tipica strip da LFIA

l'accesso alle analisi strumentali è molto limitato. Questi saggi immunochimici eterogenei a flusso laterale sfruttano le interazioni specifiche tra antigene ed anticorpo per rivelare la presenza dell'analita di interesse. Una tipica *strip* da LFIA (Fig. 1) presenta un *sample pad*, che permette di trattare il campione e di renderlo compatibile con le altre componenti del sistema, e un *conjugate pad*, che ha il compito di immagazzinare un coniugato tra un antigene o un anticorpo e le nanoparticelle d'oro. Poi si ha una membrana porosa, in nitrocellulosa, che rappresenta la regione analitica del sistema ed ha lo scopo di legare bioreagenti in zone spazialmente confinate, definite “linee di test e di controllo”, dove la linea di test fornisce informazioni riguardo l'analita, mentre la linea di controllo assicura il corretto funzionamento del sistema. Infine si ha l'*absorbent pad* che blocca e raccoglie il liquido alla fine della migrazione del campione.

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle “Giornate di Chimica Analitica” dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

L'aggiunta del campione liquido, o di un suo estratto, in corrispondenza del *sample pad*, avvia una migrazione per capillarità che risospende in soluzione il reattivo marcato presente sul *conjugate pad*. In seguito, il tutto arriva nella zona in cui avvengono le interazioni specifiche con l'analita ed alla fine si ottiene un segnale visivo, correlabile con la presenza o l'assenza dell'analita stesso.

Le nanoparticelle d'oro di forma sferica, con un diametro di circa 30-40 nm, rappresentano il marcatore di riferimento nei LFIA poiché la loro preparazione è semplice e poco costosa, sono facilmente coniugabili con gli anticorpi ed il segnale prodotto è visibile ad occhio nudo, grazie al tipico colore rosso ciliegia che le caratterizza, dovuto alla banda SPR attorno ai 525 nm.

I LFIA attualmente più diffusi consentono la determinazione di un solo analita alla volta; il classico esempio è il test di gravidanza, in cui si va a ricercare la presenza della gonadotropina corionica nelle urine. La nuova frontiera dei LFIA è rappresentata dalla possibilità di effettuare analisi multianalita, le quali consentono di ridurre ulteriormente i tempi ed i costi delle analisi di *screening*. Una delle strategie maggiormente impiegate, dal punto di vista commerciale, per ottenere un LFIA multianalita consiste nell'inserire in un unico *device* più *strips*, ognuna delle quali riconosce un singolo analita [2-4]. Ovviamente questa strategia consente di mantenere tutte le caratteristiche positive dei LFIA convenzionali, ma ad un costo maggiore, a causa dell'incremento dei reagenti e dei materiali impiegati. Un'altra strategia, che consente di limitare i costi e che risulta anche essere la più immediata per ottenere LFIA in formato multianalita è quella di dispensare due o più linee di test su una sola *strip*. Dell'impiego di questa strategia sono presenti meno esempi sul mercato, ma è indubbiamente la strategia che consente un maggior risparmio ed è possibile trovarne degli esempi in letteratura [5-7].

Utilizzando le nanoparticelle d'oro di forma sferica come marcatore, un LFIA multianalita di questo tipo sarà caratterizzato da un determinato numero di li-

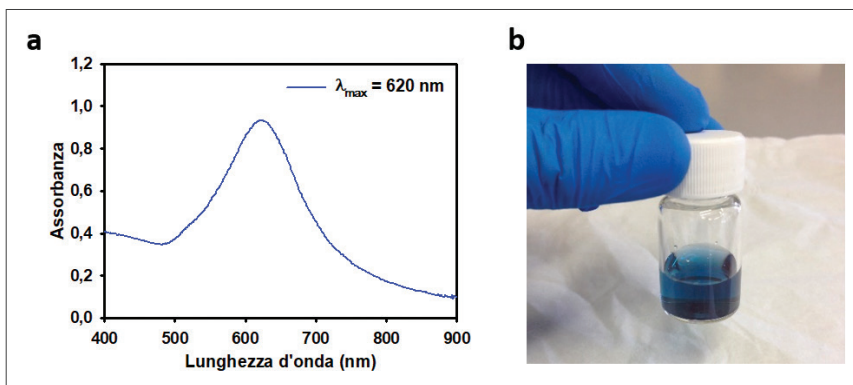


Fig. 2 - a) Spettro visibile del sol di nanoparticelle d'oro non sferiche, con banda SPR a 620 nm; b) immagine fotografica del sol con caratteristico colore blu

nee dello stesso colore, ossia rosse. Volendo facilitare la valutazione dei LFIA multianalita, senza andare ad inficiare pesantemente sui costi del sistema (quindi evitando l'impiego di lettori integrati), si potrebbero utilizzare marcatori caratterizzati da colori differenti, consentendo un'associazione più diretta ed agevole tra le linee di test e gli analiti d'interesse. Usando questa strategia, si è recentemente sviluppato un LFIA multianalita multicolore [8]. Per sviluppare questo test, si è sfruttata la forte dipendenza della banda SPR delle nanoparticelle d'oro dalla loro dimensione e forma. Di conseguenza, sintetizzando nanoparticelle d'oro di forma non sferica, si sono ottenute particelle caratterizzate da una banda SPR intorno a 620 nanometri, che si riflette nel colore blu del colloide (Fig. 2). Dopo aver verificato la fattibilità dell'impiego delle nanoparticelle non sferiche come marcatore in LFIA, si è valutata la possibilità di un loro impiego simultaneo con le classiche nanoparticelle sferiche. L'assenza di interazioni tra i due colloidi, una volta miscelati, ha permesso di procedere con lo sviluppo del LFIA multicolore.

Come sistema modello si è scelto la rivelazione dell'aflatossina B1 (AFB1) e della fumonissina B1 (FMB1) nelle farine di mais. Queste micotossine sono normate dall'Unione Europea [9, 10] ed il loro controllo risulta di fondamentale importanza per la sicurezza alimentare. Dopo la messa a punto di tutti i parametri e del sistema di estrazione, si è valutata la sensibilità analitica del test andando a determinarne il LOD visivo. Questo parametro è stato definito come la minima concentrazione di micotossina risultante in un'intensità della linea di test significa-

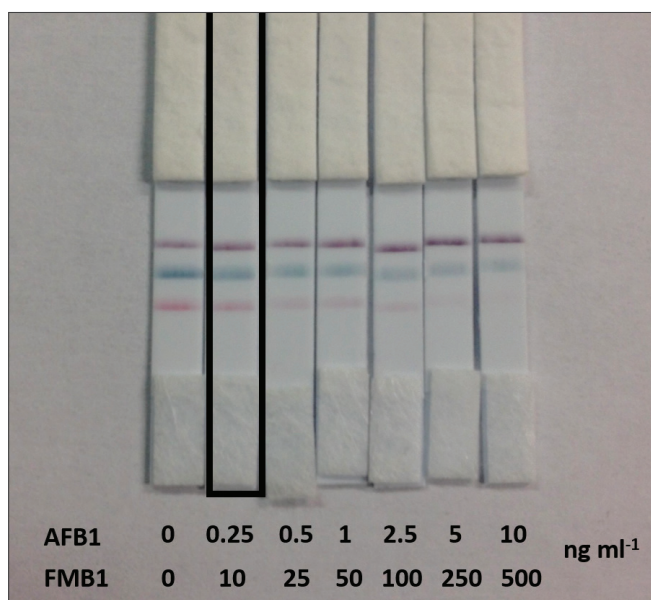


Fig. 3 - Immagine fotografica della determinazione dei LOD visivi per aflatoxina B1 e fumonisina B1. In nero è evidenziata la *strip* corrispondente ai LOD per le due micotossine

tivamente più bassa di quella di un campione bianco, questo perché, essendo un test competitivo, si ha una diminuzione del segnale all'aumentare della concentrazione di analita (Fig. 3).

Analizzando, con il test sviluppato, 18 campioni reali precedentemente dosati mediante metodi di riferimento, si è ottenuta una soddisfacente figura di merito, con nessun falso negativo ed una percentuale molto bassa di falsi positivi (3,7%), dimostrando ottime affidabilità e robustezza.

Dato che i colloidali di metalli nobili si prestano molto bene ad essere impiegati come marcatori colorati nei LFIA, per incrementare il numero di analiti discriminabili in base al colore del marcatore, si è anche preso in considerazione l'impiego di nanoparticelle d'argento di forma sferica. Tale colloide, presentando una banda SPR attorno ai 400 nm, è caratterizzato da un colore giallo. In Fig. 4 è riportata

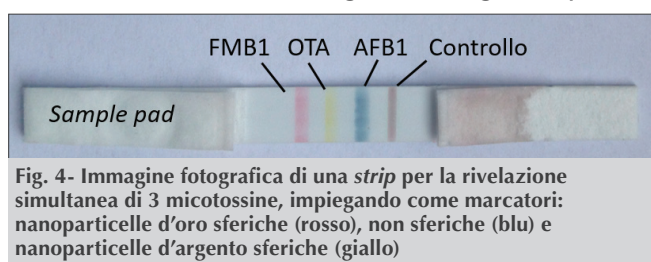


Fig. 4 - Immagine fotografica di una *strip* per la rivelazione simultanea di 3 micotossine, impiegando come marcatori: nanoparticelle d'oro sferiche (rosso), non sferiche (blu) e nanoparticelle d'argento sferiche (giallo)

un'anteprima dell'uso simultaneo di nanoparticelle d'oro e d'argento per la rivelazione simultanea di 3 micotossine: ocratossina A (OTA), FMB1 e AFB1. In conclusione, l'impiego di marcatori caratterizzati da colori differenti può rendere significativamente più semplice la valutazione di un test LFIA in formato multianalita. Tuttavia, viste le limitazioni dovute ai colori nettamente discriminabili dall'occhio umano, tale strategia non può essere applicata per incrementare esponenzialmente il numero di analiti rivelabili simultaneamente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Prakash *et al.*, *Advances in colloid and interface science*, 2015, **226**, 187.
- [2] <https://homehealth-uk.com/all-products/10-drug-multipanel-test-bup/>
- [3] <http://www.rapidexams.com/Tox-Cup-Cli-Waived-14-panel-drug-test-p/dt14.htm>
- [4] <https://www.screenpharmashop.com/droga-test/droga-test-urina-10.html>
- [5] X. Li *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **49**, 426.
- [6] S. Song *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 4995.
- [7] S. Han *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 2016, **927**, 64.
- [8] F. Di Nardo *et al.*, *Microchimica Acta*, 2017, **184**, 1295.
- [9] Regolamento della Commissione (CE) No. 165, GU Unione Europea, 2010, L 50, 8.
- [10] Regolamento della Commissione (CE) No. 1126, GU Unione Europea, 2007, L 255, 14.

Multiplex Colorimetric Lateral Flow Immunoassays

The Lateral Flow Immunoassay (LFIA) is one of the most successful analytical format for "point-of-need" analysis. Conventional LFIA can only detect one target molecule at one time. The new challenge in this area is the development of multiplex LFIA. The employment of noble metal nanoparticles, characterized by different colors, can facilitate the simultaneous visual detection of multiple analytes on a single device.