



MICOTOSSINE:

*sviluppo, validazione e
monitoraggio delle performance
di un kit ELISA*

Relatore: Giulia Rosar

Data: 12 Marzo 2025

PROGRAMMA

- 1 | Sviluppo di un kit ELISA
- 2 | Validazione di un kit ELISA



SVILUPPO DI UN KIT ELISA

PROCESSO DI SVILUPPO DI UN SAGGIO ELISA

PERCHE' SVILUPPARE UN NUOVO SAGGIO?

1. Modifica/introduzione di un limite di legge
2. Necessità di essere competitivi rispetto ai concorrenti
3. Esigenza di mercato di metodi innovativi

BUSINESS HYPOTHESIS

1. Idea del progetto
2. Analisi dei bisogni dei clienti e vantaggi che il nuovo prodotto può portare
3. Confronto con le soluzioni commercialmente disponibili
4. Clienti potenziali
5. Mercato potenziale
6. Stima costi e ricavi

PROCESSO DI SVILUPPO DI UN SAGGIO ELISA

COME SVILUPPARE UN NUOVO SAGGIO?

PRODUCT REQUIREMENTS

SPECIFICHE TECNICHE

1. Tempo totale di saggio
2. Requisiti di utilizzabilità: esecuzione dell'estrazione e del test analitico
3. Range di quantificazione: idoneità rispetto ai limiti normativi o ai requisiti del mercato
4. Selettività: cross-reattività vs sostanze analoghe
5. Matrici di applicazione: campioni analizzabili e modalità di verifica
6. Specifiche di prestazione: specificità, sensibilità, precisione, accuratezza

SPECIFICHE INDUSTRIALI

1. Processo produttivo e costi
2. Conservazione, spedizione
3. Requisiti di etichettatura
4. Documentazione

SPECIFICHE «REGULATORY»

1. Sicurezza
2. Etichettatura

PROCESSO DI SVILUPPO DI UN SAGGIO ELISA

COME SVILUPPARE UN NUOVO SAGGIO?

- 1. STUDIO DI FATTIBILITA'**
- 2. SVILUPPO DEL PROTOTIPO**
- 3. VALIDAZIONE E INDUSTRIALIZZAZIONE**
- 4. LANCIO – PRODUZIONE - VENDITA**

1: STUDIO di FATTIBILITA'

1. Valutazione Background Scientifico e Tecnologico
2. Valutazione IP
3. Analisi dei requisiti
4. Studio (anche sperimentale) di fattibilità (inclusa la parte economica)
5. Analisi dei rischi
6. Sviluppo di un piano di progetto

2: DESIGN & SVILUPPO

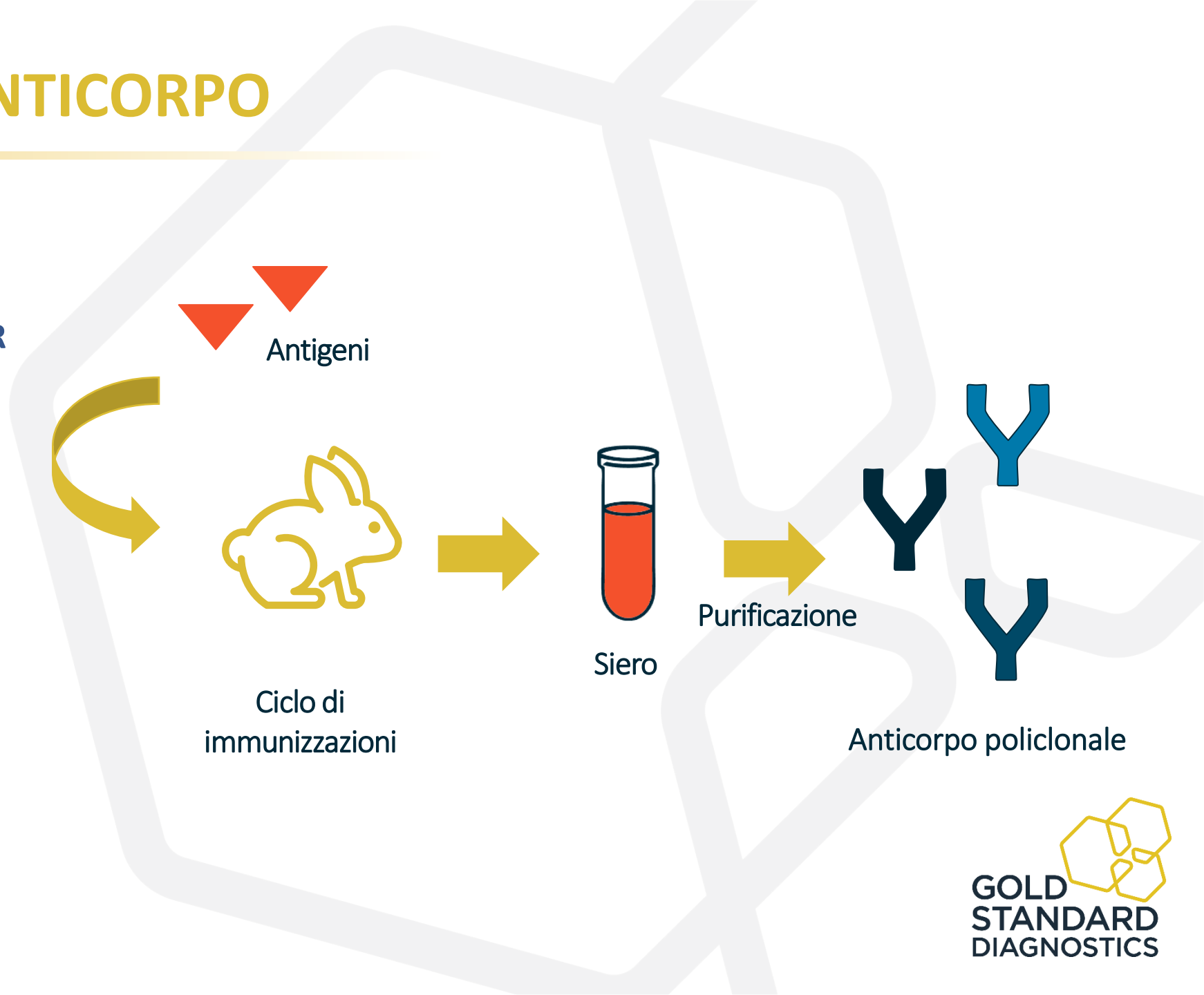
1. ottenimento di **reagenti specifici** idonei
2. **messa a punto del saggio**: definizione della fase solida, delle tempistiche di saggio, dei tamponi
3. sviluppo della procedura di **preparazione del campione**: modalità estrattiva, fattore di diluizione, tamponi di diluizione, ottimizzazione delle prestazioni
4. **prove preliminari** sulle matrici di applicazione, verifica della conformità alle specifiche richieste
5. Studi di **stabilità e robustezza**

DESIGN FREEZE

SVILUPPO dell'ANTICORPO

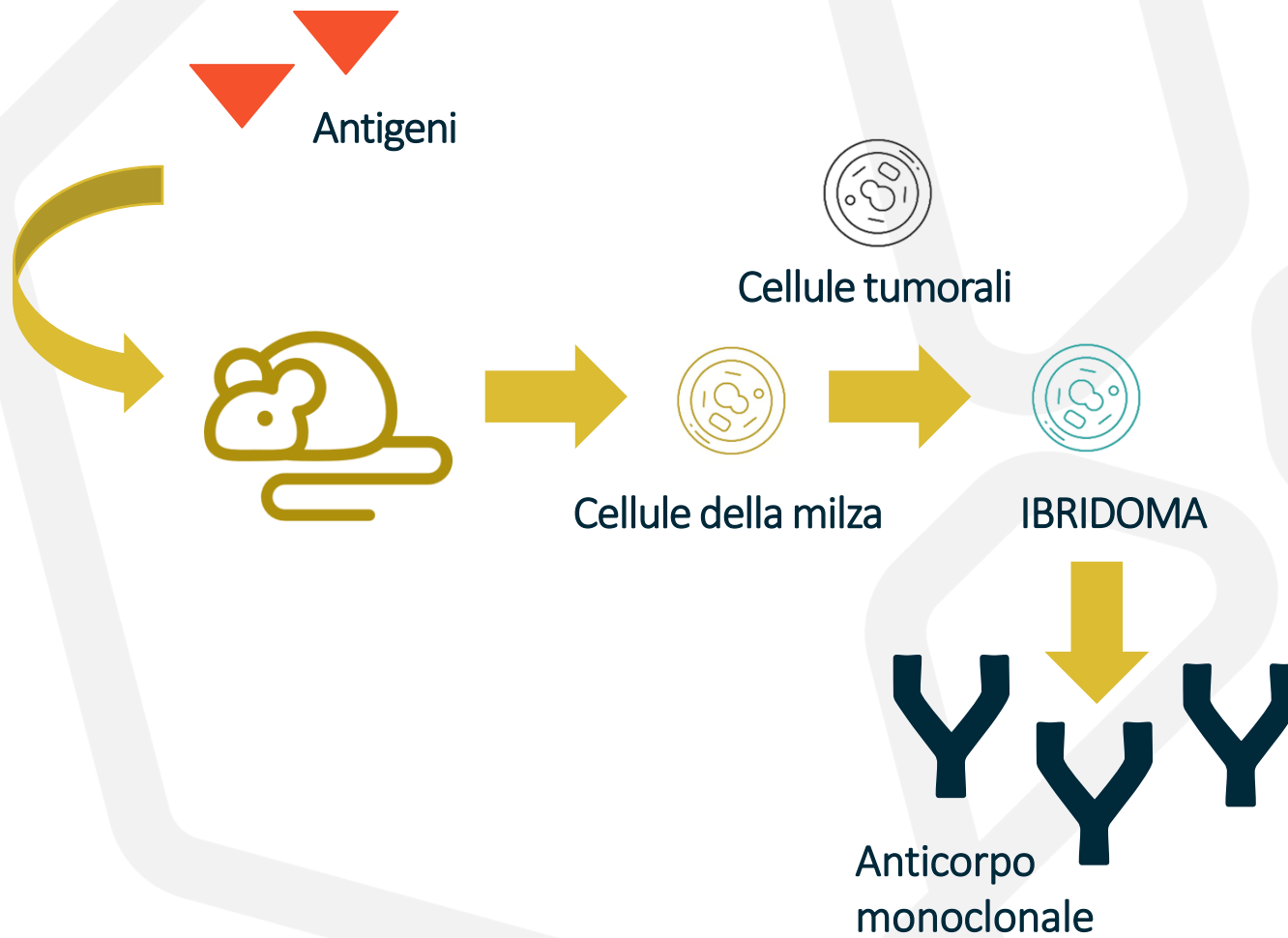
CONIUGATO APTENE - CARRIER

- Disponibilità di gruppi reattivi sulle molecole da coniugare (es. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$)
- Protocolli di coniugazione



SVILUPPO dell'ANTICORPO

CONIUGATO APTENE - CARRIER

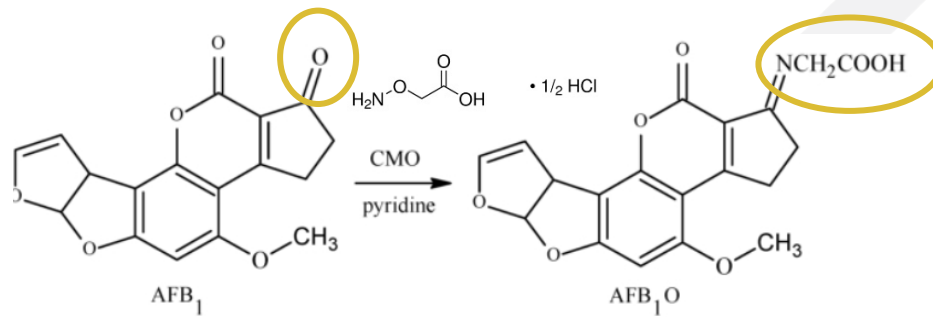


**GOLD
STANDARD
DIAGNOSTICS**

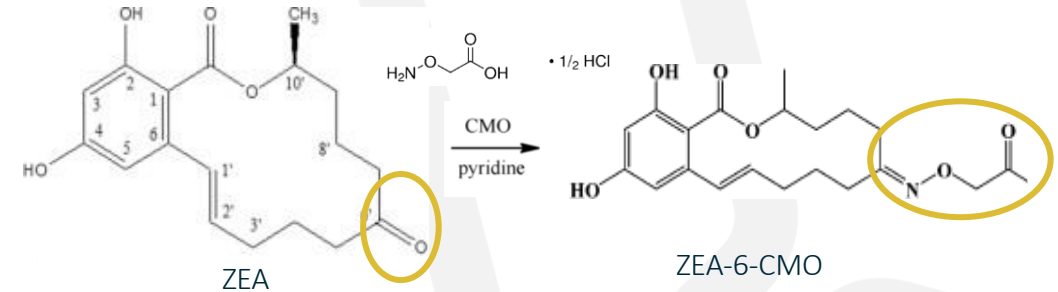


Sintesi dell'immunogeno: derivatizzazione delle tossine

AFLATOSSINA B1

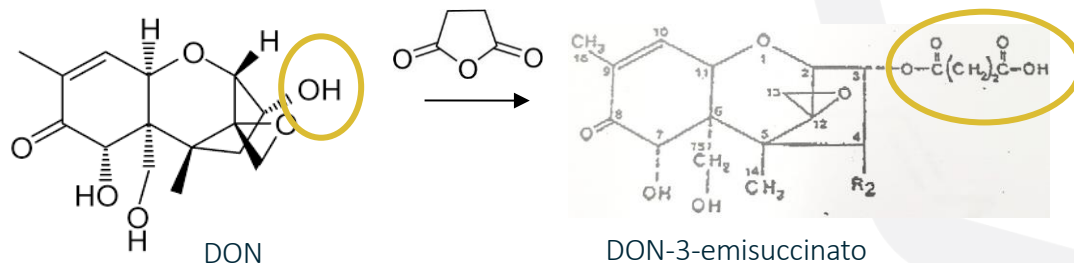


ZEARALENONE



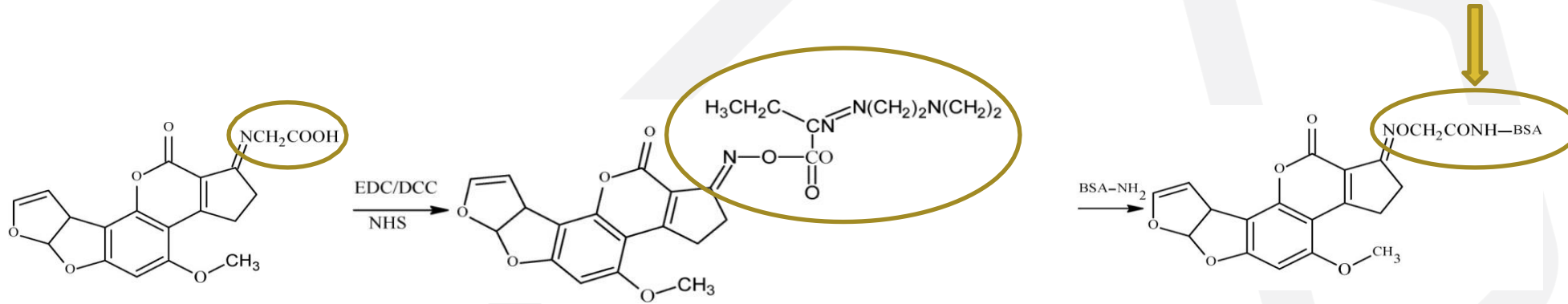
La O-(Carbossimetil)- idrossilamina- emicloruro (CMO) reagisce con il gruppo chetonico introducendo un gruppo carbossilico sull'**aflatossina B1** e sullo **zearalenone**

DEOSSINIVALENOLO



L'anidride succinica reagisce con il gruppo OH introducendo un gruppo carbossilico emisuccinato sul **deossinivalenolo**

Sintesi dell'immunogeno: coniugazione con il carrier



Il gruppo-COOH introdotto tramite derivatizzazione è sfruttato per la coniugazione con i gruppi -NH_2 sulle proteine carrier (es. BSA, KLH, OVA), per formare un legame ammidico

ATTIVAZIONE del gruppo carbossilico ad estere attivo utilizzando il metodo delle carbodiimidi:
EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)- N'-etilcarbodiimide) + NHS (N-idrossisuccinimide)

CONIUGAZIONE del gruppo estere attivo con i gruppi -NH_2 della proteina a formare un legame stabile

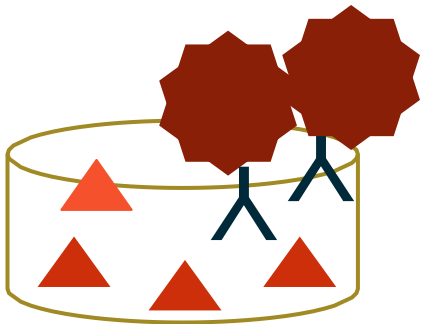
La scelta dell'immunogeno è fondamentale per ottenere un anticorpo con le caratteristiche di cross-reattività desiderate

SVILUPPO del COMPETITORE



Nel saggio diretto occorre un coniugato tossina – enzima (perossidasi)

- Messa a punto ed ottimizzazione del protocollo di derivatizzazione e coniugazione
- Messa a punto del rapporto molare tossina – perossidasi
- Messa a punto della modalità di purificazione
- Conservazione / stabilizzazione
- Definizione della concentrazione d'uso e del tampone in cui è preparato

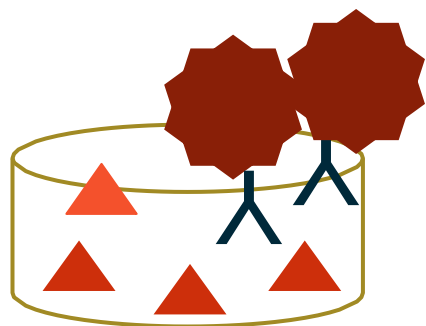


Nel saggio indiretto occorre un coniugato tossina – proteina

- Scelta della proteina (eterologa rispetto all'immunogeno!!)
- Messa a punto ed ottimizzazione del protocollo di derivatizzazione e coniugazione
- Messa a punto del rapporto molare tossina – proteina
- Messa a punto della modalità di purificazione
- Definizione della concentrazione e modalità di coating sulla micropiastra
- Stabilità della piastra

SVILUPPO del CONIUGATO ENZIMATICO

nel saggio indiretto



Nel saggio indiretto occorre un coniugato anticorpo - perossidasi

- Protocollo di purificazione dell'anticorpo
- Messa a punto ed ottimizzazione del protocollo di coniugazione
- Messa a punto del rapporto molare anticorpo – perossidasi
- Messa a punto della modalità di purificazione del coniugato
- Conservazione / stabilizzazione
- Definizione della concentrazione d'uso e del tampone in cui è preparato



E' preferibile fornire nel kit un
coniugato liquido pronto
all'uso, liquido concentrato o
liofilizzato?



Ma come seleziono l'anticorpo giusto per il mio saggio?

Specifiche: SPECIFICITA'



Cross-reagente
0% cross-reattività



Cross-reagente
60% cross-reattività



Antigene originante l'anticorpo
100% cross-reattività



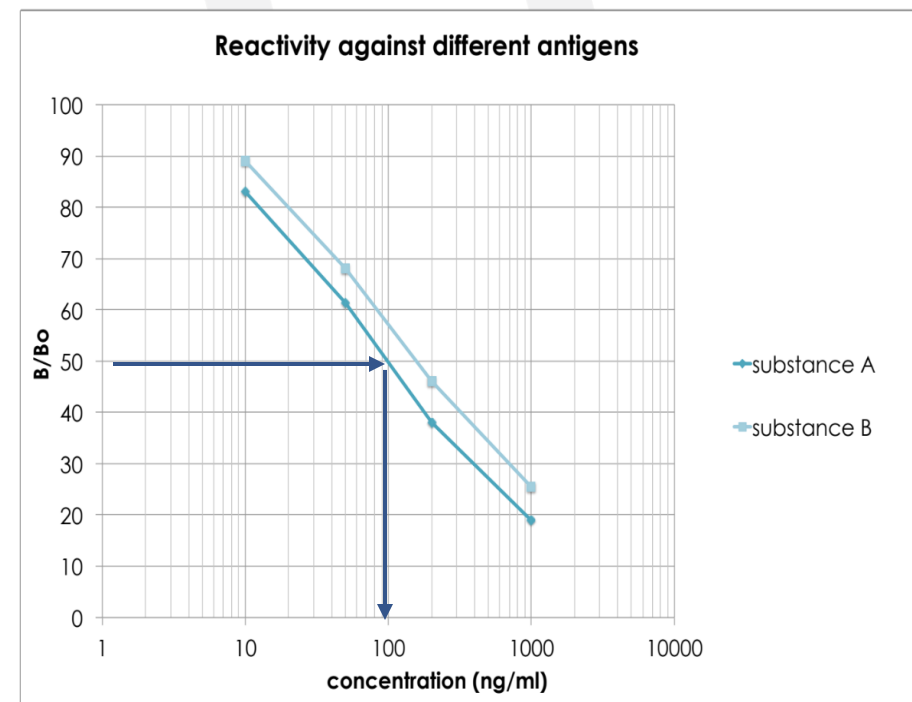
Cross-reagente
125% cross-reattività

Ovvero: CROSS-REATTIVITA'

Capacità del saggio (anticorpo) di rilevare molecole simili all'antigene specifico

Espressa come rapporto % tra il valore di IC₅₀ della curva ottenuta con l'analita specifico ed il valore di IC₅₀ della curva del cross- reagente

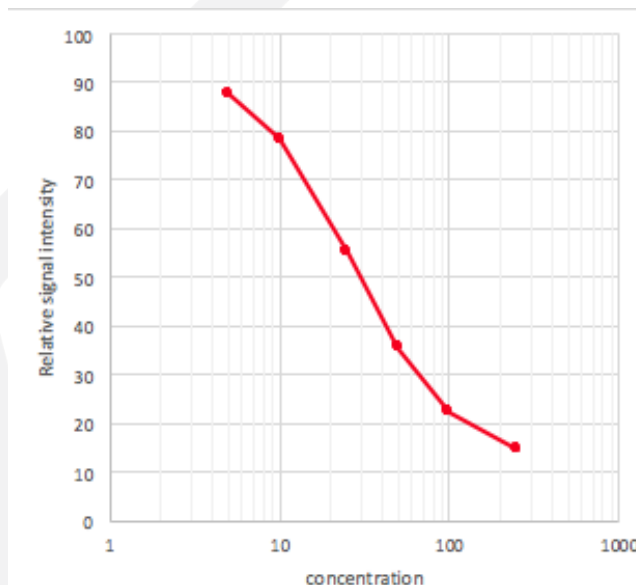
B/B₀ 50%



RANGE DI MISURA

RANGE DI CALIBRAZIONE

*intervallo di misura del saggio
(espresso in termini di
concentrazione minima e
massima della curva di
calibrazione)*



RANGE DI QUANTIFICAZIONE

*intervallo di misura corrispondente
nel campione
(ottenuto moltiplicando l'intervallo
della curva per il fattore di diluizione
del campione dato dalla procedura
di estrazione)*

- ppt (parti per trilione): ng/Kg
- ppb (parti per bilione): $\mu\text{g/Kg}$ o ng/g
- ppm (parti per milione): mg/Kg o $\mu\text{g/g}$

ATTENZIONE alla diluizione del campione



Pesare 5 g di
campione



Estrarre con 25 ml di estraente
(fattore di diluizione 5x)



Diluire 1 ml di estratto in 3 ml di tampone
(fattore di diluizione 4x)

TOTALE DI DILUIZIONE DEL CAMPIONE: 5 X 4 = 20

Range di calibrazione 0,1 – 20 ng/ml

Range di quantificazione corrispondente nel campione: 2 - 400 ppb

ESTRAZIONE DEL CAMPIONE



- Dimensione dell'aliquota analitica
- Requisiti per il contenitore

- Tampone / soluzione di estrazione
- Volume
- Modalità di estrazione
- Tempo di estrazione
- Temperatura di estrazione
- Modalità di separazione tra solido e liquido

- Necessità di diluizione
- Tampone o soluzione di diluizione
- Volume di diluizione

2: DESIGN & SVILUPPO

1. ottenimento di **reagenti specifici** idonei
2. **messa a punto del saggio**: definizione della fase solida, delle tempistiche di saggio, dei tamponi
3. sviluppo della procedura di **preparazione del campione**: modalità estrattiva, fattore di diluizione, tamponi di diluizione, ottimizzazione delle prestazioni
4. **prove preliminari** sulle matrici di applicazione, verifica della conformità alle specifiche richieste
5. Studi di **stabilità e robustezza**

DESIGN FREEZE

3. Industrializzazione e Validazione

1. Trasferimento tecnologico al team di produzione
2. Produzione di tre lotti pilota
3. Definizione delle modalità di controllo di qualità del prodotto
4. Validazione dei campioni
5. Analisi dei rischi
6. Realizzazione delle etichette, packaging primario e secondario, istruzioni
7. Preparazione del piano di lancio

CHE COS'E' LA VALIDAZIONE?

Processo per confermare che la procedura analitica impiegata sia adatta allo scopo, mediante la produzione di evidenze oggettive.

PERCHE' VALIDARE UN KIT DI SCREENING?

PRODUTTORE

- Determinazione dei parametri di prestazione su diverse matrici
(fase fondamentale del processo di sviluppo di un kit)

CERTIFICAZIONE

UTILIZZATORE

- Verifica delle prestazioni dichiarate dal produttore
- Determinazione di parametri di prestazione «in casa»
- Da eseguirsi sulle matrici di maggiore interesse
(verifica che il kit scelto sia effettivamente adatto allo scopo)

ACCREDITAMENTO

GLOSSARIO

Analita	Misurando. Qualunque componente di un campione che venga identificato qualitativamente e/o misurato quantitativamente
Matrice	L'insieme dei costituenti chimici del campione nei quali si trova l'analita. In un campione, è tutto ciò che NON è l'analita
Effetto Matrice	Segnale o dose apparente dell'analita rilevata in campioni che non lo contengono.
Esattezza	Grado di concordanza tra il valore misurato con un metodo e un valore atteso / valore di riferimento.
Accuratezza	Grado di concordanza tra il valore misurato con un metodo e un valore di riferimento accettato. Si ottiene dalla misura dell'esattezza e della precisione.
Precisione	Misura della concordanza tra risultati di prove indipendenti in condizione di ripetibilità (stesso laboratorio, stesso operatore, stessa seduta analitica), riproducibilità intermedia (stesso laboratorio, operatori diversi e sedute indipendenti) e riproducibilità inter-laboratorio.
Specificità	Capacità di un metodo di dare una risposta accurata pur in presenza di una matrice. Una certa aspecificità determina il numero di risultati falsamente positivi o falsamente non conformi
Sensibilità	Capacità di un metodo di misurare concentrazioni piccole di analita.

MATRICE

Analita
Matrice
Effetto Matrice
Esattezza
Accuratezza
Precisione
Specificità
Sensibilità

Per ogni tipologia di matrice:

- Verificare la risposta del saggio in presenza di sola matrice >> effetto su specificità e precisione
- Sviluppare strategie per mitigare l'effetto matrice >> preparazione del campione, condizioni di analisi stringenti
- Ricercare congeneri, sostanze chimiche simili al target o altri contaminanti per misurarne l'interferenza (cross-reattività)

Nota bene: la conferma della validazione interna fornita dal produttore è fondamentale e deve essere eseguita nel laboratorio dell'utilizzatore con le matrici che si utilizzano in routine

SENSIBILITA'

Analita

Matrice

Effetto Matrice

Esattezza

Accuratezza

Precisione

Specificità

Sensibilità

Definito quale/i analita/i è/sono rilevato/i dal saggio, occorre verificare, per ciascuna matrice, **qual è la più bassa concentrazione di analita distinguibile dal bianco** (oppure verificare che il saggio sia in grado di rilevare una certa concentrazione target di interesse).

La sensibilità va studiata in matrice in quanto questa può influenzare la capacità del sistema analitico di rilevare un analita a basse concentrazioni.

La concentrazione target rappresenta la concentrazione desiderata di analita che vogliamo che il sistema analitico sia in grado di rilevare e quantificare (LOQ) >> può variare in base allo scopo delle analisi e alla tipologia del campione analizzato.

SPECIFICITA' E SENSIBILITA'

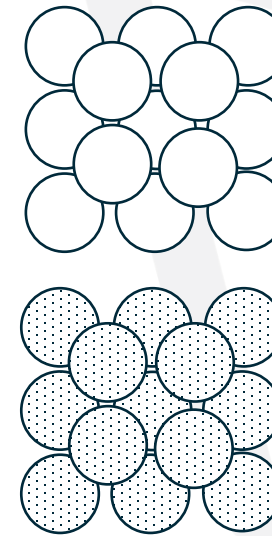
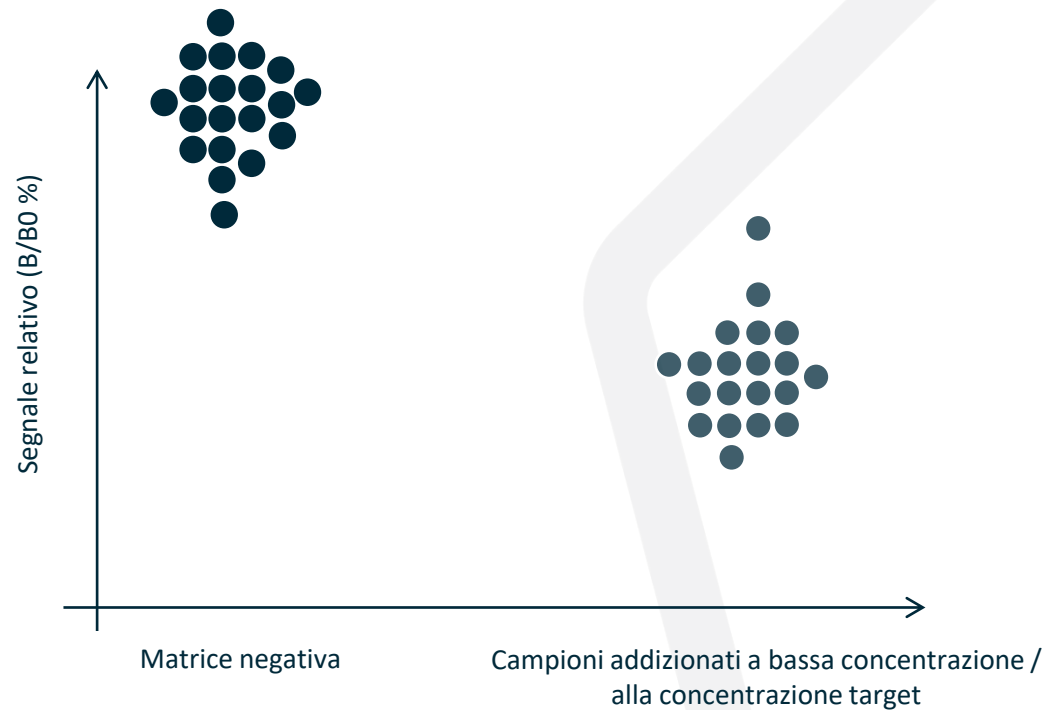
Attenzione alla **variabilità della matrice** >> per avere un numero rappresentativo di campioni è fondamentale la numerosità.

Nota: Selezionare UN campione negativo e analizzarlo in più repliche NON è equivalente a reperire più campioni indipendenti ed analizzarli individualmente.

Rif. REGOLAMENTO (UE) N. 519/2014 DELLA COMMISSIONE del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le specie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2021/808 DELLA COMMISSIONE del 22 marzo 2021 sul rendimento dei metodi analitici in relazione ai residui di sostanze farmacologicamente attive impiegate negli animali destinati alla produzione di alimenti, sull'interpretazione dei risultati e sui metodi da utilizzare per il campionamento e che abroga le decisioni 2002/657/CE e 98/179/CE

SPECIFICITA' E SENSIBILITA'



SPECIFICITA'
20 Campioni negativi CERTI
analizzati in 2 sessioni analitiche

SENSIBILITA'
Addizionamento dei campioni
negativi alla minore
concentrazione di interesse
(LOQ).

Quando le popolazioni di campioni negativi e contaminati sono sovrapposte, si generano dei risultati «falsi»

- Falsi positivi: un campione non contaminato produce una dose apparente che viene scambiata per contaminazione
- Falsi negativi: un campione positivo non viene intercettato e passa come non contaminato

SPECIFICITA' E SENSIBILITA'

Per non tornare indietro a ri-sviluppare un nuovo prototipo, è importante avere già caratterizzato il comportamento del saggio in fase di sviluppo, utilizzando numerosi campioni ed ottimizzando la procedura di preparazione :

- Cambiando rapporto matrice / estraente
- Cambiando estraente
- Cambiando tampone e / o fattore di diluzione
- Cambiando modalità di estrazione
- Cambiando modalità di separazione di fase
- MA ANCHE: cambiando tampone di reazione, tempi di saggio, reagenti specifici.

Arrivati a questo punto è possibile intervenire sulla preparativa ma non sui reagenti, a meno di non tornare indietro allo sviluppo e ripetere tutte le fasi successive.

Quando le popolazioni di campioni negativi e contaminati sono sovrapposte, si generano dei risultati «falsi»

- Falsi positivi: un campione non contaminato produce una dose apparente che viene scambiata per contaminazione
- Falsi negativi: un campione positivo non viene intercettato e passa come non contaminato

QUANTIFICAZIONE

Analita

Matrice

Effetto Matrice

Esattezza

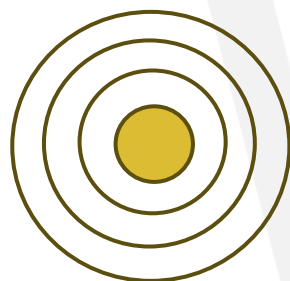
Accuratezza

Precisione

Specificità

Sensibilità

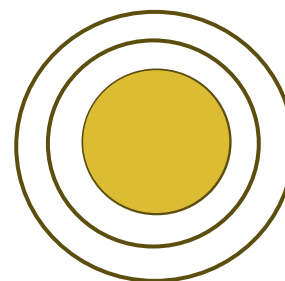
Verifica della dose di campioni contaminanti con il misurando a diversi livelli di concentrazione.



Precisione +
Esattezza +



Precisione +
Esattezza -



Precisione -
Esattezza +



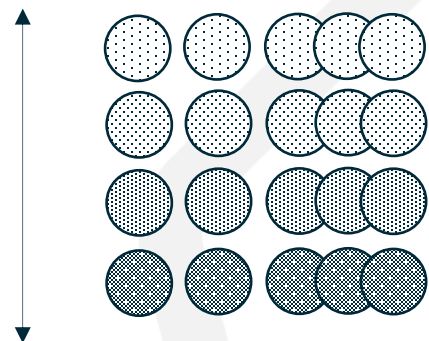
Precisione -
Esattezza -



E' meglio un kit accurato e impreciso o un kit inaccurato ma preciso?

PRECISIONE ed ACCURATEZZA

Diversi livelli di contaminazione



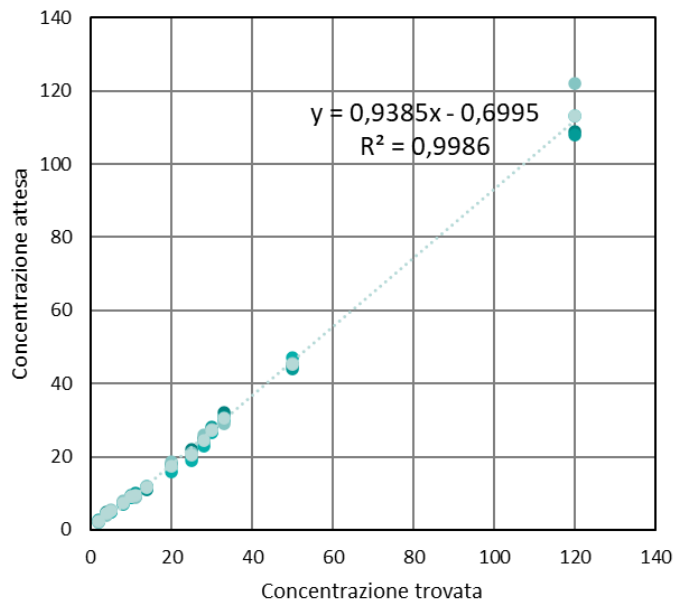
Reperire dei campioni di riferimento con valore assegnato certificato, se disponibili, oppure campioni naturalmente contaminati, oppure campioni negativi da aggiungere.

Estrarre almeno tre volte.

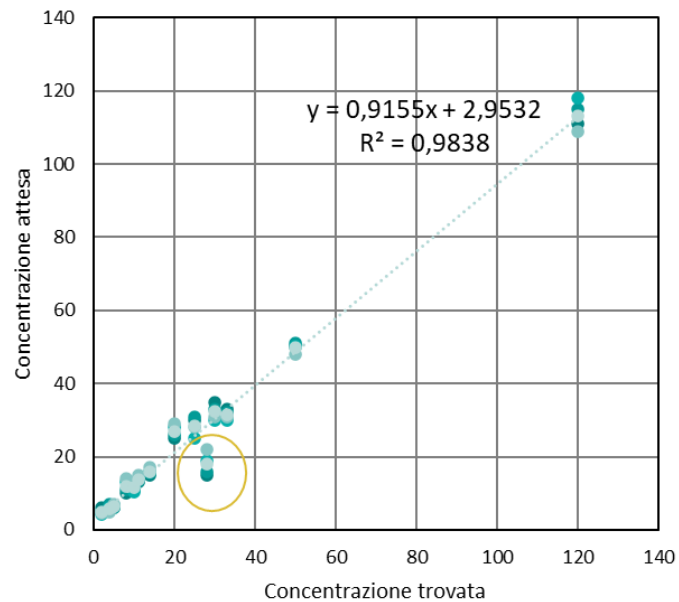
In una sessione, correre almeno tre repliche per estratto.

PRECISIONE ed ACCURATEZZA

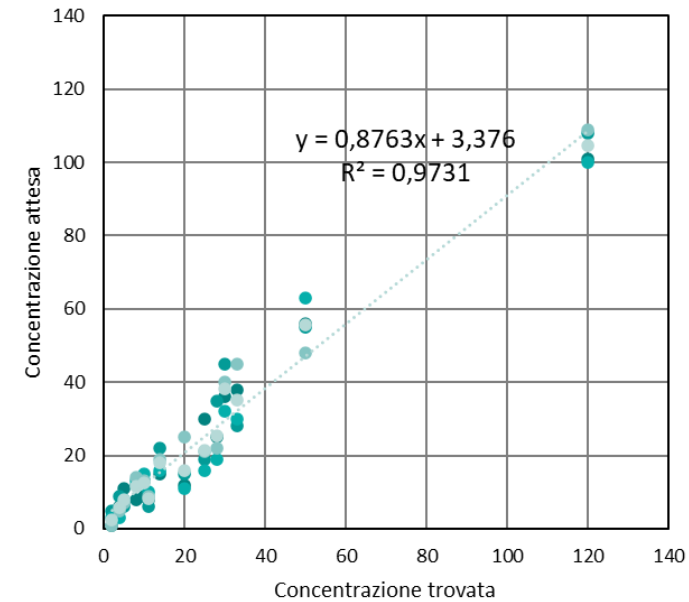
Correlazione dose attesa-dose trovata



Correlazione dose attesa-dose trovata



Correlazione dose attesa-dose trovata



LINEA GUIDA DI VALIDAZIONE

Fornisce protocolli specifici per la validazione ai fini della certificazione di kit per la determinazione quantitativa di aflatossine, deossinivalenolo, fumonisine, ocratossina A, zearalenone, definendo specifiche e requisiti da soddisfare.



*Protocolli disponibili online
<https://www.ams.usda.gov/services/fgis/standardization/tke>

Uno schema di validazione viene preparato congiuntamente dal proprietario del metodo e dai consulenti tecnici di AOAC definendo i test che devono essere eseguiti dallo sviluppatore e da un laboratorio indipendente per difendere le rivendicazioni del proprietario.



Regolamento della Commissione Europea 51/2014

Fornisce un protocollo per la determinazione della specificità e dell'idoneità del test di screening a rilevare (discriminare) la tossina ad una concentrazione target.

Punta sulla caratterizzazione della variabilità della matrice.

4. Lancio – Produzione - Vendita

1. Preparazione dello stock
2. Controllo e verifica di tutti gli adempimenti normativi
3. Formazione interna ed esterna
4. Esecuzione del piano di lancio
5. Avvio della produzione di routine

LIFE CYCLE

Gestione della vita del prodotto
Monitoraggio delle performance mediante criteri interni ed esterni
Stabilità in tempo reale
Verifica sul campo
Organizzazione di certificazioni esterne
Estensione del campo di validazione
(Sorveglianza post-vendita)



Di quanti campioni ho bisogno
per fare la validazione?



Dove trovo dei campioni di
cereale contaminati?

Grazie!

Q&A

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY © Gold Standard Diagnostics

All rights reserved. This document contains information that is confidential and proprietary to Gold Standard Diagnostics and / or its affiliates and is solely for the use of the personnel of Gold Standard Diagnostics and all its affiliates. No part of it may be used, circulated, quoted, or reproduced for distribution outside companies belonging to Gold Standard Diagnostics. If you are not the intended recipient of this document, you are hereby notified that the use, circulation, quoting, or reproducing of this document is strictly prohibited and may be unlawful.