

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo 33

**Settore Concorsuale:** 07/H2 - PATOLOGIA VETERINARIA E ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/04 - ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

SVILUPPO DI SENSORI ELETTROCHIMICI PER LA DETERMINAZIONE DI  
AMINE BIOGENE E MICRORGANISMI PATOGENI IN ALIMENTI DI ORIGINE  
ANIMALE

**Presentata da:** Alessandra Corradini

**Coordinatore Dottorato**

Arcangelo Gentile

**Supervisore**

Marcello Trevisani

**Esame finale anno 2021**

## INDICE

<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DELLE PUBBLICAZIONI.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>8</b>
<b>2. TIPOLOGIE DI SENSORI.....</b>	<b>11</b>
2.1. Definizione.....	11
2.2. Classificazione.....	12
2.2.1. Sensori elettrochimici.....	14
2.2.2. Sensori ottici.....	18
2.2.3. Sensori piezoelettrici.....	18
2.2.4. Sensori calorimetrici.....	19
2.3. Bibliografia.....	20
<b>3. STATO DELL'ARTE.....</b>	<b>29</b>
3.1. Elementi caratterizzanti i sensori elettrochimici.....	29
3.1.1. Micro e nano-materiali.....	30
3.1.2. Cross-linking.....	30
3.1.3. Labelling.....	31
3.2. Applicazioni nell'industria alimentare.....	32
3.2.1. Istamina e batteri istamino produttori.....	32
3.2.2. Sensori elettrochimici per istamina.....	35
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> verocitotossici.....	36
3.2.4. Sensori elettrochimici per <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.2.5. Sensori elettrochimici per <i>Salmonella</i> .....	39

3.2.6.	Sensori elettrochimici per la ricerca di antibiotici.....	44
3.3.	Bibliografia.....	47
<b>4.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALI, METODI E RISULTATI.....</b>	<b>60</b>
5.1.	Strumenti.....	60
5.2.	Reagenti.....	60
5.3.	Campioni.....	61
5.4.	Procedura operativa degli esperimenti di voltammetria ciclica e di cronoamperometria.....	62
5.5.	Sviluppo di un biosensore per la determinazione dell'istamina.....	62
5.5.1.	Preparazione dell'elettrodo.....	62
5.5.2.	Procedura di calibrazione e tecnica di analisi.....	63
5.5.3.	Risultati.....	67
5.5.4.	Bibliografia.....	72
5.6.	Sviluppo di un immunosensore per la ricerca rapida di <i>E.coli</i> O26.....	73
5.6.1.	Preparazione dei campioni.....	73
5.6.2.	Parametri e tecnica di analisi.....	75
5.6.3.	Risultati.....	77
5.6.4.	Bibliografia.....	80
5.7.	Sviluppo di biosensori per antibiotici.....	81
5.7.1.	Analisi preliminare.....	81
5.7.2.	Bibliografia.....	90
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>ALLEGATI.....</b>	<b>96</b>

## **ABBREVIAZIONI**

4-ABA 4-aminobenzoic acid

BMIMPF6 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate

BSA bovine serum albumin

CNTs carbon nanotubes

CR cross-reactivity

DAHrp antibody anti-E.coli O26, peroxidase labelled

DAO diamine oxidase

ELIME Enzyme-Linked-Immuno-Magnetic-Electrochemical sensors

ELISA Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

GA glutaraldehyde

GCEs glassy carbon disk electrodes

GNPs gold nanoparticles

GR graphene

HDC histidine decarboxylase

HDH histamine dehydrogenase

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HQ Idrochinone

HRP horseradish peroxidase

IMBs immunobeads

MRL maximum residue limit

NaseFDW DNase-RNase-free distilled water

NFs Nanofibers

NMBs nano-sized magnetic beads

MBs magnetic beads

MMBs micro magnetic beads

OPA o-phthalaldehyde

PBS phosphate-buffered saline

POC point-of-care

PVA-co-PE poly (vinyl alcohol-co-ethylene)

QCM quartz crystal microbalance

RPM rotation per minute

SPCEs screen-printed carbon electrodes

SPEs screen-printed electrodes

SP-IDME screen-printed interdigitated microelectrode

SPR surface plasmon resonance

TBS tris-buffered saline

TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TSA tryptone soy agar

TSB tryptone soy broth

## **ABSTRACT**

The availability of reliable and easy-to-use screening methods represents an advantage over the possibility to detect pathogens, residues of veterinary drugs and contaminants in foods.

For this purpose, different biosensor systems are under development able to adapt different biological recognition elements to thermal, optical, electrical or piezoelectric transducers that recognise, amplify and elaborate the signal originating from the interaction between an analyte and the sensor. The biological recognition element can consist of enzymes, antigens, aptens, nucleic acids or cells and determine the sensitivity of the sensor towards the pathogens or the contaminants that have to be detected.

For this Research project different analytical techniques have been developed, to detect and quantify the presence of histamine and histamine producing-bacteria in fish samples and to determine the presence of *Escherichia coli* strains in raw milk.

The presence of residues of veterinary drugs in foods of animal origin was also studied.

The main objectives were: develop electrochemical immunological-sensors and evaluate their potential use as screening methods; validate the results obtained with these sensors in comparison to standard analytical methods and study future applications of electrochemical biosensors in the framework of a monitoring plan based on risk-assessment.



## LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

Questa tesi si basa sulla bibliografia specifica e sugli studi presenti nelle seguenti pubblicazioni, che verranno richiamate nel testo con i seguenti numeri romani:

- I. Trevisani, M., Cecchini, M., Fedrizzi, G., **Corradini, A.**, Mancusi, R. and Tothill, IE. (2019) Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna. *Front. Microbiol.* 10:1844. doi: 10.3389/fmicb.2019.01844
  
- II. **Corradini, A.**, Cecchini, M. and Trevisani, M. (2020) A Rapid Enzyme-Linked Immunomagnetic Electrochemical (ELIME) Assay for the Detection of *Escherichia coli* O26 in Raw Milk. *Food Anal. Methods* 13, 1366–1370. <https://doi-org.ezproxy.unibo.it/10.1007/s12161-020-01758-8>

L'autore ha partecipato anche alla stesura dei seguenti elaborati:

**Corradini, A.**, Trevisani, M., Dosa, G., Padovani, A. (2018) Information management and ante-mortem inspection procedures for the emerging diseases control: Experiences acquired in the epidemiological surveillance of bluetongue and lumpy skin disease. *IJFS* 7:1 – 5. doi: 10.4081/ijfs.2018.6922

**Corradini, A.**, Gandini, G., Andrea, B., Peli, A., Valentini, S., Isani, G., Pey, PB., Trevisani, M. (2019) Education in veterinary public health: a brief analysis on eight different European programs. Conference proceedings SISVET 2019, p. 75.

## **1. INTRODUZIONE**

Le malattie di origine alimentare sono un problema di rilevanza globale ed in costante aumento (Holban and Grumezescu, 2008; EFSA, 2015). I cambiamenti demografici, l'entità della moderna industria alimentare, la diffusione di un mercato globale e lo sviluppo dell'antibioticoresistenza hanno determinato l'emergenza di nuove minacce per la salute pubblica (Odeyemi and Sani, 2016; Singh, 2016). Come stabilito dalla normativa comunitaria, la sicurezza degli alimenti deve essere garantita da un approccio di tipo preventivo, che preveda l'applicazione di standard riconosciuti a livello internazionale come le buone pratiche in materia di igiene e le norme di buona lavorazione (Good Hygiene Practice, GHP e Good Manufacturing Practise, GMP), oltre che i principi dell'analisi di rischio e la definizione dei punti critici di controllo (HACCP) (Kafetzopoulos et al., 2013; Motarjemi and Mortimore, 2005; Jacxsens et al., 2010). Tali norme devono essere applicate dagli operatori del settore alimentare in ogni fase della produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti (Baiano, 2017; Bunney et al., 2017). L'ottimizzazione delle metodiche analitiche e l'utilizzo di test rapidi per la determinazione della presenza di microrganismi patogeni o loro metaboliti rappresentano un settore su cui l'industria alimentare, negli ultimi anni, ha iniziato ad investire al fine di assicurare la commercializzazione di alimenti sicuri (Wu et al., 2017; Singh et al., 2016). I metodi di analisi convenzionali, infatti, richiedono tempo, nonché la presenza di personale esperto e qualificato, oltre che una rigorosa e spesso elaborata preparazione dei campioni. Ad esempio, i metodi standard per l'identificazione dei patogeni basati sul conteggio di colonie messe in coltura possono richiedere diversi giorni. I metodi fisico-chimici, tra cui la cromatografia liquida e la spettrometria di massa tandem (LCMS/MS), utilizzati per la rilevazione di contaminanti come tossine, residui di farmaci veterinari e metalli pesanti, invece, tendono ad essere costosi e complicati da eseguire (McGrath et

al., 2012; Frenich et al., 2004; Verdu et al., 2013). È pur vero che la cromatografia e la spettrometria possono fornire risultati più accurati e conclusivi, ma i test di screening garantiscono una maggiore produttività con una minore formazione dell'operatore. Lo sviluppo di un test rapido che consenta di monitorare la sicurezza e la qualità degli alimenti in diverse fasi della produzione, mantenendo un elevato grado di affidabilità, potrebbe essere la scelta migliore per rispondere alle necessità della moderna industria alimentare. I biosensori possono inserirsi a tutti gli effetti in questo contesto e diventare un'alternativa valida alle tecniche di analisi convenzionali. Dalle applicazioni in campo medico, l'uso si è rapidamente esteso allo sviluppo di test per analisi su alimenti e ambiente (Sheikh, 2017; Jin et al., 2005; Luo et al., 2009; Pisoschi, 2016), i sensori offrono, infatti, diversi vantaggi in termini di rapporto costo-beneficio. Il loro campo di applicazione non si limita a patogeni come *Escherchia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*, ma si estende anche alla determinazione di altri patogeni, amine biogene, micotossine, pesticidi, contaminanti e residui antibiotici (Xu et al., 2017; Ali et al., 2017; Vidal et al., 2013; Parker and Tothill, 2009; Trevisani et al., 2019). L'alto grado di sensibilità e specificità è associato ad una preparazione minima del campione. La miniaturizzazione dei dispositivi, inoltre, ne consente l'utilizzo in campo con la possibilità di un monitoraggio in tempo reale (Singh et al., 2013). Poiché i biosensori consentono la rilevazione di microrganismi patogeni, pesticidi e altri contaminanti in ore o minuti (Luo et al., 2009; Mostafa, 2010) possono essere utilizzati anche all'interno di un sistema HACCP per verificare che un determinato processo sia sotto controllo. In conclusione, viste le loro molteplici applicazioni, i biosensori si configurano come uno strumento altamente versatile e dalle enormi potenzialità, utile a monitorare la sicurezza di tutta la filiera.



## 2. TIPOLOGIE DI SENSORI

### 2.1. Definizione di biosensore

Un biosensore può essere definito come uno strumento analitico che si compone di due parti, un bioelemento o *recognition element* (costituito ad es. da anticorpi, acidi nucleici, enzimi, cellule intere o aptameri) ed un trasduttore o *transducer*, che converte quanto rintracciato dal *recognition element* in un segnale misurabile strumentalmente (Thévenot et al., 2001; Velusamy et al., 2010).

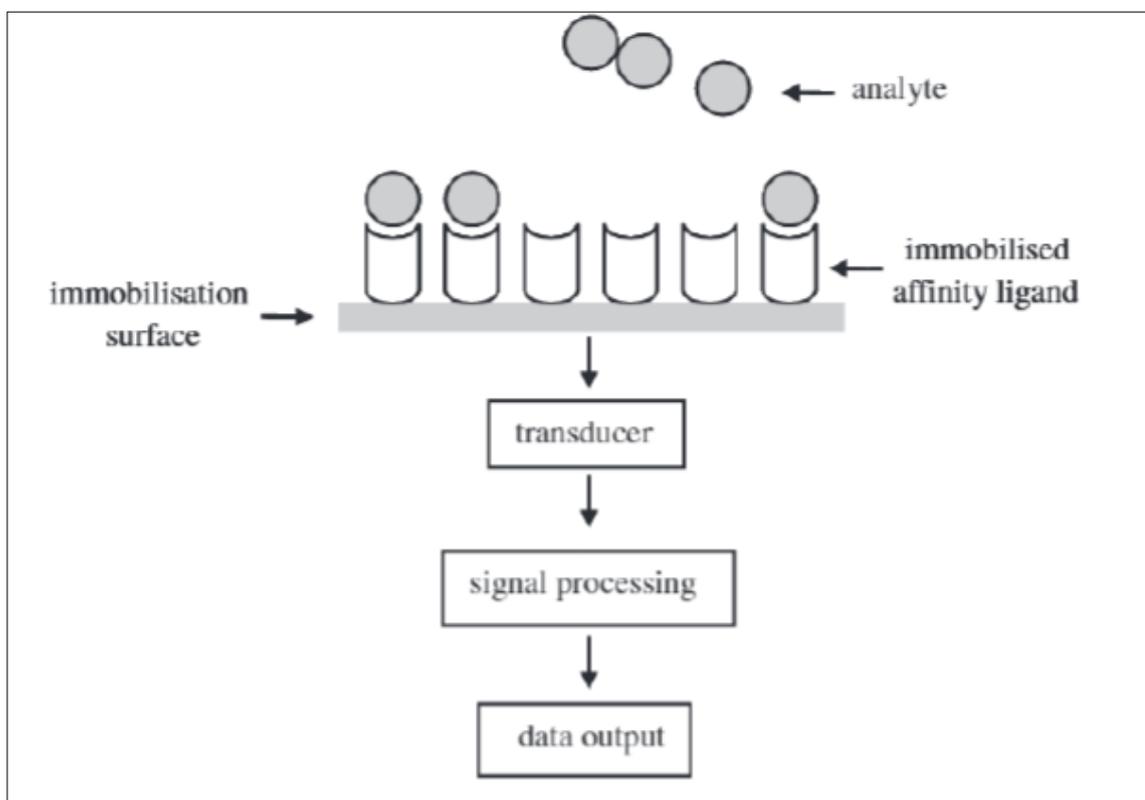
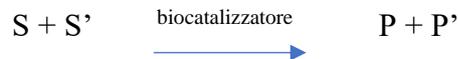


Figura 1: Riproduzione schematica delle parti che costituiscono un biosensore (Huet et al., 2010)

## 2.2. Classificazione

I biosensori vengono classificati in base alla componente biologica del *recognition element* o al sistema di trasduzione o, in alternativa, in base all'analita/alla reazione che monitorano. In base alla componente deputata al riconoscimento si distinguono sensori biocatalitici e di affinità (Ronkainen et al., 2010; Chaubey and Malhotra, 2002; Göpel and Heiduschka, 1995). Nel primo caso, il funzionamento del sensore si basa su una reazione catalizzata da macromolecole che vengono immobilizzate sul sensore stesso. Queste possono essere: enzimi (singoli o multipli), cellule intere (batteri, funghi o lieviti) o singoli organelli (mitocondri) e tessuti (tessuti animali o vegetali) (Dabrowski et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Quando uno o più analiti (o substrati, S e S') reagiscono con gli enzimi, le cellule o i tessuti del bioelemento, si originano diversi prodotti (P e P') che vengono misurati (Farabee, 2001).



Può avvenire, ad esempio, la catalisi enzimatica dovuta alla presenza della suddetta specie chimica che genera un segnale proporzionale alla concentrazione e all'efficienza enzimatica (Tothill and Turner, 2003); oppure, al contrario, l'attività enzimatica può essere inibita dalla molecola target. Nei biosensori che invece utilizzano come componente biologico intere cellule o microrganismi, il segnale analitico viene rilevato misurando lo stato metabolico generale di questi organismi viventi, come ad esempio l'inibizione della crescita, la vitalità della cellula, la respirazione cellulare o la bioluminescenza batterica (Choi and Gu, 2002; Jin et al., 2005; Nunes-Halldorson and Duran, 2003). Nel caso dei biosensori ad affinità, il mediatore lega in maniera specifica l'analita formando un prodotto che viene rilevato dal trasduttore. Si basano, quindi, sull'interazione fra l'analita e altri bioelementi, che possono essere stati prodotti

naturalmente o bioingegnerizzati (Zhao, 2018). Le interazioni possono essere di tipo antigene-anticorpo, oppure di tipo recettore-agonista-antagonista. In tale contesto, gli elementi di riconoscimento maggiormente impiegati sono gli anticorpi e si parla quindi di immunosensori (Karunakaran et al., 2015; Thakur and Ragavan, 2013). Gli anticorpi che vengono utilizzati possono essere di tipo policlonale, ovvero derivanti dal processo di immunizzazione di una determinata specie animale, oppure monoclonali, prodotti da cloni di plasmacellule. I primi possono legarsi all'antigene in luoghi diversi o con diverse affinità vincolanti, mentre i secondi sono specifici per un determinato epitopo e sono più selettivi degli anticorpi policlonali (Hau and J. Schapiro, 2003.; Leenaars and Hendriksen, 2005). Per aumentare la sensibilità degli immunosensori, generalmente vengono utilizzati anticorpi marcati con specifici enzimi (come ad esempio la perossidasi, la fosfatasi alcalina o l'ureasi). Altri elementi di riconoscimento sono gli acidi nucleici (Giallo et al., 2005; Ligaj et al., 2014). Il principio di rilevazione di questo tipo di sensori si basa sul fenomeno d'ibridazione del DNA, ossia il legame che avviene fra due ssDNA complementari. Il filamento di DNA (o RNA) target viene riconosciuto attraverso l'appaiamento con il filamento di DNA (o RNA) di riconoscimento (Ali et al., 2017). L'ibridazione si verifica in particolari regioni della sequenza di DNA o RNA bersaglio e l'evento di bioriconoscimento può portare all'appaiamento delle basi del DNA complementari (matching) oppure al mismatching (Rossetti et al., 2015; Karunakaran et al., 2015). Lo sviluppo di questo tipo di biosensori viene seguito con particolare attenzione grazie alle loro potenziali applicazioni nel campo dell'analisi genetica e della diagnostica clinica. Sono stati sviluppati, infine, biosensori che utilizzano gli aptameri come elemento di riconoscimento molecolare (Sharma et al., 2015; Vigneshvar et al., 2016). Gli aptameri sono piccoli filamenti di RNA e o DNA che legano ad essi specifiche molecole target con elevata specificità ed affinità. Grazie alle loro piccole dimensioni

(30-100 nucleotidi) rispetto agli anticorpi e agli enzimi, possono essere immobilizzati con una maggiore densità e, inoltre, possono essere sintetizzati con alti valori di riproducibilità e purezza (Di Pietrantonio et al., 2019). Il loro uso come elemento di riconoscimento biologico nei biosensori appare promettente per la determinazione rapida e semplice di proteine (Kirby et al., 2004). I biosensori vengono anche classificati in base alla natura del trasduttore impiegato per riconoscere il segnale generato dall'interazione tra l'elemento di riconoscimento biologico e la sostanza che si intende determinare (Peixoto and Silva, 2017; Pellegrini et al., 2005). I sistemi di trasduzione dei sensori chimici possono essere di tipo elettrochimico, ottico, piezoelettrico o calorimetrico.

### **2.2.1. Sensori elettrochimici**

I sensori elettrochimici sono quelli maggiormente utilizzati e si basano sul fatto che molte reazioni chimiche producono o consumano ioni o elettroni, determinando variazioni nelle proprietà elettriche delle soluzioni, o di specie presenti sull'elettrodo, che possono essere rilevate e misurate (Bard and Faulkner, 2000). I sensori elettrochimici sono classificabili in potenziometrici, amperometrici-voltammetrici e conduttimetrici a seconda del segnale fornito dal trasduttore (Peixoto and Silva, 2017; Pellegrini et al., 2005; Mungroo and Neethirajan, 2014). All'interno di ciascuna classe i sensori differiscono per la natura dello strato sensibile, per il modo in cui esso è immobilizzato sul trasduttore, la tipologia di analita determinabile, la struttura globale e la modalità di elaborazione del segnale (Thevenot et al., 2001). Per la determinazione di molti analiti si sfruttano reazioni chimiche note, come la formazione di complessi di ioni metallici o l'ossidazione di una sostanza organica catalizzata da un enzima. Lo strato sensibile può essere immobilizzato con vari meccanismi: formazione di legami chimici con il corpo del trasduttore, elettropolimerizzazione, adsorbimento o deposizione in fase vapore, oppure può essere incorporato all'interno di una membrana. Poiché tutte le reazioni avvengono direttamente

sull'elettrodo o nelle sue immediate vicinanze, la composizione di quest'ultimo gioca un ruolo cruciale nelle prestazioni dei biosensori elettrochimici. Dal punto di vista strutturale, i sensori possono essere costituiti da elettrodi convenzionali opportunamente funzionalizzati, o da dispositivi di piccole dimensioni realizzati con tecniche di screen printing o microelettronica; possono essere monouso o riutilizzabili, applicabili in laboratorio, in campo o per misurazioni in autodiagnosi (Mungroo and Neethirajan, 2014). La risposta analitica può essere qualitativa, semi-quantitativa o quantitativa e l'elaborazione dei dati può essere effettuata con le tecniche statistiche classiche o, nel caso di arrays di sensori, con procedure statistiche multivariate (Abollino et al., 2014).

I sensori elettrochimici si possono differenziare anche per la modalità di misurazione del segnale in: potenziometrici, amperometrici e conduttimetrici (Fraden, 2010; Śliwińska et al, 2014).

#### 2.2.1.1 Potenziometrici

I biosensori potenziometrici si basano sulla misurazione della differenza di potenziale che vige all'equilibrio elettrochimico tra un elettrodo indicatore (trasduttore) ed un elettrodo di riferimento o tra due superfici di un'opportuna membrana interessata a fenomeni di scambio ionico (Koncki, 2007). L'accoppiamento di questi dispositivi con un componente biologico (enzimi o anticorpi) li trasforma, di fatto, in biosensori, che vengono definiti *transistor* a effetto di campo (possono essere enzimatici o immunologici) (Pisoschi, 2016). In generale, la differenza di potenziale attraverso la membrana è legata alle attività dello ione all'esterno dell'elettrodo ( $a_x$ ) ed all'interno ( $a_1$ ) ed è definita dalla relazione:

$$E_m = -\frac{RT}{nF} \ln \frac{a_1}{a_x} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_x}{a_1}$$

I principali vantaggi di questo tipo di biosensori sono la disponibilità di un elevato numero di enzimi utilizzabili, l'elevata tecnologia disponibile, la facile installazione, l'ottenimento di misure semplici e dirette, la possibilità di utilizzo di diverse configurazioni, la facile automazione e i bassi costi. Vi è però il problema della scarsa selettività di alcuni sensori realizzati con questo metodo di rilevazione. Gli elettrodi sono soggetti a contaminazione in presenza di proteine o altri soluti organici, che possono determinare una risposta più lenta o una deriva del potenziale (Bard and Faulkner, 2000).

#### 2.2.1.2 Amperometrici

La determinazione amperometrica riguarda il monitoraggio delle variazioni di corrente prodotte dalle interazioni tra l'analita ed il sistema di bioriconoscimento molecolare, che possono portare a reazioni redox catalizzate dagli enzimi, oppure a reazioni di bioaffinità che avvengono sulla superficie del trasduttore (Rastogi et al., 2009; Ruiz-Valdepeñas Montiel et al., 2017). Sull'elettrodo di lavoro, solitamente di platino, oro o grafite, viene applicato un potenziale costante e viene registrata la variazione di corrente in funzione della concentrazione della specie elettroattiva (anticorpi, enzimi, mediatori). I principali vantaggi derivanti dall'utilizzo di questi sensori sono: la possibilità di ottenere una risposta lineare dove la corrente è proporzionale alla concentrazione di analita, la maggior sensibilità rispetto ai potenziometrici e la possibilità di miniaturizzazione (Adley, 2014; Thakur and Ragavan, 2013). Di contro abbiamo che la misura amperometrica viene eseguita ad un particolare potenziale di lavoro dove altre sostanze potrebbero reagire ed interferire. Inoltre, sia l'analita che il materiale con cui è costituito il sensore tendono a consumarsi, diminuendone, quindi, il tempo di utilizzo.

### 2.2.1.3 Conduttimetrici

Il funzionamento dei biosensori conduttimetrici è basato sul fatto che quasi tutte le reazioni enzimatiche portano o al consumo o alla produzione di specie cariche e, di conseguenza, determinano modifiche della composizione ionica del campione (Karunakaran et al., 2015). La conducibilità di una soluzione ionica è determinata dal moto degli ioni in essa presenti. Quando viene applicata una differenza di potenziale tra gli elettrodi di un'opportuna cella immersa in una soluzione elettrolitica, viene in essa generato un campo elettrico, che induce un movimento ordinato ed opposto delle specie ioniche in base alla loro carica. Nello specifico si avrà un flusso di cationi verso il polo negativo, mentre gli anioni tenderanno a spostarsi verso il polo positivo (Jaffrezic-Renault and Dzyadevych, 2008). I dispositivi di questo tipo presentano diversi vantaggi: gli elettrodi a film sottile sono, per esempio, adatti alla miniaturizzazione e possono essere prodotti su larga scala utilizzando una tecnologia poco costosa. La loro applicazione non richiede l'impiego di elettrodi di riferimento ed i trasduttori non sono sensibili alla luce.

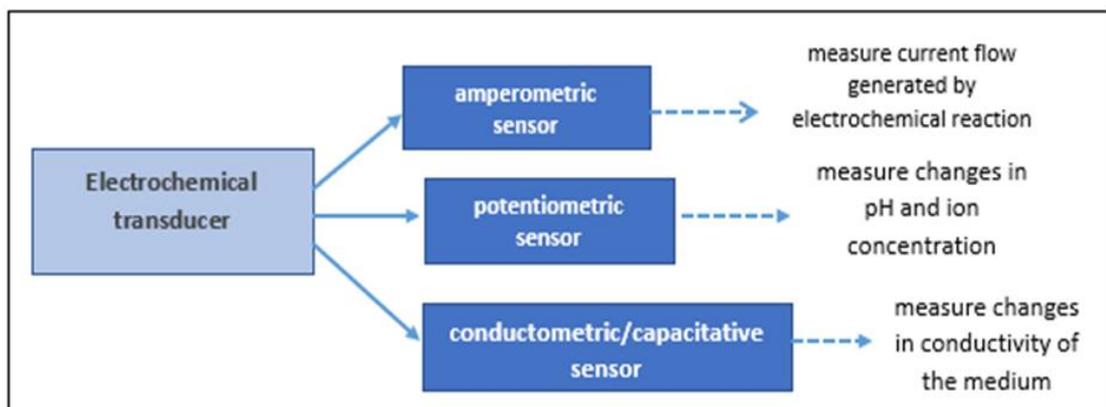


Figura 2: Sistemi di trasduzione di tipo elettrochimico (adattato da Huet et al., 2010)

### **2.2.2. Sensori ottici**

Molti dei dispositivi ottici basano il proprio meccanismo d'azione sulla risonanza plasmonica di superficie (SPR) oppure sulla tecnologia delle fibre ottiche, combinate con le varie tecniche spettroscopiche (Marazuela and Moreno-Bondi, 2002; Thakur and Ragavan, 2013). Nei biosensori SPR, le molecole di riconoscimento biologico (anticorpi, oligonucleotidi, aptameri) vengono prima immobilizzate sulla superficie del trasduttore; quando la soluzione contenente le molecole target si ritrova a contatto con la superficie, si instaurano delle interazioni per affinità tra le due componenti, che inducono un cambiamento dell'indice di rifrazione della superficie dell'elettrodo (Marazuela and Moreno-Bondi, 2002).

### **2.2.3. Sensori piezoelettrici**

I biosensori piezoelettrici sono dei dispositivi sensibili alle variazioni della massa, della viscosità o della densità di campioni che vengono messi in contatto con una superficie piezoelettricamente attiva (Minunni et al., 1994; Borman, 1987). Il trasduttore piezoelettrico maggiormente impiegato è la microbilancia al cristallo di quarzo (QCM). Grazie alle sue proprietà piezoelettriche, il cristallo può dar luogo a delle oscillazioni, attraverso un semplice circuito elettrico, secondo una frequenza naturale direttamente proporzionale allo spessore del cristallo (Bao et al., 1996). Ove una massa venga depositata sulla superficie del cristallo di quarzo (nel caso dei biosensori, parliamo della componente biologica) si registra una riduzione della frequenza di oscillazione (Borman, 1987). I maggiori vantaggi nell'impiego di questi dispositivi risiedono nell'ottenimento di risultati in tempo reale a bassi costi ed in maniera semplice (Kimmel et al., 2012; Mungroo and Neethirajan, 2014). Gli svantaggi riguardano però la bassa sensibilità ed

una limitata specificità, a causa della possibilità d'interferenze sulla superficie del sensore.

#### 2.2.4. Sensori calorimetrici

Questi ultimi, meno diffusi rispetto ai precedenti, sono dispositivi in grado di misurare la variazione di temperatura della soluzione contenente l'analita a seguito del decorso di una reazione (promossa dall'elemento biologico) che lo vede coinvolto, ed associarla alla concentrazione della specie in esame (Thakur and Ragavan, 2013).

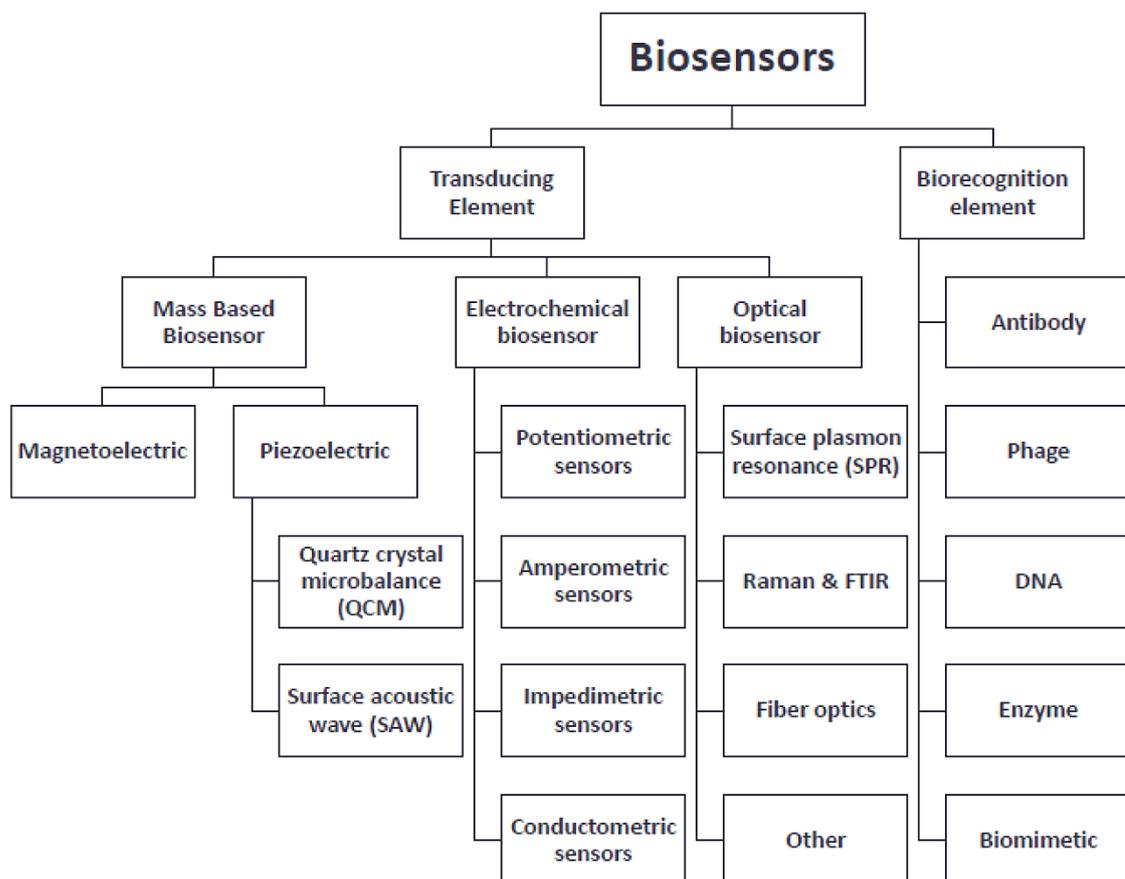


Figura 3: Classificazione dei biosensori (Mungroo and Neethirajan, 2014)

### 2.3. Bibliografia

- Abollino, O., Giacomino, A., Gioia, C. La, & Toniolo, R. (2014). Principi ed applicazioni dei sensori elettrochimici. *Chimica & Elettrochimica*.
- Adley, C. (2014). Past, Present and Future of Sensors in Food Production. *Foods*, 3(3), 491–510. <https://doi.org/10.3390/foods3030491>
- Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 08(01). <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
- Baiano, A. (2017). Applications of hyperspectral imaging for quality assessment of liquid based and semi-liquid food products: A review. *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.012>
- Bao, L., Deng, L., Nie, L., Yao, S., & Wei, W. (1996). Determination of microorganisms with a quartz crystal microbalance sensor. *Analytica Chimica Acta*, 319(1–2), 97–101. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00466-1](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00466-1)
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition. Wiley. Available from <https://www.wiley.com/en-ir/Electrochemical+Methods%3A+Fundamentals+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9780470452530>
- Borman, S. (1987). Optical and piezoelectric biosensors. *Analytical Chemistry*, 59(19). <https://doi.org/10.1021/ac00146a743>
- Bunney, J., Williamson, S., Atkin, D., Jeanneret, M., Cozzolino, D., Chapman, J., & Chandra, S. (2017). The use of electrochemical biosensors in food analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 5(3), 183–195. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.02>
- Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002, June 26). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X)
- Choi, S. H., & Gu, M. B. (2002). A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. In *Biosensors and Bioelectronics*. 17(5), 433–

440. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00303-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00303-7)
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., G. Pinacho, D., Reviejo, A. J., Marco, M. P., & Pingarrón, J. M. (2012). Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, *36*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044>
- Dabrowski, M., Sharma, P. S., Iskierko, Z., Noworyta, K., Cieplak, M., Lisowski, W., ... Kutner, W. (2016). Early diagnosis of fungal infections using piezomicrogravimetric and electric chemosensors based on polymers molecularly imprinted with D-arabitol. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.088>
- Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., & Benetti, M. (2019). Biosensor technologies based on nanomaterials. *Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814401-5.00008-6>
- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, *13*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- Farabee, M. J. (2001). Reactions & enzymes. Available from <https://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/biobk/BioBookEnzym.html> Accessed 19/12/2020.
- Fraden, J. (2010). Sensor Characteristics. In *Handbook of Modern Sensors*, 13–52. Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6466-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6466-3_2)
- Frenich, G.A., Martínez Vidal, J. L., López López, T., Cortés Aguado, S., & Martínez Salvador, I. (2004). Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A*, *1048*(2), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.027>
- Giallo, M. L. Del, Ariksoysal, D. O., Marrazza, G., Mascini, M., & Ozsoz, M. (2005). Disposable Electrochemical Enzyme-Amplified Genosensor for *Salmonella* Bacteria Detection. *Analytical Letters*, *38*(15), 2509–2523. <https://doi.org/10.1080/00032710500369687>

- Göpel, W., & Heiduschka, P. (1995). Interface analysis in biosensor design. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9–10), 853–883. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)99225-A](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)99225-A)
- Hau, J., & J. Schapiro, S. (2003). Handbook of Laboratory Animal Science: Essential Principles and Practices. CRC Press. Available from [https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=G\\_nKBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA391&dq=polyclonal+and+monoclonal+production&ots=OwbPj6eMdi&sig=6Rb1kVbd43pGNCC9WAcnmBVI\\_qQ#v=onepage&q=polyclonal and monoclonal production&f=false](https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=G_nKBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA391&dq=polyclonal+and+monoclonal+production&ots=OwbPj6eMdi&sig=6Rb1kVbd43pGNCC9WAcnmBVI_qQ#v=onepage&q=polyclonal+and+monoclonal+production&f=false)
- Holban, A. M., & Grumezescu, A. M. (2008). Foodborne Diseases. *Emerging infectious Diseases*, 14(7). <https://doi.org/10.3201/eid1407.080346>
- Huet, A. C., Delahaut, P., Fodey, T., Haughey, S. A., Elliott, C., & Weigel, S. (2010). Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1281–1294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.017>
- Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., Rovira, J., Gomez, S. O., & Luning, P. A. (2010). Food safety performance indicators to benchmark food safety output of food safety management systems. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.003>
- Jaffrezic-Renault, N., & Dzyadevych, S. V. (2008). Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors*, 8(4), 2569–2588. <https://doi.org/10.3390/s8042569>
- Jin, H. L., Mitchell, R. J., Byoung, C. K., Cullen, D. C., & Man, B. G. (2005). A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.015>
- Kafetzopoulos, D. P., Psomas, E. L., & Kafetzopoulos, P. D. (2013). Measuring the effectiveness of the HACCP Food Safety Management System. *Food Control*, 33(2), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.044>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics*, 1–68. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>

- Kimmel, D. W., Leblanc, G., Meschievitz, M. E., & Cliffel, D. E. (2012). Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>
- Kirby, R., Cho, E. J., Gehrke, B., Bayer, T., Park, Y. S., Neikirk, D. P., ... Ellington, A. D. (2004). Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Analytical Chemistry*, 76(14), 4066–4075. <https://doi.org/10.1021/ac049858n>
- Koncki, R. (2007). Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003>
- Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. M. (2005). Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal*, 46(3), 269–279. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
- Ligaj, M., Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D., & Filipiak, M. (2014). Electrochemical DNA biosensor for the detection of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Electrochimica Acta*, 128, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.061>
- Luo, J., Liu, X., Tian, Q., Yue, W., Zeng, J., Chen, G., & Cai, X. (2009). Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food. *Analytical Biochemistry*, 394(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.021>
- Marazuela, M. D., & Moreno-Bondi, M. C. (2002). Fiber-optic biosensors - An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(5–6), 664–682. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1235-9>
- McGrath, T. F., Elliott, C. T., & Fodey, T. L. (2012). Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5685-9>
- Minunni, M., Skládals, P., & Mascini, M. (1994). A Piezoelectric Quartz Crystal Biosensor as a Direct Affinity Sensor. *Analytical Letters*, 27(8), 1475–1487. <https://doi.org/10.1080/00032719408006383>
- Mostafa, G. (2010). Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides~!2010-02-01~!2010-06-30~!2010-07-21~! *The Open Electrochemistry Journal*, 2(1), 22–42. <https://doi.org/10.2174/1876505x01002010022>

- Motarjemi, Y., & Mortimore, S. (2005). Industry's need and expectations to meet food safety, 5th International Meeting: Noordwijk Food Safety and HACCP Forum 9-10 December 2002. *Food Control*, 16(6), 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.014>
- Mungroo, N., & Neethirajan, S. (2014). Biosensors for the Detection of Antibiotics in Poultry Industry—A Review. *Biosensors*, 4(4), 472–493. <https://doi.org/10.3390/bios4040472>
- Nunes-Halldorson, V. D. S., & Duran, N. L. (2003). Bioluminescent bacteria: Lux genes as environmental biosensors. *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200001>
- Odeyemi, O. A., & Sani, N. A. (2016). Antibiotic resistance and burden of foodborne diseases in developing countries. *Future Science OA*, 2(4), FSO139. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0023>
- Parker, C. O., & Tothill, I. E. (2009). Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8), 2452–2457. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.021>
- Peixoto, A. C., & Silva, A. F. (2017). Smart devices: Micro- and nanosensors. *Bioinspired Materials for Medical Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100741-9.00011-5>
- Pellegrini, G. E., Carpico, G., Guidotti, M., & Chimici, R. C. (2005). Qualità Degli Alimenti. *Focus*. Available from [http://www.iss.it/binary/cnra/cont/contaminanti\\_chimici\\_degli\\_alimenti\\_Pellegrini\\_Biosensori.1135854768.pdf](http://www.iss.it/binary/cnra/cont/contaminanti_chimici_degli_alimenti_Pellegrini_Biosensori.1135854768.pdf)
- Pisoschi, A. M. (2016). Potentiometric Biosensors: Concept and Analytical Applications- An Editorial. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 5(3), 0–0. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e164>
- Rastogi, S. K., Gibbon, S., Branen, J. R., & Branen, A. L. (2009). Amperometric detection of staphylococcal enterotoxin B in milk using magnetic bead-based immunoassay on disposable screen printed carbon electrode strip. *NSTI Nanotechnology Conference and Expo*, 1, 480–483.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors.

- Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>
- Rossetti, G., Dans, P. D., Gomez-Pinto, I., Ivani, I., Gonzalez, C., & Orozco, M. (2015). The structural impact of DNA mismatches. *Nucleic Acids Research*, 43(8), 4309–4321. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv254>
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Gutiérrez, M. L., Torrente-Rodríguez, R. M., Povedano, E., Vargas, E., Reviejo, J., ... Pingarrón, J. M. (2017). Disposable Amperometric Polymerase Chain Reaction-Free Biosensor for Direct Detection of Adulteration with Horsemeat in Raw Lysates Targeting Mitochondrial DNA. *Analytical Chemistry*, 89(17), 9474–9482. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02412>
- Santana Oliveira, I., da Silva Junior, A. G., de Andrade, C. A. S., & Lima Oliveira, M. D. (2019). Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.004>
- Sharma, R., Ragavan, K. V., Thakur, M. S., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.017>
- Sharma, R., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Nanoparticle-Based Aptasensors for Food Contaminant Detection. In *Nanomaterials for Food Application*, 123–145. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00006-3>
- Sheikh, N. J., & Sheikh, O. (2017). Forecasting of biosensor technologies for emerging point of care and medical IoT applications using bibliometrics and patent analysis. In *PICMET 2016 - Portland International Conference on Management of Engineering and Technology*, 3082–3093. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. <https://doi.org/10.1109/PICMET.2016.7806585>
- Singh, P. K., Jairath, G., Ahlawat, S. S., Pathera, A., & Singh, P. (2016). Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. *Journal of Food Science and Technology*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2041-7>
- Śliwińska, M., Wiśniewska, P., Dymerski, T., Namieśnik, J., & Wardencki, W. (2014). Food analysis using artificial senses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf403215y>

- Thakur, M. S., & Ragavan, K. V. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0783-z>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Tothill, I. E., & Turner, A. P. F. (2003). Biosensors. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second, p. 6000). Academic Press.
- Trevisani, M., Cecchini, M., Fedrizzi, G., Corradini, A., Mancusi, R., & Tothill, I. E. (2019). Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01844>
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>
- Verdu, C. F., Gatto, J., Freuze, I., Richomme, P., Laurens, F., & Guilet, D. (2013). Comparison of two methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the quantification of polyphenols in cider apple juices. *Molecules*, 18(9), 10213–10227. <https://doi.org/10.3390/molecules180910213>
- Vidal, J. C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J. R., Cubel, C., & Castillo, J. R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.05.008>
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., & Prakash, H. (2016). Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
- Wu, M. Y. C., Hsu, M. Y., Chen, S. J., Hwang, D. K., Yen, T. H., & Cheng, C. M. (2017). Point-of-Care Detection Devices for Food Safety Monitoring: Proactive Disease Prevention. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.005>
- Xu, S., Zhang, Y., Dong, K., Wen, J., Zheng, C., & Zhao, S. (2017). Electrochemical DNA biosensor based on graphene oxide-chitosan hybrid nanocomposites for

detection of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Electrochemical Science*, 12(4), 3443–3458. <https://doi.org/10.20964/2017.04.16>

Zhao, Y.-W., Wang, H.-X., Jia, G.-C., & Li, Z. (2018). Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*. *Sensors*, 18(8), 2518; <https://doi.org/10.3390/s18082518>

*I capitoli seguenti contengono una review sulle performance dei principali sensori elettrochimici applicati alla ricerca di microrganismi, amine biogene e residui di antibiotici in matrici alimentari. Il testo sarà oggetto di pubblicazione e la presente versione potrà, quindi, subire variazioni in seguito alla sottomissione del lavoro.*

## **Electrochemical sensors to detect bacteria, biogenic amines and veterinary drugs in foods: an overview**

### **Abstract**

The availability of reliable and easy-to-use screening methods to detect pathogens, residues of veterinary drugs and contaminants is an important concern for food operators in every stage of the food supply chain. Moreover, develop portable analytical device that work with a small sample pre-treatment is fundamental to obtain a rapid response. For this reason, in the last years the number of scientific papers on electrochemical biosensors has increased. The range of application in which they operate is very wide and varies from industrial sector to environmental monitoring, biodefence and clinical diagnosis. In the food sector, the applications regard the determination of biological contaminants (micotoxins, biogenic amines, heavy metals), pathogens (bacteria, virus, fungi) and residues of veterinary drugs in different types of matrices. In this work the latest electrochemical sensors with food-safety applications are presented. The performance criteria, such as analysis time and limit of detection are discussed and summarized. Future applications are also considered.

### 3. STATO DELL'ARTE

#### 3.1. Elementi caratterizzanti i sensori elettrochimici

Un biosensore è un dispositivo analitico che incorpora un materiale biologico, con funzione di elemento di riconoscimento, all'interno di un trasduttore fisico-chimico. Lo scopo è produrre un segnale elettrico che sia proporzionale alla concentrazione di uno specifico analita. Questo segnale può quindi essere convertito dal trasduttore in una risposta misurabile (Tothill and Turner, 2003). I biosensori elettrochimici si basano generalmente su reazioni di catalisi enzimatica da cui deriva la produzione di ioni (Thévenot et al., 2001). Un sensore elettrochimico, in particolare, è costituito da tre elettrodi: un elettrodo di riferimento (*reference electrode*), un elettrodo di lavoro (*working electrode*) ed un contro elettrodo (*counter electrode*). L'analita è coinvolto direttamente nella reazione, che avviene sulla superficie dell'elettrodo di lavoro, e gli ioni prodotti generano un potenziale che viene paragonato a quello dell'elettrodo di riferimento e da cui origina il segnale. I biosensori elettrochimici hanno dimostrato la loro efficacia in molteplici applicazioni, dal settore industriale, al monitoraggio ambientale, alla biodifesa, alla diagnostica clinica (Sheikh NJ and Sheikh O, 2017). In campo alimentare, il loro utilizzo spazia dalla determinazione della presenza di contaminanti biologici (micotossine, amine biogene, metalli pesanti) (Ali et al., 2017; Vidal et al., 2013; Parker and Tothill, 2009; Trevisani et al., 2019), alla ricerca di microrganismi patogeni (batteri, virus, funghi) (Xu et al., 2017), alla determinazione della concentrazione di residui di farmaci (antibiotici, antiparassitari, immunostimolanti) (Bunney et al., 2017; Gaudin, 2017; Singh et al., 2016), in varie matrici alimentari.

### **3.1.1. Micro e nano-materiali**

Negli ultimi anni, sono sempre più frequenti i sensori che prevedono l'utilizzo di micro e nano-materiali. Fra questi, i più utilizzati sono: particelle d'oro (gold nanoparticles, GNPs), nanotubi (carbon nanotubes, CNTs), grafene (GR), particelle magnetiche (magnetic beads, MBs) e polimeri conduttori. Questi materiali vengono utilizzati per modificare la superficie degli elettrodi e/o come elementi marker per generare strumenti ad alta efficienza (Cinti et al., 2017). Le GNPs, grazie alla loro eccellente elettroattività e rapporto superficie/volume, possono essere utilizzate per promuovere il trasferimento di elettroni, oppure come sonda redox in ambiente acido (in seguito a dissoluzione ossidativa degli atomi d'oro). Diversamente dalle GNPs, i nanotubi sono in grado solamente di amplificare la conduttività dell'elettrodo favorendo il raggiungimento dello stesso da parte del bioelemento. I polimeri possono essere impiegati sia come carrier di elettroni che di cariche e, in base alle condizioni di elettropolimerizzazione, possono entrare a far parte di superfici in grado di discriminare diverse classi di batteri (Cinti et al., 2017). Le MBs permettono una semplificazione notevole nella pre-concentrazione del campione e nella riduzione degli interferenti (Yáñez-Sedeño et al., 2016); in combinazione con enzimi e anticorpi marcati consentono di ottenere sensori dalle elevate performance (Jones et al., 2019).

### **3.1.2. Cross-linking**

Il cross-linking prevede l'utilizzo di glutaraldeide (GA) o altri agenti bifunzionali per l'immobilizzazione enzimatica. L'immobilizzazione enzimatica avviene sfruttando un gel ottenuto dalla co-reticolazione della glutaraldeide con, ad esempio, albumina di siero bovino (BSA) depositato sull'elettrodo.

### 3.1.3. Labelling

Gli immunosensori elettrochimici sono sensori di affinità basati su un supporto in fase solida su cui avvengono le reazioni antigene-anticorpo, che vengono convertite da un trasduttore in un segnale elettrochimico. Il concetto che sta alla base di questo tipo di sensori è di molto affine al test ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) convenzionale, anche se, diversamente da questa, grazie alla presenza dei trasduttori si può ottenere un'efficiente determinazione della formazione degli immunocomplessi e la relativa quantificazione del substrato analitico. Gli immunosensori *label-based* prevedono la presenza di un marker legato ad un antigene (Ag) o ad un anticorpo (Ab) che permette lo scambio di elettroni. L'entità del segnale dipende dalla quantità di antigene/anticorpo marcato che viene rintracciata e tale valore corrisponde alla presenza dell'analita (Cinti et al., 2017). La maggior parte dei sensori immunoenzimatici sviluppati per i batteri utilizzano un tipo di sandwich diretto, dove la cellula target è immobilizzata fra due anticorpi specifici (di cui uno immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo, o altro supporto, e l'altro coniugato con un marcatore). La molecola utilizzata come marker può essere essa stessa elettricamente attiva oppure essere capace di generare dei prodotti che lo sono. Queste molecole sono ampiamente utilizzate ed hanno il vantaggio di poter amplificare il segnale (a seconda del tipo e della quantità di marcatore presente). Possono anche, tuttavia, influenzare l'efficienza del legame antigene-anticorpo e rendere in questo modo la resa del sistema variabile.

### **3.2. Applicazioni nell'industria alimentare**

Le malattie associate al consumo di alimenti di origine animale sono un problema di rilevanza globale, con importanti ricadute sulla Sanità Pubblica e sulla popolazione in generale. L'avere a disposizione strumenti per l'analisi rapida di queste categorie di prodotti, che superino le criticità dei sistemi tradizionali (elevati costi, lunga preparazione dei campioni, necessità di personale esperto), rappresenta una nuova sfida per la ricerca in sicurezza alimentare. I recenti e crescenti sviluppi dei biosensori elettrochimici hanno permesso di raggiungere ottimi risultati, sia riguardo alla determinazione qualitativa dell'analita (che siano batteri, tossine o residui di farmaci), che nei tempi di analisi. Queste tecnologie, infatti, consentono di avere, oltre che un'elevata specificità, un metodo di analisi che si adatta a matrici complesse, nonostante le differenze di composizione, densità, pH e temperatura.

#### **3.2.1. Istamina e batteri istamino produttori**

L'istamina è un composto azotato idrofilo costituito da un anello imidazolico e da un gruppo amminico che appartiene alla famiglia delle ammine biogene, è uno dei mediatori chimici dell'infiammazione e deriva dalla decarbossilazione dell'istidina ad opera della L-istidina decarbossilasi. È una molecola ampiamente diffusa nell'organismo, dove ricopre un ruolo importante nelle risposte infiammatorie ed allergiche. Viene ossidata dall'enzima mono-diaminossidasi nell'intestino, nel fegato, nei reni, nei polmoni ed in altri organi (Loffredi, 2018). Insieme ad altre ammine biogene quali la tiramina, la cadaverina e la putrescina può essere, però, presente anche in vari tipi di alimenti a seguito dell'azione di alcuni microrganismi ed alle decarbossilasi batteriche da questi prodotte (Lange and Wittman, 2002). L'intossicazione da istamina associata al consumo di prodotti ittici è un esempio di malattia alimentare dovuto alla sua presenza negli alimenti. Si può manifestare, infatti, in seguito al consumo di pesce, o prodotti derivati, contenenti elevate

quantità di questa sostanza (Hungerford, 2010; EFSA, 2017). Tra il 2018 e il 2020, le allerte registrate sul portale RASFF per la categoria dei contaminanti biologici sono state in totale 101, di cui 70 per alimenti contenenti istamina (RASFF Portal). Le manifestazioni cliniche sono suddivisibili secondo la sede principale in sintomi cutanei (rash cutaneo, orticaria, edema facciale, ponfi, iperemia congiuntivale, prurito); sintomi gastrointestinali (diarrea, dolore addominale, nausea, vomito, bruciore, gonfiore della bocca e della lingua); sintomi emodinamici (ipotensione, vertigini) e sintomi neurologici (mal di testa, palpitazioni, formicolio, disturbi alla visione, tremori, debolezza, sensazione di calore) (Kovacova-Hanusikova et al., 2015). In letteratura sono stati riportati episodi di intossicazione da scombridi di insolita gravità, con sintomi estremamente seri che hanno reso necessari trattamenti d'urgenza per risolvere stati di bronco-spasmo ed ipotensione ingravescente fino allo shock. Le manifestazioni sono correlate alla elevata concentrazione d'istamina, (Gonzaga et al., 2009) che si accumula a seguito dell'azione di batteri produttori di istidino-decarbossilasi, raggiungendo concentrazioni tossiche rilevanti soprattutto in alcune specie ittiche nelle cui carni la concentrazione d'istidina libera è maggiore (Rawles, 1996). Si ritiene che l'intossicazione da istamina si verifichi dopo il consumo di alimenti contenenti ammine biogene a concentrazioni superiori a 500 ppm. I batteri produttori di istamina (HPB) vengono classificati in base alla attività dell'istidino-decarbossilasi, come produttori di istamina deboli, medi e forti (Kristin et al., 2009; De Las Rivas, 2006). I forti produttori appartengono prevalentemente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (*Morganella*, *Raoultella*, *Erwinia*, *Proteus*) (Cantoni, 2008). Anche i batteri del genere *Photobacterium* (*P. damsela* e *P. phosphoreum*) hanno dimostrato una forte attività istidino-decarbossilante e sono stati implicati in casi clinici di intossicazione (Emborg and Dalgaard, 2006; Landete et al., 2008). Questi batteri vengono introdotti nei tessuti in conseguenza di modifiche autolitiche post-mortem o di

una manipolazione inappropriata del pesce durante le procedure di lavorazione. Poiché i prodotti ittici vengono normalmente conservati a temperature prossime allo zero, alcuni batteri psicotolleranti possono avere un ruolo importante nei focolai non correlati a un'interruzione della catena del freddo (Kanki et al., 2007; Emborg et al., 2006; Prester, 2011). Questi batteri includono i batteri *Morganella morganii*-simili (*Morganella psychrotolerans*) e *P. phosphoreum*. Il Regolamento (CE) 2073/2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari ha stabilito i livelli di accettabilità per l'istamina nei pesci appartenenti alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombersocidae*, fissando i limiti a 100 mg/kg (m), con una tolleranza fino a 200 mg/kg (M) in non più di due unità campionarie sul totale di nove. Nel caso di prodotti in salamoia che hanno subito un trattamento di maturazione enzimatica, i limiti ammissibili d'istamina sono raddoppiati. Mentre per la salsa di pesce prodotta mediante fermentazione di prodotti della pesca il limite è fissato a 400 mg/kg per un'unica aliquota (Regolamento UE n. 1019/2013). La Food and Drug Administration degli Stati Uniti ha fissato un limite di 50 mg/kg per l'istamina nel tonno, nel mahi-mahi e nei pesci affini (FDA, 2011). Per soddisfare questi criteri, gli operatori del settore alimentare devono definire degli obiettivi di processo nella gestione delle operazioni e quindi essere in grado di stimare l'attività dei batteri produttori di istamina nella catena di produzione. Il Regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche prevedono, inoltre, che per la ricerca di istamina venga utilizzato il metodo UNI EN ISO 19343:2017, basato sull'utilizzo della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevazione fluorometrica. I limiti di questa metodica derivano dal fatto che il processo di preparazione dei campioni per l'analisi è lungo e complesso, richiede tecnici qualificati ed una strumentazione molto costosa. Queste analisi hanno, inoltre, come finalità essenzialmente la stima della quantità di istamina già formata nell'alimento e non

forniscono informazioni riguardanti la flora istaminogena. I test ELISA, allo stesso modo, richiedono una certa preparazione del campione e personale formato, i tempi di incubazione dei campioni possono variare dai 15 ai 90 minuti ed il costo dei kit non è trascurabile.

### **3.2.2. Sensori elettrochimici per istamina**

I sensori elettrochimici per la rilevazione dell'istamina nel pesce si basano essenzialmente sulla realizzazione di un cross-linking sulla superficie dell'elettrodo o sull'utilizzo di CNTs. Perez et al. (2013) utilizzano una membrana costituita da polisolfone, CNTs e ferrocene per immobilizzare la diamminossidasi (DAO) e la perossidasi (HRP) sulla superficie dell'elettrodo. Il LOD è di  $0.17 \mu\text{M}$  in PBS. Le prove su matrici reali sono state effettuate utilizzando campioni di acciughe, tonno, sardine, gamberetti e sgombro. Sono stati utilizzati sia SPE che dual-SPE. Il metodo è stato in grado di rilevare da  $26 \pm 1$  a  $208 \pm 19 \mu\text{g/g}$  di istamina in 20 secondi (SPE). Entrambi i sensori hanno permesso di quantificare l'istamina presente nei campioni. Tuttavia, con l'SPE nel tonno è stata rilevata un'interferenza derivante da fenomeni ossidativi, non presente nel dual-SPE. Un altro sensore per istamina è stato realizzato utilizzando una percentuale di tetratiafulvalene per realizzare l'SPCE. GA e BSA sono state utilizzate per immobilizzare l'istamina deidrogenasi (HDH) nel cross-linking. Il LOD di questo sensore è di  $8.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$  in PBS e l'intervallo di risposta va da 8 a  $60 \mu\text{M}$ . Le prove su matrici reali (contenenti una quantità certificata di istamina, pari a  $8.7 \text{ mg/kg}$ ) hanno mostrato che il sensore è in grado di quantificare l'istamina nei campioni ( $8.7 \text{ mg/kg}$  vs  $8.9 \pm 0.4 \text{ mg/kg}$ ). Un dual-SPCE è stato utilizzato per testare sia istamina che putrescina in campioni di polpo. I risultati sono paragonabili a quelli ottenuti con il metodo di riferimento HPLC.

### **3.2.3. *Escherichia coli* verocitotossici**

Gli *Escherichia coli* produttori di Shiga-Tossina o verocitotossici (STEC o VTEC) sono agenti zoonosici in grado di produrre tossine pericolose per la salute umana, inducendo una grave forma di diarrea emorragica. Una possibile complicazione è la sindrome emolitico-uremica (SEU), caratterizzata da una grave insufficienza renale acuta, associata ad anemia e piastrinopenia, che talvolta si rivela fatale (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, n.d.). L'infezione da VTEC si trasmette prevalentemente attraverso il consumo o la manipolazione di cibi contaminati e attraverso il contatto con animali infetti. L'ulteriore trasmissione da persona a persona è possibile in caso di stretto contatto. Vari generi alimentari sono stati associati all'origine di questo tipo d'infezione, quali ad esempio la carne bovina non sufficientemente cotta, il latte non pastorizzato, vari prodotti freschi (cetrioli, germogli, spinaci e insalate), il succo di mela non pastorizzato e il formaggio (EFSA 2013). E' sufficiente un numero molto ridotto di VTEC per provocare l'infezione nell'essere umano (Delannoy et al., 2013). I ceppi di VTEC possono appartenere a differenti sierotipi, ma i casi di infezione riportati nell'uomo risultano causati prevalentemente da *E. coli* O157, O26, O111, O103 e O145 (EFSA, 2013). Il sierotipo più importante dal punto di vista clinico ed alimentare è l'*E. coli* O157:H7 ma, recenti epidemie di *E. coli* O26 sottolineano come questo sia un rischio emergente di infezione, in particolare associato ai prodotti lattiero-caseari (ECDC, 2017; Severi et al., 2016; Germinario et al., 2016). Sebbene non esista ad oggi uno standard internazionale di riferimento per la determinazione e l'isolamento di VTEC non-O157, il metodo maggiormente impiegato per il rilevamento di VTEC negli alimenti e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 si basa su metodiche colturali associate a real-time PCR (RTi-PCR) (ISO/TS 13136:2012). I ceppi positivi per il gene della verocitotossina 2 (*vtx2*) e per i geni *eae* (che codificano la produzione di

intimina) sono associati a un rischio più elevato di malattie gravi rispetto ad altre combinazioni di geni di virulenza (EFSA, 2013; Delannoy et al., 2013). Per questo, la rilevazione mediante PCR di geni che codificano per le tossine Shiga e le intimine differenziano efficacemente i ceppi citotossici dai ceppi non patogeni. Questi metodi, tuttavia, hanno il limite che tra l'arrivo del campione al laboratorio ed il risultato analitico intercorrono diversi giorni. I biosensori sono, invece, in grado di dare una risposta in ore o minuti.

#### **3.2.4. Sensori elettrochimici per *Escherichia coli* O157:H7**

Tra i primi sensori per *Escherichia coli* vi è quello sviluppato da Abdel-Hamid et al., un immunosensore amperometrico in grado di rilevare da  $1 \times 10^2$  a  $6 \times 10^2$  CFU/mL di *E. coli* O157:H7 in 30 min (Abdel-Hamid et al., 1999). Brewster e Mazenko ne hanno messo a punto uno basato sulla cattura per filtrazione delle cellule legate ad anticorpi marcati con fosfatasi, il cui LOD è di  $5 \times 10^3$  CFU/mL (in 25 min) (Brewster and Mazenko, 1998). Un altro immunosensore, di tipo conduttimetrico, viene invece sviluppato da Muhammad-Tahir e Alocilja, ed è in grado di rilevare  $7.9 \times 10^1$  CFU/mL in 10 min. La risposta del sensore di Muhammad a *E. coli* O157:H7 è significativa rispetto al controllo negativo, tuttavia non vi sono differenze statisticamente rilevanti fra i vari livelli di contaminazione superiori al LOD. Sono stati eseguiti anche dei test di cross-reattività con *E. coli* non patogeni e due diverse sierovarianti di *Salmonella enterica* (Thompson e Typhimurium) (Muhammad-Tahir and Alocilja, 2003). Nei test sugli alimenti il LOD è di  $8.1 \times 10^1$  CFU/mL. Un sensore ELIME è stato, invece, sviluppato da Gehring et al. per la determinazione rapida di *E. coli* O157:H7. Poiché la tecnica prevede un sandwich, gli anticorpi di cattura sono legati alle MBs e gli altri sono coniugati con fosfatasi. Le MBs vengono attratte sull'elettrodo tramite un magnete (multiwell plate format). L'aggiunta del

substrato (1-naftil fosfato) porta alla liberazione di elettroni che vengono convertiti in segnale attraverso il trasduttore elettrochimico. Con questa tecnica è stato possibile rilevare cellule vitali di *E. coli* O157:H7 sia in TBS che in succo di mela (pH portato a 7.6), con un tempo totale di analisi di 80 min. Il LOD è di  $5 \times 10^3$  CFU/mL (Gehring and Tu, 2005). Lin, invece, utilizza un sandwich indiretto, con anticorpi marcati. Sugli elettrodi in carbone (SPCEs), le GNPs vengono immobilizzate con glutaraldeide. Le GNPs fanno da supporto agli anticorpi specifici per *E. coli* O157:H7, mentre gli anticorpi coniugati con HRP vengono aggiunti dopo il contatto col campione e incubati a 37 °C per 15 min. Il perossido di idrogeno e l'acido ferrocendicarbossilico vengono utilizzati come substrati. I risultati mostrano che l'utilizzo delle GNPs permette di amplificare sensibilmente la risposta del sensore. L'intervallo di misura va da  $10^2$  a  $10^7$  CFU/mL. Il limite di quantificazione nel latte è di  $6 \times 10^2$  CFU/mL in PBS e  $5.3 \times 10^3$  CFU/mL. Questo tipo di sensore ha buone potenzialità per un utilizzo in campo e potrebbe far parte di un sistema integrato volto alla determinazione rapida di *E.coli* O157:H7 nel latte (Lin et al., 2008). Altri sensori costituiti da SP-IDME (screen-printed interdigitated microelectrode) riportano un LOD di  $10^2$  CFU/mL (Xu, 2016) e  $10^4$  CFU/mL (Radke and Alocilja, 2005) in brodo di coltura, e  $2.05 \times 10^3$  nella carne di manzo. I sensori elettrochimici per *E. coli* fin qui descritti riguardano essenzialmente *E. coli* O157:H7. In letteratura, infatti, sono pochi gli studi su VTEC diversi da *E. coli* O157:H7. Alcuni sensori di tipo *aptamer based* e *gene-based* sono stati sviluppati per altri sierotipi (Wang et al., 2019; Zhao et al., 2018; Zhang et al., 2013 e Luo et al., 2012), ma richiedono l'utilizzo di molecole bioingegnerizzate. Il primo immunosensore per *E.coli* O 26 è quello sviluppato dal nostro gruppo di ricerca. L'utilizzo di anticorpi specifici per *E. coli* O26, come quelli utilizzati per il nostro biosensore, rappresentano la scelta migliore per indagare la presenza di questo sierotipo in matrici alimentari.

TIPO DI SENSORE	TECNICA ELETTROCHIMICA	MICRO E NANO-MATERIALI	PREPARAZIONE DEL SENSORE E ANALISI	LOD BRODO DI COLTURA (CFU/mL)	MATRICI ALIMENTARI E PERFORMANCE	TEST DI CROSS-REATTIVITA'	FONTE
in-house	amperometria	/	40 min	100	/	/	Abdel-Hamid et al. 1998
GCE	voltammetria	/	25 min	5000	/	/	Brewester e Mazenko 1998
in-house	conduttimetria	/	10 min (+preparazione)	79	vegetali 81 CFU/mL	<i>E. coli</i> non patogeni	Muhammad-Tahir e Alociljia 2004
GR	voltammetria	MBS	80 min	3300	succo di mela 1500 CFU/mL	/	Gehring et al 2005
SPCEs	amperometria	GNPs	4 h	600	latte 5003 CFU/mL	<i>E. coli</i> K12, <i>Listeria monocytogens</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Lin 2008

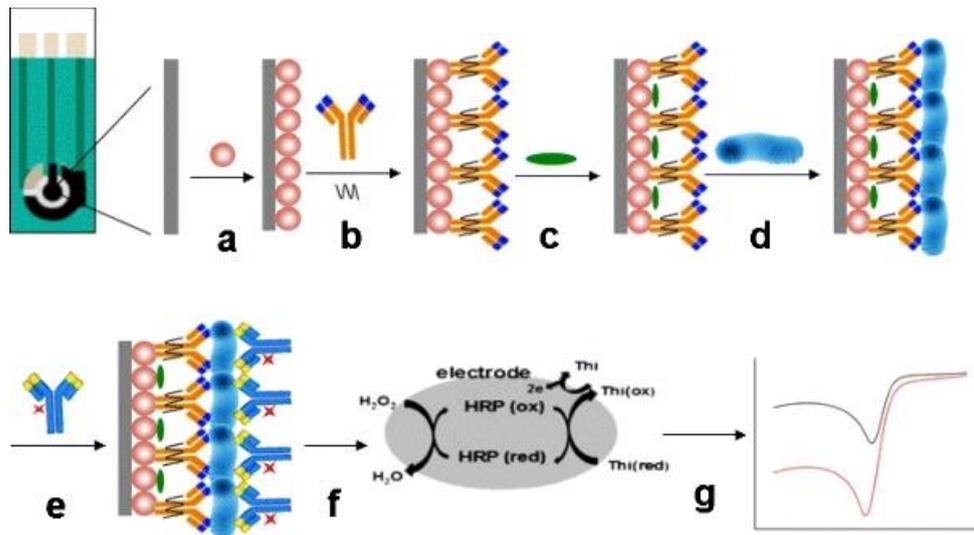
Tabella 2: Sensori elettrochimici per *E. coli*

[in-house, developed in laboratory; GCE, glassy carbon electrodes; GR, graphene]

### 3.2.5. Sensori elettrochimici per *Salmonella*

Fra i *label-based*, troviamo i sensori sviluppati da due diversi gruppi di ricerca (Xiang et al., 2015; Fei et al., 2015), che prevedono l'utilizzo di GNP. Xiang utilizza un idrogel a base di chitosano in cui vengono disperse le GNPs per modificare la superficie dell'elettrodo e creare un film composito ove immobilizzare gli anticorpi anti-*Salmonella*. Dopo un periodo di incubazione di un'ora in una soluzione contenente i batteri e un'altra ora a contatto con gli anticorpi coniugati con HRP, si viene a formare un sandwich GNP-Ab-*Salmonella*-AbHRP. Per le analisi è stata utilizzata una voltammetria differenziale ad impulsi ed i risultati delle misurazioni seguono un andamento lineare da  $10$  a  $10^5$  CFU/mL, con un LOD pari a 5 CFU/mL in PBS-Tween. Il tempo di analisi è pari a 4 ore escluso l'arricchimento (24 h). Nonostante non vengano dettagliati i tempi di preparazione dell'elettrodo, si può affermare che il tempo totale delle analisi sia molto buono. Per

quanto riguarda le applicazioni in campo, sono state fatte alcune prove su matrici alimentari (latte), con un range fra  $1.4$  e  $4.8 \times 10^3$  CFU/mL (Xiang et al., 2015). Allo stesso modo, Fei utilizza le GNPs per sviluppare un immunosensore per *Salmonella pullorum* e *gallinarum*. Le GNPs vengono depositate su di un elettrodo SPE in carbone al fine di catturare gli anticorpi e garantire la trasmissione del segnale. Alle GNPs, per generare un miglior micro-ambiente per gli anticorpi, è stato aggiunto un liquido ionico a base di BMIMPF<sub>6</sub>. Gli anticorpi specifici anti-*S. pullorum* e *gallinarum* (isolati da siero di coniglio) sono stati lasciati a contatto con le GNPs sulla superficie del sensore, conservato poi per 12 ore a 4 °C. Per bloccare i siti non specifici è stata utilizzata BSA (0.25%), con un tempo di incubazione di 1 ora. Dopo 40 minuti di contatto fra gli anticorpi di cattura e *Salmonella* (T=30 °C), sono stati aggiunti gli anticorpi marcati con HRP (40 min, 30 °C). Come substrato per l'enzima sono stati utilizzati perossido di idrogeno e tionina (nella sua forma ridotta) ed il prodotto della reazione derivante (tionina ossidata) ha generato un segnale, letto tramite voltammetria ciclica, misurando il picco di riduzione. Il range entro cui opera questo sensore è di  $10^4$ - $10^9$  CFU/mL, con un LOD pari a  $3 \times 10^3$  CFU/mL (Figura 4, Fei et al., 2015). L'applicabilità del sensore è stata verificata su campioni di uova e carne di pollo, contaminati in laboratorio, insieme a delle prove colturali classiche. La minor sensibilità può essere imputabile all'utilizzo di matrici complesse.



○: AuNPs; : Anti-*S. pullorum* and *S. gallinarum* (Isolated from rabbit); : BMIMPF<sub>6</sub>;  
: *S. pullorum* and *S. gallinarum*; : 0.2% BSA; : HRP-Anti-*S. pullorum* and *S. gallinarum* (Isolated from rabbit)

Figura 4: Parti che costituiscono un immunosensore (Fei et al., 2015).

Un altro gruppo di ricerca ha sviluppato un sensore per *Salmonella enterica* subs. enterica sierovar. Typhimurium, utilizzando le MBs come supporto per un immunocomplesso formato da *Salmonella* e GNPs coniugate con anticorpi anti-*Salmonella*. Il tempo di analisi è di 1 ora e 30 minuti. Il range di applicazione è  $10^3$ - $10^6$  CFU/mL con un LOD pari a 143 CFU/mL (Afonso et al., 2013). Il sensore è stato testato anche su due campioni di latte contaminato, con buone performance. Il gruppo di ricerca di Brandão ha studiato, invece, la differenza fra MMBs (2.8 m) e NMBs (300 nm) in un immunosensore per *Salmonella*, serovar Typhimurium, realizzato con anticorpi di cattura monoclonali e anticorpi anti-*Salmonella* policlonali marcati con HRP. Il LOD è di 538 CFU/mL con le MMBs e 291 CFU/mL con le NMBs, per le prove fatte in latte. Nonostante le NMBs diano risultati apparentemente migliori, sono stati segnalati dei problemi di adsorbimento non specifico e tempi di cattura maggiori (Brandão et al., 2015). Sono stati analizzati,

successivamente, anche campioni in latte previo arricchimento (0, 4, 6, 8 e 10 ore) ed il sensore ha dimostrato la capacità di rintracciare 1 cellula batterica in 25 mL, dopo 8 ore di pre-arricchimento (Brandão et al., 2015). Questo sensore sarebbe quindi in grado di identificare i campioni non conformi in base ai criteri posti dalla legislazione (Reg. 2073/2005 della Commissione Europea). Il gruppo di ricerca di Fabiani, invece, dopo aver sviluppato un sensore ELIME per la ricerca di *Salmonella enterica* in acque di irrigazione (Volpe et al., 2016), ha sviluppato un sensore per testare la contaminazione dai sierotipi *S. Napolis* e *S. Thompson* su vegetali a foglia verde (sia prodotto fresco che ready-to-eat) (Fabiani et al., 2017). I campioni sono stati contaminati con 1-10 CFU di *Salmonella*/25 gr e testati in parallelo con test ELIME e RTi-PCR (con un pre-arricchimento di 20 ore e 8 ore a 37° C, rispettivamente). I risultati mostrano che entrambi i metodi sono in grado di rilevare la presenza di 1-10 CFU di *Salmonella* in 25 gr di alimento (i campioni sono stati testati anche con metodo ISO 6579:2002 per la conferma). Un'informazione che spesso manca, ma che in questo lavoro viene esplicitata, riguarda il costo delle analisi: il costo totale di entrambe le analisi è di circa 6 euro per 3 ripetizioni (escludendo i macchinari). Nonostante il tempo di arricchimento richiesto dalla RTi-PCR sia minore, il biosensore permette di avere a disposizione una strumentazione portatile e a basso costo, con tecnologia miniaturizzata che permette di eseguire un elevato numero di analisi, senza la necessità di laboratori dedicati e la presenza di personale esperto. Sensori di questo tipo rappresentano un valido approccio alla sicurezza alimentare, nell'ottica di un'ottimizzazione dei piani HACCP per i prodotti freschi. I tempi di analisi delle prove standard richiedono, infatti, almeno 5 giorni (ISO 6579:2002) e non garantiscono una risposta adeguata a questa categoria di prodotti.

Un sensore *label-free* è stato infine sviluppato da Farka et al. per la determinazione rapida di *Salmonella* Typhimurium, basato sulla spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) (Farka et al., 2016). Gli anticorpi specifici sono immobilizzati sulla superficie di un SPE in oro tramite un monostrato in cisteamina, attivato con glutaraldeide. Questo sensore è in grado di rilevare  $1 \times 10^3$  CFU/mL. Lo svantaggio è che il metodo richiede una modifica dell'elettrodo, con una conseguente perdita di sensibilità ed un maggior tempo per lo svolgimento delle analisi.

TIPO DI SENSORE	TECNICA ELETTROCHIMICA	MICRO NANO-MATERIALI	PREPARAZIONE DEL SENSORE E ANALISI	LOD BRODDO DI CULTURA (CFU/mL)	MATRICI ALIMENTARI E PERFORMANCE	TEST DI CROSS-REATTIVITA'	FONTE
GCE	voltammetria differenziale impulsiva	GNPs	4 h	5	latte, 1.4 e $4.8 \times 10^3$ CFU/mL	lievito, <i>E. coli</i>	Xiang 2015
SPE	voltammetria ciclica	GNPs	14 h 20 min	3000	uova e carne di pollo (accuratezza 80-100%)	<i>E. sakazakii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i>	Fei 2015
SPE	voltammetria differenziale impulsiva	MBs/GNPs	1 h 30 min	143	latte (recupero 83-94%)	<i>E. coli</i>	Afonso 2013
GCE	amperometria	NMBs	1 h	462	latte LOD 261 CFU/mL LOD 1 CFU/25 mL (8 ore arricchimento)	<i>E. coli</i>	Brandao 2015
GCE	amperometria	MMBs	1 h	853	latte LOD 538 CFU/mL	<i>E. coli</i>	Brandao 2016
8-SPE strip	amperometria	MBs	1 h	1000	vegetali a foglia verde LOD 1 CFU/25 gr (20 h arricchimento)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. ureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>C. braaki</i> , <i>M. morgani</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>S. liquefaciens</i>	Fabiani 2017
gold 2-channel SPE	EIS	/	15 h (in matrice)	1000	latte LOD $10^3$ CFU/mL	<i>E. coli</i>	Farka 2016

Tabella 1: Sensori elettrochimici per *Salmonella*

[GCE, glassy carbon disk electrodes; SPE, SPEs screen-printed electrodes; EIS, electrochemical impedance spectroscopy; GNPs, gold nano-particles; MBs, magnetic beads; LOD limit of detection]

### 3.2.6. Sensori elettrochimici per la ricerca di antibiotici

I biosensori possono trovare applicazione anche nel controllo dei residui di farmaci ad uso veterinario, su prodotti quali fluidi corporei e alimenti di origine animale, oltre che per il monitoraggio ambientale. La diffusione degli antibiotici ed il loro utilizzo sconsiderato rappresentano, infatti, un forte rischio per la Sanità Pubblica, poiché vanno ad incrementare la diffusione dell'antibioticoresistenza. In letteratura, i primi lavori sui sensori elettrochimici per la ricerca di antibiotici che prevedono l'utilizzo di anticorpi risalgono al 2007 (Ionescu et al., 2007). Negli anni successivi vi è un rapido incremento nelle pubblicazioni e nell'interesse di costruire sensori di rapida e facile applicazione. Conzuelo ed il suo gruppo di ricerca hanno studiato e sviluppato un sensore amperometrico per la ricerca di tetracicline nel latte, con l'utilizzo di anticorpi e MBs funzionalizzate con proteina G. Il saggio è di tipo competitivo, dove l'antibiotico (TC) compete con un tracciante enzimatico (TC-HRP) legato ad una molecola di antibiotico. L'aggiunta del substrato ( $H_2O_2$ ) in presenza del mediatore idrochinone (HQ), permette di registrare il segnale di risposta amperometrica (figura 5).

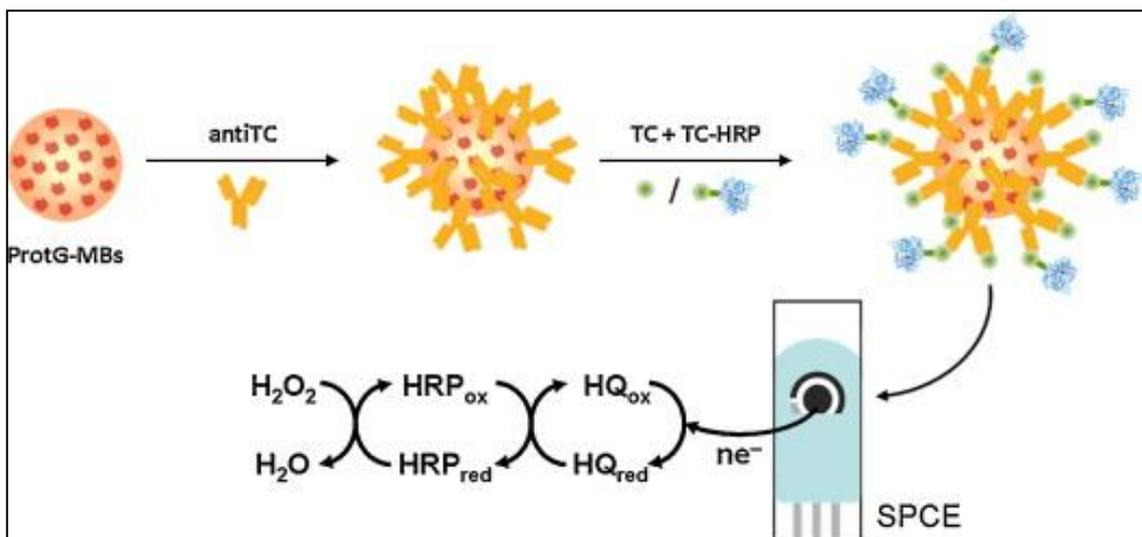


Figura 5: Immunosensore amperometrico con MBs per la ricerca diretta di residui di tetracicline nel latte (Conzuelo et al, 2012).

Il LOD di questo sensore è di 1.9 ng/mL, l'intervallo di misura va da 6.3 a 380.7 ng/mL in PBST-latte. È stata testata la possibile interferenza legata alla presenza di ioni Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e la selettività del sensore rispetto a 6 antibiotici diversi da tetraciclina. In entrambi i casi non vi è una variazione significativa del segnale (LOD 8.9 ng/mL PBST-Ca-latte, CR<1%). Il sensore ha mostrato anche una buona riproducibilità e conservabilità nel tempo. I risultati di questo studio permettono di considerare questo sensore un ottimo strumento in grado di determinare la presenza di tetracicline nel latte, per valori al di sotto dei limiti di legge (Conzuelo et al., 2012a). Lo stesso metodo è stato impiegato per sviluppare un immunosensore per i sulfamidici. Gli antibiotici di cattura vengono, in questo caso, immobilizzati su di un sensore SPE modificato con acido 4-amminobenzoico (4-ABA). Il meccanismo di competizione è lo stesso del precedente ed in questo caso il range di applicazione va da 0.6 a 64.2 ng/mL, con un LOD pari a 0.15 ng/mL in PBST. La selettività è stata testata su quattro antibiotici non target, mostrando una buona risposta. La percentuale di recupero in latte contaminato è pari al 103%. Il LOD nel latte intero, non diluito, è pari a 0.20 ng/mL, molto al di sotto dei limiti di legge (Conzuelo et al., 2012b). Tra i sensori *label-free* troviamo quello sviluppato da El-Moghazy et al. Si tratta di un immunosensore realizzato su SPCE, a cui viene aggiunto uno strato di poly(vinyl alcohol-co-ethylene) (PVA-co-PE) a cui sono legati gli anticorpi anti-cloramfenicolo (El-Moghazy et al., 2018). Il PVA-co-PE è un polimero idrofilo, non tossico, utilizzato per formare membrane nano-fibrose ad alta biocompatibilità, estremamente assorbenti. In questo studio, viene utilizzato per migliorare la risposta del sensore, consentendo di raggiungere un LOD pari a 0.0047 ng/mL, range 0.01–10 ng/mL. Anche la selettività e la specificità sono buone e, in particolare, sono state testate le performance del sensore in presenza di amoxicillina, gentamicina, sulfametazina e ciprofloxacina. Le prove su matrici reali sono state svolte in latte. Infine, un

immunosensore per la ricerca simultanea di più antibiotici (cefalosporine, sulfamidici e tetracicline) è stato sviluppato da Conzuelo nel 2014. Questo sensore è stato utilizzato sia per l'analisi di latte fresco (previa inattivazione delle lattoperossidasi endogene) che UHT e si è mostrato in grado di rilevare la presenza di residui di antibiotici nei campioni contaminati, per valori al di sotto dei rispettivi LMR, in soli 5 minuti (Conzuelo et al., 2014). Tuttavia, è necessario specificare che questo tipo di sensore è in grado di determinare solamente la presenza/assenza di residui antibiotici nel campione. Non è, invece, in grado di identificare la molecola rintracciata.

MOLECOLA DI INTERESSE	TIPO DI SENSORE	TECNICA ELETTROCHIMICA	MICRO E NANO-MATERIALI	PREPARAZIONE DEL SENSORE E ANALISI	LOD BRODO DI CULTURA (CFU/mL)	MATRICI ALIMENTARI E PERFORMANCE	TEST DI CROSS-REATTIVITA'	FONTE BIBLIOGRAFICA
Tetraciclina cloridrato Ossitetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina	SPCE	amperometria	MBs	1h	LOD 8.9 ng/mL	latte, LOD 1.9 ng/mL (recupero 99%)	Ampicillina, Amoxicillina, Pennicillina G, Entrofloxacin, Sulfapiridina, Cefapirina	Conzuelo 2012a
Sulfamerazina Sulfametazina Sulfadiazina Sulfaclopiridazina Sulfacetamide Sulfatiazolo	SPCE	amperometria	4-ABA	30 min	LOD 0.15 ng/mL	latte intero, LOD 0.20 ng/mL	Pennicillina G, Entrofloxacin, Tetraciclina cloridrato, Cefapirina	Conzuelo 2012b
Cloramfenicolo	SPCE	amperometria	PVA-co-PE	6 h e 30 min	LOD 0.0047 ng/mL	latte, range 0.05-1 ng/mL (recupero >92%)	Amoxicillina, Gentamicina, Sulfametazina, Ciprofloxacina	El-Moghazy 2018
Cefalosporine Sulfamidici Tetracicline	SPCE	amperometria	modified MBs	5 minuti	/	latte fresco e UHT, LOD < LMR	/	Conzuelo 2014

Tabella 3: Sensori elettrochimici per la ricerca di antibiotici

[4-ABA, 4-aminobenzoic acid; PVA-co-PE, poly (vinyl alcohol-co-ethylene)]

Lo sviluppo di metodi di analisi, come quelli presentati in questo lavoro, rappresenta un importante passo avanti per la ricerca in questo settore. I biosensori elettrochimici si configurano, infatti, come strumenti di facile applicazione in grado di identificare e quantificare la presenza di patogeni e residui di farmaci veterinari in varie matrici alimentari. L'utilizzo di micro e nano-materiali, inoltre, consente una semplificazione delle procedure e migliori performance. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari al fine di rendere questi strumenti attrattivi per l'industria alimentare.

### 3.5. Bibliografia

- Abdel-Hamid, I., Ivnitski, D., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1999). Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, *14*(3), 309–316. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00004-4)
- Afonso, A. S., Pérez-López, B., Faria, R. C., Mattoso, L. H. C., Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A. X., & Merkoçi, A. (2013). Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, *40*(1), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.054>
- Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, *08*(01). <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>
- Brandão, D., Liébana, S., Campoy, S., Alegret, S., & Pividori, M. I. (2015). Immunomagnetic separation of *Salmonella* with tailored magnetic micro and nanocarriers. A comparative study. *Talanta*, *143*, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.035>

- Brewster, J. D., & Mazenko, R. S. (1998). Filtration capture and immunoelectrochemical detection for rapid assay of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Immunological Methods*, 211(1–2), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00161-0)
- Bunney, J., Williamson, S., Atkin, D., Jeanneret, M., Cozzolino, D., Chapman, J., & Chandra, S. (2017). The use of electrochemical biosensors in food analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 5(3), 183–195. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.02>
- Cantoni, C. (2008). Sistematica dei batteri produttori di istamina nelle carni di pesce. *Il Pesce*, 6, 115–119. Available from <http://www.pubblicitaitalia.com/ilpesce/2008/6/8619.html>
- Cinti, S., Volpe, G., Piermarini, S., Delibato, E., & Palleschi, G. (2017). Electrochemical Biosensors for Rapid Detection of Foodborne Salmonella: A Critical Overview. *Sensors*, 17(8), 1910. <https://doi.org/10.3390/s17081910>
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L 338, 22.12.2005
- Commission Regulation (EU) No 1019/2013 of 23 October 2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. *Official Journal of the European Union*, L 282/46, 24.10.2013
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Pinacho, D. G., Reviejo, A. J., Marco, M. P., & Pingarrón, J. M. (2012). Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 36(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044>
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2012). Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, 737, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>
- Conzuelo, F., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Campuzano, S., Gamella, M., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2014). Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors. *Analytica Chimica Acta*, 820, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.005>

- Cordonnier, C., Etienne-Mesmin, L., Thévenot, J., Rougeron, A., Rénier, S., Chassaing, B., & Livrelli, V. (2017). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: Role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep44655>
- De Las Rivas, B., Marcobal, Á., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2509–2514. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.10.2509>
- Delannoy, S., Beutin, L., & Fach, P. (2013). Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC strains based on detection of various combinations of Type III effector genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3257–3262. <https://doi.org/10.1128/JCM.01471-13>
- ECDC. (2017). Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection. Surveillance report.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 11(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3138>
- EFSA. (2017). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. *EFSA Supporting Publications*, 14(9). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.en-1301>
- El-Moghazy, A. Y., Zhao, C., Istamboulie, G., Amaly, N., Si, Y., Noguer, T., & Sun, G. (2018). Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor based on PVA-co-PE nanofibrous membrane for the detection of chloramphenicol residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 117, 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>
- Emborg, J., Dalgaard, P., & Ahrens, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10), 2473–2479. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64357-0>
- Fabiani, L., Pucci, E., Delibato, E., Volpe, G., Piermarini, S., De Medici, D., & Palleschi, G. (2017). ELIME assay vs Real-Time PCR and conventional culture method for an

- effective detection of Salmonella in fresh leafy green vegetables. *Talanta*, 166, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.071>
- Farka, Z., Juřík, T., Pastucha, M., Kovář, D., Lacina, K., & Skládal, P. (2016). Rapid Immunosensing of *Salmonella* Typhimurium Using Electrochemical Impedance Spectroscopy: the Effect of Sample Treatment. *Electroanalysis*, 28(8), 1803–1809. <https://doi.org/10.1002/elan.201600093>
- FDA. (2011). Guidance for Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Controls. Available from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-fish-and-fishery-products-hazards-and-controls>
- Fei, J., Dou, W., & Zhao, G. (2015). A sandwich electrochemical immunosensor for *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* based on a screen-printed carbon electrode modified with an ionic liquid and electrodeposited gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 182(13–14), 2267–2275. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1573-x>
- Gaudin, V. (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
- Gehring, A. G., & Tu, S.-I. (2005). Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of live *Escherichia coli* 0157:H7 in apple juice. *Journal of Food Protection*, 68(1), 146–149. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.1.146>
- Germinario, C., Caprioli, A., Giordano, M., Chironna, M., Gallone, M. S., Tafuri, S., & Scavia, G. S. (2016). Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26: H11 in southern Italy, summer 2013. *Eurosurveillance*, 21(38). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30343>
- Gonzaga, V. E., Lescano, A. G., Huamán, A. A., Salmón-Mulanovich, G., & Blazes, D. L. (2009). Histamine levels in fish from markets in Lima, Perú. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1112–1115. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1112>
- Hungerford, J. M. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, 56(2), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.006>

- International Organization for Standardization. (2012). *ISO/TS 13136:2012* - Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and th. Available from <https://www.iso.org/standard/53328.html>
- Ionescu, R. E., Jaffrezic-Renault, N., Bouffier, L., Gondran, C., Cosnier, S., Pinacho, D. G., & Martelet, C. (2007). Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. *Biosensors and Bioelectronics*, *23*(4), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.07.014>
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri. (n.d.). ESCHERICHIA COLI STEC. Available from <http://www.izslt.it/escherichia-coli-stec/>. Accessed 9 October 2019
- Jones, G., Lefèvre, S., Donguy, M.-P., Nisavanh, A., Terpant, G., Fougère, E., & Mariani-Kurkdjian, P. (2019). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Eurosurveillance*, *24*(22). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305>
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1467–1473. <https://doi.org/10.1128/AEM.01907-06>
- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., & Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*. Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>
- Kristin, B., Bolton, G. E., McClellan-Green, P. D., Jaykus, L. A., & Green, D. P. (2009). Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: A comparative study. *Journal of Food Protection*, *72*(9), 1987–1991. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.9.1987>
- Landete, J. M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2008). Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food*

*Science and Nutrition*, 48(8), 697–714.  
<https://doi.org/10.1080/10408390701639041>

- Lange J. & Wittmann C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 372(2) , 276-283
- Lin, Y. H., Chen, S. H., Chuang, Y. C., Lu, Y. C., Shen, T. Y., Chang, C. A., & Lin, C. S. (2008). Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(12), 1832–1837. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.02.030>
- Loffredi, G. (2018). Istamina e sindrome sgombroide. <https://sicurezzaalimentare.aslfrsinoone.it/istamina-e-sindrome-sgombroide>
- Luo, C., Lei, Y., Yan, L., Yu, T., Li, Q., Zhang, D., & Ju, H. (2012). A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of *Escherichia Coli* O111. *Electroanalysis*, 24(5), 1186–1191. <https://doi.org/10.1002/elan.201100700>
- Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J. J., Dalgaard, P., & Dousset, X. (2013). Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2612–2619. <https://doi.org/10.1128/AEM.03677-12>
- Muhammad-Tahir, Z., & Alocilja, E. C. (2003). A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6), 813–819. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00020-4)
- Parker, C. O., & Tothill, I. E. (2009). Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8), 2452–2457. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.021>
- Podeur, G., Dalgaard, P., Leroi, F., Prévost, H., Emborg, J., Martinussen, J., & Pilet, M. F. (2015). Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.005>

- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(11), 1547–1560. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.600728>
- Radke, S. M., & Alocilja, E. C. (2005). A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 20, pp. 1662–1667). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.07.021>
- RASFF Portal. (n.d.). Accessed 3 December 2020, from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>
- Rawles, D. D., Flick, G. J., & Martin, R. E. (1996). Biogenic Amines in Fish and Shellfish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39(C), 329–365. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60076-5](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60076-5)
- Severi, E., Vial, F., Peron, E., Mardh, O., Niskanen, T., & Takkinen, J. (2016). Community-wide outbreaks of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in Italy and Romania: A new challenge for the European union. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30420>
- Sheikh, N. J., & Sheikh, O. (2017). Forecasting of biosensor technologies for emerging point of care and medical IoT applications using bibliometrics and patent analysis. In *PICMET 2016 - Portland International Conference on Management of Engineering and Technology*. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. <https://doi.org/10.1109/PICMET.2016.7806585>
- Singh, P. K., Jairath, G., Ahlawat, S. S., Pathera, A., & Singh, P. (2016). Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. *Journal of Food Science and Technology*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2041-7>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Tothill, I. E., & Turner, A. P. F. (2003). Biosensors. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second, p. 6000). Academic Press.

- Trevisani, M., Cecchini, M., Fedrizzi, G., Corradini, A., Mancusi, R., & Tothill, I. E. (2019). Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01844>
- Trevisani, M., Mancusi, R., Cecchini, M., Costanza, C., & Prearo, M. (2017). Detection and characterization of histamine-producing strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from mullets. *Veterinary Sciences*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci4020031>
- Vidal, J. C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J. R., Cubel, C., & Castillo, J. R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.05.008>
- Volpe, G., Delibato, E., Fabiani, L., Pucci, E., Piermarini, S., D'Angelo, A., & Palleschi, G. (2016). 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*, *149*, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.015>
- Wang, H., Zhao, Y., Bie, S., Suo, T., Jia, G., Liu, B., & Li, Z. (2019). Development of an Electrochemical Biosensor for Rapid and Effective Detection of Pathogenic *Escherichia coli* in Licorice Extract. *Applied Sciences*, *9*(2), 295. <https://doi.org/10.3390/app9020295>
- Xiang, C., Li, R., Adhikari, B., She, Z., Li, Y., & Kraatz, H. B. (2015). Sensitive electrochemical detection of *Salmonella* with chitosan-gold nanoparticles composite film. *Talanta*, *140*, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.033>
- Xu, M., Wang, R., & Li, Y. (2016). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. *Talanta*, *148*, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.082>
- Xu, S., Zhang, Y., Dong, K., Wen, J., Zheng, C., & Zhao, S. (2017). Electrochemical DNA biosensor based on graphene oxide-chitosan hybrid nanocomposites for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Electrochemical Science*, *12*(4), 3443–3458. <https://doi.org/10.20964/2017.04.16>
- Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2016). Magnetic particles coupled

to disposable screen printed transducers for electrochemical biosensing. *Sensors (Switzerland)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s16101585>

Zhang, W., Luo, C., Zhong, L., Nie, S., Cheng, W., Zhao, D., & Ding, S. (2013). Sensitive detection of enteropathogenic *E. coli* using a bfpA gene-based electrochemical sensor. *Microchimica Acta*, *180*(13–14), 1233–1240. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1061-0>

Zhao, Y.-W., Wang, H.-X., Jia, G.-C., & Li, Z. (2018). Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*. <https://doi.org/10.3390/s18082518>

#### 4. SCOPO DELLA TESI

La possibilità di monitorare la presenza di residui di farmaci veterinari e contaminanti biologici negli alimenti può trarre beneficio dall'uso di metodi di screening affidabili e di facile utilizzo. A tal fine, sono in fase di sviluppo molteplici applicazioni di biosensori in grado di coniugare sistemi di rilevamento biologico-specifici con trasduttori elettronici o ottici capaci di rilevare, amplificare, elaborare e misurare il segnale derivante dall'interazione tra un substrato costituito da enzimi, anticorpi o apteni e contaminanti ambientali o alimentari. Lo sviluppo di biosensori permette di rilevare la presenza di quantità residuali di un determinato analita in varie matrici sia animali che alimentari.

Per questo Progetto di Ricerca sono state messe a punto tecniche di analisi elettrochimiche per rilevare quantitativamente la presenza di istamina e di batteri istaminogeni in campioni di pesce e determinare la presenza di ceppi di *Escherichia coli* nel latte crudo. Sono stati condotti anche degli studi riguardanti la presenza di residui di farmaci veterinari negli alimenti.

Lo scopo di queste ricerche era quello di:

- Sviluppare diversi tipi di sensori elettrochimici ed immunoenzimatici (II) e valutare le loro potenzialità come metodi di analisi rapida (I-II).
- Validare i risultati mediante comparazione con metodi analitici di riferimento (I-II).
- Avviare uno studio per lo sviluppo di biosensori per i residui di farmaci veterinari negli alimenti sulla base di dati derivanti dal campionamento ufficiale e da informazioni raccolte al macello



## PARTE SPERIMENTALE



## **5. MATERIALI, METODI E RISULTATI**

### **5.1. Strumenti**

Le prove elettrochimiche sono state effettuate con un bi-potenziostato/galvanostato portatile,  $\mu$ Stat 400 della Dropsens (Oviedo, Spain) (I) e con il potenziostato Metrohm Autolab (II), collegato tramite un cavo di connessione Dropsens CAST al sensore SPCE. Il software di gestione DropView 8400 è stato utilizzato per controllare lo strumento e svolgere le analisi, tramite un personal computer in ambiente Window 7 (I, II). In alcuni casi è stato utilizzato anche il software NOVA 2.0 (II). La cella conica CFLWCL-CONIC (Dropsens) ci ha permesso di mantenere il campione sull'elettrodo (I), mentre nei test con le immunobeads è stato utilizzato un magnete posto direttamente sotto l'SPCE (II).

### **5.2. Reagenti**

Per le analisi (I) sono state utilizzate, la diamino ossidasi (DAO) da rene suino, la perossidasi di rafano (HRP), la sieroalbumina bovina (BSA), la glutaraldeide (GA), il mediatore redox ferrocianuro di potassio triidrato  $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$ , l'istamina dicloridrato, il sodio fosfato dibasico anidro ( $Na_3HPO_4$ ), il sodio fosfato monobasico monoidrato ( $Na_3HPO_4 \cdot H_2O$ ), il cloruro di potassio (KCl) e l'idrossido di potassio (KOH), l'acido cloridrico (HCl), l'acido tricloroacetico (TCA), il Cloruro di sodio (NaCl), la ftaldeide (OPA) e l'istidina acquistati dalla Sigma Aldrich. Tutte le soluzioni standard sono state preparate in tampone fosfato (PBS, 0.1 M  $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ , pH 7.4, con 0.1 M KCl) con acqua deionizzata ottenuta per osmosi inversa (RO) tramite il sistema di purificazione New Human Power II (Human Corporation, Korea). I terreni di coltura come Tryptone Soy Broth (TSB), Tryptone Soy Agar (TSA), Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS), Iron Agar-Lyngby

(IA) ed il peptone provengono dalla Thermo Scientific Oxoid (Basingstoke, United Kingdom). I terreni colturali impiegati nel secondo sensore (II), tra cui Buffered Peptone Water (BPW), PBS, TSA, triptone bile agar con X-glucuroide (TBX) e le IMB (Dynabeads, anti-EPEC/VTEC O26), sono stati acquistati da Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). La BSA, la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ed il Tween®20 provengono dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Gli anticorpi di capra anti-*E.coli* O26, marcati con la perossidasi (DAHrp), provengono dalla Seracare Life Sciences (Milford, USA). I primer per la PCR verso il gene specifico *wzx* O26 sono distribuiti dalla Eurofins Genomics (Milano, Italia). Il ceppo di *E.coli* O26, non verocitotossico, utilizzato per contaminare sperimentalmente i campioni è stato isolato da Trevisani et al. (2014).

### **5.3. Campioni**

Sono stati testati 8 lotti di tonno fresco a filetti (*Thunnus albacares*), comprati in due diversi supermercati (I). Dal momento dell'acquisto, fino all'arrivo in laboratorio, i campioni sono stati mantenuti a bassa temperatura e processati entro 1 ora. Da ogni lotto è stata prelevata una porzione di 25 gr per l'analisi della flora istaminogena di fondo, la restante parte è stata suddivisa in piccole parti di 5 gr. I campioni di 5 gr sono stati quindi coperti con una pellicola in polietilene e conservati in frigorifero a 4°C. Dopo 1 settimana il livello di istamina in essi contenuto è stato misurato con sensore amperometrico.

I campioni di latte (II) sono stati, invece, prelevati da quattro diversi distributori di latte crudo presenti nella Provincia di Bologna, mantenuti refrigerati fino all'arrivo in laboratorio (< 1 ora).

#### **5.4 Procedura operativa degli esperimenti di voltammetria ciclica e di cronoamperometria**

Una parte degli esperimenti di voltammetria ciclica e di cronoamperometria sono stati eseguiti in cella (I), altri prevedevano il posizionamento di un sensore SPE su di una superficie magnetica (II). Per la determinazione del valore di corrente da utilizzare nelle analisi è stata eseguita la voltammetria ciclica dapprima sulla soluzione tampone (PBS), a cui poi è stato aggiunto il mediatore (med) e infine il campione.

#### **5.5. Sviluppo di un biosensore per la determinazione dell'istamina (I)**

Il nostro interesse era quello di sviluppare un metodo rapido da utilizzare come strumento di screening per rilevare l'istamina e la presenza dei batteri istaminoproduttori in campioni alimentari, già a bassissime concentrazioni. Il sensore è stato sviluppato immobilizzando istidina decarbossilasi e HRP sulla superficie di elettrodi serigrafati mediante una procedura di reticolazione (cross-linking) che impiega glutaraldeide e BSA. Il segnale generato in presenza di istamina sulla superficie dell'elettrodo è stato quindi misurato mediante cronoamperometria grazie alla reazione derivante dal contatto con un mediatore redox solubile. Parallelamente, la flora istaminogena naturale dei campioni è stata messa in coltura ed identificata.

##### **5.5.1. Preparazione dell'elettrodo**

Per realizzare il cross-linking, la DAO e l'HRP sono state immobilizzate sulla superficie dell'elettrodo SPCE (DRP-150, Dropsens) utilizzando BSA e GA. In una prima fase, 10 mg di DAO e 5 mg di HRP sono stati disciolti in 100  $\mu$ L di tampone fosfato (0.1 M) ciascuno. Quindi, 70  $\mu$ L di DAO e 30  $\mu$ L di HRP sono stati uniti in un'unica soluzione, in cui sono stati disciolti 4 mg di BSA. Infine, 15 mL della soluzione DAO-HRP-BSA

sono stati uniti a 5  $\mu\text{L}$  di GA (2.5%). Di questi, 10  $\mu\text{L}$  sono stati depositati immediatamente sull'elettrodo e lasciati asciugare a temperatura ambiente. L'elettrodo così costituito è stato poi lavato per rimuovere l'enzima in eccesso e conservato in tampone fosfato a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

### **5.5.2. Procedura di calibrazione e tecnica di analisi**

I campioni e le soluzioni standard di istamina sono state preparate in tampone fosfato (0.1 M, pH 7.4) contenente ferrocianuro di potassio 50 mM (PBS-Med). Prima dell'aggiunta del campione, 100  $\mu\text{L}$  di PBS-med sono stati depositati sull'elettrodo e la corrente misurata a - 0.025 V (test sul bianco). La quantità di istamina presente nel campione è stata calcolata mediante il metodo della retta di taratura, partendo dal valore della corrente ottenuto dal campione a cui è stato sottratto il valore del bianco. Tutte le prove sono state ripetute tre volte, nelle stesse condizioni. Per la calibrazione sono state preparate delle soluzioni standard di istamina a diverse concentrazioni (da 2 a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). I campioni sono stati quindi diluiti in PBS-Med fino a raggiungere un valore che rientrasse nel range di calibrazione del sensore. Le curve di calibrazione sono state eseguite per ogni nuovo elettrodo, poichè ogni minima variazione nella realizzazione del cross-linking poteva influenzarne la risposta (Barbosa et al., 2014). Un campione contenente 5  $\text{ng}/\text{mL}$  di istamina è stato utilizzato come controllo prima di intraprendere le sessioni di analisi.

Di seguito vengono riportate le varie prove che sono state effettuate.

**A) Determinazione dei batteri istaminogeni in campioni di pesce fresco**

**B) Estrazione dell'istamina e test di recupero**

**C) Challenge test e comparazione con metodica HPLC**

**D) Durata dell'elettrodo**

### **A) Determinazione dei batteri istaminogeni in campioni di pesce fresco**

I campioni sono stati diluiti (1:10) in due aliquote di TSB contenenti l'1% di istidina, il 2% di NaCl e lo 0,0005% di piridossal HCl (brodo HD). Uno è stato incubato a 20 ° C per 3 giorni e utilizzato per il rilevamento dell'istamina. L'altro è stato utilizzato per la valutazione della crescita di batteri produttori di istamina (flora di fondo) e, a tal fine, è stato inoculato 1 mL e 0,1 mL di campione su quattro diversi terreni: (a) TSA / VRBGA; (b) terreno SCW (Seawater Complete Medium), (c) TCBS; (d) IA. Le colonie rosse cresciute sulle piastre di TSA/VRBGA sono state contate e identificate come *Morganella psychrotolerans* o *M. morganii* con il metodo sviluppato da Podeur et al. (2015). In breve, è stato distribuito 1 mL di campione su 5 mL di TSA e, dopo 2 ore a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 12-15 mL di VRBGA. Le piastre TSA/VRBGA sono state poi incubate a 25 °C per 2 giorni. Successivamente, sono state selezionate 5 colonie in modo casuale dalle piastre con la massima diluizione, queste, quindi, sono state utilizzate per l'identificazione e la caratterizzazione delle specie. Le piastre di SCW sono state incubate a 5 °C per 10 giorni e osservate al buio per contare le colonie luminose di *P. phosphoreum*, quindi sono state identificate tramite real time-PCR (utilizzando la procedura di Macé et al., 2013). Le colonie verdi che sono cresciute su TCBS sono state testate per rilevare la presenza di *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* utilizzando la procedura sviluppata da Trevisani et al. (2017). Le colonie nere che sono cresciute sulle piastre di IA (25 °C per 3 giorni) indicative di batteri produttori di solfuro di idrogeno (H<sub>2</sub>S) sono state raccolte e identificate come *Shewanella* spp. mediante colorazione di Gram e per le loro caratteristiche biochimiche (sistemi API 20e e API 20NE, BioMérieux, Francia). Infine, i campioni non inoculati sono stati analizzati per la presenza di batteri istaminoproduttori testando il livello di istamina prodotta nel brodo di arricchimento (20

°C per 2 giorni). I ceppi isolati sono stati valutati anche per la presenza del gene dell'istidina decarbossilasi.

### **B) Estrazione dell'istamina e test di recupero**

Per l'estrazione dell'istamina, le colture arricchite in brodo HD sono state sterilizzate a 121 °C per 15 min, quindi centrifugate (15.000 g per 15 min), diluite in PBS-Med e analizzate con il biosensore. L'efficienza di estrazione dalle brodocolture e dai campioni di tonno è stata valutata con un test di recupero. A questo scopo è stato utilizzato del tonno scongelato, in modo da emulare la matrice naturale del campione (tonno 1:10 in brodo HD), riducendo l'interferenza di HPB vitali (soprattutto *Photobacterium* spp.). Pertanto, un filetto di tonno (circa 100 g) scongelato a 4 °C è stato tritato, aliquote da 2 g sono state addizionate di istamina (0, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 µg/g) e omogeneizzate in brodo HD. Sono state testate cinque repliche per ogni livello di istamina e ogni campione è stato analizzato in tre repliche. L'intervallo 50-1000 µg/mL è stato deciso in base ai valori di istamina sviluppati nel brodo HD da produttori di istamina bassi, medi e forti. La concentrazione di istamina è stata calcolata in base alle curve di calibrazione costruite per ciascun elettrodo.

### **C) Challenge test e comparazione con metodica HPLC**

Uno degli obiettivi della nostra ricerca era quello di confrontare i risultati delle analisi svolte col biosensore con quelli di un metodo di riferimento ufficiale in un intervallo di quantificazione coerente con i limiti imposti dalla legislazione. Il Regolamento (EU) 2073/2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari ha stabilito i livelli di accettabilità per l'istamina nei pesci appartenenti alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*,

*Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombersocidae*, fissando i limiti a 100 mg/kg (m), con una tolleranza fino a 200 mg/kg (M) in non più di due unità campionarie sul totale di nove. Pertanto, è stato effettuato un challenge test utilizzando dei campioni provenienti da tre lotti di tonno (23 giugno, 7 luglio e 15 luglio), costituiti da fette di circa 100 g di tonno. Uno è stato analizzato per rilevare la presenza di HPB di fondo, le altre due fette sono state inoculate con 100 µL di una coltura mista di *M. psychrotolerans* o non inoculate, coperte con una pellicola di polietilene a bassa densità e conservate a 10 °C o 4 °C C per 3 e 5 o 7 giorni, con l'obiettivo di ottenere campioni di pesce con sei diversi livelli di istamina, in un range compreso tra zero e 500 ppm. Il primo campione è stato omogeneizzato (in modo asettico) in un cutter domestico. Le aliquote da 5 g sono state pesate in un recipiente pulito con etanolo, risciacquate con acqua sterile ed essiccate in una cabina a flusso laminare. I sottocampioni sono stati testati per la determinazione quantitativa di *Morganella* spp. e *Photobacterium phosphoreum* (n =2) e per la presenza di istamina sia con il biosensore (n =6) che con metodica HPLC (n =6). I sottocampioni da 5 g destinati all'analisi con biosensore sono stati diluiti (1:10) con tampone fosfato. Il metodo di preparazione per l'analisi HPLC comprendeva l'omogeneizzazione dei sottocampioni da 5 g con 60 mL di acido tricloroacetico 10% p/v, 2 mL di HCl 6N e 4 mL di n-eptano, centrifugazione a 4000 rpm per 15 min e derivatizzazione precolonna del supernatante con O-ftalaldeide (OPA). È stato utilizzato un sistema di rilevamento della fluorescenza: l'eccitazione è stata fissata a 350 nm e l'emissione è stata letta a 450 nm (EN ISO 19343:2017). Il metodo utilizza anche 1,7-diamminoeptano come standard interno (IS). La quantificazione dell'istamina è stata eseguita calcolando ciascun fattore di risposta contro IS e utilizzando una curva di calibrazione. Il valore LOQ era 10 µg/g. La rilevazione di altre ammine biogene non è stata presa in considerazione dal metodo convalidato utilizzato in questo studio.

#### **D) Durata dell'elettrodo**

La stabilità del sensore è stata valutata periodicamente misurando la risposta allo standard di controllo (5 µg/mL) in quattro giorni diversi e per un periodo di 74 giorni.

#### **5.5.3. Risultati**

##### **A) Determinazione dei batteri istaminogeni in campioni di pesce fresco**

I batteri produttori di istamina sono stati rilevati in tutti i campioni di tonno (8 lotti) conservati a <4 °C per 7 giorni (Tabella 4). Il contenuto di istamina era sempre basso o inferiore al limite di rilevamento del metodo, con un massimo di 60 µg/g. *Morganella psychrotolerans* e *Photobacterium phosphoreum* sono gli HPB più presenti, *P. phosphoreum* è stato rilevato solo nei filetti di tonno sottovuoto. Alcune colonie di *P. phosphoreum* che hanno prodotto una bassa quantità di istamina a 20 °C (in 2 giorni), hanno dimostrato di crescere meglio a 4 °C. E' stata verificata la presenza del gene dell'HDC mediante PCR in tutti i ceppi, utilizzando i primer progettati da De Las Rivas et al. (2006). Tuttavia, a causa di una debole amplificazione, per il ceppo *P. damsela* è stato utilizzato un primer progettato specificamente per questa specie da Trevisani et al. (2017). I ceppi di *M. psychrotolerans* sono stati isolati in due campioni da VRBGA e TCBS.

Lot	Histamine detected by biosensor			Species	PCR	
	Culture ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	Tuna 7 days ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>b</sup>	Strain ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>c</sup>		id genes <sup>d</sup>	HDC <sup>e</sup>
Feb 21	5,920	24	8,473 <sup>rt</sup>	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k-	+
Mar 7	5,770	18	6,518 <sup>rt</sup>	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k-	+
Mar 13	7,880	<LOD	8,506 <sup>rt</sup>	<i>P. damsela</i>		±*
Apr 4	11,046	60	8,212 <sup>rt</sup> ; 368 <sup>rt</sup> ; 7,312 <sup>rt</sup>	<i>K. oxytoca</i> <i>H. alvei</i> <i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k-	++ +
May 2	1,169	20	88 <sup>rt</sup> ; 332 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jun 23	2,216	<LOD	412 <sup>rt</sup> ; 250 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jul 7	1,451	na	17 <sup>rt</sup> ; 316 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jul 15	na	na	na	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k-	+

<sup>a</sup> histamine produced by sample homogenates enriched in HD broth at 20° C, 3 days. <sup>b</sup> histamine in tuna samples stored at <4° C for 7 days. <sup>c</sup> histamine produced by isolated colonies enriched in HD broth at 20° C, 2 days (rt) or 4° C, 5 days (ct). <sup>d</sup> PCR identification test *M. psychrotolerans* (Podeur et al., 2015) and *P. phosphoreum* (Macé et al., 2013). *P. damsela*, *K. oxytoca* and *H. alvei* were identified on the basis of biochemical tests (API 20e and API 20ne). <sup>e</sup> PCR test for HDC gene of Gram-bacteria (De Las Rivas et al., 2006) or specific of *P. damsela* subsp. *damsela*\* (Trevisani et al., 2017). na, not assessed; <LOD, below the limit of detection.

Tabella 4: Batteri produttori di istamina isolati da filetti di tonno dopo 7 giorni di conservazione in ghiaccio.

## B) Recupero di istamina da colture in brodo

Un aspetto fondamentale nello sviluppo di elettrodi SPCE per il dosaggio dell'istamina è garantire un'elevata riproducibilità e la possibilità di eseguire misurazioni accurate su molti campioni, senza una significativa perdita di sensibilità. I risultati di precisione e accuratezza del metodo basato sui biosensori sono riportati nella Tabella 5. Il massimo grado di accuratezza è stato ottenuto con concentrazioni di istamina superiori a 5.000  $\mu\text{g/g}$  (500  $\mu\text{g/mL}$ ). Nell'intervallo di concentrazione 497-1991  $\mu\text{g/g}$  (da 50 a 199  $\mu\text{g/mL}$ ) le differenze tra le concentrazioni di istamina inoculate e misurate erano relativamente basse (bias medio da 12,69 a 6,65%), ma significative.

	N	Nominal concentration				
		15	15	15	15	15
Spiked <sup>a</sup>	Mean ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ SD	496.82 $\pm$ 1.69	993.17 $\pm$ 4.78	1990.67 $\pm$ 7.33	4973.68 $\pm$ 16.10	9930.49 $\pm$ 36.31
Detected <sup>b</sup>	Mean ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ SD	433.78 $\pm$ 16.60	913.50 $\pm$ 38.88	1858.28 $\pm$ 67.79	4892.79 $\pm$ 188.69	10085.79 $\pm$ 385.65
Precision	Within-run RSD	9.95%	5.97%	4.85%	7.08%	7.26%
	Between-run RSD	9.93%	4.68%	6.00%	9.98%	9.91%
Accuracy	Mean Bias	-12.69%	-8.02%	-6.65%	-1.62%	1.63%
	RMSE	8.82%	4.40%	5.63%	11.11%	10.20%
	Significance t-test	<0.0001	0.00973	0.0116	0.393	0.402

<sup>a</sup> amount spiked in 2-g tuna samples that were homogenized in HD broth; <sup>b</sup> values calculated according to the dilution factors.

Tabella 5: Precisione e accuratezza del metodo basato sul biosensore per la determinazione quantitativa dell'istamina in colture arricchite in brodo.

Le curve di calibrazione dei due SPCE utilizzati per le prove di recupero mostravano valori di pendenza e intercetta molto vicini ed i coefficienti di determinazione ( $r^2$ ) indicavano che le previsioni di regressione si adattavano perfettamente ai dati. La ripetibilità nella risposta amperometrica è stata verificata ad ogni ciclo utilizzando standard di controllo di 5  $\mu\text{g/mL}$ . Le misurazioni rientravano nel range del 20% del valore reale, con RDS inferiore al 12%. Tutte le misurazioni necessarie per valutare il recupero dalle colture in brodo ( $n = 225$ ) e per le curve di calibrazione ( $n = 8$ ) sono state effettuate con solo due elettrodi enzimatici, senza alcuna perdita di sensibilità. La sensibilità degli elettrodi bienzimatici risultava migliore nell'intervallo 1,31–1,59  $\mu\text{A/mM}$  (11,81–14,31  $\text{nA}/\mu\text{g/mL}$ ) con un intervallo lineare da 2 a 20  $\mu\text{g/mL}$  e un limite di rilevabilità (LOD) di 0,11  $\mu\text{g/mL}$ . Il LOD in realtà è uguale a 1, perché i campioni erano stati diluiti (1:10). Il LOD calcolato secondo i criteri 3 sb/m, in cui il limite di rivelabilità è fissato ad una distanza dal valore medio del bianco pari a 3 sb (dove Sb corrisponde al segnale medio del bianco) per i due elettrodi era 1,31 e 1,59  $\mu\text{g/mL}$ .

### **C) Challenge test e comparazione con metodica HPLC**

Nella preparazione dei campioni per lo studio comparativo sono state preparate delle aliquote conservate a 10 °C o 4 °C per 3, 5 o 7 giorni con l'obiettivo di ottenere campioni di pesce con sei diversi livelli di istamina, in un range compreso tra zero e 500 ppm.

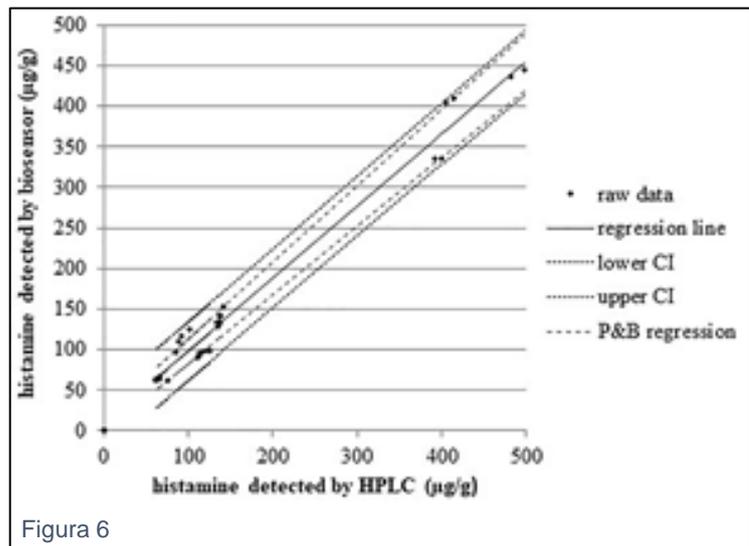
Tabella 6: Livelli di istamina ( $\mu\text{g/g}$ ) e numero di *M. psychrotolerans* e *P. phosphoreum* (media  $\pm$  DS) rilevati in campioni di tonno inoculati e non inoculati a diversi giorni di conservazione.

Inoculum log CFU/g	Storage °C, days	Lot	Histamine ( $\mu\text{g/g}$ )		Count (log CFU/g)	
			HPLC	Biosensor	<i>M. psychrotolerans</i>	<i>P. phosphoreum</i>
Non-inoculated	<4°C, 3 days	Jun 23	<LOD	<LOD	ND	NL-NC
	10°C, 3 days	Jul 15	66 $\pm$ 5	63 $\pm$ 2	3.99 $\pm$ 0.10	4.74 $\pm$ 0.18
	<4°C, 7 days	Jul 15	107 $\pm$ 23	119 $\pm$ 15	2.00 $\pm$ 0.08	ND
	10°C, 5 days	Jul 7	116 $\pm$ 6	95 $\pm$ 4	ND	5.05 $\pm$ 0.12
3.4 $\pm$ 2.6	10°C, 3 days	Jun 23	138 $\pm$ 2	138 $\pm$ 9	5.72 $\pm$ 0.21	5.10 $\pm$ 0.19
3.4 $\pm$ 2.6	10°C, 7 days	Jun 23	432 $\pm$ 46	395 $\pm$ 49	7.72 $\pm$ 0.02	TNTC
4.4 $\pm$ 3.6	10°C, 7 days	Jun 23	517 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	753 $\pm$ 52 <sup>b</sup>	7.69 $\pm$ 0.08	TNTC

Histamine values with different superscript in the same row are significantly different; TNTC, too numerous to count at the dilution  $10^{-3}$ , confluent growth tested positive for gyrB gene of *P. phosphoreum* by PCR. NL-NC, non-luminescent colonies too numerous to count at the dilution  $10^{-3}$ ; ND, not detected at the dilution  $10^{-1}$ .

La tabella 6 riporta i conteggi di *M. psychrotolerans* e *P. phosphoreum* nei campioni inoculati e nei controlli non inoculati, ed i livelli di istamina misurati in questi campioni utilizzando la metodica HPLC ed il biosensore. I due metodi hanno fornito risultati analitici simili nell'intervallo di concentrazione 0–432  $\mu\text{g/g}$ . A concentrazioni più elevate il metodo basato sul biosensore tendeva a sovrastimare la concentrazione di istamina nei campioni.

La Figura 6 mostra un grafico a dispersione dei livelli di istamina misurati con entrambi i metodi, HPLC e biosensore, nell'intervallo di concentrazione 75–498  $\mu\text{g/g}$ . Il coefficiente di correlazione tra i due metodi



è  $r=0,990$  (intervallo di confidenza al 95%,  $CI = 0,980-0,995$ ,  $P < 0,001$ ) e l'equazione di regressione è  $y = 8,85$  (da 1,70 a 19,41) +  $0,89$  (da 0,84 a 0,94)  $x$ .

Per quanto riguarda le prove microbiologiche è emerso che la flora di fondo naturale dei campioni ha contribuito a produrre istamina. Tutti i filetti di tonno pinna gialla freschi utilizzati nelle prove comparative e non inoculati sono stati trovati, infatti, contaminati da *P. phosphoreum* o *M. psychrotolerans*. Le analisi hanno rivelato, in particolare, la presenza di *P. phosphoreum* (ceppi luminescenti) nei lotti 7 luglio e 15 luglio e di *M. psychrotolerans* nel lotto 15 luglio. I campioni non inoculati dei lotti 7 e 15 luglio presentavano concentrazioni di istamina equivalenti al limite di legge di 100 mg/kg dopo la conservazione rispettivamente a 10 °C per 5 giorni e 4 °C per 7 giorni. I campioni inoculati che sono stati conservati a 10 °C hanno raggiunto concentrazioni di istamina superiori al limite legale in 3 giorni e livelli superiori a 400 mg/kg in 1 settimana.

#### **D) Durata dell'elettrodo**

Il biosensore utilizzato per questo test di validazione ha una durata di circa 1 mese, tempo nel quale non ha mostrato una significativa perdita di sensibilità. La sua stabilità è stata valutata periodicamente durante questo periodo misurando la risposta allo standard di controllo (5 µg/mL) in quattro giorni diversi e per un periodo di 74 giorni. Al termine delle analisi il segnale era diminuito solo del 10,8% (da 25,34 a 22,61 µA, RSD = 7,89%), ciò dimostra che il sensore possiede un'eccellente stabilità. Il rinnovo dell'elettrodo enzimatico risulta necessario in caso di distacco della membrana GA-BSA.

#### 5.5.4. Bibliografía

- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>
- De Las Rivas, B., Marcobal, Á., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2509–2514. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.10.2509>
- Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J. J., Dalgaard, P., & Dousset, X. (2013). Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2612–2619. <https://doi.org/10.1128/AEM.03677-12>
- Podeur, G., Dalgaard, P., Leroi, F., Prévost, H., Emborg, J., Martinussen, J., & Pilet, M. F. (2015). Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.005>
- Trevisani, M., Mancusi, R., Delle Donne, G., Bacci, C., Bassi, L., & Bonardi, S. (2014). Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 45–49. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.12.033>
- Trevisani, M., Mancusi, R., Cecchini, M., Costanza, C., & Prearo, M. (2017). Detection and characterization of histamine-producing strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from mullets. *Veterinary Sciences*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci4020031>

## **5.6. Sviluppo di un immunosensore per la ricerca rapida di *E.coli* O26 nel latte crudo (II)**

Un altro ambito su cui si è concentrato il nostro gruppo di ricerca riguarda lo sviluppo di metodi di rilevazione di tipo elettrochimico che prevedano l'utilizzo di anticorpi di cattura (*capture antibody*) e anticorpi marcati (*detection antibody*) per la determinazione rapida di microrganismi patogeni in matrici alimentari. Gli immunosensori, già definiti in precedenza, possono presentare diverse configurazioni a seconda di come interagiscono gli anticorpi e gli antigeni con l'elettrodo. A questo tipo di sensori è, infatti, possibile accoppiare diversi tipi di nano-materiali, che permettono di facilitare lo scambio di elettroni e aumentare la resa del metodo. Nel nostro studio abbiamo deciso di sfruttare le particolarità delle MBs al fine di ottenere dei campioni per le analisi elettrochimiche che potessero poi anche essere testati con metodi colturali. In questo caso, la struttura delle MBs, a cui erano legati gli anticorpi di cattura anti-*E.coli* O26, ci ha permesso di concentrare i campioni e, allo stesso tempo, di testarli con diverse metodiche (elettrochimiche e colturali).

### **5.6.1. Preparazione dei campioni**

Una sospensione di *E. coli* O26 è stata arricchita a 37 °C in BPW per una notte e diluita con lo stesso mezzo per raggiungere una densità di cellule microbiche che rientrasse tra lo 0.20 e 0.40 di trasmittanza, OD 540 nm. Sono state quindi preparate diluizioni seriali in BPW, seminate anche su TSA per la successiva conta batterica. La sospensione di *E. coli* diluita è stata mantenuta a 6 °C per 24 ore per simulare le condizioni di crescita nella cisterna del latte dopo la raccolta; è riportato in letteratura, infatti, che rapidi cambiamenti di temperatura possono influenzare la durata della fase di latenza (Mellefont and Ross, 2003) e modificare la crescita di *E. coli* durante l'arricchimento. Il giorno dell'analisi 1

mL di sospensione contenente circa  $1 \times 10^2$  CFU/mL è stato diluito in 9 mL di latte crudo (1:10) e da quella diluizione sono state prelevate aliquote di 1 e 0.1 mL. Le aliquote sono state messe in una sacca per stomacher contenenti 24 e 24.9 mL di latte crudo, rispettivamente. È stato così raggiunto un livello di contaminazione di circa 10 e 1 CFU in 25 mL di latte. Sono stati preparati anche campioni non inoculati come controllo negativo in latte e campioni in BPW di controllo positivo (circa 10 CFU). I campioni di latte inoculato ed i controlli sono stati arricchiti in BPW (25 mL + 225 mL BPW) per 6 ore a 37 °C. Dopo 6 ore, aliquote da 1 mL sono state prelevate dagli arricchimenti e utilizzate per l'analisi con l'immunosensore e la parte rimanente è stata lasciata a 37 °C per 24 ore e testata mediante RTi-PCR. Per i campioni con una bassa densità di cellule è stata utilizzata una distribuzione binomiale per stimare il numero di risultati positivi tra le repliche. Con una densità cellulare media teorica di 9 o 0,9 CFU in 25 mL su tre replicati, la probabilità che alcune provette fossero positive era pari rispettivamente a 0,99988 e 0,59343. Pertanto, sono stati analizzati con il test ELIME solamente 1 su tre campioni inoculati con l'inoculo più alto (10 CFU in 25 mL di latte) e tutti i campioni con il livello di inoculo inferiore (1 CFU in 25 mL di latte). Le aliquote da 1 mL prelevate a 6 h sono state processate come raccomandato dal protocollo Dynabeads® EPEC/VTEC O26 utilizzando un BeadRetriever™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), con alcune modifiche. Il periodo di incubazione è stato portato a 30 min a temperatura ambiente (invece di 10 min), per catturare un numero maggiore di batteri e, inoltre, è stata introdotta una fase aggiuntiva dopo le fasi di lavaggio. La BSA (1%) è stata utilizzata come blocking buffer per ridurre il legame non specifico degli anticorpi alle MBs, che è stato osservato anche nei controlli negativi (dati non riportati). L'incubazione dei complessi MBs-*E. coli* O26 con il blocking buffer è stata effettuata per 1 h con leggera agitazione, quindi è stata aggiunta la soluzione DAHrp (1 µg/mL) e lasciata per 30 min

consentendo la formazione di complessi antigene-anticorpo. Gli immunocomplessi MBs-*E. coli* O26-DAHrp sono stati lavati tre volte con PBS Tween® e risospesi in 100 µL di PBS-KCl 0.1 M. Dopo questi passaggi, i coniugati (10 µL) sono stati catturati sulla superficie dell'elettrodo di lavoro utilizzando un magnete posto al di sotto dell'SPCE, a cui sono stati aggiunti 40 µL di TMB per far partire la reazione enzimatica.

### **5.6.2. Parametri e tecnica di analisi**

Le misurazioni amperometriche sono state effettuate applicando un potenziale di lavoro (E) di - 0,10 V per 200 secondi (s). Sono stati analizzati tutti i campioni con un livello di inoculo di 1 CFU in 25 mL di latte e solamente uno su tre dei campioni inoculati con 10 CFU. I campioni preparati secondo la procedura precedentemente descritta sono stati, quindi, depositati sulla superficie dell'elettrodo con una pipetta. Al di sotto del SPCE è stato posizionato un magnete al fine di immobilizzare le MBs e facilitare lo scambio di elettroni. Il TMB è stato aggiunto dopo 5 s ed immediatamente è stata fatta partire la lettura. Il procedere dell'analisi è stato seguito su di un pc tramite software di gestione DropView 8400. Le stesse colture utilizzate per il test ELIME sono state analizzate anche a 24 h mediante RTi-PCR, seguendo il metodo standard ISO/TS 13136:2012. A questo scopo il DNA batterico è stato estratto utilizzando Chelex 100® (Walsh et al., 2013) da aliquote da 1 mL delle colture arricchite e la RTi-PCR è stata eseguita in un termociclatore MiniOpticon® (Bio-Rad, USA) utilizzando un pre-reagente (IQ Supermix, Bio-Rad USA) e 40 cicli di amplificazione a 90 °C per 10 s e 63 °C per 45 s, con una fase di denaturazione preliminare a 93 °C per 180 s. Gli standard di calibrazione sono stati preparati con diluizioni di colture di *E. coli* O26 contenenti 2-6 log CFU/mL. Le colture positive per il gene wzx O26 alla PCR sono state analizzate con metodi colturali selettivi per confermare la presenza di batteri vitali. A tal fine, 100 µL delle diluizioni dei campioni

positivi sono stati inoculati su piastre di TSA e TBX e incubati per una notte a 37 °C. In seguito, cinque colonie con morfologia riferibile a *E. coli* ed un aspetto caratteristico, in base al tipo di terreno utilizzato, sono state valutate per il sierogruppo O26 mediante test di sieroaagglutinazione con il kit Dryspot *E. coli* Serocheck (Oxoid, UK). La stessa procedura è stata utilizzata per i campioni positivi al test ELIME (testando cinque colonie dalle piastre inoculate con 50 µL dei complessi MBs-*E. coli* O26). Il modello di crescita per *E. coli* nel brodo stima un incremento di circa 7–8 log CFU/mL per 24 ore a 37 °C (ComBase Team, 2013), tale parametro è stato considerato per determinare i tempi di incubazione. È importante sottolineare anche che, recentemente, le prestazioni del metodo ISO/TS 13136 sono state valutate dal Laboratorio di riferimento dell'UE per *E. coli* nell'ambito del programma di prove valutative EURL-VTEC (2009–2017) (EU Reference Laboratory for *E. coli*, 2018). L'isolamento di *E. coli* O26 dalle matrici alimentari analizzate nelle prove interlaboratorio non è stato ottenuto ad un livello inferiore a 40 CFU.

### 5.6.3. Risultati

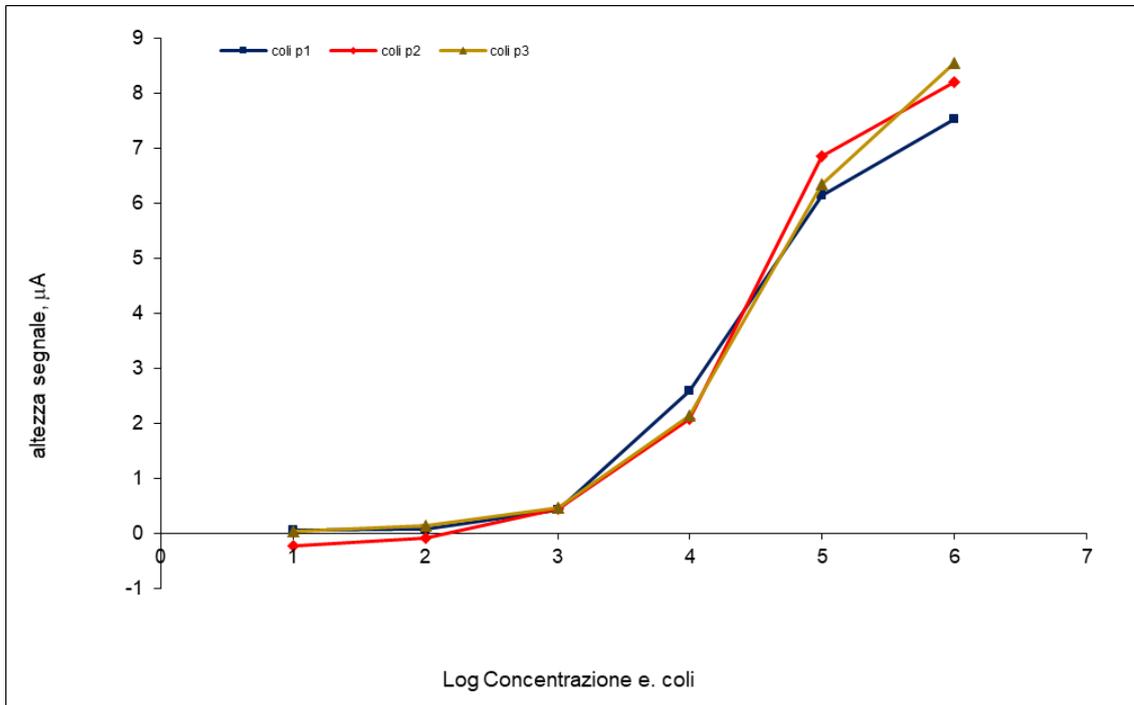


Figura 7: Segnale derivante dall'analisi di  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  CFU/mL di *E.coli* O26.

In PBS-KCl pH 7,4 E= - 0,1 V s= 200

Il sensore MBs/*E.coli*O26/DA-HRP (figura 7) è in grado di rilevare diverse concentrazioni di *E. coli* O26 in BPW. Le tre ripetizioni hanno mostrato un andamento simile. Il LOD è pari a  $1 \times 10^3$  CFU/mL.

I valori della corrente registrati con il test ELIME dopo 6 ore di arricchimento ed i risultati del test RTi-PCR sono riportati nella Tabella 7.

Milk batches	Inoculum in 25 mL of milk (CFU)	ELIME signal ( $\mu\text{A}$ ) (mean $\pm$ sd)		ELIME positivity <sup>a</sup>	RTi-PCR (Ct value) (mean $\pm$ sd)		RTi-PCR positivity <sup>b</sup>
		Dilution 1 $\times$ (n = 1)	Dilution 0.1 $\times$ (n = 3)		Dilution 1 $\times$ (n = 3)	Dilution 0.1 $\times$ (n = 3)	
Feb26	14.50	5.30	2.18 $\pm$ 0.41	1/1; 3/3	24.45 $\pm$ 0.08	28.51 $\pm$ 2.07	3/3; 3/3
Mar7	14.50	2.32	1.05 $\pm$ 0.09	1/1; 3/3	23.28 $\pm$ 0.39	25.31 $\pm$ 2.47	3/3; 3/3
Mar14	18.80	1.82	0.83 $\pm$ 0.05	1/1; 1/3	23.68 $\pm$ 2.72	32.99 $\pm$ 5.75	3/3; 2/3
Mar27	9.00	3.17	1.00 $\pm$ 0.02	1/1; 3/3	19.19 $\pm$ 3.66	36.99 $\pm$ 1.63	3/3; 3/3
Jul4	9.60	3.99	1.09 $\pm$ 0.23	1/1; 3/3	23.15 $\pm$ 0.46	28.00 $\pm$ 3.55	3/3; 3/3

<sup>a</sup> Cut-off values equal to 0.86  $\mu\text{A}$

<sup>b</sup> Cut-off value equal to 38.70 Ct

Tabella 7: Risultati delle prove di sensibilità e confronto tra ELIME e real-time PCR

Il sensore ELIME ha mostrato una buona sensibilità nel rilevare *E. coli* O26 alla concentrazione di 1 CFU in 25 mL di latte dopo 6 ore di arricchimento. I valori della corrente registrati con il test ELIME dipendono dal numero di batteri target presenti nell'arricchimento al termine dell'incubazione (ovvero dopo 6 h dall'inoculo). Le differenze di concentrazione al termine dell'arricchimento possono essere maggiori delle differenze presenti nel livello di inoculo iniziale utilizzato (che va da 9.00 a 18.80 CFU), ciò è giustificato dal numero di batteri competitivi presenti nella flora di fondo. Per il test ELIME, il valore di cut-off è stato calcolato come il valore medio dei campioni negativi (campioni non inoculati e che non hanno mostrato amplificazione) più tre volte la loro deviazione standard. Come evidenziato nella Tabella 7, tutti i campioni inoculati presentavano valori superiori al livello di cut-off selezionato per il test ELIME, eccetto due (di cui uno era anche al di sotto del livello di cut-off del test RTi-PCR). Il rilevamento di isolati di *E. coli* O26 nelle colture di 24 ore seminate su piastra ha confermato i risultati

della RTi-PCR nei campioni inoculati con 9–18.8 CFU in 25 mL, ma non in quelli con una densità inferiore (1:10). Tuttavia, l'isolamento effettuato testando cinque colonie dalle piastre inoculate con 50 µL dei complessi MBs-*E. coli* O26, recuperati dal latte arricchito, non esclude completamente la loro presenza che può essere stata mascherata dai numerosi isolati di *E. coli* osservati nelle piastre di agar TBX. Il cut-off per il test RTi-PCR è stato calcolato come il valore di Ct corrispondente alla media degli standard quantitativi contenenti  $1 \times 10^2$  CFU/mL, più tre volte la deviazione standard di quel valore (Ct 38,70). La variabilità tra i replicati può essere influenzata dalla concentrazione di inibitori della PCR e dall'efficienza di cattura delle MBs per diverse densità cellulari presenti tra i singoli campioni (Fakruddin et al., 2017). La RTi-PCR ha confermato l'assenza di *E. coli* O26 nei campioni di latte non inoculato.

#### 5.6.4. Bibliografia

- ComBase Team. (2013). ComBase: A Web Resource for Quantitative and Predictive Food Microbiology. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1967>
- EU Reference Laboratory for *E. coli*. (2018). ISO TS 13136:2012 Report on the primary validation of the PCR screening reactions and the determination of the performance parameters, based on the results of the analytical tests carried out within the EURL-VTEC proficiency testing program (2009–2017). Retrieved November 20, 2019, from [http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Performance\\_ISO\\_TS\\_13136\\_Rev3.pdf](http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Performance_ISO_TS_13136_Rev3.pdf)
- Fakruddin, M., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Evaluation of microplate immunocapture method for detection of *Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhi* and *Shigella flexneri* from food. *BMC Microbiology*, *17*(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1099-y>
- Mellefont, L. A., & Ross, T. (2003). The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology*, *83*(3), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00378-1)
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higushi, R. (2013). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* *10*(4): 506-13 (April 1991). *BioTechniques*, *54*(3), 134–139. <https://doi.org/10.2144/000114018>

## **5.7. Sviluppo di biosensori per antibiotici**

Oltre alla determinazione di amine biogene e microrganismi patogeni negli alimenti, uno dei settori di interesse del nostro gruppo di ricerca riguarda lo sviluppo di biosensori per i residui di farmaci veterinari. A tal fine è stata condotta una valutazione della presenza di sostanze chimiche in carni suine, basata sui rilievi ispettivi e sui riscontri di positività derivanti dai piani di campionamento ufficiali. I risultati di questa analisi hanno lo scopo di guidare la messa a punto di metodi di screening di tipo elettrochimico da parte del Laboratorio di Sicurezza Alimentare-Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

### **5.7.1. Analisi preliminare**

Nel progettare nuovi biosensori è stato tenuto conto di un'analisi preliminare basata sui rilievi ispettivi svolti presso un grande macello industriale di suini nella Provincia di Modena e sulle positività che con maggior frequenza sono state rilevate nell'ambito del Piano Nazionale Residui dell'ultimo triennio in Emilia Romagna (periodo 2017-2019). Un aspetto importante del controllo degli alimenti riguarda, infatti, la valutazione e la predisposizione di attività di campionamento atte ad individuare, con il minor margine di errore, le partite che con una maggior probabilità sono esposte ad un utilizzo del farmaco veterinario in allevamento e, quindi, alla presenza di residui e contaminanti nell'alimento. Nel caso dei residui di farmaci veterinari, la valutazione deve essere specifica per ogni categoria di animali che entra a far parte della catena alimentare e basarsi sui dati relativi alle patologie prevalenti in allevamento, al management aziendale, alla predisposizione genetica e alle condizioni ambientali esterne (clima, umidità, alimentazione, ecc.) che influenzano la risposta adattativa degli animali e li predispongono all'utilizzo di trattamenti farmacologici (Trevisani et al., 2019). Per un'opportuna scelta del campione (Allegato 1, Tabella con i criteri di campionamento mirato), andrebbe compiuta un'analisi

quanto più dettagliata possibile dei fattori causali, andando a testare con maggior frequenza le molecole che sono di più largo uso per le patologie prevalenti negli allevamenti o che sono state già oggetto di riscontri di positività (Sandro et al., 2019). Uno scambio di dati fra veterinario aziendale e veterinario ufficiale consente di attuare dei piani mirati, atti ad evitare l'ingresso nell'alimentazione umana di partite contaminate. I dati relativi alle condizioni dell'allevamento, infatti, sono fondamentali al fine di ottenere un quadro completo della situazione sanitaria delle partite inviate al macello. Le cosiddette ICA (Informazioni sulla Catena Alimentare), così come definite nel Reg. (CE) n. 853/04. all.II sez. III, riportano diverse informazioni, quali a) lo *status* sanitario dell'azienda di provenienza o lo *status* sanitario del territorio regionale per quanto riguarda gli animali; b) le condizioni di salute degli animali; c) i medicinali veterinari somministrati e gli altri trattamenti cui sono stati sottoposti gli animali nell'arco di un determinato periodo e con un tempo di sospensione superiore a zero giorni, come pure le date delle somministrazioni e dei trattamenti e i tempi di sospensione; d) la presenza di malattie che potrebbero incidere sulla sicurezza delle carni; e) i risultati, se pertinenti ai fini della tutela della salute pubblica, di tutte le analisi effettuate su campioni prelevati dagli animali o su altri campioni prelevati al fine di diagnosticare malattie che potrebbero incidere sulla sicurezza delle carni, compresi i campioni prelevati nel quadro del monitoraggio e controllo delle zoonosi e dei residui; f) le pertinenti relazioni relative alle ispezioni *ante* e *post-mortem* sugli animali della stessa azienda di provenienza, comprese, in particolare, le relazioni del veterinario ufficiale; g) i dati relativi alla produzione, quando ciò potrebbe indicare la presenza di una malattia; h) il nome e l'indirizzo del veterinario privato che assiste di norma l'azienda di provenienza. Lo sviluppo di metodiche analitiche innovative e a basso costo, insieme ad un'attenta e strutturata valutazione del rischio, consentirebbe di rispondere in maniera ancora più efficace alla

richiesta dei consumatori di prodotti sicuri e di qualità. Inoltre, monitorare la presenza di residui negli allevamenti che manifestano criticità legate a malattie infettive endemiche risulta utile al fine di intervenire in modo mirato sul rischio chimico e supportare i veterinari ispettori nell'attuazione dei piani di monitoraggio. Il sistema Classyfarm, voluto e finanziato dal Ministero della Salute e realizzato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna in collaborazione con l'Università di Parma, risponde a queste necessità e consente di categorizzare gli allevamenti secondo degli indicatori numerici scientificamente validati. L'obiettivo di Classyfarm è quello di elaborare i dati provenienti da ogni allevamento censito nella Banca Dati Nazionale (BDN), esclusi quelli per autoconsumo o familiari, calcolando un valore che indica il livello di rischio dell'allevamento per ognuna delle aree sottoposte a valutazione (biosicurezza, benessere animale, parametri sanitari e produttivi, alimentazione animale, consumo di farmaci antimicrobici e lesioni rilevate al macello). Tuttavia, ad eccezione dell'area inerente il benessere animale, questo sistema non è stato ancora del tutto implementato e non abbiamo avuto la possibilità di ottenere dati riguardanti il nostro settore di interesse. Per definire le classi di molecole su cui orientare le nostre analisi ci siamo basati, quindi, sui risultati dei campionamenti ufficiali.

## **Risultati dei campionamenti ufficiali**

Dall'analisi dei riscontri di positività dei test ufficiali realizzati con metodica LC MS/MS presso il Reparto Chimico degli Alimenti di Bologna dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna è emerso che la classe di antimicrobici maggiormente rappresentata è quella dei Sulfamidici (80%), seguita dalle Tetracicline (20%) nel muscolo di suino (figura 8), e dai Chinolonici nel muscolo bovino (dati non pubblicati). Nei campioni con residui al di sotto dell'LMR, la classe prevalente è quella delle Tetracicline (49 %), seguita dai Sulfamidici (48%) e, in bassa percentuale, dai Fluorochinoloni (3%) (figura 9). Quello che emerge è che le molecole rintracciate nel contesto del PNR (nonostante le positività per anno siano prossime allo 0,1%), corrispondono in larga parte ai farmaci di elezione per le patologie che prevalentemente si riscontrano nella specie suina.

### Positività > LMR riscontrate in campioni PNR di muscolo suino (periodo 2017-2019)<sup>a</sup>

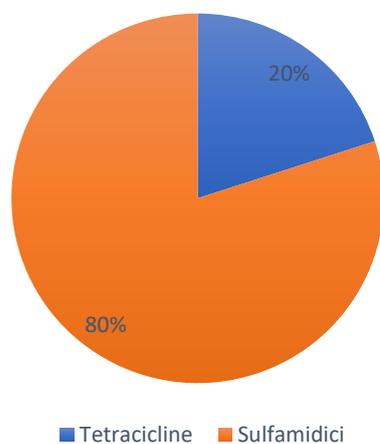


Figura 8: Residui di farmaci veterinari rilevati in n.5 campioni di muscolo suino. <sup>a</sup> Per la classe dei sulfamidici il principio attivo rilevato è la sulfadimetossina (su un totale di 4 campioni positivi, 2 nel 2017 e 2 nel 2019), mentre per le tetraciline è stata rintracciata ossitetraciclina col suo epimero epiossitetraciclina (1 campione nel 2017).

### Positività < LMR riscontrate in campioni PNR di muscolo suino (periodo 2017-2019)<sup>b</sup>

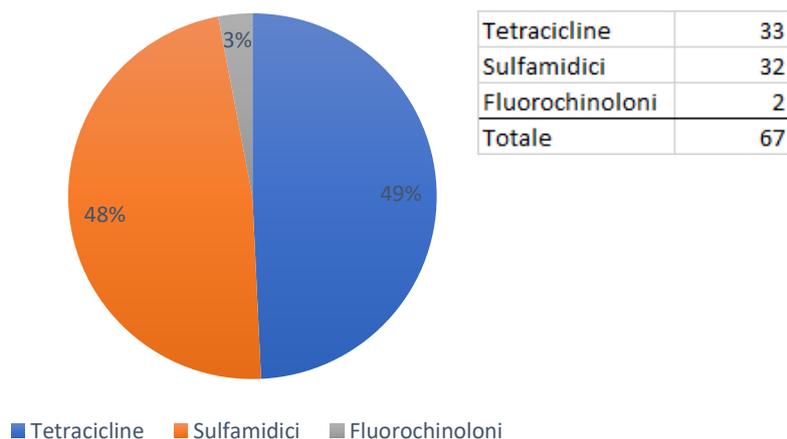


Figura 9: Residui di farmaci veterinari rilevati in n. 67 campioni di muscolo suino ad un dosaggio inferiore al LMR e di cui 52 inferiori anche al LOQ del metodo di analisi. <sup>b</sup> Per la classe dei sulfamidici i principi attivi rilevati sono sulfadimetossina, sulfadiazina, sulfametazina; doxiciclina, ossitetraciclina/epiossitetraciclina e clortetraciclina/epi-clortetraciclina per le tetraciline e marbofloxacin per i fluoroquinolon

## **Valutazione dell'uso del farmaco sulla base delle lesioni rilevate in sede di macellazione e patologie associate**

Dall'analisi dei dati relativi alle cause di esclusione delle carcasse di suino dal consumo umano è emerso che gli ascessi multipli a varia localizzazione sono tra le patologie prevalentemente osservate in catena di macellazione, seguiti da peritoniti e forme itteriche (tabella 8).

<b>RILIEVI ISPETTIVI</b>	<b>APRILE</b>	<b>NOVEMBRE</b>	<b>DICEMBRE</b>	<b>TOT.</b>
ascessi mult.	14	32	33	79
peritonite	4	25	23	52
pleuroperit.	2	2	6	10
odore sess.	1	4	2	7
ittero	1	9	8	18
enterite	1	1	0	2
incidente	1	8	6	15
TOT. macellati	63341	71068	65326	

Tabella 8: Risultati dell'attività realizzata presso le strutture del servizio veterinario dell'Emilia Romagna: patologie prevalenti rilevate in sede di macellazione causa di esclusione dal consumo umano

I dati provengono da un macello industriale della Provincia di Modena e si riferiscono al 2018. I Veterinari ispettori dello stesso macello riportano che, sulla base della loro esperienza, le cause maggiori di esclusione sono proprio gli ascessi multipli e le peritoniti. Va considerato però che gli allevamenti che conferiscono a questo macello provengono da un sistema di filiera, i dati non rispecchiano quindi la situazione sanitaria generale degli altri allevamenti presenti sul territorio.

Gli ascessi a varia localizzazione, riscontrati in suini provenienti da diversi conferenti, sono dovuti probabilmente a problemi di benessere animale in allevamento. Dall'entrata in vigore della direttiva 2008/120/CE, recepita nel nostro Paese con il D.lgs 122/2011, non è più possibile procedere alla caudectomia di routine, ma è invece necessario attuare tutte quelle strategie volte a garantire il benessere animale ai fini della prevenzione del taglio della coda. Tuttavia, in condizioni di stress in questo tipo di allevamenti possono insorgere problemi di morsicatura, fino ad arrivare a prevalenze di poco inferiori al 30%

di animali con ferite gravi caratterizzate da sangue e croste, evidenti infezioni, perdita di ingenti quantità di tessuto e conseguente riduzione in lunghezza della coda (Scollo, 2018). Nonostante questi problemi si presentino maggiormente nella fase dello svezzamento, con un aumento dei costi legati al trattamento antibiotico inevitabilmente associato alla presenza delle lesioni, le perdite più evidenti si presentano nelle fasi di magronaggio ed ingrasso (la mortalità media può raggiungere il +2,5%). Gli animali, anche a distanza di settimane dall'evento di morsicatura acuto, possono mostrare segni di mieliti ed infezioni ascendenti lungo la colonna vertebrale (deambulazione compromessa, da parziale fino a totale). Ulteriori perdite derivano dal mancato trasporto di questi animali verso il macello, come anche da animali macellati clinicamente sani che mostrarono ascessi lungo la colonna vertebrale tali da richiedere l'esclusione dal consumo umano o la rifilatura di importanti parti della carcassa. Questo tipo di rilievo ispettivo, tuttavia, essendo associato a trattamenti svolti in larga parte in fase di svezzamento, può non essere direttamente associato al rischio di residui antibiotici nelle carni. Tale condizione va, pertanto, valutata caso per caso, verificando se vi sono altri indizi relativi a possibili trattamenti recenti (registro dei trattamenti, segni di iniezioni, presenza di altre patologie acute). La peritonite è un'altra causa di rifilatura parziale della carcassa e in alcuni casi del suo sequestro. Una delle cause può essere imputata alla Malattia di Glasser (*Haemophilus parasuis*), che determina la presenza di peritonite fibrinosa. Quadri anatomopatologici simili si osservano in casi di infezione da *Streptococcus suis*. Quando lo *Streptococcus suis* è il responsabile del processo si può rilevare maggior coinvolgimento peritoneale e l'aspetto della fibrina appare più opaco o più purulento che nella malattia di Glasser (De las Heras and de Jalón Ciercoles, 2002). La presenza di polisierosite, associata a peritonite è condizione indicativa di polisierosite infettiva, che può essere attribuita a gravi infezioni sostenute da *Actinobacillus pleuropneumoniae* o da altri agenti primari di polisierosite,

oppure essere secondaria a infezioni al polmone. Esiste un'associazione tra pleurite, pericardite e peritonite ma non tra queste e l'artrite (Teixeira et al., 2016). Dal momento che *Mycoplasma hyorhinis* e *Haemophilus parasuis* hanno molta affinità per le articolazioni, si conclude che questi agenti non sono la causa principale del complesso polisierosite. Soggetti con questo tipo di lesioni hanno in genere avuto una sintomatologia clinica ed è quindi probabile che siano stati trattati con farmaci antibiotici. I farmaci di prima scelta per il tipo di patologie riscontrate fanno riferimento a diverse molecole e classi di antibiotici, tra cui le cefalosporine di I e II generazione, florfenicolo/tiamfenicolo, tetraciclina e associazione sulfonamidi/trimetoprim. I farmaci di seconda scelta sono, invece, ampicillina, amoxicillina, associazione amoxicillina/acido clavulanico e penicillina. I farmaci di terza scelta appartengono alle classi delle cefalosporine di III e IV generazione, fluorochinoloni e macrolidi (Diegoli et al., 2018). La presenza di una carcassa itterica, invece, può essere segno di infezione da Leptospirosi, Circoviroosi suina o Ascaridiosi. L'ittero è causato dall'accumulo di bilirubina, pigmenti biliari ed emoglobina nel sangue, con una localizzazione prevalente nei tessuti cutanei o sottocutanei, sistema digerente, sistema linfatico, fegato e milza. Il riscontro di lesioni macroscopiche in fegato e milza, per esempio, possono essere segno di un'infezione sistemica dovuta alla leptospirosi. Il controllo/prevenzione di questa patologia si basa sull'utilizzo di mangimi medicati con tetraciclina, ossitetraciclina o clortetraciclina (Nassuato et al., 2006). Alla luce di quanto sopra, per una migliore analisi andrebbero svolti dei campioni specifici sugli allevamenti oggetto dei rilievi ispettivi, che non rientra però nello scopo del nostro studio. Sulla base di queste informazioni il nostro interesse era, invece, quello di sviluppare un biosensore per un utilizzo *on-site* in grado di rilevare una o più molecole di più largo uso fra quelle qui individuate. Avere a disposizione uno strumento di screening rapido e a basso costo avrebbe importanti ricadute sulla capacità

di analisi (numero dei campioni) e, in generale, sull'attività di controllo degli alimenti per la Sanità Pubblica. Un biosensore per la ricerca di sulfamidici (sulfamerazina, sulfametazina, sulfadiazina, sulfacloropiridazina, sulfacetamide e sulfatiazolo) e uno per le tetracicline (tetraciclina cloridrato, ossitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) sono stati già sviluppati da Conzuelo (Conzuelo 2012a; Conzuelo 2012b); un immunosensore per cloramfenicolo è stato sviluppato da El-Moghazy (2018) e, infine, un immunosensore per la ricerca simultanea di più antibiotici (cefalosporine, sulfamidici e tetracicline) è stato sviluppato da Conzuelo nel 2014, con buone performance e ridotti tempi di analisi. Tuttavia, questi studi sono stati fatti in latte ed è quindi da valutare se l'applicazione su altre matrici influenzi o meno la risposta amperometrica.

## 5.7.2 Bibliografia

- Conzuelo, Felipe, Gamella, M., Campuzano, S., G. Pinacho, D., Reviejo, A. J., Marco, M. P., & Pingarrón, J. M. (2012a). Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 36(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044>
- Conzuelo, Felipe, Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2012b). Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, 737, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>
- Conzuelo, F., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Campuzano, S., Gamella, M., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2014). Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors. *Analytica Chimica Acta*, 820, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.005>
- Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs. *Official Journal of the European Union*, L 47/5, 18/02/2009
- De las Heras, M., & de Jalón Ciercoles, J. A. G. (2002). Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina. Elanco Animal Health.
- Diegoli G., Granito G., Luppi A., Masera F., Merialdi G., Miraglia V., Prospero M. and Trevisi P. & Trambajolo G. (2018). Linee guida Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino. [https://www.alimenti-salute.it/doc/Linee\\_Guida\\_SUINI\\_2018.pdf](https://www.alimenti-salute.it/doc/Linee_Guida_SUINI_2018.pdf).
- El-Moghazy, A. Y., Zhao, C., Istamboulie, G., Amaly, N., Si, Y., Noguer, T., & Sun, G. (2018). Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor based on PVA-co-PE nanofibrous membrane for the detection of chloramphenicol residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 117, 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>
- Nassuato, C., Cominardi, P., Tagliabue, S., & Pennelli, D. (2006). Gestione di un focolaio da *Leptospira interrogans* sierovariante Pomona in un allevamento suino

da ingrasso. *L'osservatorio*, 2, 4–9.

Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 338/1, 30/04/2004

Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. *Official Journal of the European Union*, L 95/1, 7/04/2017

Sandro, A., Roberti, F., Ventre, C., de Martino, M. & Cardelli, G. (2019). Relazione contenente i risultati dei controlli ufficiali svolti in attuazione del Piano Nazionale Residui. Dal sito del Ministero della Salute [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2959\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2959_allegato.pdf).

Scollo, A. (2018). Caso clinico: Gestione di eventi di morsicatura della coda in un allevamento di suini a coda non tagliata. Retrieved December 8, 2020, from [https://www.3tre3.it/articoli/gestione-di-eventi-di-morsicatura-della-coda\\_8020/](https://www.3tre3.it/articoli/gestione-di-eventi-di-morsicatura-della-coda_8020/)

Teixeira, D. L., Harley, S., Hanlon, A., O'Connell, N. E., More, S. J., Manzanilla, E. G., & Boyle, L. A. (2016). Study on the association between tail lesion score, cold carcass weight, and viscera condemnations in slaughter pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00024>

Trevisani, M., Fedrizzi, G. & Diegoli, G. (2019). Chemical hazards in meat and associated monitoring activities. In I. M. C. M. R. and M. R. Frans J.M. Smulders (Ed.), *Chemical hazards in foods of animal origin*, 315–340. Wageningen. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3\\_13](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_13).

## 6. DISCUSSIONE

I sensori elettrochimici sviluppati in questo studio ci hanno permesso di identificare con successo la presenza di istamina (I) e *E. coli* O26 (II) sia in brodo che in matrici reali.

Per il sensore enzimatico è stato possibile inoltre determinare la sensibilità, la precisione e l'accuratezza del metodo con buoni risultati. In entrambi i casi sono state effettuate delle prove comparative con i metodi ufficiali di riferimento, che hanno dimostrato come i sensori siano in grado di dare risposte affidabili in un lasso di tempo inferiore e con minori costi.

Uno dei limiti del nostro studio riguarda però la determinazione e l'eliminazione di possibili composti interferenti, cioè sostanze che producono una risposta amperometrica e che possono influenzare le misurazioni dei sensori. Per il sensore (I) questi includono le altre amine biogene che possono essere prodotte a seguito di contaminazione microbica e condizioni di conservazione inadeguate del pesce (Biji et al., 2016; Rossi et al., 2002; Visciano et al., 2014). Nonostante i metodi enzimatici siano generalmente specifici, la cadaverina, la tiramina e la putrescina possono interferire con i biosensori dell'istamina basati sull'attività della DAO (Lange and Wittmann, 2002). Le differenze osservate nel nostro studio (I) tra i risultati dell'HPLC e il metodo basato sul biosensore per quanto riguarda il campione conservato a 10 °C per 7 giorni, ad esempio, potrebbe essere dovuto alla presenza di altre amine biogene. Tuttavia, queste sviluppano in pesci mal conservati, mentre lo screening rapido è da utilizzare per lotti di pesce fresco allo sbarco o in fase di lavorazione del prodotto fresco. Recentemente un biosensore enzimatico commerciale per il rilevamento dell'istamina nel pesce e nei prodotti della pesca (Biofish-300, Biolan, Zamudio, Spagna) è stato validato ed ha ottenuto la certificazione AOAC (Salleres et al., 2016).

La presenza di cellule batteriche che non vengono rimosse dalle fasi di lavaggio o batteri della flora di fondo che reagiscono in modo crociato con gli anticorpi di cattura che rivestono le MBs possono influenzare, invece, la sensibilità e la specificità del test ELIME. Il produttore di Dynabeads® anti-EPEC/VTEC O26 riferisce che le MBs possono reagire in modo crociato in misura limitata con altri batteri che hanno epitopi antigenici simili, come *Escherichia hermannii*, *Salmonella* O gruppo N e *Proteus* spp. Altri studi riportano che gli anticorpi anti-*E.coli* O26 possono cross-reagire con *E. coli* che possiedono gli antigeni 4, 13, 25, 32, 100 e 102 e con *Pseudomonas aeruginosa* O12 (Rivera-Betancourt and Keen, 2000). In questo studio, l'uso della BSA come agente bloccante ha dimostrato di ridurre efficacemente il legame non specifico degli anticorpi di rilevamento e la presenza simultanea di ceppi di *E. coli* non O26 nel latte crudo e non ha interferito con i risultati del test ELIME. Ciò è dimostrato anche in studi precedenti (Volpe et al., 2016).

Inoltre, un vantaggio dei biosensori ELIME è che le aliquote dei complessi MBs-*E. coli* O26 possono essere utilizzate direttamente per confermare i risultati mediante isolamento e caratterizzazione degli isolati. Ciò è particolarmente importante per i patogeni di origine alimentare come gli EHEC, la cui patogenicità può essere confermata solo dopo la dimostrazione della presenza di diversi tratti di virulenza nello stesso isolato (Bugarel et al. 2011). Un altro vantaggio dei biosensori ELIME è l'utilizzo di SPCE nudi, in cui cioè non è necessaria alcuna modifica, rendendo il saggio facilmente riproducibile in altri laboratori.

Per quanto riguarda il confronto con le metodiche convenzionali è necessario considerare diversi parametri (numero di campioni analizzabili, costi, tempi, complessità delle procedure, LOD). I biosensori I e II hanno dimostrato la capacità di analizzare un buon numero di campioni, mantenendo un alto livello di sensibilità. Nel caso di elettrodi di tipo

multi-channel è possibile anche un'analisi simultanea dei campioni. Rispetto ad un test ELISA i biosensori sono meno costosi, richiedono una minor preparazione del campione e la risposta è più rapida. La cromatografia associata alla spettrometria permette di identificare e quantificare l'analita ed è utilizzata come metodo di conferma per la determinazione di residui antibiotici (Cháfer-Pericás et al., 2010). Tuttavia la preparazione dei campioni richiede una procedura lunga e complessa, che va eseguita da personale esperto ed i costi sono notevoli.

METODO	VANTAGGI	SVANTAGGI
<b>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta sensibilità e specificità</li> <li>- Analisi di più campioni contemporaneamente in un breve periodo di tempo, con conseguenti caratteristiche di praticità e convenienza in termini di test su larga scala</li> <li>- Screening di un gran numero di campioni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Richiede tempo a causa del pretrattamento e della pulizia del campione</li> <li>- Non è pratica per il rilevamento rapido</li> <li>- Costosa</li> <li>- Il rilevamento non è in tempo reale</li> </ul>
<b>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altamente sensibile e in grado di gestire miscele complesse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Richiede tempo a causa del pretrattamento e della pulizia del campione</li> <li>- Non pratico per il rilevamento rapido</li> <li>- Costoso</li> <li>- Il rilevamento non è in tempo reale</li> </ul>
<b>Biosensors</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevata specificità del sistema</li> <li>- Controllo rapido (tempo di risposta breve) e lunga durata</li> <li>- Applicazione pratica per un utilizzo in tempo reale/ industriale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La stabilità del materiale biologico (cellula, anticorpo, tessuto, ecc.) è subordinata alle proprietà naturali della molecola in condizioni ambientali (pH, temperatura)</li> <li>- Possibile presenza di interferenti</li> <li>- Limitazioni dovute alle dimensioni del trasduttore</li> </ul>

Tabella 9: Confronto fra ELISA, LC-MS e biosensori. Adattato da Mungroo et al, 2014

## 7. CONCLUSIONI

La capacità del biosensore (I) amperometrico enzimatico di rilevare l'istamina ha permesso lo sviluppo di un metodo semplice, rapido ed economico per misurare l'istamina nel tonno. Il biosensore può essere utilizzato dagli operatori del settore alimentare come strumento di screening per monitorare la contaminazione microbica dei lotti di tonno nelle fasi critiche della produzione e per assicurarsi che vengano rispettati i requisiti di sicurezza alimentare. Inoltre, un'ulteriore applicazione riguarda la valutazione del potenziale istaminogeno dei batteri in coltura, utile per effettuare una valutazione del rischio in caso di abusi delle temperature di conservazione.

I risultati del test ELIME (II) sono sovrapponibili a quelli ottenuti con il metodo di riferimento. Il rilevamento di un basso numero di *E. coli* O26 (1 CFU in 25 mL) è stato raggiunto in una giornata lavorativa. I campioni risultati positivi possono essere confermati mediante colture dei complessi MBs-*E.coli* O26, consentendo un'ulteriore caratterizzazione degli isolati, importante per discriminare i ceppi enteroemorragici.

La miniaturizzazione dei devices, inoltre, consente di svolgere le analisi su campioni reali sia in allevamento che nei locali di trasformazione/distribuzione degli alimenti consentendo di monitorare tutta la filiera. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari al fine di validare la metodica proposta e rendere questi strumenti attrattivi per l'industria alimentare. L'esperienza maturata in seno a questo progetto risulta comunque utile per ulteriori applicazioni future (es. sviluppo di biosensori per la determinazione di residui di farmaci veterinari).

## Bibliografía

- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. S. (2016). Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and Technology*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2224-x>
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>
- Lange, J., & Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 372(2), 276–283. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1130-9>
- Rivera-Betancourt, M., & Keen, J. E. (2000). Murine Monoclonal Antibodies Specific for Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O26 and O111. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4124–4127. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4124-4127.2000>
- Rossi, S., Lee, C., Ellis, P. C., & Pivarnik, L. F. (2002). Biogenic Amines Formation in Bigeye Tuna Steaks and Whole Skipjack Tuna. *Journal of Food Science*, 67(6), 2056–2060. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09500.x>
- Salleres, S., González, I., Rantzamendi, A. A., González, R., Maza, S., Jaureguibeitia, A., & Benner, R. A. (2016). Validation of the biofish-300 HIS enzymatic biosensor for the detection of histamine in fishery products. *Journal of AOAC International*, 99(5), 1338–1355. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0180>
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2014). Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00500>
- Volpe, G., Delibato, E., Fabiani, L., Pucci, E., Piermarini, S., D'Angelo, A., & Palleschi, G. (2016). 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*, 149, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.015>



## ALL 2. Pubblicazioni scientifiche (I)

### Abstract

#### **Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna**

Marcello Trevisani<sup>1\*</sup>, Matilde Cecchini<sup>1</sup>, Giorgio Fedrizzi<sup>2</sup>, Alessandra Corradini<sup>1</sup>, Rocco Mancusi<sup>1</sup> and Ibtisam E. Tothill<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food Hygiene, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>2</sup> Laboratory of Food Chemistry, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia, Italy

<sup>3</sup> Surface Engineering and Precision Institute, Cranfield University, Cranfield, United Kingdom

Histamine poisoning is the most common cause of human foodborne illness due to the consumption of fish products. An enzyme-based amperometric biosensor was developed to be used as a screening tool to detect histamine and histamine-producing bacteria (HPB) in tuna. It was developed by immobilizing histidine decarboxylase and horseradish peroxidase on the surface of screen-printed electrodes through a cross-linking procedure employing glutaraldehyde and bovine serum albumin. The signal generated in presence of histamine at the surface of the electrode was measured by chronoamperometry in presence of a soluble redox mediator. The sensitivity of the electrode was 1.31–1.59  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , with a linear range from 2 to 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and detection limit of 0.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In this study fresh tuna filets purchased in supermarkets in different days ( $n = 8$ ) were analyzed to detect HPB. Samples with different concentration of histamine were analyzed with culture-based counting methods, biosensor and HPLC and also a challenge test was made. Recovery of histamine from cultures and tuna samples was also assessed. The presence of *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. damsela* and *Hafnia alvei* was detected using culture- and PCR-based methods. At the time of purchase these tuna samples had histamine concentrations from below the limit of detection (LOD) to 60  $\mu\text{g}/\text{g}$ . HPLC and biosensor methods provided similar results in the range from zero to 432  $\mu\text{g}/\text{g}$  (correlation coefficient,  $R^2 = 0.990$ ) and the recovery of histamine from cultures and tuna samples was very high (mean bias  $-12.69$  to  $1.63\%$ , with root-mean-square error  $<12\%$ ). These results clearly show that fresh tuna is commonly contaminated with strong HPB. The histamine biosensor can be used by the Food Business Operators as a screening tool to detect their presence and to determine whether their process controls are adequate or not.



# Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna

Marcello Trevisani<sup>1\*</sup>, Matilde Cecchini<sup>1</sup>, Giorgio Fedrizzi<sup>2</sup>, Alessandra Corradini<sup>1</sup>, Rocco Mancusi<sup>1</sup> and Ibtisam E. Tothill<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food Hygiene, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy,

<sup>2</sup> Laboratory of Food Chemistry, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno

Ubertini", Brescia, Italy, <sup>3</sup> Surface Engineering and Precision Institute, Cranfield University, Cranfield, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fatih Ozogul,  
Çukurova University, Turkey

### Reviewed by:

Piotr Kulawik,  
University of Agriculture in Krakow,  
Poland

Osman Kadir Topuz,  
Akdeniz University, Turkey  
Giulia Tabanelli,  
University of Bologna, Italy

### \*Correspondence:

Marcello Trevisani  
marcello.trevisani@unibo.it

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 02 May 2019

Accepted: 26 July 2019

Published: 27 August 2019

### Citation:

Trevisani M, Cecchini M,  
Fedrizzi G, Corradini A, Mancusi R  
and Tothill IE (2019) Biosensing  
the Histamine Producing Potential  
of Bacteria in Tuna.  
Front. Microbiol. 10:1844.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.01844

Histamine poisoning is the most common cause of human foodborne illness due to the consumption of fish products. An enzyme-based amperometric biosensor was developed to be used as a screening tool to detect histamine and histamine-producing bacteria (HPB) in tuna. It was developed by immobilizing histidine decarboxylase and horseradish peroxidase on the surface of screen-printed electrodes through a cross-linking procedure employing glutaraldehyde and bovine serum albumin. The signal generated in presence of histamine at the surface of the electrode was measured by chronoamperometry at in presence of a soluble redox mediator. The sensitivity of the electrode was 1.31–1.59  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , with a linear range from 2 to 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and detection limit of 0.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In this study fresh tuna filets purchased in supermarkets in different days ( $n = 8$ ) were analyzed to detect HPB. Samples with different concentration of histamine were analyzed with culture-based counting methods, biosensor and HPLC and also a challenge test was made. Recovery of histamine from cultures and tuna samples was also assessed. The presence of *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. damsela* and *Hafnia alvei* was detected using culture- and PCR-based methods. At the time of purchase these tuna samples had histamine concentrations from below the limit of detection (LOD) to 60  $\mu\text{g}/\text{g}$ . HPLC and biosensor methods provided similar results in the range from zero to 432  $\mu\text{g}/\text{g}$  (correlation coefficient,  $R^2 = 0.990$ ) and the recovery of histamine from cultures and tuna samples was very high (mean bias  $-12.69$  to  $1.63\%$ , with root-mean-square error  $<12\%$ ). These results clearly show that fresh tuna is commonly contaminated with strong HPB. The histamine biosensor can be used by the Food Business Operators as a screening tool to detect their presence and to determine whether their process controls are adequate or not.

**Keywords:** histamine-producing bacteria, amperometric biosensor, tuna, histidine decarboxylase activity, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*, microbiological criteria

## INTRODUCTION

Histamine poisoning is the most common cause of human foodborne illness due to the consumption of fish products. During the period 2010–2015, 12 EU Member States reported 176 food-borne outbreaks caused by histamine associated with the consumption of fish and fish products. These outbreaks involved 961 human cases and 104 of hospitalizations (European Food Safety Authority [EFSA], 2017).

The intoxication by histamine occurs after the consumption of food containing biogenic amines, particularly histamine, at concentrations higher than 500 ppm (Gonzaga et al., 2009). Histamine production results from the decarboxylation of free histidine present in a wide variety of pelagic fish. Some bacteria that are present in the gut and on the skin have high histidine-decarboxylase activity. These bacteria are likely introduced into the fish flesh in consequence of post-mortem autolytic changes and inappropriate handling during storage or processing. The European Commission Regulation (EC) No 2073, (2005) set criteria defining the acceptability for fish belonging to the families *Scomberidae* (e.g., tuna, albacore, mackerel), *Scomersocidae* (sauries), *Clupeidae* (e.g., herrings and sardines), *Engraulidae* (anchovies), *Coryphaenidae* (mahimahi/dorado) and *Pomatomidae* (bluefish), fixing the limits of histamine at 100 mg/kg (m), with a tolerance up to 200 mg/kg (M) in not more than two units sample out of nine to be sampled from the lots inspected. The U.S. Food & Drug Administration have a 50 mg/kg defect action level for histamine in tuna, mahi-mahi and related fish (FDA, 2011). These limits concern fish and fish products placed on the market during their shelf life.

To meet these criteria, manufacturers have to define performance objectives (POs) in operation management and therefore they should be able to estimate the activity of histamine-producing bacteria (HPB) at relevant stages of the production chain. HPB have been classified, according to their histidine-decarboxylase activity, as weak, medium and strong histamine producers (Bjornsdottir et al., 2009). Most active histamine HPB occurring in fish belong to the family *Enterobacteriaceae* (*Morganella*, *Raoultella*, *Erwinia*, *Proteus* and other) (Cantoni, 2008). Among non-*Enterobacteriaceae*, bacteria of the genus *Photobacterium* (i.e., *P. damsela* and *P. phosphoreum*) showed to have a strong histidine decarboxylase activity (HDC) and were implicated in clinical cases of histamine intoxication (Emborg and Dalgaard, 2006; Landete et al., 2008). Since fish products are normally kept at temperatures next to 0°C, the psychrotolerant HPB can have a major role in outbreaks not related to an interruption of the cold chain. These bacteria include *Morganella morganii*-like bacteria (*Morganella psychrotolerans*) and *P. phosphoreum* (Kanki et al., 2004; Emborg et al., 2006; Prester, 2011). The photobacteria are more often detected in fish under vacuum or CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres with an extended the shelf-life (Emborg and Dalgaard, 2006).

Analytical methods for histamine testing in fish include HPLC with fluorescent detection (Duflos et al., 2018) or coupled to Mass Spectroscopy (Kaufmann and Maden, 2018). These methods have high accuracy and precision and can be partially automated, but are labor intensive and costly, requiring skilled technicians and expensive instruments. Biosensors can provide a valid alternative for testing fish at the laboratories of the food business operators, which have to qualify suppliers and monitor the fish quality. Amperometric biosensors are relatively inexpensive and analyses can be made using miniaturized, sensitive and portable devices and disposable screen-printed sensors for the electrochemical

detection (Hayat and Marty, 2014). The use of bi-enzymatic biosensors combining amino oxidases with peroxidases (i.e., horseradish peroxidase-HRP) present advantages, since hydrogen peroxide, in presence of a suitable oxidized mediator, such as ferrocenium ion, can be reduced on the electrode surface at low operating potential, avoiding undesirable oxidation of electroactive interferents (Tombelli and Mascini, 1998; Niraj and Pandey, 2012). The use of these biosensors for measurement of histamine produced by HPB in standardized culture media can provide a valuable tool for monitoring the quality of fish. By using biosensors less time is required to conduct experiments and do not use solvents for the extraction process.

Extraction of histamine from fish homogenates and culture media with high temperature and high-pressure treatment represent an interesting approach, since histamine solutions can be sterilized by heating with little degradation (Pratter et al., 1985; McDonald et al., 1990) and biosensors do not require labor-intensive clean-up for water soluble small molecules, such as histamine. Sterilization is also useful to inactivate the histidine decarboxylase that can be released by HPB during refrigerated storage and after freeze-thaw sample preparation (Kanki et al., 2007), which would affect the analytical results.

Herein, a simple (second generation) amperometric screen-printed biosensor was used to assist in the detection of histamine-producing bacteria (HPB) and assess their histidine decarboxylase activity in histidine decarboxylase broth (HD broth). Spike and recovery experiments and challenge tests with HPB were carried out under standardized conditions to demonstrate the validity of histamine biosensors as a screening method for testing fish at the laboratories of the food business operators.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and Microbiological Media

Diamine Oxidase (DAO) from Porcine Kidney, Peroxidase Type II from Horseradish (HRP), Albumin from Bovine Serum (BSA), Glutaraldehyde (GA) (25% w/v), potassium hexacyanoferrate (II)-Trihydrate (Reagentplus®) [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O], Histamine Dihydrochloride (≥99% TLC), sodium phosphate dibasic anhydrous (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sodium phosphate monobasic monohydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), Potassium Chloride (KCl), Potassium Hydroxide (KOH), Hydrochloric Acid (HCl), Trichloroacetic Acid (TCA), n-heptane o-phthalaldehyde (OPA), Histidine, Sodium Chloride (NaCl) and 0.0005% pyridoxal HCl were purchased by Sigma-Aldrich (Milan, Italy). All standard solutions used for the biosensor were prepared in phosphate buffer (0.1 M HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, pH 7.4, with 0.1 M KCl) in deionized water, obtained by reverse osmosis (RO) using the water purification system New Human Power II (Human Corporation, Korea). Pre-formulated microbiological media (Tryptone Soy Broth, TSB; Tryptone Soy Broth, TSA; Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA; thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS; Iron Agar-Lyngby, IA) and peptone were purchased from Thermo Scientific Oxoid, Basingstoke, United Kingdom).

## Apparatus and Electrodes

Amperometric measurements were carried out with a portable BiPotentiostat/Galvanostat  $\mu$ Stat 400 from Dropsens (Oviedo, Spain) connected via a Cable Connector (Dropsens, CAST) to Screen-Printed Carbon Electrodes (SPCEs) (Dropsens, DRP-150). The SPCEs include a carbon working electrode (4 mm diameter), a silver pseudo-reference electrode and a carbon counter electrode. The SPCEs were placed in a methacrylate cell (Dropsens, CFLWCL-CONIC) that hold the samples extract on the surface. The supplied DropView 8400 software for Windows was used to control the instrument, plot measurements and perform the analysis of results.

## Assembly of the Enzyme Electrode

Diamine Oxidase and HRP were immobilized onto the surface of the screen-printed carbon electrode (4 mm diameter) using glutaraldehyde and bovine serum albumin (BSA) cross-linking. 10 mg of DAO and 5 mg of HRP were dissolved each in 100  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer. 4 mg of BSA were dissolved in 100  $\mu$ l solution (70  $\mu$ l of DAO and 30  $\mu$ l of HRP). Then 15  $\mu$ l of the DAO-HRP-BSA solution were mixed with 5  $\mu$ l of GA 2.5% and soon 10  $\mu$ l of the mixed solution were placed on working electrode and let dry at room temperature; then washed with phosphate buffer to ensure the removal of any unbound enzyme. The modified electrodes were kept at 4°C in phosphate buffer until further use.

## Histamine Biosensor Calibration and Assay Procedure

Samples and standard solutions of histamine were prepared in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing potassium hexacyanoferrate (II) 50 mM (PBS-Med). One hundred  $\mu$ l of this solution was deposited on the surface of the SPCE and the current was measured at  $-0.025$  V after 500 s, when a steady state was reached. Before sample addition, 100  $\mu$ l of PBS-Med (blank solution) were placed on the electrode and current was measured at  $-0.025$  V vs. screen printed Ag/AgCl reference electrode. The difference in current intensity between the sample and the blank solutions was calculated and correlated with histamine concentration. Experiments were performed in triplicate ( $n = 3$ ). For the histamine calibration curves, the standards consisted of histamine solutions at different concentrations ranging from 2 to 20  $\mu$ g/ml, which was chosen as the operative range. Samples were diluted using PBS-Med, to have histamine concentrations that fit in the calibration range of the biosensor. The calibration curves have to be calculated every time a new sensor is built, because even small changes in the cross-linking reaction that is needed to immobilize the enzymes may slightly affect the response (Barbosa et al., 2014). The prepared biosensors were stored in PBS at 4°C when not in use and at the beginning of every batch of analyses a low-level sample containing 5 ng/ml of histamine was tested to check the repeatability of the response (calibration check). Results were compensated for the dilution factor. The fresh fish samples were normally diluted 1:10 (1:20–1:50 at 3–7 days of storage), while the range of dilution for enriched HD broth was from 1:200 to 1:1000.

## Fish Samples

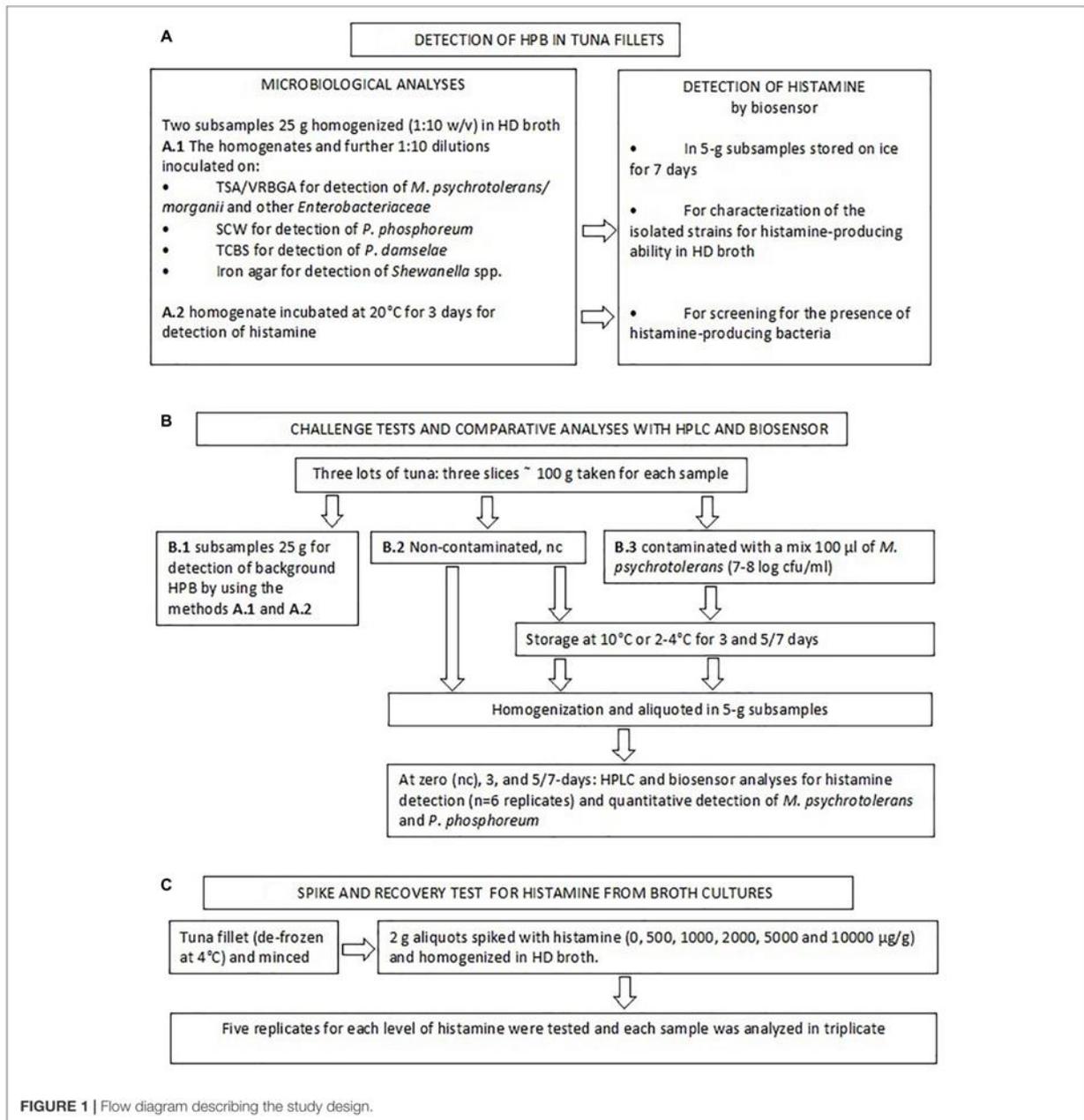
The samples were taken from eight lots of fresh yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) filets purchased in two supermarkets. The filets were packed on foam polystyrene trays overwrapped with low-density polyethylene film. The samples were transported within 1 h to the laboratory in an insulated chiller box with cool freezer pack. From each fillet a 25-g portion was used for the isolation of background histamine forming bacteria and the remaining part was cut into 5-g pieces and put in polystyrene weighing dishes. These subsamples were covered with a low-density polyethylene film and stored in insulated boxes on ice chips put in a chilling room at 4°C and analyzed for histamine and for detection of histamine-producing bacteria (HPB). Histamine level was determined amperometrically by biosensor in the tuna sub-samples stored on ice in the insulated box for 1 week.

A flow chart of the analyses that were used to detect and characterize HPB and to validate the biosensor method is reported in Figure 1.

## Methods for Detection of Histamine-Producing Bacteria

Samples were diluted (1:10) in two aliquots of TSB containing 1% histidine, 2% NaCl, and 0.0005% pyridoxal HCl (HD broth). One was incubated at 20°C for 3 days and used for detection of histamine. The other was used for the detection of background histamine-producing bacteria was made by inoculating 1 ml and 0.1 aliquots of the sample homogenates on four different media: (a) TSA/VRBGA; (b) seawater complete medium (SCW medium, composed of peptone 5 g, yeast extract 3 g, glycerol 3 ml, agar 15 g, aged seawater 750 ml, water up to 1 liter) (Martini et al., 2013), (c) TCBS; (d) Iron Agar.

Red colonies on TSA/VRBGA plates were counted and identified as *Morganella psychrotolerans* or *M. morgani* with the method developed by Podeur et al. (2015). Briefly, isolated colonies were enumerated by spreading 1 ml of diluted samples on  $\approx 5$  ml TSA, then, after 2 h at room temperature, 12–15 ml of VRBGA were added and these TSA/VRBGA plates were incubated (25°C, 2 d). Subsequently, 5 colonies randomly selected from the plates of the highest dilution showing growth and tested for species identification and characterization. SCW plates were incubated at +5°C up to 10 days and plates were also observed in the dark to enumerate luminous *P. phosphoreum* colonies, then five colonies randomly selected were identified using the real-time PCR method developed by Macé et al. (2013). The green colonies that grew on TCBS were tested to detect the presence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* using the procedure developed by Trevisani et al. (2017). The black colonies that grew on the Iron Agar plates (25°C, 3 days) indicative of H<sub>2</sub>S-producing bacteria were picked and presumptively identified as *Shewanella* spp. by Gram staining and biochemical characteristics (API 20e and API 20NE systems, BioMérieux, France). In addition, non-inoculated samples were analyzed for the presence of HPB by testing the level of histamine produced in HD broth enrichment at 20°C, 2 days). The isolated strains were also evaluated for the presence of histidine



decarboxylase gene of the Gram- bacteria (De Las Rivas et al., 2006; Trevisani et al., 2017) and their ability to produce histamine in HD broth. With this aim single colonies isolated from the fish samples (or used for the challenge tests, section “Bacterial Strains Used for the Challenge Tests”) were cultured in duplicate in 10 ml HD broth at 4°C for 5 days (*P. phosphoreum*) or 20°C for 2 days (*M. psychrotolerans* and other HPB) and histamine was extracted as described in the section “Extraction of Histamine From Bacterial Cultures and Recovery Tests” and detected by

the enzyme-based amperometric biosensor, as described in the section “Histamine Biosensor Calibration and Assay Procedure.”

### Extraction of Histamine From Bacterial Cultures and Recovery Tests

Histidine decarboxylase broth cultures were sterilized at 121°C for 15 min, then centrifuged (15.000 × g for 15 min), diluted in PBS-Med and analyzed with the histamine biosensor.

The extraction efficiency of histamine from broth cultures and tuna samples diluted in phosphate buffer have to be assessed and this was done with spike-recovery tests. With this aim, de-frozen tuna was used to emulate the natural test sample matrix (1:10 tuna in HD broth), but reducing the interference of viable HPB (especially *Photobacterium* spp.) that were often detected in the vacuum-packed fresh tuna samples. Therefore, one fillet of tuna (approximately 100 g) de-frozen at 4°C was minced, 2 g aliquots were spiked with histamine (0, 500, 1000, 2000, 5000, and 10000 µg/g) and homogenized in HD broth. Five replicates for each level of histamine were tested and each sample was analyzed in three replicates. The range 50–1000 µg/ml was decided according to the values of histamine developed in HD broth by low, middle and strong histamine producers (Bjornsdottir et al., 2009). The concentration of histamine was calculated according to the calibration curves constructed for each enzyme electrode. The spike recoveries were calculated by following equation: Spike recovery (%) = (total amount detected – amount original)/amount spiked × 100%.

### Challenge Test With HPB and Comparison of the Biosensor and HPLC Methods for Real Sample Analysis

One aim of this study was to compare the results of the biosensor method with those of an official reference method in a quantification range that is consistent with current legislation. Therefore, in parallel with the above-mentioned analyses a challenge test was made with using the samples of three lots of tuna (Jun 23, Jul 7, and Jul 15) (Figure 1). Three slices of approximately 100 g of tuna were purchased. One was analyzed to detect the presence of background HPB as described at the section Methods for Detection of Histamine-Producing Bacteria.” The other two slices were either inoculated with 100 µl of a *M. psychrotolerans* mixed culture (section “Bacterial Strains Used for the Challenge Tests”) or not inoculated, covered with a low-density polyethylene film and stored at 10°C or 4°C for 3 and 5 or 7 days with the aim of obtaining fish samples with six different levels of histamine in a range between zero and approximately 500 ppm (Table 4). For the analyses the slices were homogenized (aseptically) in a household cutter (Moulinette; Moulinex, Paris, France). The 5-g aliquots were weighted in vessel cleaned with ethanol, rinsed with sterile water and dried in a laminar flow cabinet. The subsamples were analyzed for histamine by the biosensor ( $n = 6$ ) and HPLC ( $n = 6$ ) and for the quantitative detection of *Morganella* spp. and *Photobacterium phosphoreum* ( $n = 2$ ). The 5-g subsamples intended for the analysis with biosensor were diluted (1:10) with phosphate buffer and processed like the bacterial cultures (section “Extraction of Histamine From Bacterial Cultures and Recovery Tests”). The preparation method for HPLC analysis included homogenization of the 5-g subsamples with 60 ml trichloroacetic acid 10% w/v, 2 ml 6N HCl and 4 ml n-heptane, centrifugation at 4000 rpm for 15 min and pre-column derivatization of supernatant with o-phthalaldehyde (OPA). A fluorescence detection system was used; excitation was set at 350 nm and emission was read at 450 nm (EN ISO 19343, 2017). The method also uses

1,7-diaminoheptane internal standard (IS). Quantification of histamine was performed by calculating each response factor against IS and using a calibration curve. LOQ value was 10 µg/g. Detection of other biogenic amines was not considered by the validated method used in this study.

### Bacterial Strains Used for the Challenge Tests

Five strains of *Morganella psychrotolerans*, isolated from different lots of European anchovy (1 strain), European pilchard (2 strains), Atlantic herring (1 strain) and Yellowfin tuna (1 strain) were used (Costanza et al., 2013). All strains were characterized with biochemical tests, are able to grow on ice-cooled fish filets (≈2°C) (Emborg et al., 2006) and were PCR-positive for the gene *vasD*, specific of the Type VI secretion system of *M. psychrotolerans* (Poddeur et al., 2015). In addition, all strains proved to be strong histamine producers in HD broth (approx. 3000 ppm at 20°C in 48 h) (see section “Methods for Detection of Histamine-Producing Bacteria”). The strains were grown in HD broth at 4°C for 4 days and diluted with the same broth to an optical density of approximately 0.39 at 540 nm (≈ 10<sup>8</sup> CFU/ml). Then they were mixed together and used to inoculate fish samples (1:10 dilution or undiluted).

### Statistical Analysis and Bioanalytical Method Validation

Regression analysis was used to evaluate the linearity of the histamine detection by biosensor in HD broth cultures. The statistical data analysis tools included in Microsoft Excel (Excel 2010, Microsoft, United States) were used for this purpose. The linearity was assessed by visual evaluation of a plot of the difference response ratio versus the respective concentration level. The response function of the calibration curves for histamine in broth cultures (recovery tests) and tuna (challenge tests) was measured by using five calibration standards run in triplicate. The target back-calculated concentrations of the calibration standards have to be within 20% of the nominal value. A calibration check sample spiked at 5 µg/ml was analyzed prior to each batch of analytes being run. Accuracy and repeatability (intra-assay precision) were determined using the spike recovery method. Within-run and between-run accuracy were estimated by analyzing five samples per level at five concentration levels with three runs analyzed in different days. The criteria for acceptability of the data included accuracy and precision within ± 15% deviation (DEV) from the nominal values and precision within 15% relative standard deviation (RSD). The Limit of detection (LOD) was calculated as the concentration corresponding to three times the blank standard deviation and also according to the 3 sb/m criteria, where m is the slope of the linear portion in the calibration graph, and sb was estimated as the standard deviation of the amperometric signals measured (European Medicines Agency [EMA], 2012). Linear regression was used to define the relationship between the concentration of histamine detected by biosensor and HPLC. Regression confidence intervals for the mean concentration were calculated for each sample and the equivalence of results of the two methods

was assessed using Bland-Altman diagram for evaluating inter-rater agreement on a continuous scale (Giavarina, 2015) and analysis of the covariance of estimates.

## RESULTS

### Detection of HPB in Tuna Samples

Histamine-producing bacteria were detected in the eight lots of tuna analyzed (Table 1). A high attention was given to test all suspect isolates due to the fact that high histamine concentrations were detected in the enriched samples. *Morganella psychrotolerans* and *Photobacterium phosphoreum* were the HPB most frequently detected, but the second was detected only in the vacuum-packed tuna steaks. Some isolated colonies of *P. phosphoreum* that produced low amount of histamine at 20°C in 2 days, proved to grow better at 4°C. All other strains were able to grow at 4°C, even if their growth rate was not assessed. The presence of the histidine decarboxylase gene (HDC) was detected by PCR in all the strains using the primers designed by De Las Rivas et al. (2006) according to the conserved region from various Gram- HPB, but amplification was very weak with the *P. damsela* strain that produced good amplification levels by using primers that were

designed specifically for this species by Trevisani et al. (2017). The *M. psychrotolerans* strains were isolated in two samples from either VRBGA and TCBS.

### Recovery of Histamine From Broth Cultures

A fundamental challenge in the development of enzyme-modified screen-printed electrodes for assay of histamine is to ensure a high reproducibility from sensor to sensor and the possibility to perform accurate measurements with many samples without significant loss of sensitivity. The results of precision and accuracy of the biosensor-based method are reported in the Table 2. The greatest degree of accuracy was obtained with histamine concentration higher than 5,000 µg/g (500 µg/ml). In the concentration range 497–1991 µg/g (≈50 to 199 µg/ml) the differences between spiked and measured concentrations of histamine were relatively low (mean bias –12.69 to –6.65 percent) but significant.

Table 3 reports the parameters of calibration curves of the two modified screen-printed electrodes used for the recovery tests. The values of slope and intercept were very close and the coefficients of determinations (*r*-squared) indicated that regression predictions perfectly fit the data. The amperometric response was also verified at every run using check standards

TABLE 1 | Histamine-producing bacteria isolated from fresh tuna filets and histamine level after 7 days of storage on ice.

Lot	Histamine detected by biosensor			Species	PCR	
	Culture (µg/ml) <sup>a</sup>	Tuna 7 days (µg/g) <sup>b</sup>	Strain (µg/ml) <sup>c</sup>		id genes <sup>d</sup>	HDC <sup>e</sup>
Feb 21	5,920	24	8,473 <sup>rt</sup>	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k–	+
Mar 7	5,770	18	6,518 <sup>rt</sup>	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k–	+
Mar 13	7,880	<LOD	8,506 <sup>rt</sup>	<i>P. damsela</i>		±*
Apr 4	11,046	60	8,212 <sup>rt</sup> 368 <sup>rt</sup> 7,312 <sup>rt</sup>	<i>K. oxytoca</i> <i>H. alvei</i> <i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k–	++ +
May 2	1,169	20	88 <sup>rt</sup> ; 332 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jun 23	2,216	<LOD	412 <sup>rt</sup> ; 250 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jul 7	1,451	na	17 <sup>rt</sup> ; 316 <sup>ct</sup>	<i>P. phosphoreum</i>	gyrB	+
Jul 15	na	na	na	<i>M. psychrotolerans</i>	Vas +, Gal k–	+

<sup>a</sup> histamine produced by sample homogenates enriched in HD broth at 20°C, 3 days. <sup>b</sup> histamine in tuna samples stored at <4°C for 7 days. <sup>c</sup> histamine produced by isolated colonies enriched in HD broth at 20°C, 2 days (rt) or 4°C, 5 days (ct). <sup>d</sup> PCR identification test *M. psychrotolerans* (Poddeur et al., 2015) and *P. phosphoreum* (Macé et al., 2013). *P. damsela*, *K. oxytoca* and *H. alvei* were identified on the basis of biochemical tests (API 20e and API 20ne). <sup>e</sup> PCR test for HDC gene of Gram-bacteria (De Las Rivas et al., 2006) or specific of *P. damsela* subsp. *damsela*\* (Trevisani et al., 2017). na, not assessed; <LOD, below the limit of detection.

TABLE 2 | Precision and accuracy summary table of the method for the quantitative detection of histamine in the enriched broth cultures.

N		Nominal concentration				
		15	15	15	15	15
Spiked <sup>a</sup>	Mean (µg/g) ± SD	496.82 ± 1.69	993.17 ± 4.78	1990.67 ± 7.33	4973.68 ± 16.10	9930.49 ± 36.31
Detected <sup>b</sup>	Mean (µg/g) ± SD	433.78 ± 16.60	913.50 ± 38.88	1858.28 ± 67.79	4892.79 ± 188.69	10085.79 ± 385.65
Precision	Within-run RSD	9.95%	5.97%	4.85%	7.08%	7.26%
	Between-run RSD	9.93%	4.68%	6.00%	9.98%	9.91%
Accuracy	Mean Bias	–12.69%	–8.02%	–6.65%	–1.62%	1.63%
	RMSE	8.82%	4.40%	5.63%	11.11%	10.20%
	Significance <i>t</i> -test	<0.0001	0.00973	0.0116	0.393	0.402

<sup>a</sup> amount spiked in 2-g tuna samples that were homogenized in HD broth; <sup>b</sup> values calculated according to the dilution factors.

**TABLE 3** | Calibration curve equations and uncertainty in the regression analysis for the histamine determination in enriched broth cultures of the two m-SPE (A and B) used for the recovery tests.

m-SPE	Equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	S <sub>m</sub>	S <sub>b</sub>	S <sub>y,x</sub>	LOD <sup>c</sup>	Check standard 5 μg/ml <sup>b</sup>	
							MBE%	RMSE%
A	$y = -14.31x + 6.56$	0.996	0.55	3.62	3.46	0.11	-2.83%	11.27%
B	$y = -11.81x + 6.00$	1.000	0.30	2.00	1.91	0.11	4.91%	11.83%

<sup>a</sup> nA vs. concentration (μg/ml); <sup>b</sup> calibration check standard measured at each run; <sup>c</sup> calculated as the concentration corresponding to three times the blank standard deviation (μg/ml).

(5 μg/ml). The measurements were within 20% of the true value, with RDS of less than 12%. All measurements that were required to assess the recovery from broth cultures ( $n = 225$ ) and for the calibration curves ( $n = 18$ ) were made with only two enzyme electrodes, without loss in sensitivity. The sensitivity of the assembled bi-enzymatic electrodes was good in the range 1.31–1.59 μA/mM (11.81–14.31 nA/μg/ml) with a linear range from 2 to 20 μg/ml and detection limit (LOD) 0.11 μg/ml (Table 3). This LOD value is actually 10×, because samples have to be diluted (1:10). The LOD calculated according to the 3 sb/m criteria for the two electrodes was 1.31 and 1.59 μg/ml.

## Detection of Histamine and HPB in Tuna Samples

Histamine content was assessed in tuna samples stored at <4°C for 7 days (Table 1). The level was always low or below the level of detection, with a maximum of 60 μg/g. One aim of the protocol was to obtain fish samples with six different levels of histamine. Table 4 reports the counts of *M. psychrotolerans* and *P. phosphoreum* in the inoculated and control samples and the levels of histamine measured in these samples using HPLC and the biosensor-based method. Both methods provided similar analytical results in the concentration range 0–432 μg/g. At higher concentrations the biosensor-based method overestimated the concentration of histamine in the samples. It should be noted that heat-induced coagulation of the soluble proteins produced a gel in the soluble phase that must be discarded before diluting the supernatant in PBS-Med to avoid

interferences (data not-reported). The biosensor that was used for this validation test did not showed significant loss of sensitivity after 1 month. The sensitivity, 0.653 μA/mM, was good. Its stability was evaluated periodically during this time by measuring the response toward histamine check standard (5 μg/ml) at each run in four different days over a 74-days period demonstrating excellent stability, since the signal decreased by only 10.8% (from 25.34 to 22.61 μA, RSD = 7.89%). The most common problem that required to renew the enzyme electrode was the detachment of the BSA-glutaraldehyde membrane that occurred after extended repeated use, with the enzyme electrodes stored at 4°C and immersed in phosphate buffer solution when not in use.

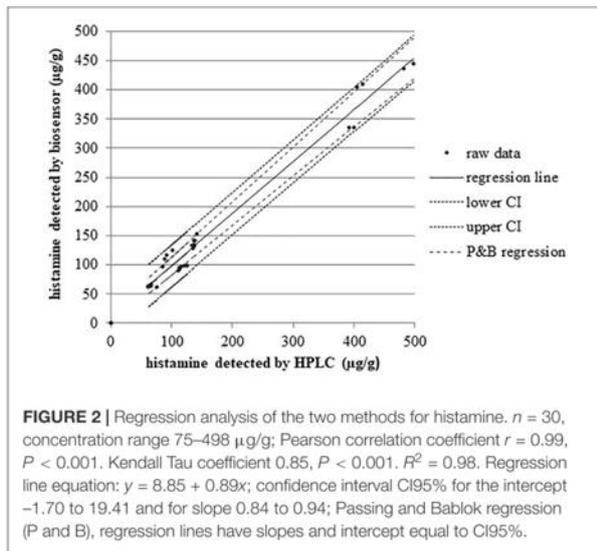
Figure 2 displays a scatterplot of the histamine levels measured with both methods in the concentration range 75–498 μg/g ( $n = 6$  replicates). The correlation coefficient between the two methods is  $r = 0.990$  (95% confidence interval, CI = 0.980–0.995,  $P < 0.001$ ), and the regression equation is  $y = 8.85 (-1.70 \text{ to } 19.41) + 0.89 (0.84 \text{ to } 0.94) x$ ; that could be evaluated as a very good agreement, with the slope coefficient indicating a relative low underestimation by biosensor. The inter-rater agreement and the Bland-Altman diagram (difference plot) between HPLC and biosensor assays are displayed in the Figure 3.

Histamine was detected in either the inoculated and non-inoculated samples. The natural background microflora of the samples, other than the inoculated *M. psychrotolerans* strains, contributed to produce histamine. The microbiological analyses revealed the presence of *P. phosphoreum* (luminescent strains) in the lots Jul 7 and Jul 15 and *M. psychrotolerans* in the lot Jul 15. Their histamine-producing potential was demonstrated

**TABLE 4** | Levels of histamine (μg/g) and numbers of *M. psychrotolerans* and *P. phosphoreum* (mean ± SD) detected in inoculated and non-inoculated tuna samples at different days of storage.

Inoculum log CFU/g	Storage°C, days	Lot	Histamine (μg/g)		Count (log CFU/g)	
			HPLC	Biosensor	<i>M. psychrotolerans</i>	<i>P. phosphoreum</i>
Non-inoculated	<4°C, 3 days	Jun 23	<LOD	<LOD	ND	NL-NC
	10°C, 3 days	Jul 15	66 ± 5	63 ± 2	3.99 ± 0.10	4.74 ± 0.18
	<4°C, 7 days	Jul 15	107 ± 23	119 ± 15	2.00 ± 0.08	ND
	10°C, 5 days	Jul 7	116 ± 6	95 ± 4	ND	5.05 ± 0.12
3.4 ± 2.6	10°C, 3 days	Jun 23	138 ± 2	138 ± 9	5.72 ± 0.21	5.10 ± 0.19
3.4 ± 2.6	10°C, 7 days	Jun 23	432 ± 46	395 ± 49	7.72 ± 0.02	TNTC
4.4 ± 3.6	10°C, 7 days	Jun 23	517 ± 32 <sup>a</sup>	753 ± 52 <sup>b</sup>	7.69 ± 0.08	TNTC

Histamine values with different superscript in the same row are significantly different; TNTC, too numerous to count at the dilution 10<sup>-3</sup>, confluent growth tested positive for *gyrB* gene of *P. phosphoreum* by PCR. NL-NC, non-luminescent colonies too numerous to count at the dilution 10<sup>-3</sup>; ND, not detected at the dilution 10<sup>-1</sup>.

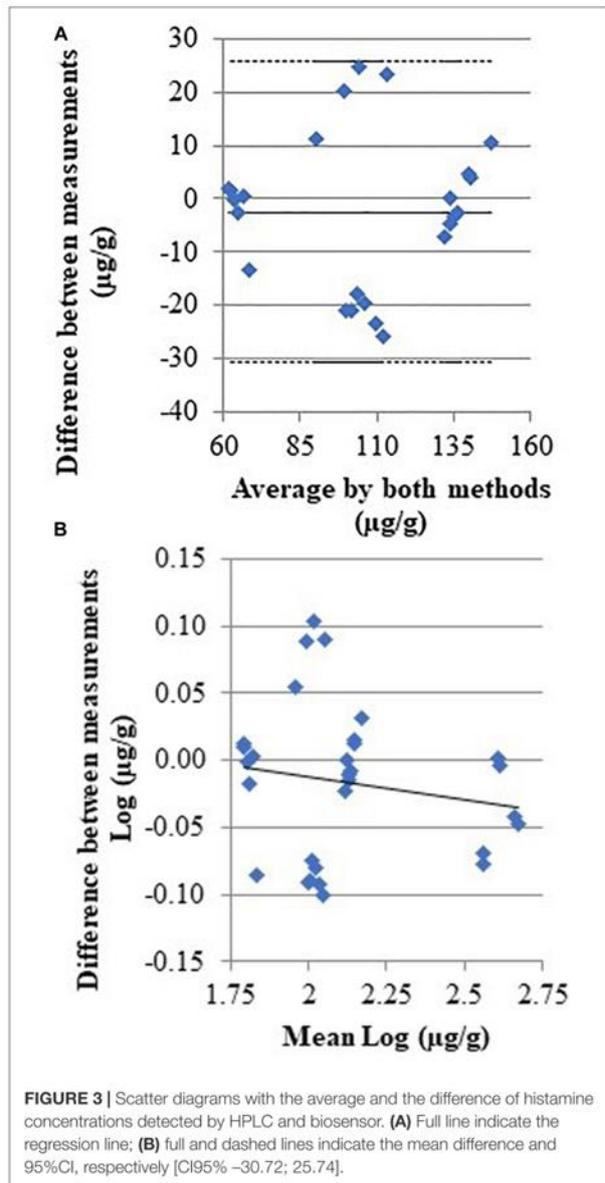


in the HD broth cultures, where the concentration of histamine in the non-inoculated samples of lots Jun 23, Jul 7, and Jul 15 was 2216, 1451, and 849  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, after incubation at  $10^\circ\text{C}$  for 3 days.

## DISCUSSION

### The Analytical Device

The results of a screening test that revealed the presence of strong HPB in HD broth and this was undoubtedly a good reason to look carefully to their presence using specific culture methods. The enzymatic biosensor was also useful to assess their histidine decarboxylase activity. The presence of high concentration of histamine in HD broth inoculated with tuna samples unequivocally indicated that they were contaminated with strong HPB and or that their number was high. The enzymatic biosensor presents some advantages over other methods that are used for screening, such as the conductimetric method developed by Klausen and Huss (1987). The conductimetric method is specific for some microbial species and requires a microbiological impedance analyzer (Bjornsdottir et al., 2009) that is more expensive than a portable amperometer connected to a personal computer. The histamine biosensor has a superior versatility because it can be used to measure also the histamine content in tuna samples as described in this study. All this data provides information to the Food Business Operators that have to decide on the shelf life, best management practices and have to evaluate the suppliers. The amperometric biosensor used in this study is a “second generation electrochemical biosensor.” Third generation biosensors involve immobilized mediators, acting as non-diffusion redox relay stations, effectively facilitating the transport of electrons from the enzyme active site to the electrode (Putzbach and Ronkainen, 2013). These sensors are required especially for *in vivo* measurements, because



mediators do not escape the active layer immobilized on the electrodes and has been developed also for histamine detection, providing faster and higher current response and response (Pérez et al., 2013; Apetrei and Apetrei, 2016). The mediator-free sensor developed by Pérez et al. (2013) for example required 3 min to reach a stable steady state current, while it was 500 s ( $\approx 8$  min) in this study. The sensitivity of the mediator-free sensor also superior (1.31–1.53 vs. 19  $\mu\text{A/mM}$ ), but both methods are fit for the purpose, since the range of measurements required for histamine detection in fresh tuna is between  $\approx 10$  (LOD of the reference method) and 100 mg/kg. It should be noted also that small changes in the sensitivity

of biosensors can be observed as a consequence of the BSA-glutaraldehyde cross-linking (in this study) or other enzyme and mediator immobilization methods, thus calibration curves have to be calculated for every biosensor (i.e., for accurate measurements) unless the biosensor production methods are highly standardized. The principal interfering compounds (i.e., substances that produce noticeable amperometric response) that can affect measurements using DAO-HRP based electrodes in tuna samples include other biogenic amines that can be produced as a result of microbial contamination and inadequate storage conditions (Biji et al., 2016). Recently a commercial enzymatic biosensor for histamine detection in fish and fishery products (Biofish-300, Biolan, Zamudio, Spain) obtained AOAC certification (Salleres et al., 2016).

Even if enzymatic methods are specific, other biogenic amines, such as cadaverine and tyramine and especially putrescine, can interfere with histamine biosensors that are based on the diamine oxidase activity (Lange and Wittmann, 2002). Putrescine and cadaverine are produced through decarboxylation of free ornithine and lysine by the exogenous decarboxylase enzymes released by microorganisms associated with seafood (Biji et al., 2016; Comas-Basté et al., 2019). While all biogenic amines were formed in tuna during storage conditions (Rossi et al., 2002; Visciano et al., 2014) and contribute to histamine intoxication, their accumulation is much more related with spoilage. The differences observed in this study between the results of HPLC and biosensor method concerning the sample stored at 10°C for 7 days (Table 4 and Figure 3) might be due to the presence of other biogenic amines. Currently the only biogenic amine for which the maximum limits have been set in the EU and United States is histamine because of its toxicological effects. The official HPLC method for histamine detection used in this study, therefore, did not consider the use of standards for the quantification of other biogenic amines.

Biogenic amine formation in fish is correlated with the growth of microbial strains with high proteolytic enzyme activity, hence the control of biogenic amine formation is mainly focused on controlling the growth of biogenic amines forming bacteria (Gardini et al., 2016). Freshly caught scombrototoxin forming fish typically contain histamine level less than 2 mg/kg (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization [FAO/WHO], 2013). In a study of Afsharmanesh et al. (2011) the maximum mean concentration of putrescine, cadaverine and histamine in *Thunnus albacares* stored in ice on-board to catch vessels were 23.39, 12.37, and 4.30 µg/g, respectively. A value of 50 µg/g for the sum of histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine, which was not exceeded in samples stored at 0°C before organoleptic rejection, was proposed as a guiding limit value for tuna acceptance (Visciano et al., 2012). A value that was higher of this “guiding limit” (60 µg/g) was detected by the histamine biosensor in a tuna sample stored on ice for 7 days, which also had the highest content of histamine detected in enriched HD broth (11,046 µg/g) and was found contaminated by different species of strong HPB, namely *M. psychrotolerans* and *K. oxytoca*.

A histamine biosensor may be also useful to detect also the activity of histidine decarboxylase that has been formed before tuna are frozen, which remains stable in frozen fish and can be reactivated after thawing (Visciano et al., 2014). In de-frozen fish, the number of viable bacteria can be reduced without affecting the activity of the enzyme that has been released into the flesh (Kanki et al., 2007; Economou et al., 2016), thus the measurement of HDC activity in the fish samples might be not always directly correlated with the number of HPB. More recently a histamine amperometric biosensor that is based on the use of antibody-antigen interaction (immunosensor) was developed to provide higher specificity (Dong et al., 2017). Nevertheless, due to the histamine low molecular weight, simple structure and thus low immunogenicity production of high specificity and affinity antibodies is difficult, significant interference with putrescine were reported and only two of the six commercial antibodies tested in a study by Mattsson et al. (2017) bound the histamine free in the solution. Therefore, due to the possible “interferences,” biosensors cannot be used as methods for histamine detection in official controls.

### Detection of HPB and Assessment of Their Activity

With regard to histamine detection in tuna samples, the within-group variance observed in the samples analyzed with the same method was relatively small, but was larger in the samples stored for 5 and 7 days (Table 4). This could be a consequence of differences in the growth rates and decarboxylase activity of HPB that occurred.

All the fresh yellowfin tuna filets used in the comparative tests were found contaminated by either *P. phosphoreum* or *M. psychrotolerans*. The non-inoculated samples of two different lots (Jul 7 and 15) had histamine concentrations equivalent to the legal limit of 100 mg/kg after storage at 10°C for 5 days and 4°C for 7 days, respectively. Notably, the not inoculated aliquots of the lot Jun 23 had undetectable level of histamine after 3 days of storage at 10°C, while its level have reached values > 100 mg/kg at the same storage conditions in the aliquot that was inoculated with 3.4 log CFU/g of *M. psychrotolerans*. It was observed also that luminescence of very small colonies of *P. phosphoreum* can be undetectable in the Marine Agar plates. Non-luminescent strains of *P. phosphoreum* has been also reported (Flodgaard et al., 2005). The inoculated samples that were stored at 10°C accumulated histamine reaching concentrations above the legal limit in 3 days and levels higher than 400 mg/kg in 1 week. The number of HPB could be estimated by measurement of their decarboxylase activity in HD broth, but the species that are psychrotolerant, such as *M. psychrotolerans* and *P. phosphoreum*, have different growth rates at the temperatures that are used for the storage of fish (i.e., -1 to 4°C) and at the temperatures that are normally used to measure their histamine-producing ability (i.e., 10 to 25°C) (Morii and Kasama, 2004; Emborg and Dalgaard, 2008; European Food Safety Authority [EFSA], 2015). For example, at 15°C the growth rates of *M. morgani*

(mesophilic) and *M. psychrotolerans* are similar and 15°C is also the optimal growth temperature for *P. phosphoreum* (Budsberg et al., 2003). Consequently, specific studies are needed to define the most appropriate temperatures for shelf life evaluation of tuna under appropriate storage temperature conditions. PCR methods that are specific for the most relevant bacteria have been also developed with the aim of detecting quantitatively HPB (Macé et al., 2013; Pondeur et al., 2015), but they are also too complex for the scope of the safety management in the fish industries.

## CONCLUSION

This study showed that the presence of microbial species that are strong histamine-producers is very common in fresh tuna. The ability of enzymatic amperometric biosensor to detect histamine, combined with phosphate buffer extraction under high temperature and pressure, allowed the development of a simple, rapid, and relatively inexpensive method to measure histamine. The histamine biosensor can be used by the Food Business Operators as a screening tool to monitor the microbial contamination in incoming batches of tuna and to make sure that their operations are designed to meet the prescribed Food Safety Objective.

## REFERENCES

- Afsharmanesh, S. H., Peighambari, S. Y., Shabanpure, B., and Daraei Garmakhany, A. (2011). Biogenic amines production during ice storage in whole yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) on-board of catch vessels. *Minerva Biotechnol.* 23, 59–63.
- Apetrei, I. M., and Apetrei, C. (2016). Amperometric biosensor based on diamine oxidase/platinum nanoparticles/graphene/chitosan modified screen-printed carbon electrode for histamine detection. *Sensors* 16:422. doi: 10.3390/s16040422
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres Sáez, R. G., Rodriguez, R. C., and Fernandez-Lafuente, R. (2014). ChemInform abstract: glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *ChemInform.* 45. doi: 10.1002/chin.201421290
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., and Srinivasa Gopal, T. K. (2016). Biogenic amines in seafood: a review. *J. Food Sci. Technol.* 53, 2210–2218. doi: 10.1007/s13197-016-2224-x
- Bjornsdottir, K., Bolton, G. E., McClellan-Green, P. D., Jaykus, L. A., and Green, D. P. (2009). Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *J. Food Prot.* 72, 1987–1991. doi: 10.4315/0362-028x-72.9.1987
- Budsberg, K. J., Wimpee, C. F., and Braddock, J. F. (2003). Isolation and identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migrating salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6938–6942. doi: 10.1128/AEM.69.11.6938-6942.2003
- Cantoni, C. (2008). Sistematica dei batteri produttori di istamina nelle carni di pesce. *Il Pesce* 6, 115–119.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-Carou, M. C. (2019). *Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*. Rijeka: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.84333
- European Commission Regulation (EC) No 2073, (2005). On microbiological criteria for foodstuffs. *OJEU L* 338, 1–26.
- Costanza, C., Cecchini, M., Mancusi, R., Mosso, A., Giani, G., and Rosmini, R. (2013). Evaluation and identification of histamine-forming bacteria on fish products of middle Adriatic Sea. *Ital. J. Food Saf.* 2:e7. doi: 10.4081/ijfs.2013.944

## DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MT conceived and designed the study and wrote the manuscript. MC, RM, MT, AC, and GF performed the experiments. All authors discussed the experiment results and reviewed the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the University of Bologna (Oriented Fundamental Research fund, RFO).

## ACKNOWLEDGMENTS

MT is grateful for the financial support received from the University of Bologna that allowed the training of MC at the Surface Engineering Precision Institute, Cranfield University.

- De Las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A. V., and Muñoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69, 2509–2514. doi: 10.4315/0362-028X-69.10.2509
- Dong, X. X., Yang, J. Y., Luo, L., Zhanga, Y. F., Mao, C., Sun, Y. M., et al. (2017). Portable amperometric immunosensor for histamine detection using Prussian blue-chitosan-gold nanoparticle nanocomposite films. *Biosens. Bioelectron.* 98, 305–309. doi: 10.1016/j.bios.2017.07.014
- Duflos, G., Inglebert, G., Himber, C., Degremont, S., Lombard, B., and Brisabois, A. (2018). Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography. *Int. J. Food Microbiol.* 288, 97–101. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.023
- Economou, V., Gousia, P., Kemenetzi, D., Sakkas, H., and Papadopoulou, C. (2016). Microbial quality and histamine producing microflora analysis of the ice used for fish preservation. *J. Food Saf.* 37, 1–8. doi: 10.1111/jfs.12285
- Emborg, J., and Dalgaard, P. (2008). Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morgani* - development and evaluation of predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 234–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.015
- Emborg, J., Dalgaard, P., and Ahrens, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2473–2479. doi: 10.1099/ijfs.0.64357-0
- Emborg, J., and Dalgaard, P. A. W. (2006). Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *J. Food Prot.* 69, 897–906. doi: 10.4315/0362-028x-69.4.897
- EN ISO 19343 (2017). *Microbiology of the Food Chain – Detection and Quantification of Histamine in Fish and Fishery Products – HPLC Method, (TAG 11) of CEN/TC 275/WG 6*. Geneva: International Organization for Standardization.
- European Food Safety Authority [EFSA] (2015). Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level. *EFSA J.* 13:4162. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4162

- European Food Safety Authority [EFSA] (2017). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. *EFSA Support. Publ.* 14:EN-1301. doi: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301
- European Medicines Agency [EMA] (2012). *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. Available at: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf) (accessed July 21, 2011).
- FDA (2011). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. 4th Edn. Available at: <https://www.fda.gov/food/seafood-guidance-documents-regulatory-information/fish-and-fishery-products-hazards-and-controls-guidance-4th-edition> (accessed April 20, 2019).
- Flodgaard, L. R., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M., Gram, L., et al. (2005). Nonbioluminescent strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the cell-to-cell communication signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2113–2120. doi: 10.1128/AEM.71.4.2113
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization [FAO/WHO] (2013). *Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Geneva: World Health Organization.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., and Özogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Front. Microbiol.* 7:1218. doi: 10.3389/fmicb.2016.01218
- Giavarina, D. (2015). Lessons in biostatistics. *Biochem. Med.* 25, 141–151. doi: 10.11613/BM.2013.003
- Gonzaga, V. E., Lescano, A. G., Huamán, A. A., Salmón- Mulanovich, G., and Blazes, D. L. (2009). NIH public access. *J. Food Prot.* 72, 1112–1115. doi: 10.1007/s10439-011-0452-9.Engineering
- Hayat, A., and Marty, J. L. (2014). Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring. *Sensors* 14, 10432–10453. doi: 10.3390/s140610432
- Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., and Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 79–87. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.019
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., and Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1467–1473. doi: 10.1128/AEM.01907-06
- Kaufmann, A., and Maden, K. (2018). Easy and fast method for the determination of biogenic amines in fish and fish products with liquid chromatography coupled to orbitrap tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 101, 336–341. doi: 10.5740/jaoacint.17-0407
- Klausen, N. K., and Huss, H. H. (1987). A rapid method for detection of histamine-producing bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 137–146. doi: 10.1016/0168-1605(87)90031-6
- Landete, J. M., De las Rivas, B., Marcobal, A., and Muñoz, R. (2008). Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 697–714. doi: 10.1080/10408390701639041
- Lange, J., and Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 276–283. doi: 10.1007/s00216-001-1130-9
- Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J. J., Dalgaard, P., et al. (2013). Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2612–2619. doi: 10.1128/AEM.03677-12
- Martini, S., Al Ali, B., Garel, M., Nerini, D., Grossi, V., Pacton, M., et al. (2013). Effects of hydrostatic pressure on growth and luminescence of a moderately-piezophilic luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200. *PLoS One* 8:e66580. doi: 10.1371/journal.pone.0066580
- Mattsson, L., Doppler, S., and Preininger, C. (2017). Challenges in developing a biochip for intact histamine using commercial antibodies. *Chemosensors* 5:33. doi: 10.3390/chemosensors5040033
- McDonald, C., Parkin, J., Richardson, C., Sweidan, M., Lonergan, D., Chan, C., et al. (1990). Stability of solutions of histamine acid phosphate after sterilization by heating in an autoclave. *J. Clin. Pharm. Ther.* 15, 41–44. doi: 10.1111/j.1365-2710.1990.tb00354.x
- Morii, H., and Kasama, K. (2004). Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations. *J. Food Prot.* 67, 1736–1742. doi: 10.4315/0362-028X-67.8.1736
- Niraj, M. M. G., and Pandey, S. (2012). Histamine biosensor: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 4158–4168.
- Pérez, S., Bartolí, J., and Fàbregas, E. (2013). Amperometric biosensor for the determination of histamine in fish samples. *Food Chem.* 141, 4066–4072. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.125
- Podeur, G., Dalgaard, P., Leroi, F., Prévost, H., Emborg, J., Martinussen, J., et al. (2015). Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 55–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.005
- Pratter, M. R., Marwaha, R. K., Irwin, R. S., Johnson, B. F., and Curley, F. J. (1985). Stability of stored histamine diphosphate solutions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 1130–1131.
- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28, 1547–1560. doi: 10.1080/19440049.2011.600728
- Putzbach, W., and Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors* 13, 4811–4840. doi: 10.3390/s130404811
- Rossi, S., Lee, C., Ellis, P. C., and Pivarnik, L. F. (2002). Biogenic amines formation in Bigeye tuna steaks and whole Skipjack tuna. *J. Food Sci.* 67, 2056–2060. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09500.x
- Salleres, S., González, I., Arantzamendi, A., González, R., Maza, S., Jaureguibeitia, A., et al. (2016). Validation of the biofish-300 HIS enzymatic biosensor for the detection of histamine in fishery products. *J. AOAC* 99, 1338–1355. doi: 10.5740/jaoacint.16-0180
- Tombelli, S., and Mascini, M. (1998). Electrochemical biosensors for biogenic amines - a comparison between different approaches. *Anal. Chim. Acta* 358, 277–285.
- Trevisani, M., Mancusi, R., Cecchini, M., Costanza, C., and Prearo, M. (2017). Detection and characterization of histamine-producing strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from mullets. *Vet. Sci.* 4:31. doi: 10.3390/vetsci4020031
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front. Microbiol.* 3:188. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2014). Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front. Microbiol.* 5:500. doi: 10.3389/fmicb.2014.00500

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer GT declared a shared affiliation, with no collaboration, with several of the authors, MT, MC, AC, and RM, to the handling Editor at the time of review.

Copyright © 2019 Trevisani, Cecchini, Fedrizzi, Corradini, Mancusi and Tothill. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **ALL: 2 Pubblicazioni scientifiche (II)**

### **Abstract**

#### **A Rapid Enzyme-Linked Immunomagnetic Electrochemical (ELIME) Assay for the Detection of *Escherichia coli* O26 in Raw Milk**

Alessandra Corradini<sup>1</sup>, Matilde Cecchini<sup>1</sup>, Marcello Trevisani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, 40064 Bologna, Italy

In this work, we present a magnetic bead-based immunosensors for the determination of *Escherichia coli* O26 in milk. The assay uses commercial Dynabeads® for the capture of the target bacteria from 6-h enrichment broth and horseradish peroxidase-labelled polyclonal antibodies and detection of the peroxidase activity by chronoamperometry. Bovine seroalbumin was used as blocking reagent for reducing the binding of non-specific antibodies to the beads and/or other bacteria. The effectiveness of the enzyme-linked immunomagnetic electrochemical (ELIME) assay to detect low number of *E. coli* O26 in milk was demonstrated using spiked milk samples from five different lots with concentrations of 9.00–18.80 or 0.90–1.88 CFU in 25 mL. Three repetitions for each concentration were analysed in parallel also by real-time PCR following the standard method ISO/TS 13136:2012, using 24-h enriched cultures. Results demonstrated that the ELIME assay can reduce the time for analyses to one working day and produce reliable results that can be confirmed by overnight cultures of the beads-bacteria complexes allowing further characterization of the virulence, including the presence of Shiga toxin-encoding genes, which is important to discriminate the enterohaemorrhagic strains.



# A Rapid Enzyme-Linked Immunomagnetic Electrochemical (ELIME) Assay for the Detection of *Escherichia coli* O26 in Raw Milk

Alessandra Corradini<sup>1</sup> · Matilde Cecchini<sup>1</sup> · Marcello Trevisani<sup>1</sup>

Received: 24 January 2020 / Accepted: 12 April 2020 / Published online: 2 May 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

## Abstract

In this work, we present a magnetic bead-based immunosensors for the determination of *Escherichia coli* O26 in milk. The assay uses commercial Dynabeads® for the capture of the target bacteria from 6-h enrichment broth and horseradish peroxidase-labelled polyclonal antibodies and detection of the peroxidase activity by chronoamperometry. Bovine serum albumin was used as blocking reagent for reducing the binding of non-specific antibodies to the beads and/or other bacteria. The effectiveness of the enzyme-linked immunomagnetic electrochemical (ELIME) assay to detect low number of *E. coli* O26 in milk was demonstrated using spiked milk samples from five different lots with concentrations of 9.00–18.80 or 0.90–1.88 CFU in 25 mL. Three repetitions for each concentration were analysed in parallel also by real-time PCR following the standard method ISO/TS 13136:2012, using 24-h enriched cultures. Results demonstrated that the ELIME assay can reduce the time for analyses to one working day and produce reliable results that can be confirmed by overnight cultures of the beads-bacteria complexes allowing further characterization of the virulence, including the presence of Shiga toxin-encoding genes, which is important to discriminate the enterohaemorrhagic strains.

**Keywords** *Escherichia coli* O26 · Raw milk · Immunosensor · Immunomagnetic beads · EHEC

## Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are zoonotic agents that have an important impact on human health; they may cause haemorrhagic diarrhoea or haemolytic uremic syndrome, especially in children. Reporting of STEC O26 infections has been steadily increasing in the EU since 2007 (both in human and food samples) recent outbreaks of serogroup O26 emphasize an emerging risk of infection associated with milk products (ECDC 2018; Severi et al. 2016; Germinario et al. 2016). The inability to ferment sorbitol or to produce β-glucuronidase, along with resistance to tellurite, facilitates the detection and identification of STEC O157:H7 on selective media (Schutz et al. 2017) and a culture-based detection method, along with real-time PCR (RTi-PCR), is the reference method for the detection of STEC and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups (ISO 2012). PCR detection of genes encoding Shiga toxins and intimins

effectively differentiates enterohaemorrhagic (EHEC) and non-pathogenic strains. To confirm the presence of EHEC in the samples that test positive using PCR screening test or immunoassays, the positive enrichment should be confirmed by detection of pathogenic strains using culture methods (Cordonnier et al. 2017). A review of the microbiological methods for the detection and characterization of human pathogenic STEC in animals and food is ongoing at the EFSA Scientific Panel on Biological Hazards (EFSA 2018). Accurate and rapid methods for the detection of the most common EHEC in foods at high risk like raw milk and derivatives that are not aged and/or pasteurized is urgent. Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and paramagnetic beads can be used in combination to obtain immunosensors able to detect different bacteria (Zhao et al. 2014; Xu et al. 2016; Mendonça et al. 2012). In this study, we have combined a specific immunomagnetic-concentration technique for the serogroup O26 with an electrochemical immunosensor based on horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-*E. coli* O26 antibodies for the detection of *E. coli* O26 in raw milk. In the presence of the target microorganisms, sandwich immunocomplexes were attracted on the surface of SPCEs by a magnet and the HRP activity was measured using a portable amperometric detector. A contamination level of 1 CFU/

✉ Marcello Trevisani  
marcello.trevisani@unibo.it

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, 40064 Bologna, Italy

25 mL was chosen in order to comply with the Italian regulatory limits for raw milk sold directly to consumers which require absence in 25 mL. The sensitivity and specificity of the ELIME assay were also determined using artificially inoculated and non-inoculated raw milk samples taken at different raw milk vending machines that were analysed using the ISO/TS 13136:2012 RTi-PCR-based method for the detection of STEC and the serogroups.

## Materials and Methods

The amperometric measurements were made with a portable BiPotentiostat/Galvanostat  $\mu$ Stat 400 from Dropsens (Oviedo, Spain), connected with a DSC plug to a SPCE. The SPCE (Dropsens, DRP-150) includes a carbon working electrode of 4 mm in diameter, a silver pseudo-reference electrode and a carbon counter electrode. A personal computer with the supplied DropView 8400 software for Windows was used to control the instrument, plot measurements and perform the analysis. Milk samples were collected from four different raw milk dispensers located in the province of Bologna (Italy), kept refrigerated and rapidly transported to the laboratory within 1 h. Pre-formulated microbiological and selective media (buffered peptone water (BPW); phosphate-buffered saline (PBS); tryptone soy agar (TSA); tryptone bile agar with X-glucuronide (TBX)) and Dynabeads® anti-EPEC/VTEC O26 (Immunobeads, IMB) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Bovine serum albumin (BSA), TMB and Tween®20 were acquired from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Goat HRP-labelled anti-*E. coli* O26 detection antibodies (DAHrp) were purchased from Seracare Life Sciences (Milford, USA). Primers for the RTi-PCR that targets the *E. coli* serogroups specific gene *wzx* O26 (Perelle et al. 2004) were delivered by Eurofins Genomics Italy (Milan, Italy). A non-Shiga toxin-producing strain *E. coli* O26:H11, which was isolated from raw milk by Trevisani et al. (2014), was used in this study. For the sample preparation, a suspension of *E. coli* O26 was enriched at 37 °C in BPW overnight and diluted with the same medium to reach a microbial cell density between 20 and 40% transmittance at 540 nm. Serial tenfold dilutions in BPW were then prepared and the number of *E. coli* O26 was counted on TSA. The *E. coli* diluted suspension was maintained at 6 °C for 24 h to simulate the growing conditions in the milk tank; rapid shifts in temperature, in fact, can affect the duration of the lag phase (Mellefont and Ross 2003) and modify the growth of the *E. coli* during the enrichment. The day of the analysis 1-mL suspension containing approximately  $1 \times 10^2$  CFU/mL was diluted in 9 mL of raw milk (1:10) and from that dilution, 1- and 0.1-mL aliquots were taken, put in a stomacher bag and added to 24/24.9 mL of raw milk, respectively. A contamination level of approximately 10 and 1 CFU in 25 mL of milk was thus reached. Non-inoculated samples were also

prepared. Positive control (approximately 10 CFU) and negative control samples were also prepared in BPW. The inoculated milk samples and controls were enriched in BPW (25 mL + 225 mL BPW) for 6 h at 37 °C and then processed. After 6 h, 1-mL aliquots were taken from the enrichments and used for the analysis with the immunosensor and the remaining part was left at 37 °C for 24 h and tested by RTi-PCR. For the samples with a low cell density, a binomial distribution was used to estimate the number of positive results among the replicates (i.e. enrichment with one or more viable *E. coli* O26) (Haas and Heller 1998). With a theoretical mean cell density of 9 or 0.9 CFU in 25 mL and three replicates, the probability that some of the tubes are positive is equal to 0.99988 and 0.59343, respectively. Therefore, all the samples with the lower inoculum level and 1 out of three samples inoculated with the higher inoculum were analysed by the ELIME assay. The 1-mL aliquots of the enrichment taken at 6 h were processed as recommended by the Dynabeads® EPEC/VTEC O26 protocol for manual immunomagnetic separation using a BeadRetriever™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) with some modifications. The period of incubation used to capture the bacteria was 30 min at room temperature, instead of 10 min, in order to capture a higher number of enriched bacteria and an additional step was introduced after the washing steps. The blocking buffer (500  $\mu$ L of PBS with 1% BSA) was used to reduce the non-specific binding of the detection antibodies to the beads that was observed also in the negative controls (data not reported). The incubation of the beads-bacteria complexes with the blocking buffer was made for 1 h with gentle agitation, then the DAHrp solution (1  $\mu$ g/mL) was added and left for 30 min allowing the formation of antigen-antibody HRP-labelled conjugates. The sandwich-type immunocomplexes were then washed again three times with PBS Tween® and resuspended in 100  $\mu$ L of PBS-KCl 0.1%. After these steps, 10  $\mu$ L of conjugates was captured onto the surface of the working electrode using a magnet located under the SPCE and 40  $\mu$ L of TMB was added. The amperometric measurements were carried out at an applied potential of  $-0.10$  V for 200 s. The enriched cultures used for the ELIME assay were analysed at 24 h by RTi-PCR following the standard method ISO/TS 13136:2012. With this aim the bacterial DNA was extracted using Chelex 100® (Walsh et al. 1991) from 1-mL aliquots of the enriched cultures and RTi-PCR was performed in a MiniOpticon® (Bio-Rad, USA) thermocycler using a pre-formulated reagent (IQ Supermix, Bio-Rad USA) and 40 cycles of amplification at 90 °C for 10 s and 63 °C for 45 s, with a preliminary denaturation step at 93 °C for 180 s. Calibration standards were prepared with dilutions of *E. coli* O26 cultures containing 2–6 log CFU/mL. The enriched cultures positive for the gene *wzx* O26 were analysed by selective cultural methods to confirm the presence of viable target bacteria. To this aim, 100  $\mu$ L of proper 10-fold dilutions of positive samples was inoculated onto TSA and TBX plates and incubated overnight at 37 °C. Five isolated

colonies with *E. coli* morphology and a characteristic aspect according to the medium used were picked and assessed for the serogroup O26 by seroagglutination tests using the Dryspot *E. coli* Serocheck kit (Oxoid, UK). The same procedure was used for the samples positive to the ELIME assay.

## Results and Discussion

The values of the current recorded with ELIME assay after 6-h enrichment and the results of the RTi-PCR test for the detection of *E. coli* O26 after 24-h enrichment are reported in Table 1. Negative results in the RTi-PCR were obtained with the non-inoculated milk samples. Detection of *E. coli* O26 isolates in the 24-h cultures confirmed the RTi-PCR results in the samples inoculated with 9–18.8 CFU in 25 mL, but not in those with a lower (1:10) cell density. However, the detection of the target bacteria by testing 5 colonies from the plates inoculated with 50  $\mu$ L of the IMB-bacteria complexes recovered from the enriched milk does not completely exclude their presence that can be masked by the presence of the many *E. coli* isolates observed in the TBX agar plates. The performances of the ISO/TS 13136 method were assessed by the EU Reference Laboratory for *E. coli* within the EURL-VTEC proficiency testing programme (2009–2017) (EU Reference Laboratory 2018). Isolation of *E. coli* O26 from the food matrices analysed was not achieved at a level below 40 CFU. The growth model for *E. coli* in broth estimates that an increment of approximately 7–8 log CFU/mL occurs at 37 °C for 24 h (ComBase 2019). For the aim of this study, we assumed that a threshold value for the RTi-PCR test can be calculated as the Ct values that correspond to the mean of the quantitative standards containing  $1 \times 10^2$  CFU/mL, plus three times the standard deviation of that value (i.e. Ct of 38.70). The ELIME sensor has shown a good sensitivity in detecting *E. coli* O26 at the concentration of 1 CFU in 25 mL of milk after 6-h enrichment. The values of the current recorded with the

ELIME assay depend on the number of target bacteria at the end of the incubation (i.e. after 6 h from the inoculum) and are therefore strongly affected by the variability in the growth kinetics of bacteria that can be greater than the differences in the inoculum level used in this study. For the ELIME assay, the cut-off value was also selected and calculated as the mean value of negative samples (non-inoculated and RTi-PCR results showing no amplification) plus three times their standard deviation. As highlighted in Table 1, all the spiked samples had results above the selected cut-off level for the ELIME assay except two and one of them was also below the cut-off level of the RTi-PCR test. The differences between numbers of competitive background bacteria justify, however, slight differences in the growth of *E. coli* O26 between samples and consequently the chance that the limits of detection of the ELIME and PCR methods are reached after 6 and 24 h of enrichment, respectively. Variability between replicates can be affected by the concentration of PCR inhibitors and the capture efficiency of IMB at different cell densities that would be expected between individual samples (Fakruddin et al. 2017). The high sensitivity level of immunosensors that combine immunocapture-based sample preparation and electrochemical detection of the HRP-labelled antibodies was demonstrated in many studies that were aimed at detecting other pathogenic bacteria in foods, including *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Campylobacter* spp. (Delibato et al. 2009; Fabiani et al. 2017; Fabiani et al. 2019; Gehring and Tu 2005; Volpe et al. 2016). An advantage of the ELIME biosensors that can combine the use of magnetic immunobeads with HRP-labelled detection antibodies and amperometric transducers is that aliquots of the beads-bacteria complexes used for the ELIME assay can be used directly to confirm the results by detection and characterization of the isolates. This is particularly important for foodborne pathogens like the EHEC, which pathogenicity can be confirmed only after the demonstration of different virulence traits in the same isolate (Bugarel et al. 2011). Another advantage of the

**Table 1** Comparison of sensitivity and quantitation between ELIME and real-time PCR

Milk batches	Inoculum in 25 mL of milk (CFU)	ELIME signal ( $\mu$ A) (mean $\pm$ sd)		ELIME positivity <sup>a</sup>	RTi-PCR (Ct value) (mean $\pm$ sd)		RTi-PCR positivity <sup>b</sup>
		Dilution 1 $\times$ (n = 1)	Dilution 0.1 $\times$ (n = 3)		Dilution 1 $\times$ (n = 3)	Dilution 0.1 $\times$ (n = 3)	
Feb26	14.50	5.30	2.18 $\pm$ 0.41	1/1; 3/3	24.45 $\pm$ 0.08	28.51 $\pm$ 2.07	3/3; 3/3
Mar7	14.50	2.32	1.05 $\pm$ 0.09	1/1; 3/3	23.28 $\pm$ 0.39	25.31 $\pm$ 2.47	3/3; 3/3
Mar14	18.80	1.82	0.83 $\pm$ 0.05	1/1; 1/3	23.68 $\pm$ 2.72	32.99 $\pm$ 5.75	3/3; 2/3
Mar27	9.00	3.17	1.00 $\pm$ 0.02	1/1; 3/3	19.19 $\pm$ 3.66	36.99 $\pm$ 1.63	3/3; 3/3
Jul4	9.60	3.99	1.09 $\pm$ 0.23	1/1; 3/3	23.15 $\pm$ 0.46	28.00 $\pm$ 3.55	3/3; 3/3

<sup>a</sup> Cut-off values equal to 0.86  $\mu$ A

<sup>b</sup> Cut-off value equal to 38.70 Ct

ELIME biosensors is that they use bare screen-printed electrodes without any sensor pre-treatment, making the assay easily reproducible in other laboratories. The presence of sticky bacterial cells that are not removed by the washing steps or background prevailing bacteria that cross-react with the capture antibodies coating the magnetic beads can affect the sensitivity and specificity of the ELIME assay. The producer of the Dynabeads® anti-EPEC/VTEC O26 reports that the IMB can cross-react to a limited extent with other bacteria that have similar antigen epitopes like *Escherichia hermannii*, *Salmonella* O group N, and *Proteus* spp. Other studies report that anti-*E. coli* O26 antibodies may cross-react with *E. coli* possessing antigens 4, 13, 25, 32, 100, and 102 and with *Pseudomonas aeruginosa* O12 (Rivera-Betancourt and Keen 2000). In this study, the use of bovine seroalbumin as a blocking agent proved to effectively reduce the non-specific binding of the detection antibodies and the simultaneous presence of non-O26 *E. coli* strains in the raw milk did not interfere with the results of the ELIME assay. Previous studies have also reported that a blocking step was necessary to drastically reduce the non-specific adsorption of non-target to IMB used in an ELIME assay to reveal the presence of *Salmonella* in irrigation water (Volpe et al. 2016). This preliminary study did not include an inclusivity and exclusivity study testing not target strains, but the relatively high numbers of  $\beta$ -glucuronidase-positive (*E. coli*) and  $\beta$ -glucuronidase-negative bacteria that were detected on TBX agar plates did not interfere with the results of the ELIME assay.

## Conclusions

The results of the ELIME assay compared well with those obtained by the reference method and detection of a low number of *E. coli* O26 (1 CFU in 25 mL) can be obtained in a working day. The suspect positive samples can be confirmed by overnight cultures of the beads-bacteria complexes allowing further characterization of *E. coli* O26, which is important to discriminate the enterohaemorrhagic strains.

**Funding Information** This work was supported by the University of Bologna (Oriented Fundamental Research fund, RFO).

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** Alessandra Corradini declares that she has no conflict of interest. Marcello Trevisani declares that he has no conflict of interest. Matilde Cecchini declares that she has no conflict of interest.

**Ethical Approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Informed Consent** Not applicable.

## References

- Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L (2011) Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol* 11:142. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-142>
- ComBase (2019) A web resource for quantitative and predictive food microbiology. University of Tasmania. <https://data.nal.usda.gov/dataset/combase-web-resource-quantitative-and-predictive-food-microbiology>. Accessed 19 January 2020
- Cordonnier C, Etienne-Mesmin L, Thévenot J, Rougeron A, Rénier S, Chassaing B, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Blanquet-Diot S, Livrelli V (2017) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Sci Rep* 7: 44655. <https://doi.org/10.1038/srep44655>
- Delibato E, Volpe G, Romanazzo D, De Medici D, Toti L, Moscone D, Palleschi G (2009) Development and application of an electrochemical plate coupled with immunomagnetic beads (ELIME) array for *Salmonella enterica* detection in meat samples. *J Agric Food Chem* 57:7200–7204. <https://doi.org/10.1021/jf901181m>
- ECDC (2018) Shiga-toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection - annual epidemiological report for 2017. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/shiga-toxinverocytotoxin-producing-escherichia-coli-stecvtec-infection-annual-0>. Accessed 20 November 2019
- EFSA (2018) Scientific panel on biological hazards minutes of the 119 th Plenary meeting. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/180418-0-m.pdf>. Accessed 20 November 2019
- EU Reference Laboratory for *E. coli* (2018) ISO TS 13136:2012 Report on the primary validation of the PCR screening reactions and the determination of the performance parameters, based on the results of the analytical tests carried out within the EURL-VTEC proficiency testing program (2009–2017). [http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Performance\\_ISO\\_TS\\_13136\\_Rev3.pdf](http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Performance_ISO_TS_13136_Rev3.pdf). Accessed 20 November 2019
- Fabiani L, Pucci E, Delibato E, Volpe G, Piermarini S, De Medici D, Capuano F, Palleschi G (2017) ELIME assay vs real-time PCR and conventional culture method for an effective detection of *Salmonella* in fresh leafy green vegetables. *Talanta* 166:321–327. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.071>
- Fabiani L, Delibato E, Volpe G, Piermarini S, De Medici D, Palleschi G (2019) Development of a sandwich ELIME assay exploiting different antibody combinations as sensing strategy for an early detection of campylobacter. *Sensors Actuators B Chem* 290:318–325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.140>
- Fakruddin M, Hossain MN, Ahmed MM (2017) Evaluation of microplate immunocapture method for detection of *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhi and *Shigella flexneri* from food. *BMC Microbiol* 17:189. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1099-y>
- Gehring AG, Tu SI (2005) Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Prot* 68:146–149
- Germinario C, Caprioli A, Giordano M, Chironna M, Gallone MS, Tafuri S, Minelli F, Maugliani A, Michelacci V, Santangelo L, Mongelli O, Montagna C, Scavia G, on behalf of all participants of the Outbreak investigation team (2016) Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26: H11 in southern Italy, summer 2013. *Euro Surveill* 21:52–60. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30343>
- Haas CN, Heller B (1998) Test of the validity of the Poisson assumption for analysis of most-probable-number results. *Appl Environ Microbiol* 54:2996–3002. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.12.2996-3002.1988>

- ISO (2012) ISO/TS 13136:2012 Microbiology of food and animal feed - real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. Published online by ISO. <https://www.iso.org/standard/53328.html>. Accessed 19 January 2020
- Mellefont LA, Ross T (2003) The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Int J Food Microbiol* 83:295–305. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00378-1)
- Mendonça M, Conrad NL, Conceição FR, Moreira AN, Da Silva WP, Alexio JAG, Bhunia AK (2012) Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *BMC Microbiol* 12:275–290. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-275>
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* 18:185–192. <https://doi.org/10.1016/J.MCP.2003.12.004>
- Rivera-Betancourt M, Keen JE (2000) Murine monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O26 and O111. *Appl Environ Microbiol* 66:4124–4127. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4124-4127.2000>
- Schutz K, Cowley LA, Shaaban S, Carroll A, McNamara E, Gally DL, Godbole G, Jenkins C, Dallman TJ (2017) Evolutionary context of non-sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O55:H7. *Emerg Infect Dis* 23:1958–1965. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170628>
- Severi E, Vial F, Peron E, Mardh O, Niskanen T, Takkinen J (2016) Community-wide outbreaks of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in Italy and Romania: a new challenge for the European Union. *Euro Surveill* 21:20–21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30420>
- Trevisani M, Mancusi R, Delle Donne G, Bacci C, Bassi L, Bonardi S (2014) Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. *Int J Food Microbiol* 184:45–49. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.12.033>
- Volpe G, Delibato E, Fabiani L, Pucci E, Piermarini S, D'Angelo A, Capuano F, De Medici D, Palleschi G (2016) 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* 149:202–210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.015>
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–513. <https://doi.org/10.2144/000114018>
- Xu M, Wang R, Li Y (2016) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. *Talanta* 148:200–208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.082>
- Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH (2014) Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol* 24:297–312. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.