



LATERAL FLOW IMMUNOASSAY (LFIA): dai fondamenti ai recenti sviluppi



Dr. Fabio Di Nardo

Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria, 5 – 10125 Torino
e-mail: fabio.dinardo@unito.it

Contenuti della lezione

- Principi di base
- Costituenti principali di un Lateral Flow Immunoassay
- Marcatori principali e metodi di rivelazione
- Formati di test
- Recenti sviluppi

COS'È UN LATERAL FLOW IMMUNOASSAY??



LFIA durante la pandemia di COVID-19

Durante la pandemia di COVID-19, LFIA antigenici e sierologici per la determinazione di SARS-CoV-2 sono stati ampiamente utilizzati



LFIA durante la pandemia di COVID-19

Durante la pandemia di COVID-19, LFIA antigenici e sierologici per la determinazione di SARS-CoV-2 sono stati ampiamente utilizzati



LFIA prima della pandemia di COVID-19

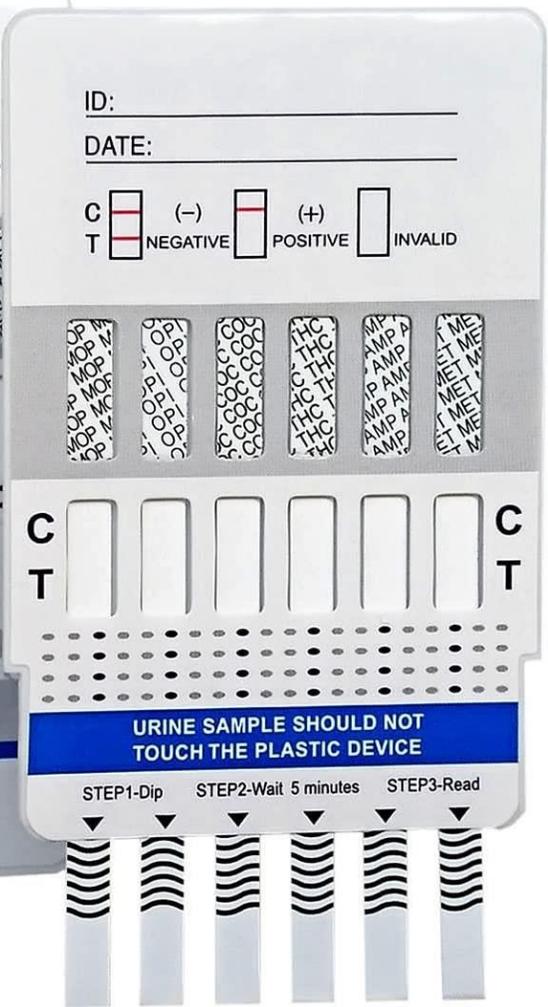
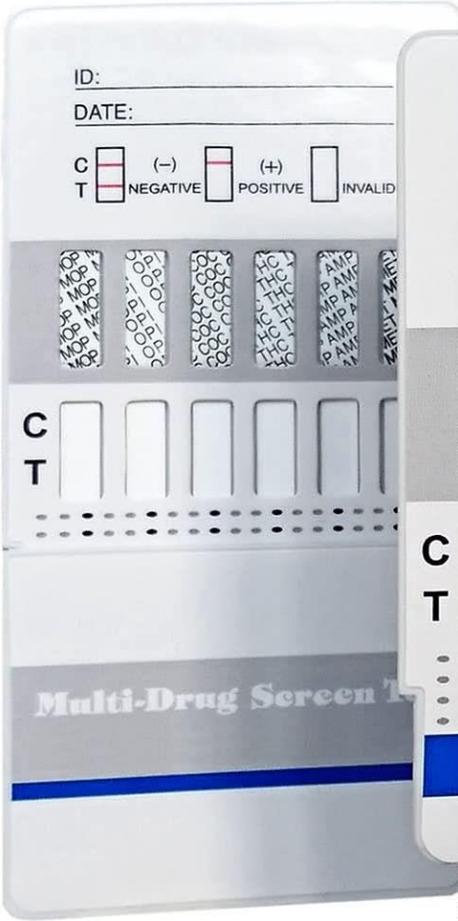
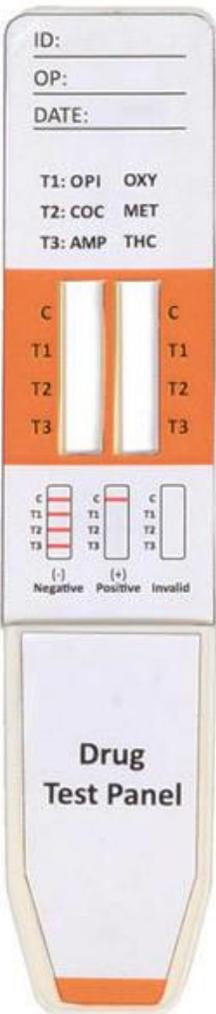


TEST DI GRAVIDANZA:
Determinazione dell'ormone
gonadotropina corionica
umana nelle urine



Il test di gravidanza Clearblue™, sviluppato e brevettato da Unipath, è stato il primo test LFIA commerciale (1988)

LFIA prima della pandemia di COVID-19

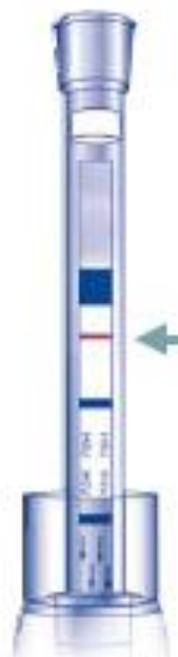


TEST ANTIDROGA:
Determinazione delle più diffuse sostanze d'abuso



LFIA prima della pandemia di COVID-19

TEST DI SCREENING PER HIV:
Determinazione della
presenza dell'antigene o
degli anticorpo prodotti

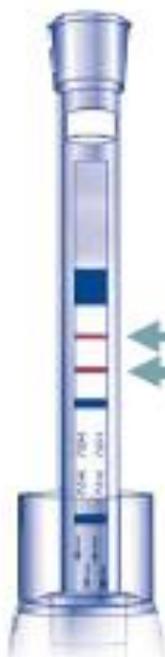


← CONTROLLO

**SE IL VOSTRO TEST È NON-REATTIVO
PROBABILMENTE SIETE
HIV NEGATIVI**

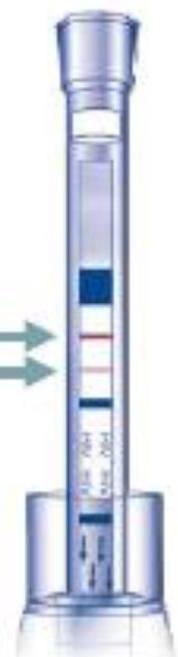


APPOGGIARE QUI
L'AUTO-TEST



← CONTROLLO TEST →

**IL VOSTRO TEST È REATTIVO
PROBABILMENTE SIETE
HIV POSITIVI**



Saggio immunochimico a flusso laterale, detto anche saggio immunocromatografico su striscia. È un saggio eterogeneo in cui si ha la separazione fisica tra la frazione libera e quella legata della specie marcata (che darà il segnale).

Lateral Flow
Immuno
Assay

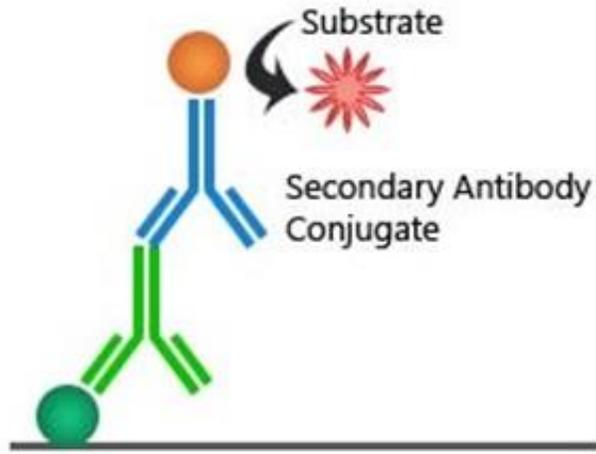
Flusso laterale
Utilizzo di anticorpi come elemento di
riconoscimento molecolare
Saggio/test

Lateral Flow Assay

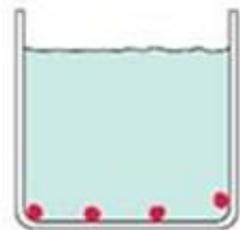


L'elemento di riconoscimento molecolare può non essere un anticorpo.

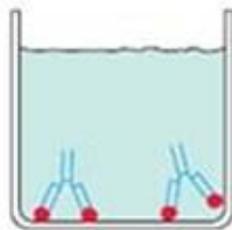
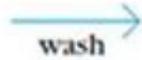
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)



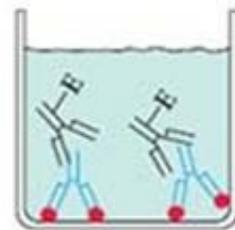
ELISA



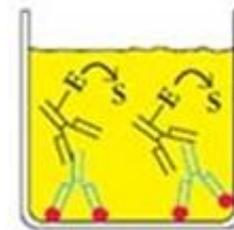
Antigen-coated well



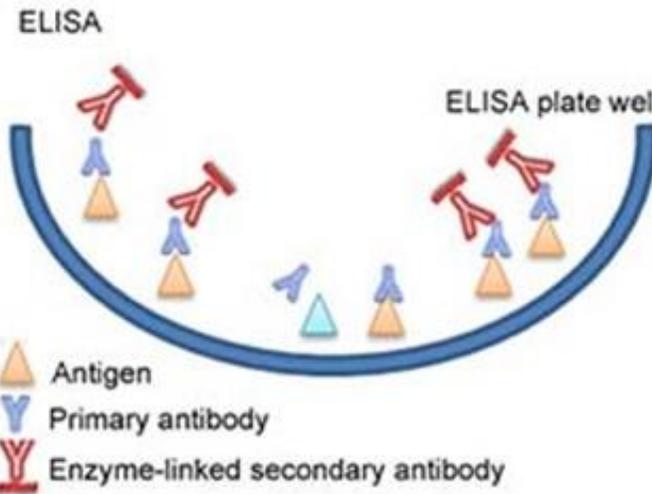
Add specific antibody to be measured



Add enzyme-conjugated secondary antibody



Add substrate (S) and measure color

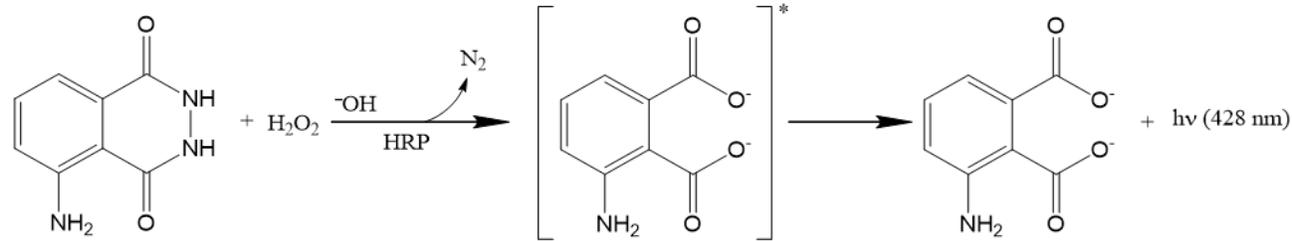


- Antigen
- Primary antibody
- Enzyme-linked secondary antibody



Chemiluminescent **immunoassay** (CLIA)

Campioni analizzabili: siero, plasma, sangue intero, urina.



Analizzatore immunologico automatico
LIAISON® (DiaSorin)



180 test per ora

Architect i1000SR (Abbott)



100 test per ora



Electrochemiluminescent **immunoassay** (ECLIA)

Moduli di immunochimica ad alta produttività che esegue un'ampia gamma di test immunologici eterogenei utilizzando la tecnologia ad elettrochemiluminescenza.

Analizzatore cobas 4000



Analizzatore cobas e 801



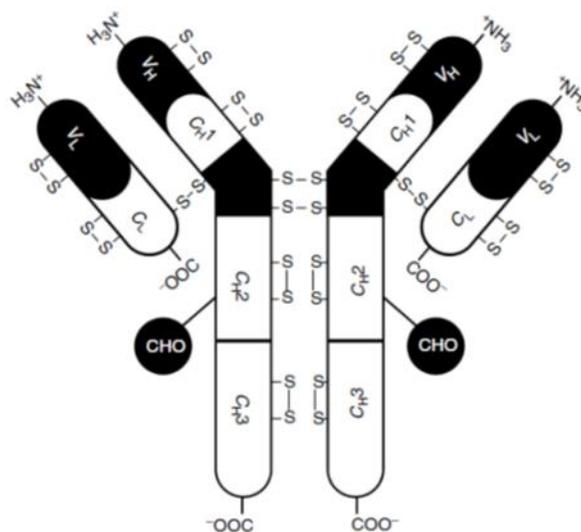
Analisi di laboratorio



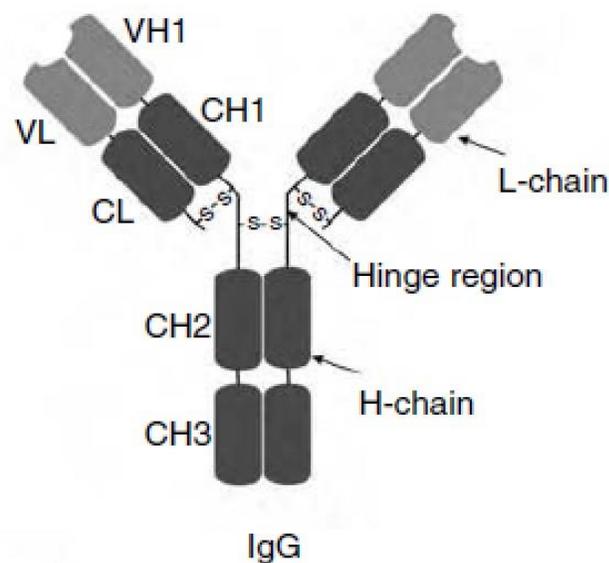
Analisi sul campo



- Gli anticorpi o immunoglobuline (Ig) sono una famiglia di glicoproteine plasmatiche, appartenenti alla classe delle γ -globuline,
- Vengono prodotti dai linfociti B maturi, appartenenti alla categoria dei globuli bianchi, che hanno il compito di difendere l'organismo da agenti esterni tramite la risposta umorale.



Anticorpo (Ab)



IgG

2 catene pesante (H-chain) ca. 50 kDa

2 catene leggere (L-chain) ca. 26 kDa

Domini variabili: V_H e V_L

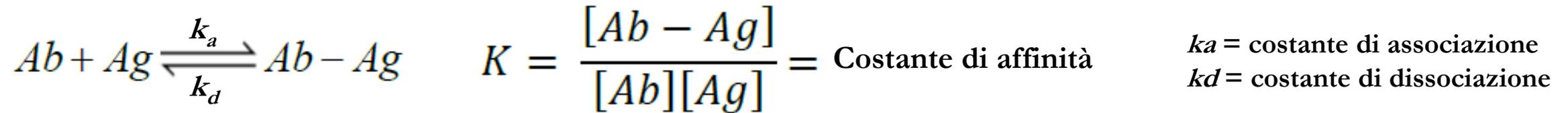
Domini costanti: C_H e C_L

Le H-chain definiscono l'isotipo (o classe) anticorpale: IgA, IgD, IgE, **IgG**, IgM

- L'antigene è una sostanza capace di interagire in maniera specifica con i prodotti finali della risposta immunitaria (anticorpi).
- L'immunogeno è quella sostanza che, dopo essere penetrata nei tessuti di un vertebrato superiore, è in grado di indurre una specifica risposta di difesa immunitaria con formazione di uno o più anticorpi.
- La capacità di indurre una risposta immunitaria e/o cellulare, coinvolgendo cellule del sistema reticolo-linfocitario, viene definita immunogenicità.
- **Attenzione: non tutti gli antigeni hanno capacità immunogenica (ad es. piccole molecole PM <3000 Da) .**
- Gli antigeni interagiscono con gli anticorpi utilizzando piccole zone superficiali specifiche dette determinanti antigenici o epitopi.
- **Attenzione (2!):** in alcuni casi antigenicità ed immunogenicità vengono usati come sinonimi.

Interazione anticorpo-antigene (Ab-Ag)

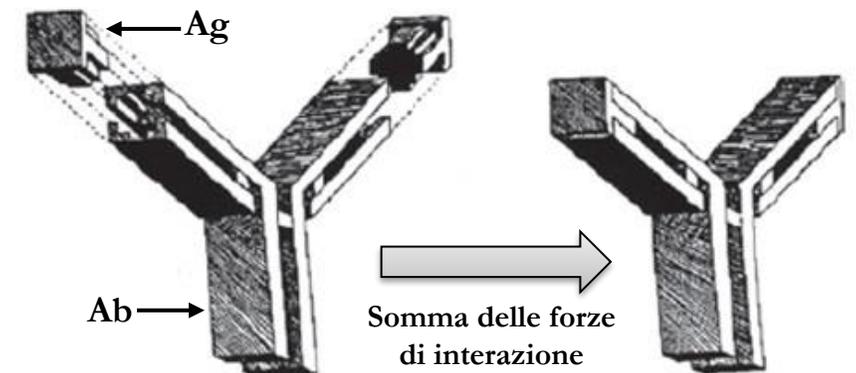
- I saggi immunochimici permettono di andare a determinare una molecola target sfruttando la formazione dell'immunocomplesso anticorpo-antigene.



Il principio della misura si basa sul grado di formazione dell'immunocomplesso che sarà proporzionale alla concentrazione di antigene.

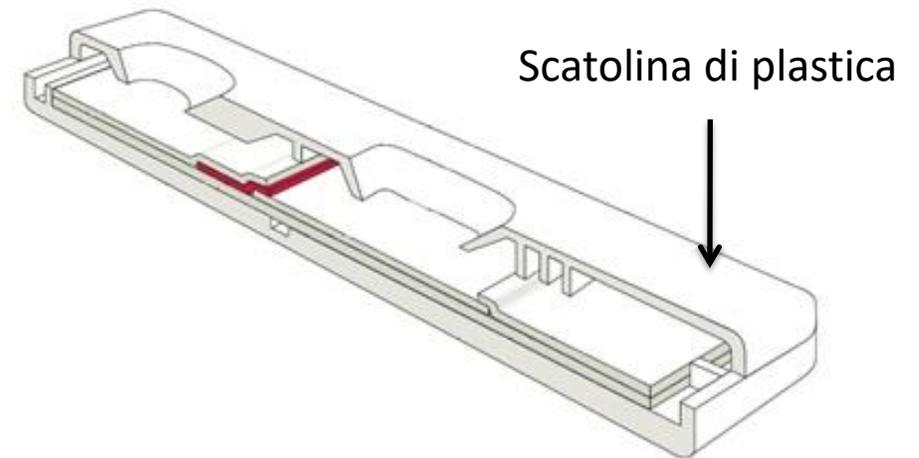
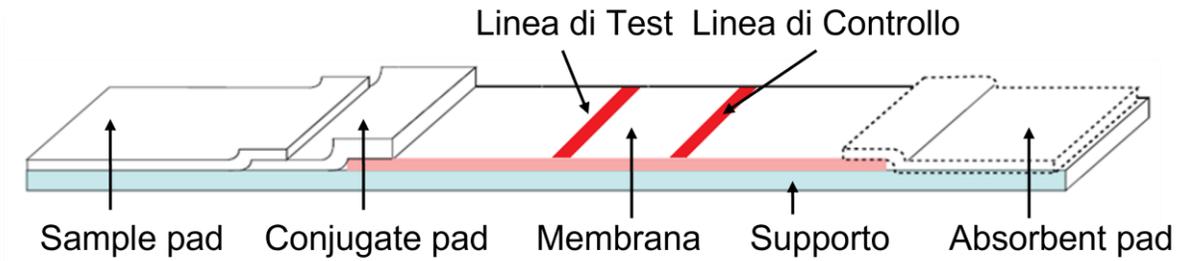
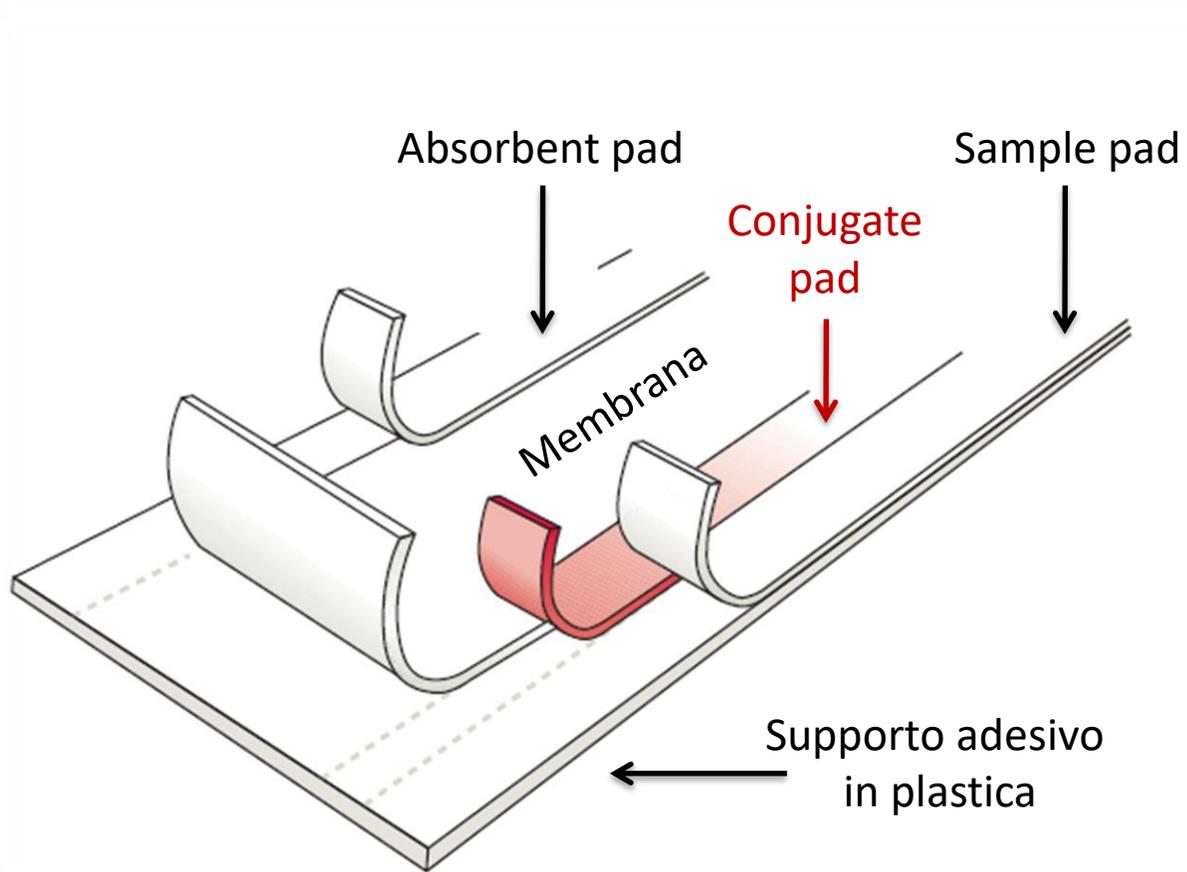
L'interazione Ab-Ag non è covalente, ma si basa principalmente su:

- legame a idrogeno
- Interazioni idrofobiche
- Interazioni ioniche
- Interazioni di van der Waals



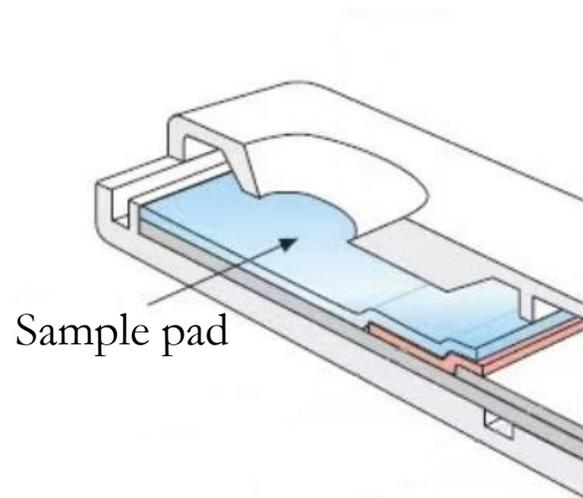
Componenti di un LFIA

Un classico LFIA contiene tutto ciò che è necessario per eseguire l'analisi.



Sample pad in LFIA

Il sample pad è posto in corrispondenza della zona di introduzione del campione. Può essere utile per effettuare un pretrattamento del campione. In genere ha effetto filtrante per allontanare quelle parti del campione che potrebbero andare ad ostruire i pori della membrana di nitrocellulosa.



- Fibra di cotone
- Fibra di vetro
- Cellulosa

Conjugate pad in LFIA

Il conjugate pad (probe pad) accoglie e conserva il marcato (in genere costituito da un coniugato tra un anticorpo ed un idoneo marcatore), mantenendolo stabile lungo il suo intero periodo di stoccaggio per poi rilasciarlo efficientemente. I materiali più utilizzati sono fibra di vetro e poliestere.

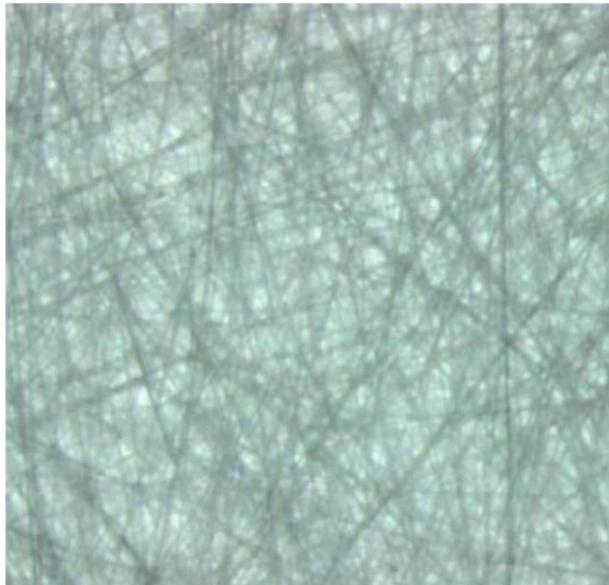
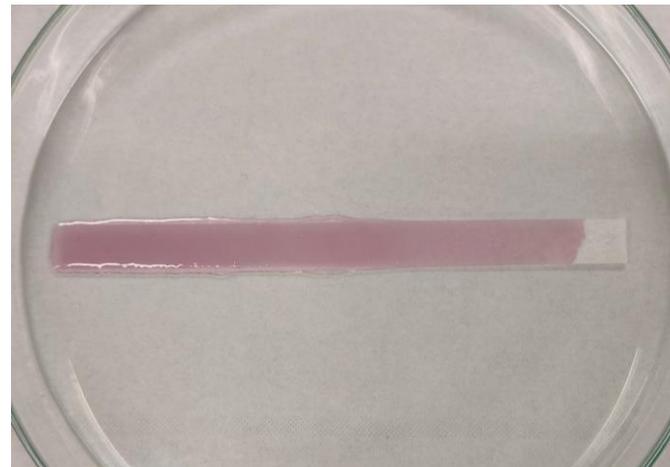


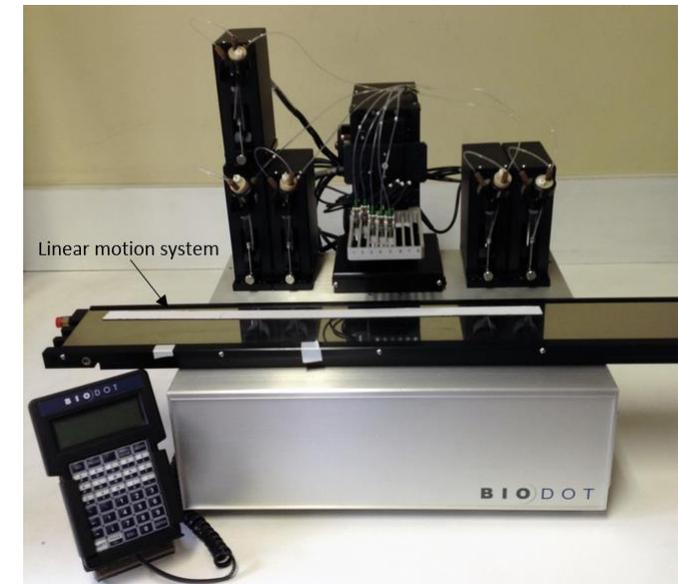
Immagine di un conjugate pad in fibra di vetro

Il conjugate pad può essere pretrattato con un'opportuna soluzione prima di venire a contatto con il marcato. Il marcato si può dispensare principalmente per 1) saturazione, 2) dispensazione senza contatto.

1.



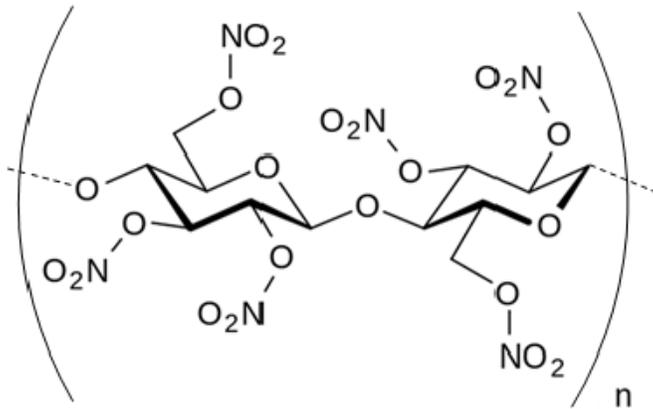
2.



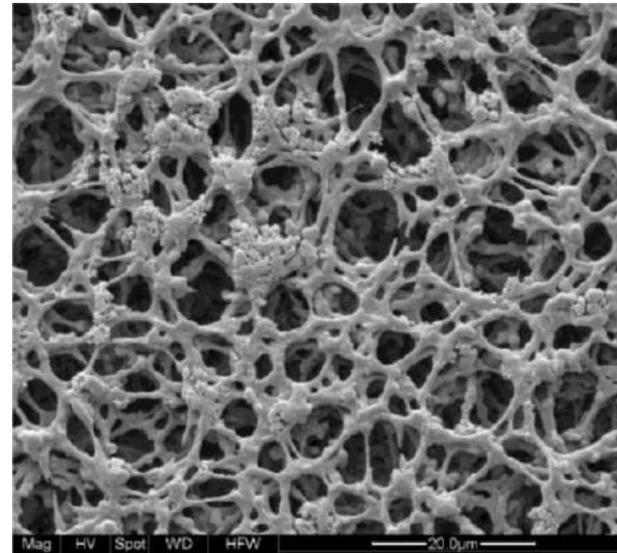
Membrana in nitrocellulosa in LFIA

La membrana in nitrocellulosa rappresenta la regione analitica in LFIA ed ha lo scopo di legare bioreagenti in zone spazialmente definite (linea di Test e linea di Controllo).

Le proteine interagiscono con la membrana attraverso una combinazione di interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno ed interazioni idrofobiche.



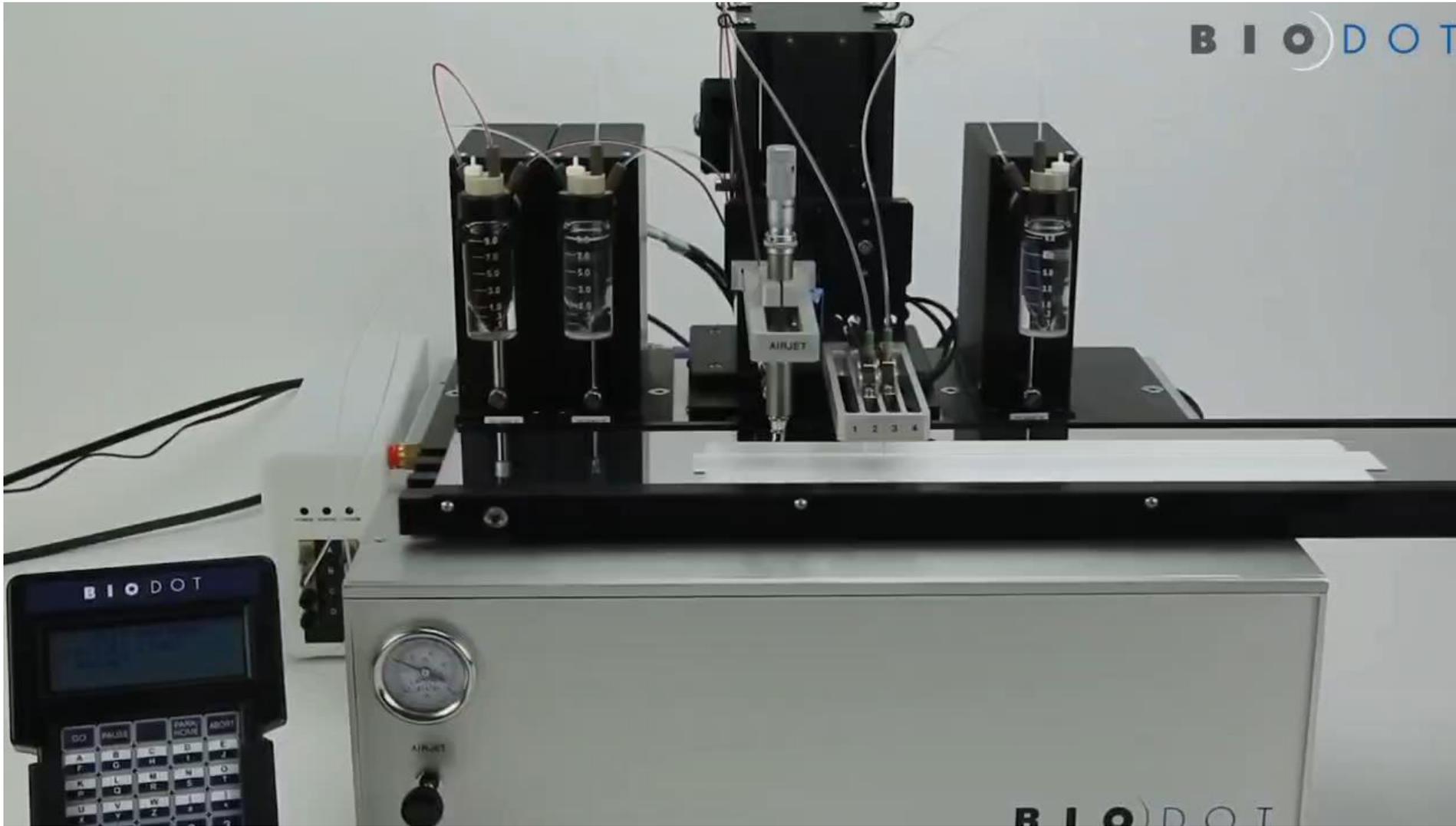
Struttura della nitrocellulosa



- Tensioattivi per incrementare la bagnabilità della nitrocellulosa.
- Tipicamente adsorbe 100 μg di IgG per cm².
- La porosità influisce (ca. 3-20 μm) sulla velocità di flusso del campione.

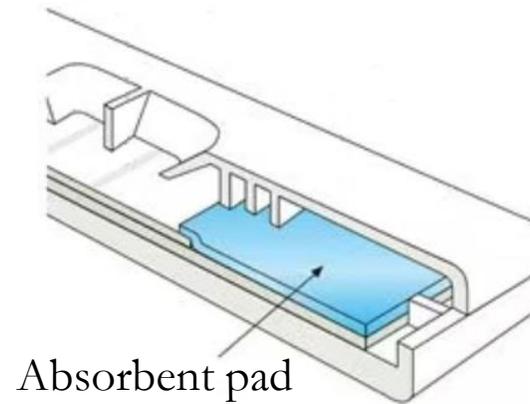
Dispensazione dei bioreagenti sulla membrana in nitrocellulosa

I bioreagenti che andranno a formare le linee di Test e di Controllo vengono deposti mediante appositi dispensatori



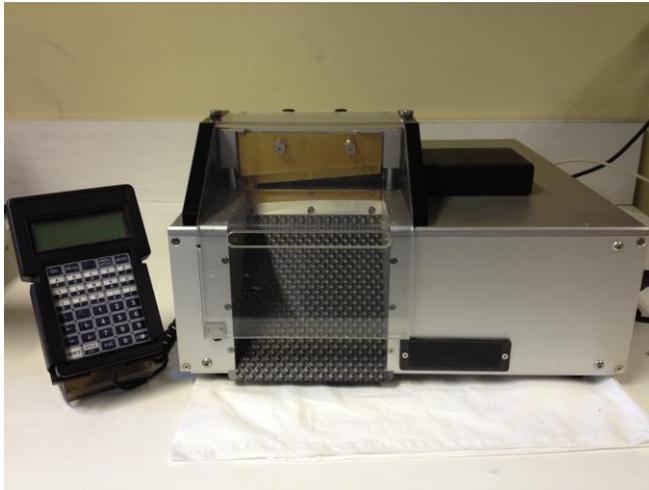
Absorbent pad in LFIA e laminazione

L'absorbent pad favorisce il flusso del campione lungo la membrana anche quando quest'ultima è completamente satura di soluzione.

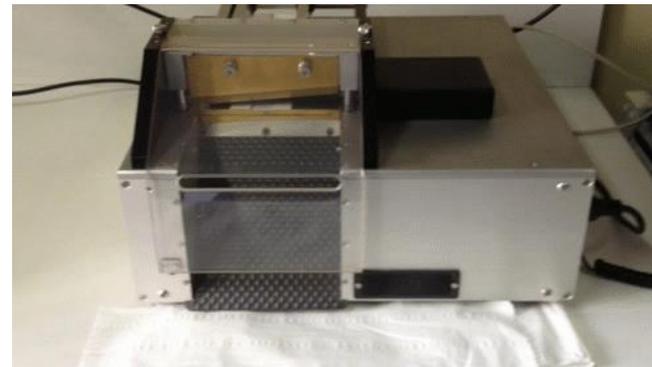


Strips e scatoline di plastica

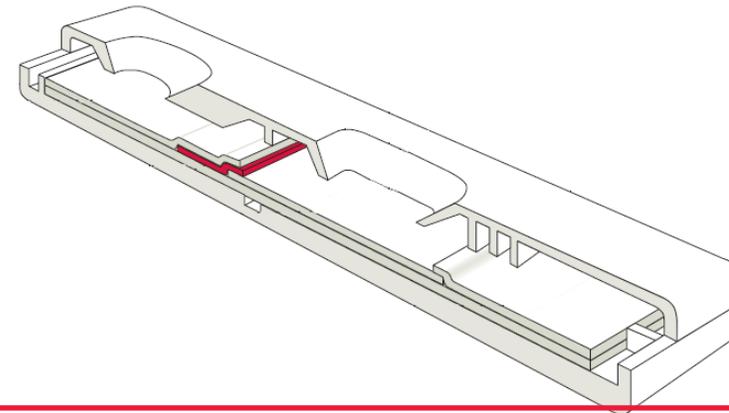
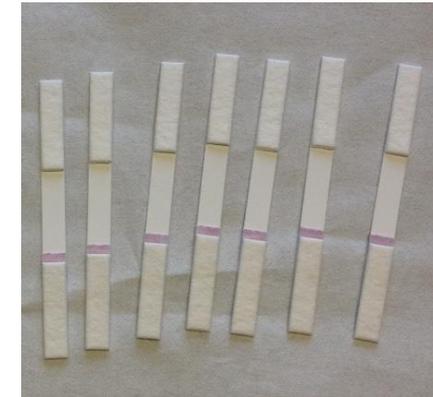
Una volta assemblata la card si procede al taglio in striscette. Infine, le striscette possono essere inserite in apposite scatoline in plastica



Taglio in strisce



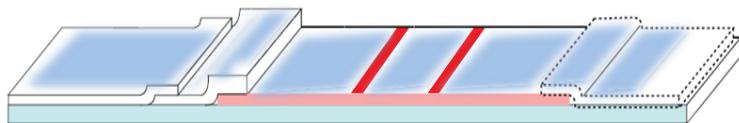
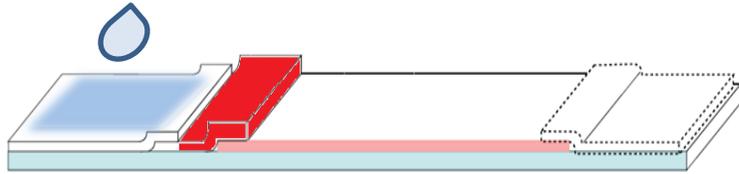
Strips



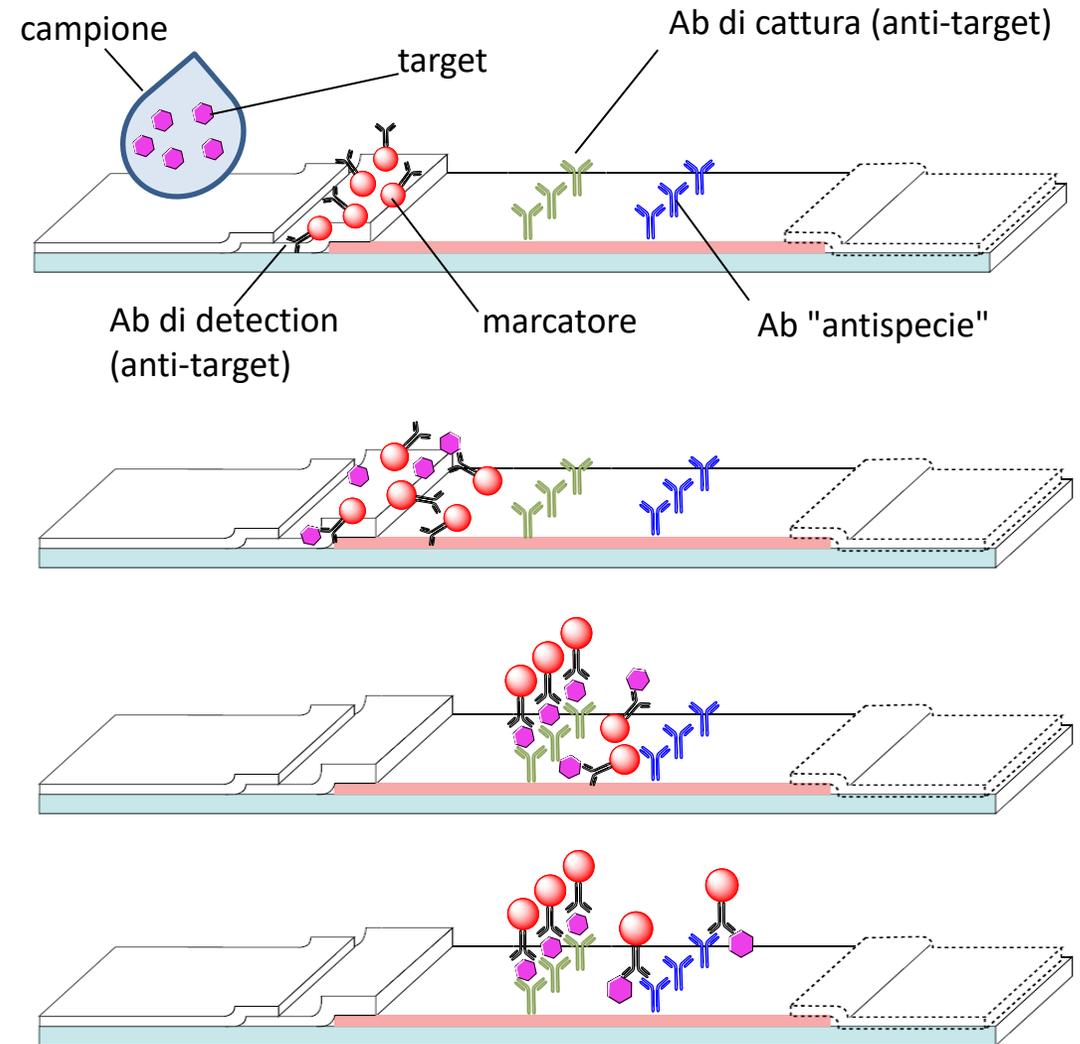
Lateral Flow Immunoassay

LFIA: come funziona?

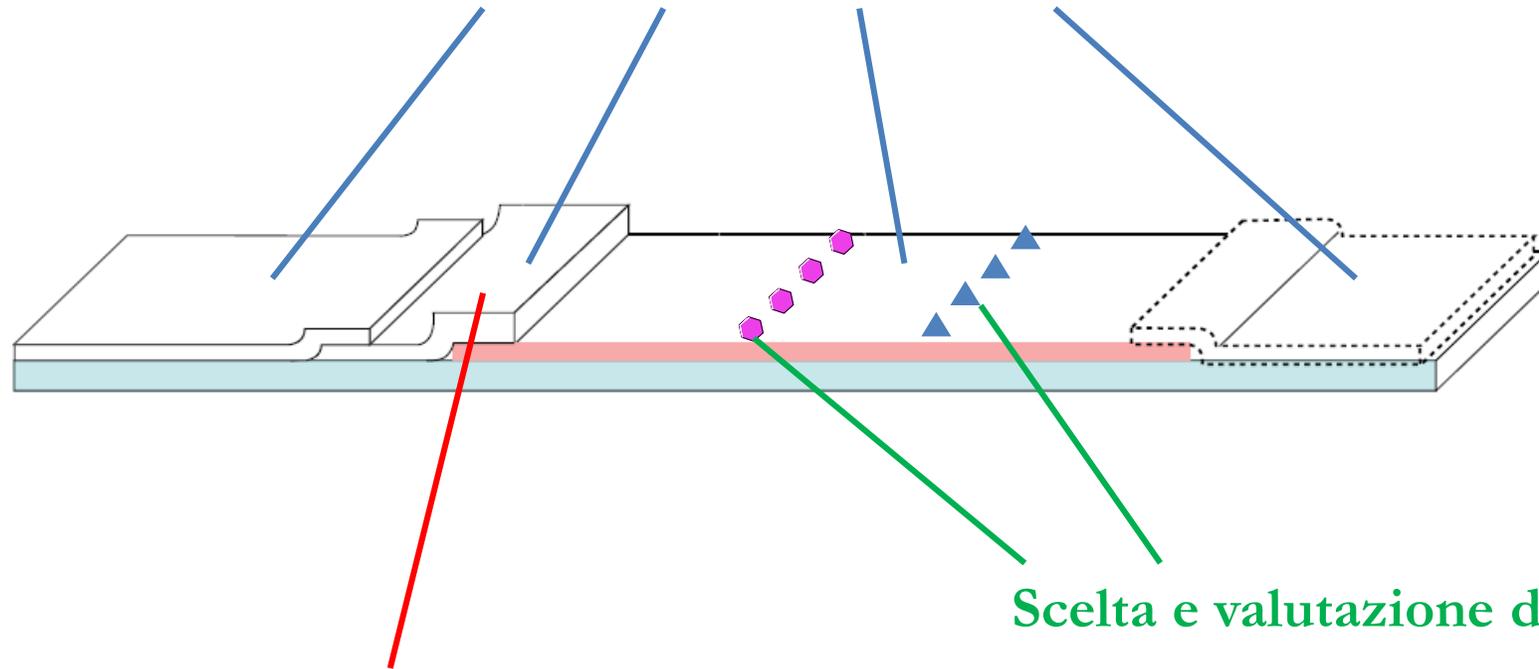
Cosa vediamo...



... cosa accade realmente



Scelta dei materiali porosi e del loro pretrattamento

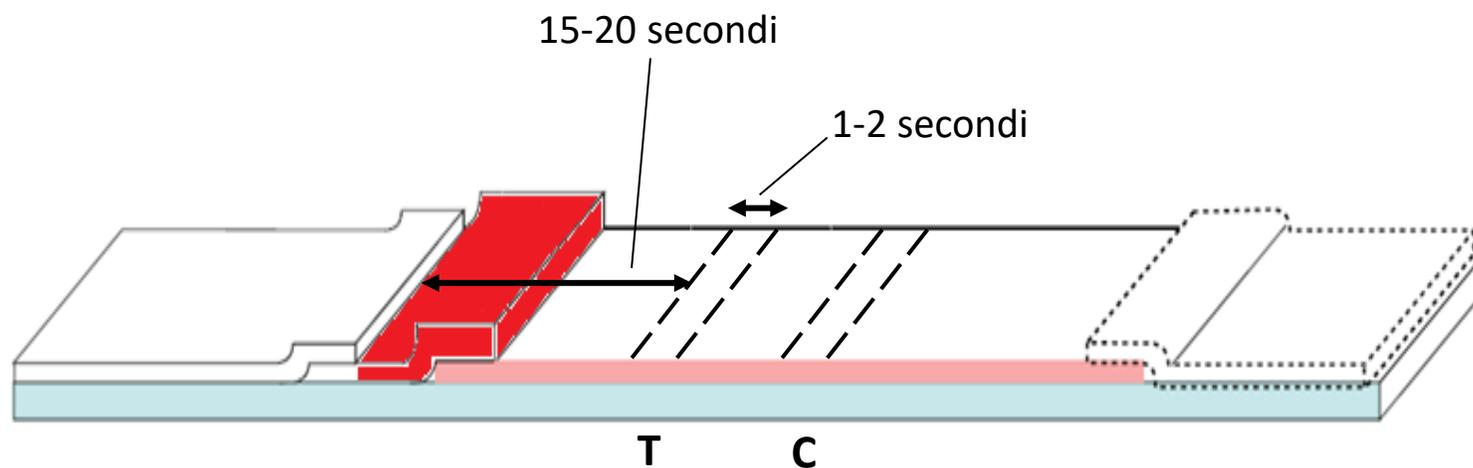
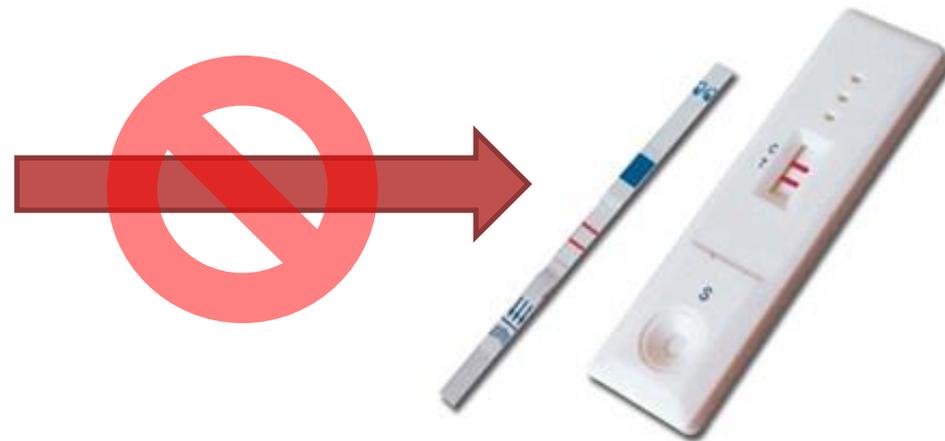
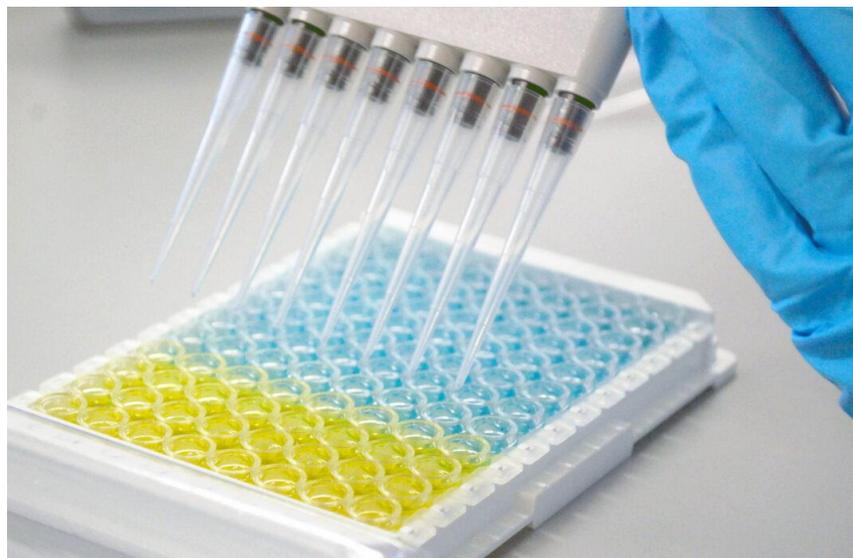
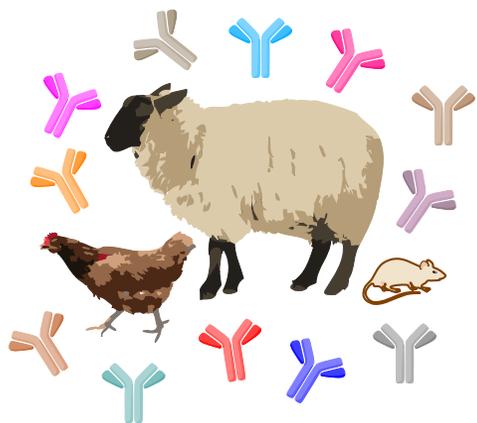


Scelta e valutazione dei bioreagenti

Scelta del marcatore (che influenza il tipo di rivelazione) e dell'elemento di riconoscimento molecolare

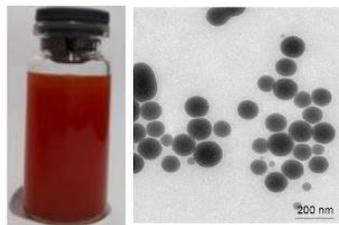
Scelta e valutazione dei bioreagenti da utilizzare in LFIA

Scelta degli anticorpi



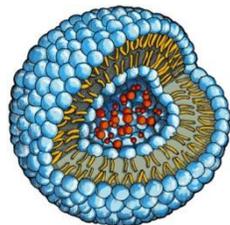
I marcatori sono fondamentali in LFIA per consentire la rivelazione degli immunocomplessi formati.

Colorimetrici



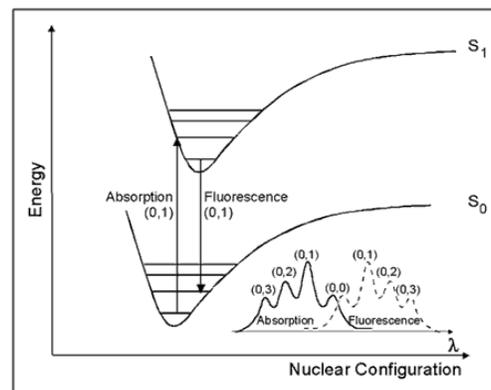
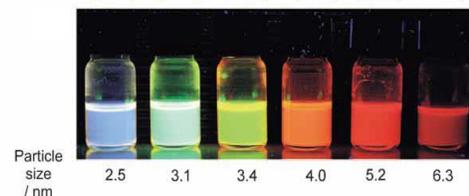
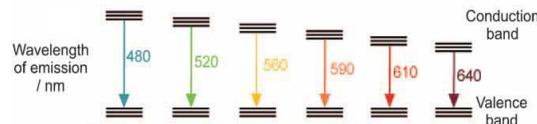
Selenio
colloidale

Lattice con
colorante

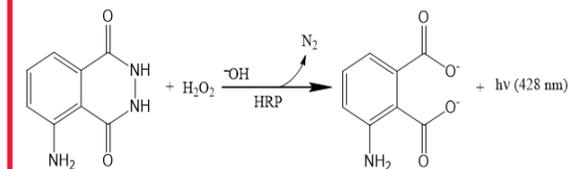
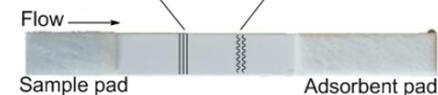
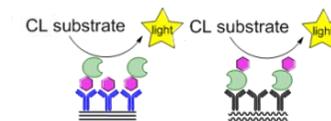
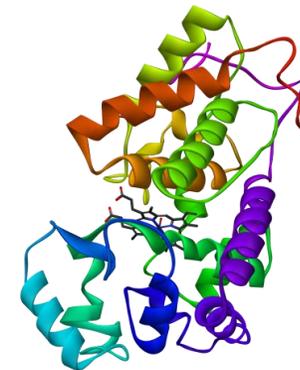


Liposomi con
colorante incapsulato

Fluorescenti



Enzimatici



I marcatori sono fondamentali in LFIA per consentire la rivelazione degli immunocomplessi formati.

Caratteristiche principali di un marcatore da LFIA

Poco costoso

Facilmente
coniugabile con Ab

Elevata stabilità

Buona capacità di
fluire attraverso la
membrana

Segnale con ampio
intervallo dinamico

Elevato rapporto
segnale/rumore

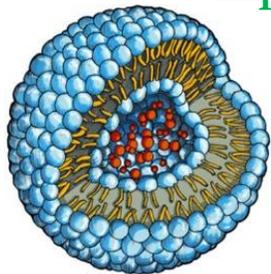
Marcatori colorimetrici più utilizzati:



Particelle di lattice con colorante



Selenio colloidale



Liposomi con colorante incapsulato

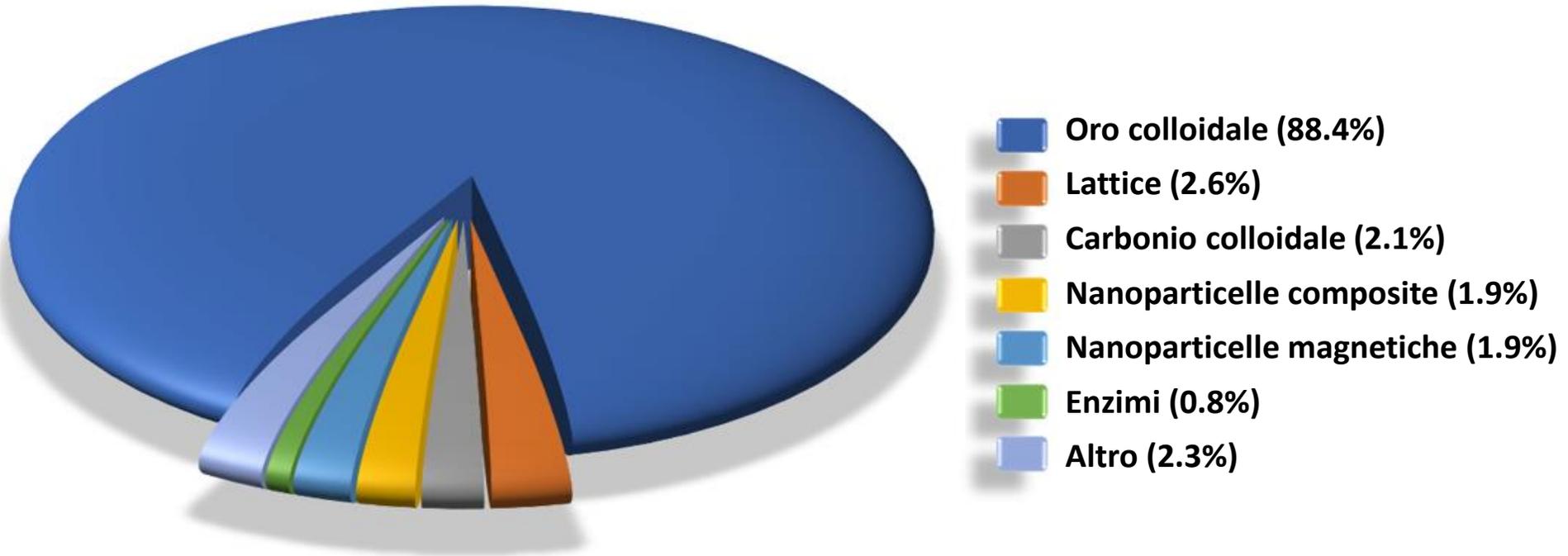
MARCATORI COLORIMETRICI

Carbonio colloidale



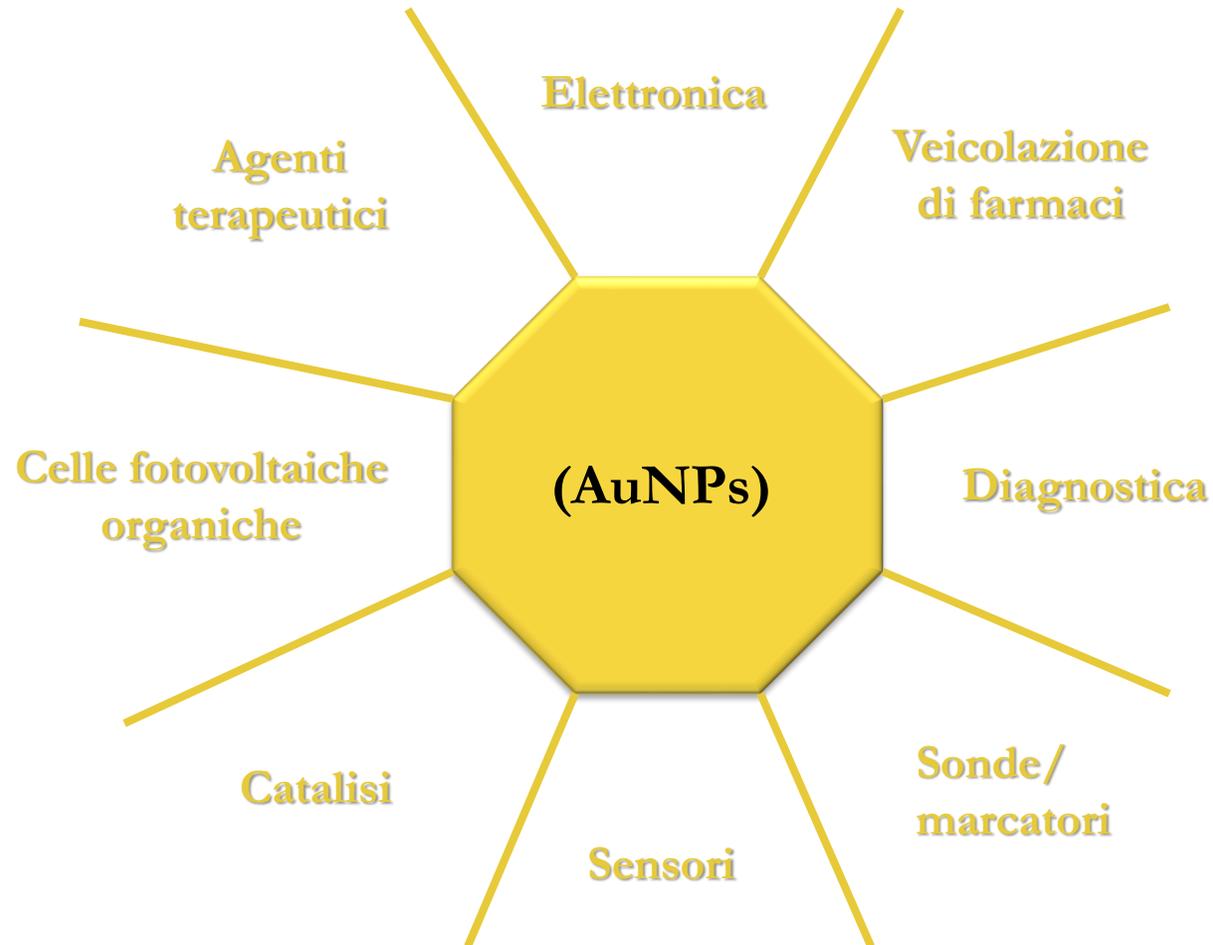
Oro colloidale

Marcatori colorimetrici più utilizzati in LFIA (pubblicazioni scientifiche dal 2010 al 2019 compresi):

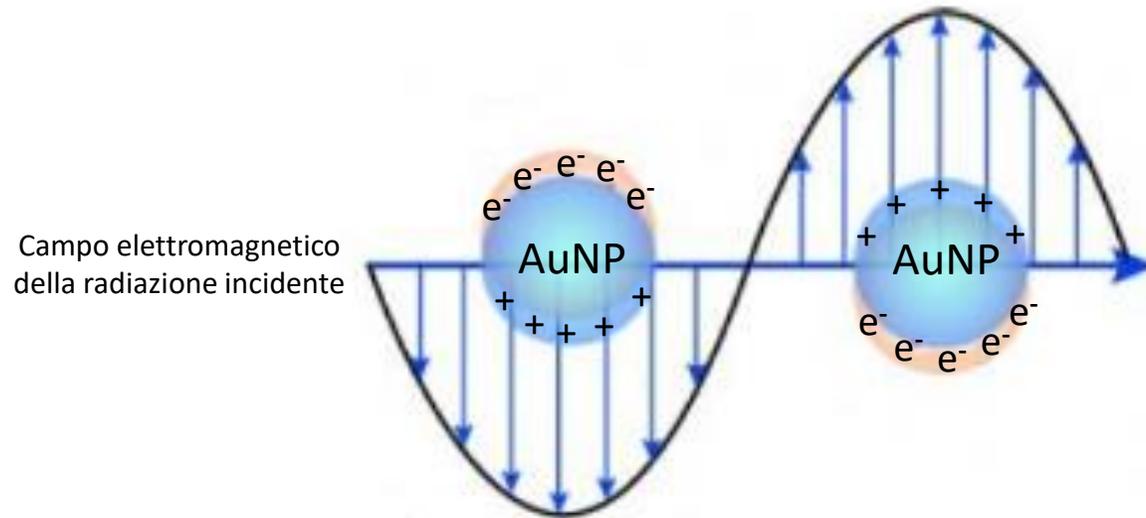


* Di Nardo, F.; Chiarello, M.; Cavallera, S.; Baggiani, C.; Anfossi, L. *Sensors* **2021**, *21*, 5185.

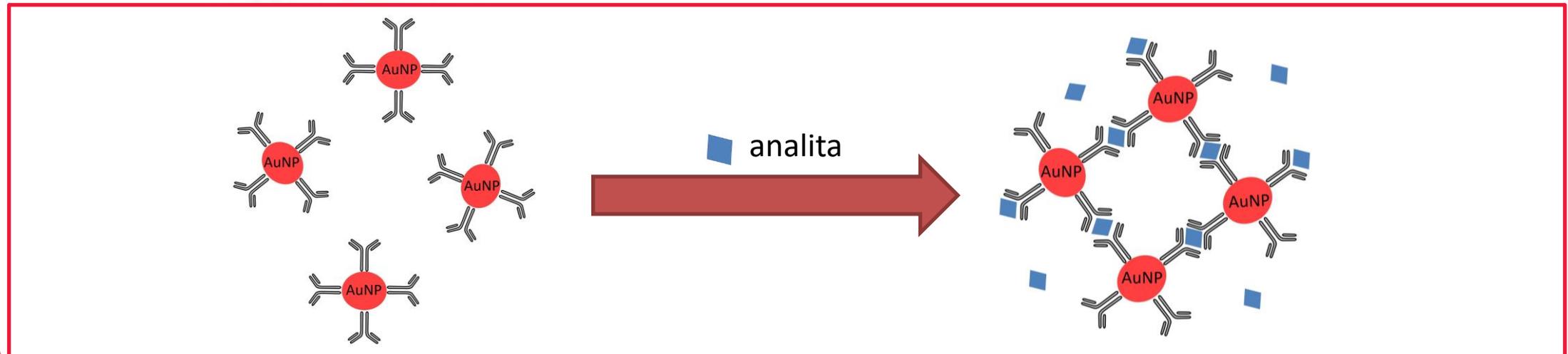
Le nanoparticelle di oro sono tra le più utilizzate tra i metalli nobili.



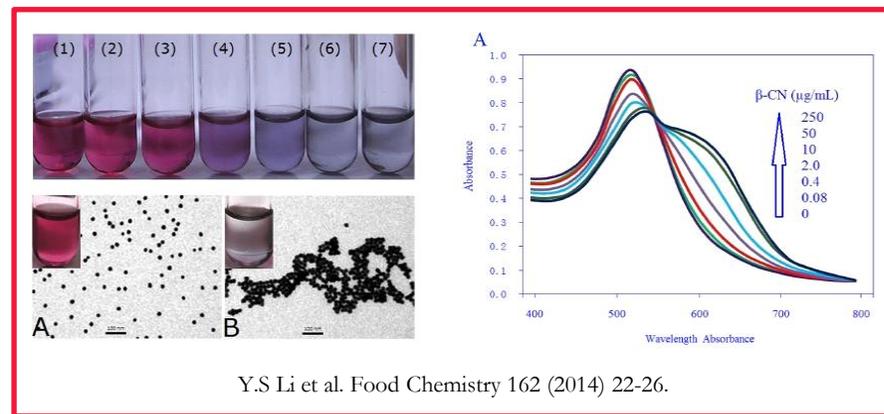
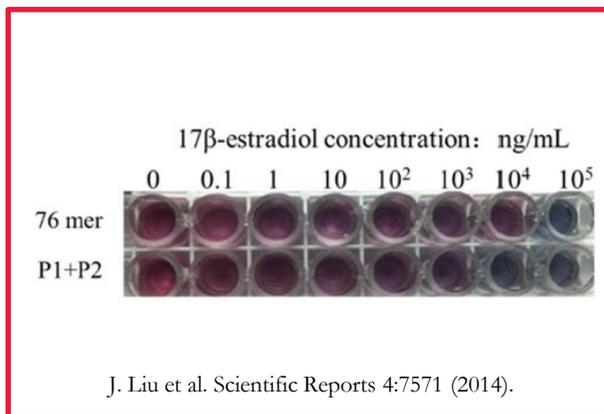
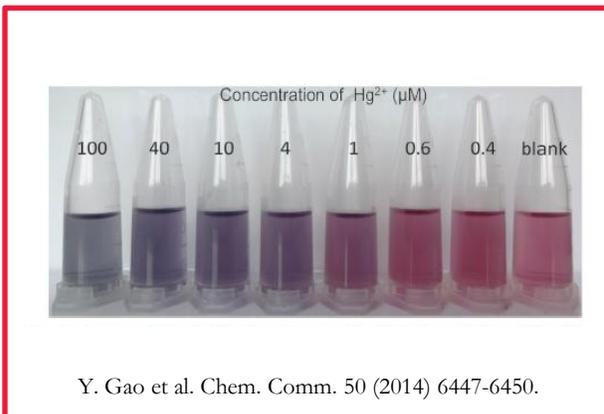
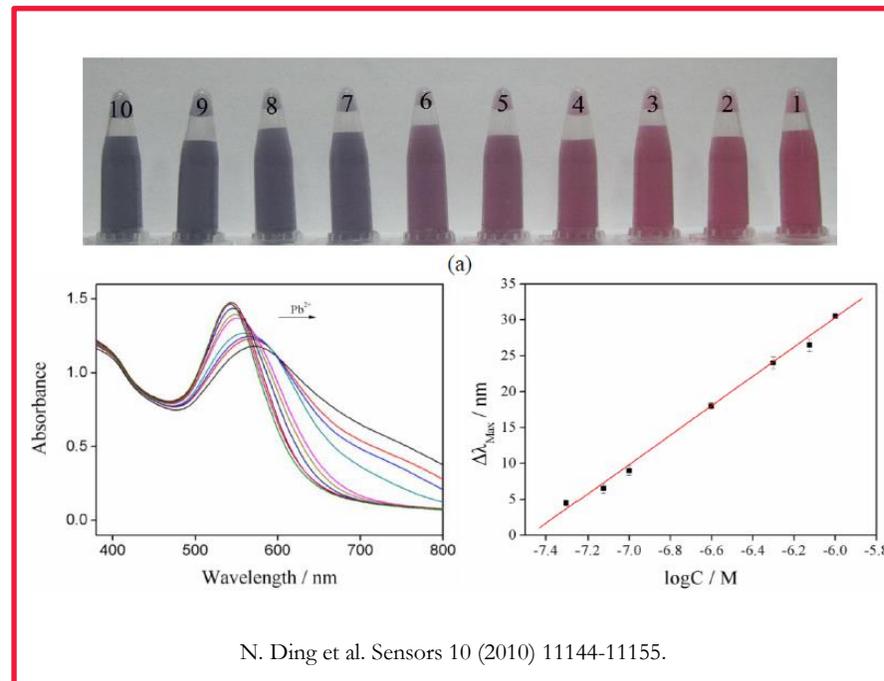
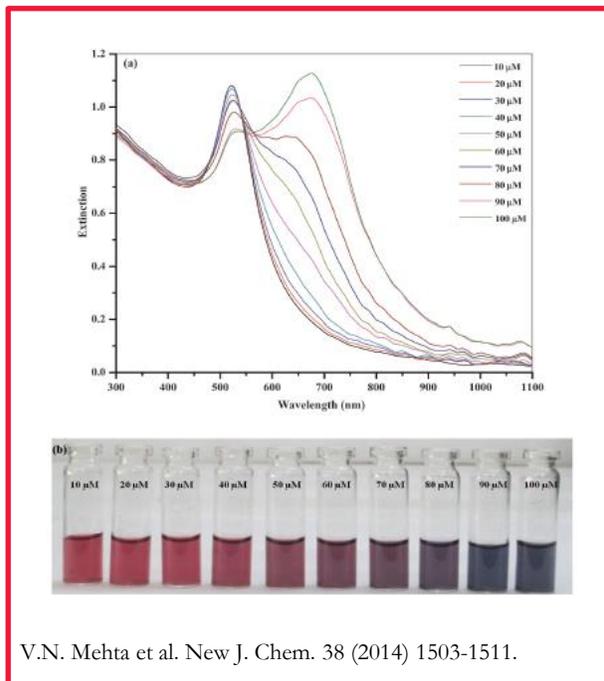
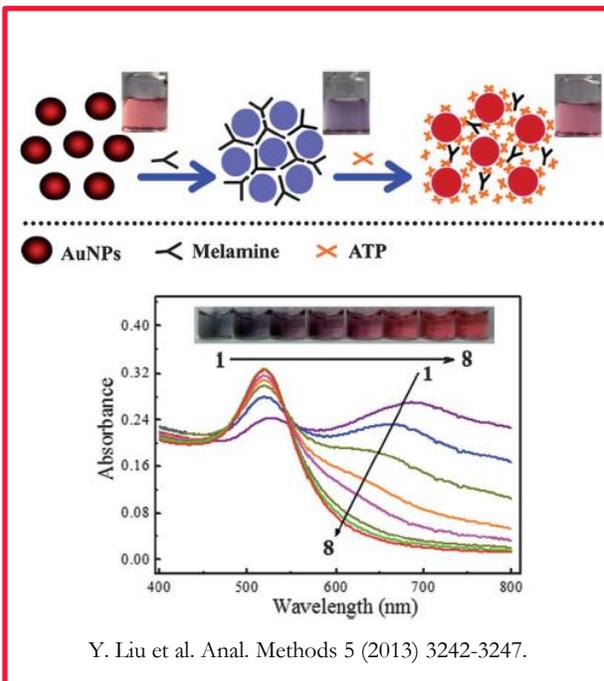
Risonanza plasmonica localizzata di superficie (LSPR):



- Composizione
- Forma
- Dimensione
- Proprietà del mezzo



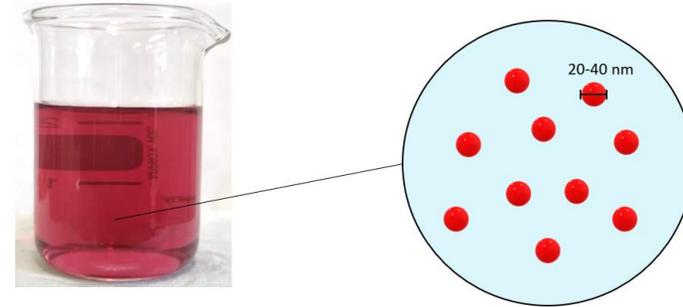
AuNPs nello sviluppo di saggi colorimetrici



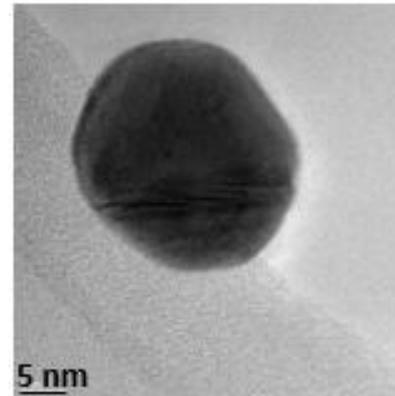
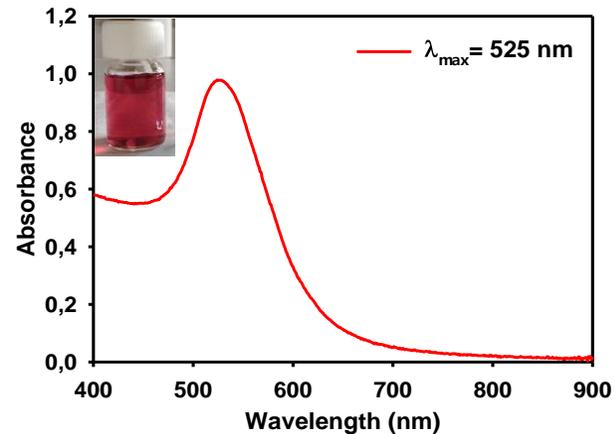
Le nanoparticelle di oro si ottengono per riduzione di Au^{3+} ad Au^0 .



1. Acido tetracloroaurico @ T ebollizione
2. Citrato di sodio



Nanoparticelle di oro (AuNPs) di forma sferica, con un diametro di circa 30 nm



- Elevati coefficienti di estinzione molare
- Sintesi semplice e poco costosa
- Facilmente coniugabili agli anticorpi

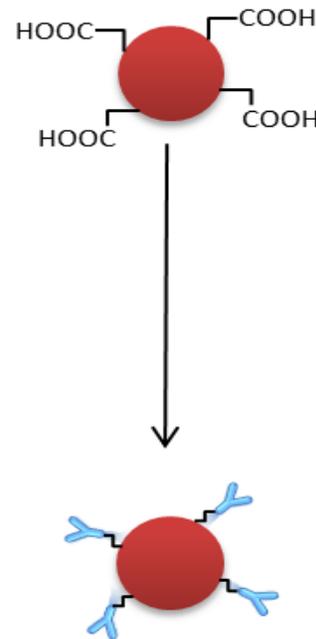
Le prestazioni analitiche di un LFIA sono influenzate dalla qualità del marcato tra anticorpo e nanoparticelle di oro.

Strategie per ottenere marcare gli anticorpi con le AuNPs (AuNPs-Ab)

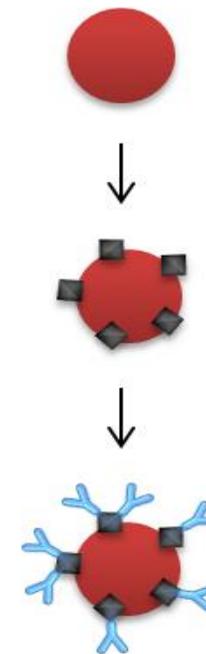
1) Adsorbimento



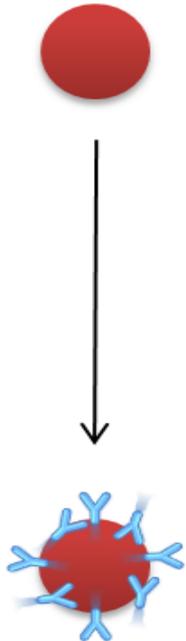
2) Legame covalente



3) Doppio strato/mediato



1) Adsorbimento

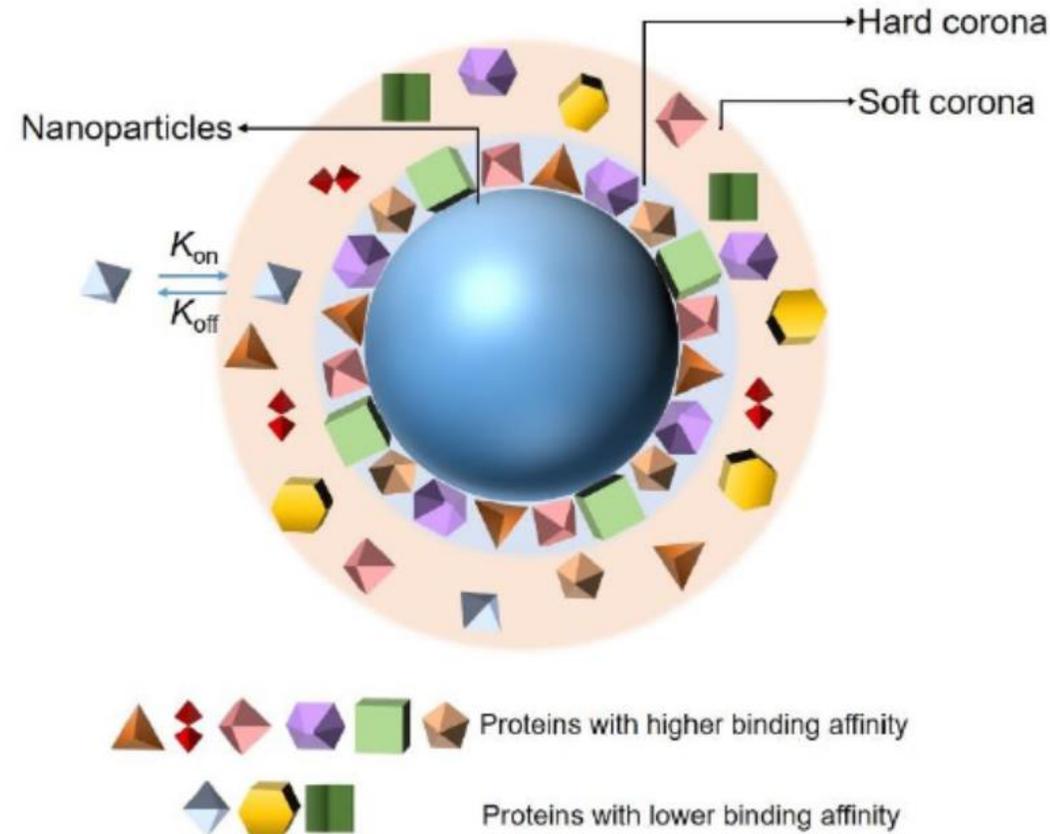


- Gli anticorpi interagiscono spontaneamente con la superficie delle AuNPs mediante una serie di interazioni non covalenti.
- L'adsorbimento è il metodo più semplice e più utilizzato per ottenere AuNPs-Ab.
- Gli anticorpi si adsorbono in maniera casuale sulla superficie delle AuNPs.
- Si stima che solo il 25% degli anticorpi adsorbiti sulla superficie delle AuNPs siano effettivamente in grado di interagire con l'antigene*.

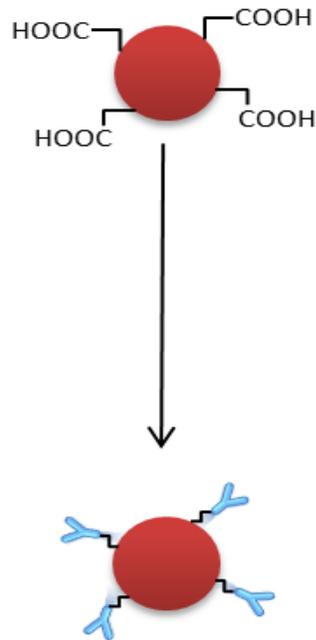
* K. Tripathi, J.D. Driskell, ACS Omega 3 (2018) 8253–8259

Marcato AuNPS-Ab: "protein corona"

L'adsorbimento delle proteine sulla superficie delle nanoparticelle porta alla formazione del cosiddetto *protein corona* che altera le proprietà di superficie e trasforma le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche delle nanoparticelle stesse. La composizione del *protein corona* dipende dalla natura delle proteine, ma anche da dimensione, forma, carica e composizione superficiale delle nanoparticelle.



2) Legame covalente

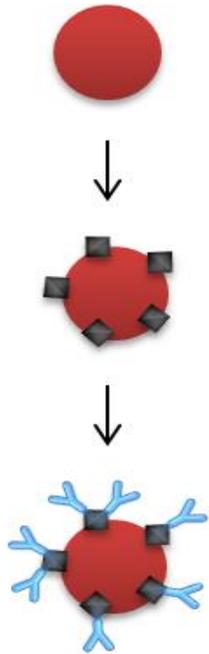


- L'interazione covalente tra Ab e AuNPs può avvenire modificando la superficie delle AuNPs con opportuni gruppi funzionali.
- In genere si utilizzano composti eterobifunzionali costituiti da un gruppo tiolo da un lato, e dal gruppo funzionale di interesse che interagirà covalentemente con l'anticorpo dall'altro.

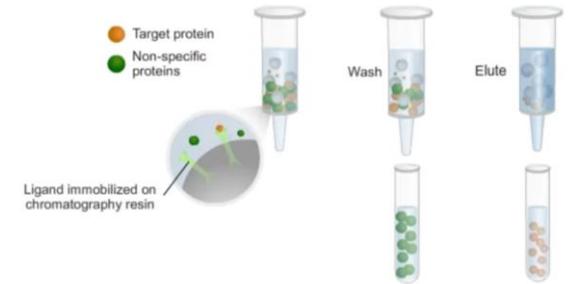


Marcato AuNPs-Ab (interazione mediata)

3) Doppio strato/mediato



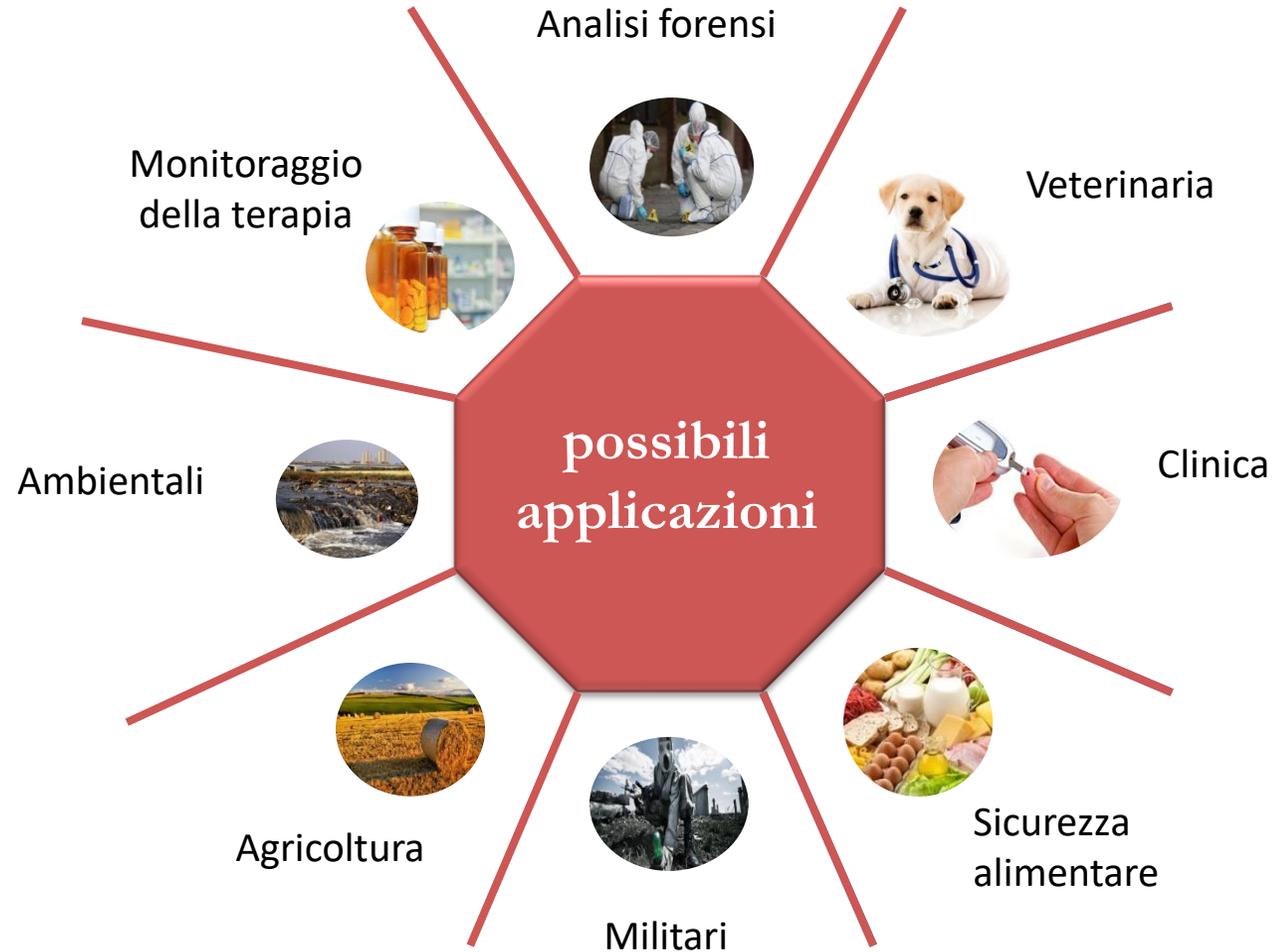
- La proteina A da *Stafilococcus aureus* può essere utilizzata come mediatore.
- La proteina A ha una massa molecolare di ca. 42 kDa.
- La proteina A è classicamente utilizzata nelle separazioni di affinità per isolare le IgG.
- La proteina A è in grado di legare IgG di varie specie animali, interagendo con la loro porzione Fc.
- L'utilizzo della proteina A come mediatore consente, quindi, l'orientamento degli anticorpi.
- Si stima che più del 90 % degli anticorpi legati tramite la proteina A sia in grado di interagire con l'antigene*.



* K. Tripathi, J.D. Driskell, ACS Omega 3 (2018) 8253–8259

Target ed applicazioni dei LFIA

Potenzialmente, in LFIA si possono analizzare tutti questi analiti per cui si ha a disposizione un anticorpo.



NON COMPETITIVO

Utilizzato per analiti con almeno due siti antigenici.

Negativo



Positivo



COMPETITIVO

Utilizzato principalmente per analiti con un solo sito antigenico.

Negativo

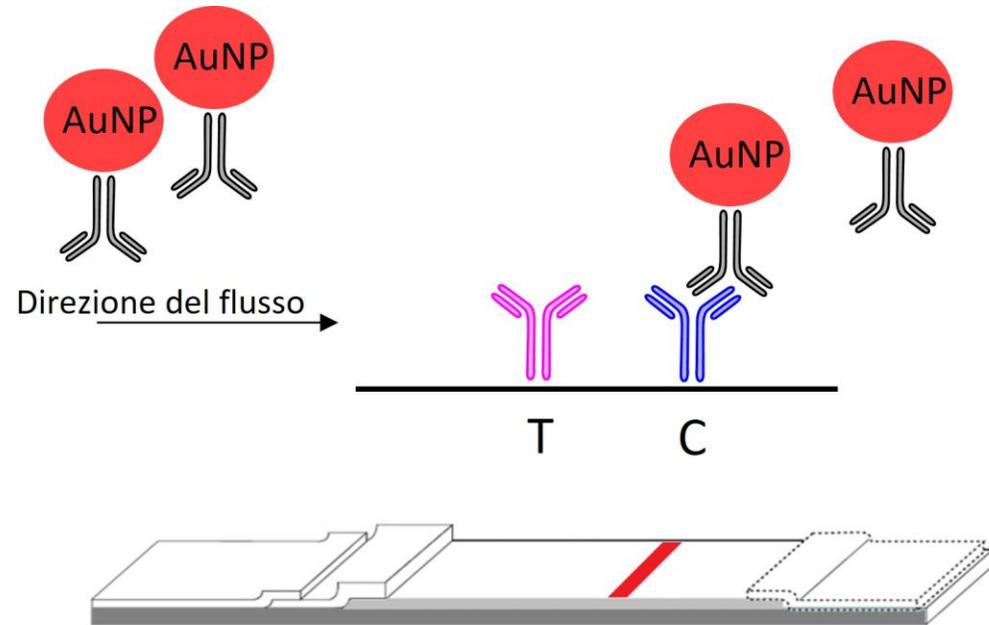


Positivo

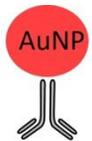
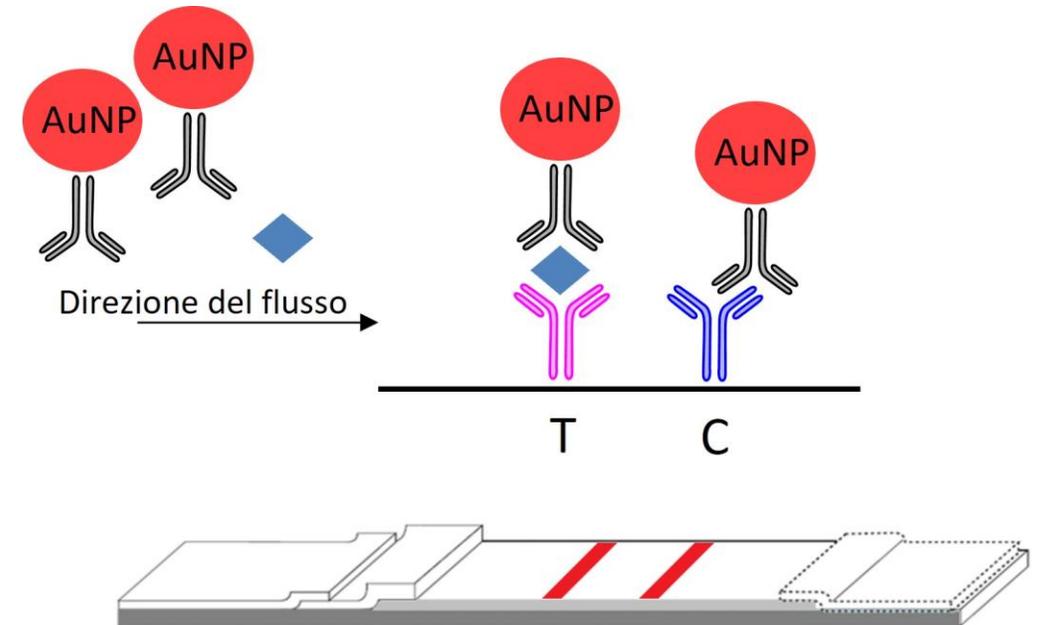


Formati di LFIA: non competitivo a due siti (sandwich)

ASSENZA ANALITA



PRESENZA ANALITA



Ab di rivelazione
marcato con AuNPs



Ab di cattura
anti-analita



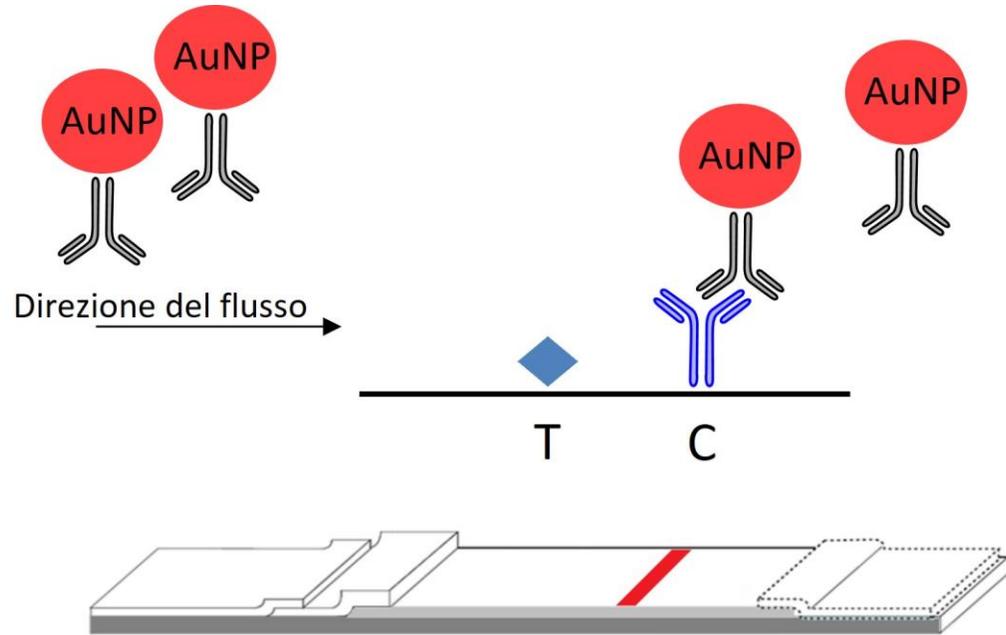
Ab anti anticorpo
di rivelazione



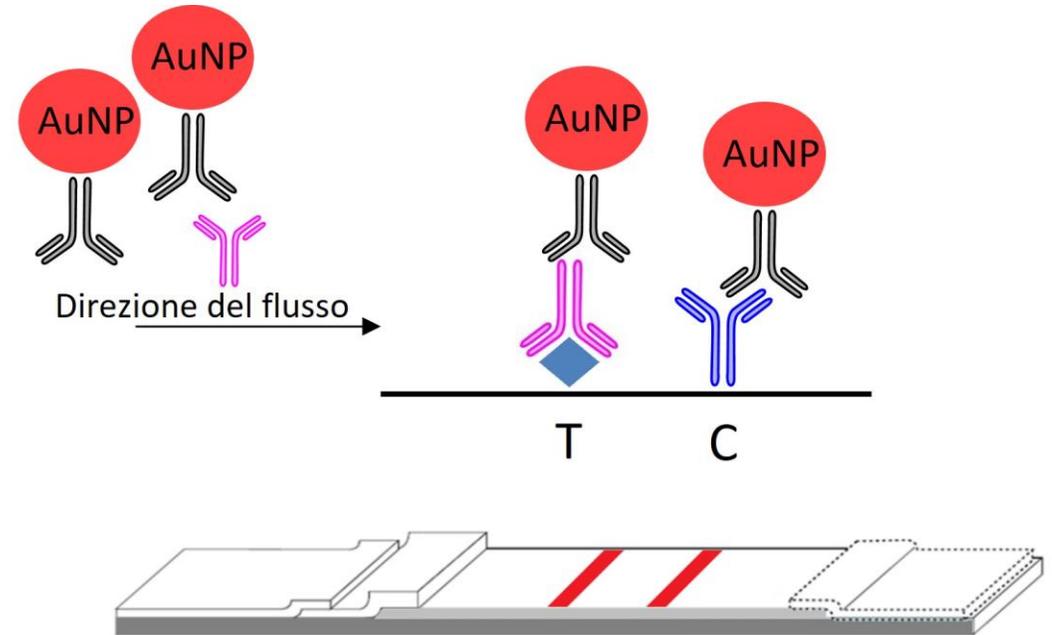
Analita

Formati di LFIA: non competitivo ad un sito

ASSENZA ANALITA



PRESENZA ANALITA



Ab di rivelazione
marcato con AuNPs



Ab (analita)



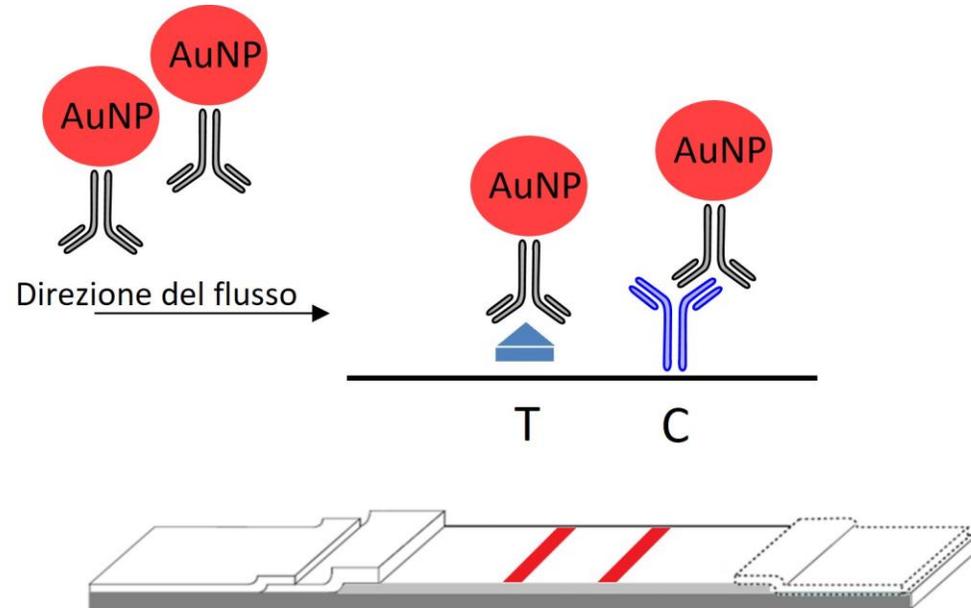
Ab anti anticorpo
di rivelazione



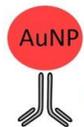
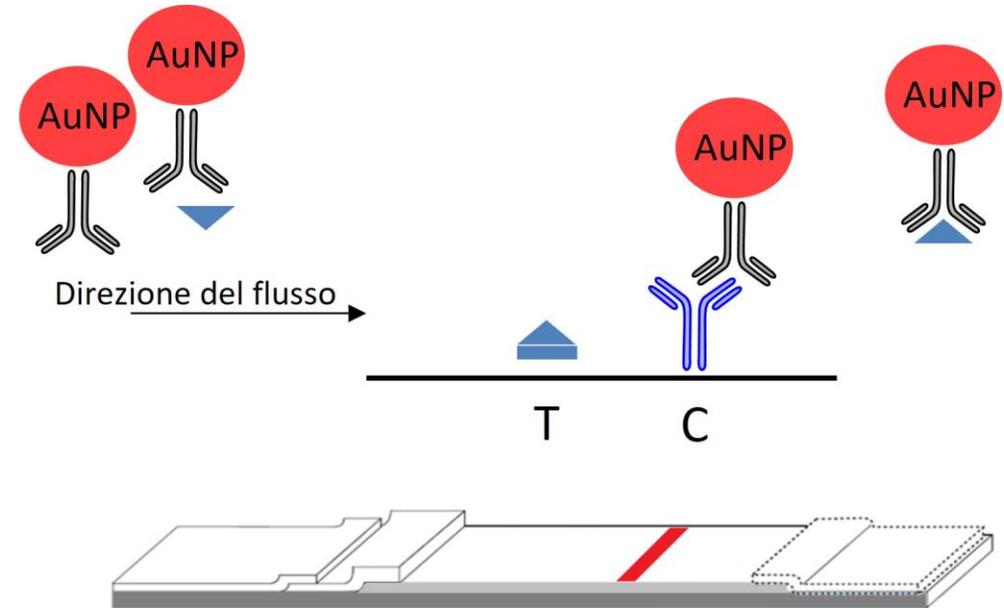
Antigene

Formati di LFIA: competitivo indiretto

ASSENZA ANALITA



PRESENZA ANALITA



Ab di rivelazione
marcato con AuNPs



Coniugato proteico
dell'analita



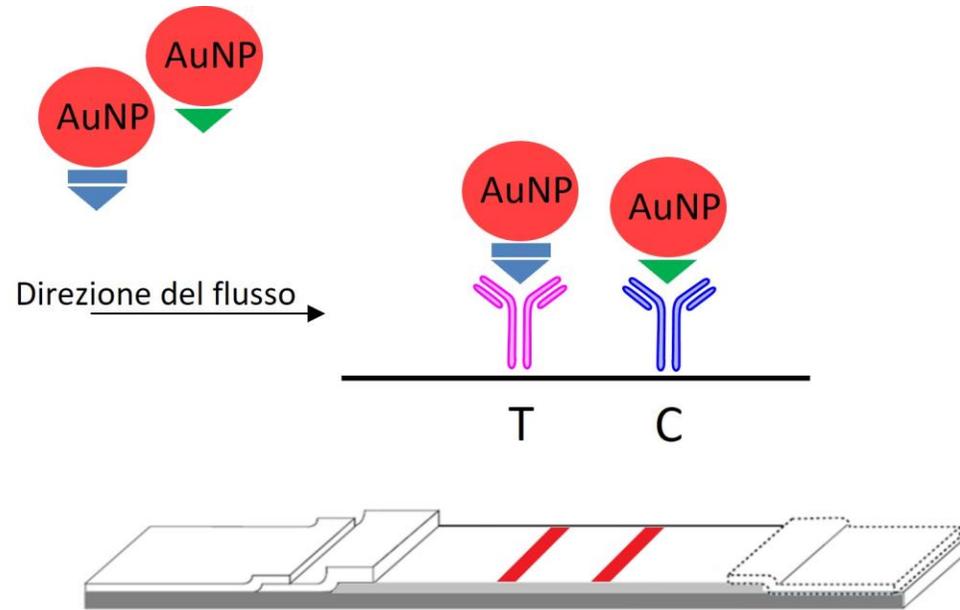
Ab anti anticorpo
di rivelazione



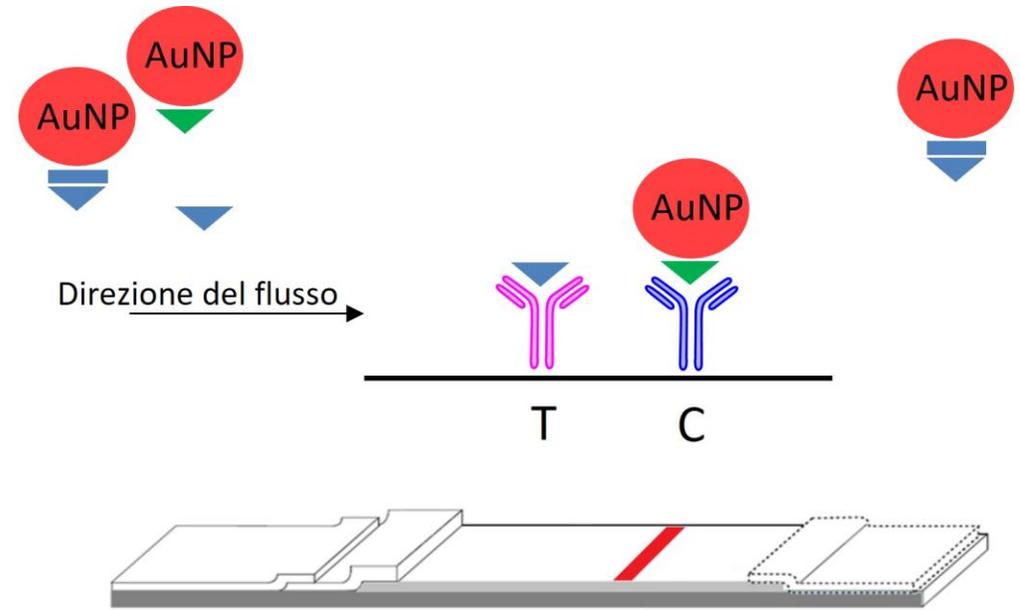
analita

Formati di LFIA: competitivo diretto

ASSENZA ANALITA



PRESENZA ANALITA



Omologo dell'analita
marcato con AuNPs



Antigene non-target
marcato con ANPs



Ab di cattura
anti-analita



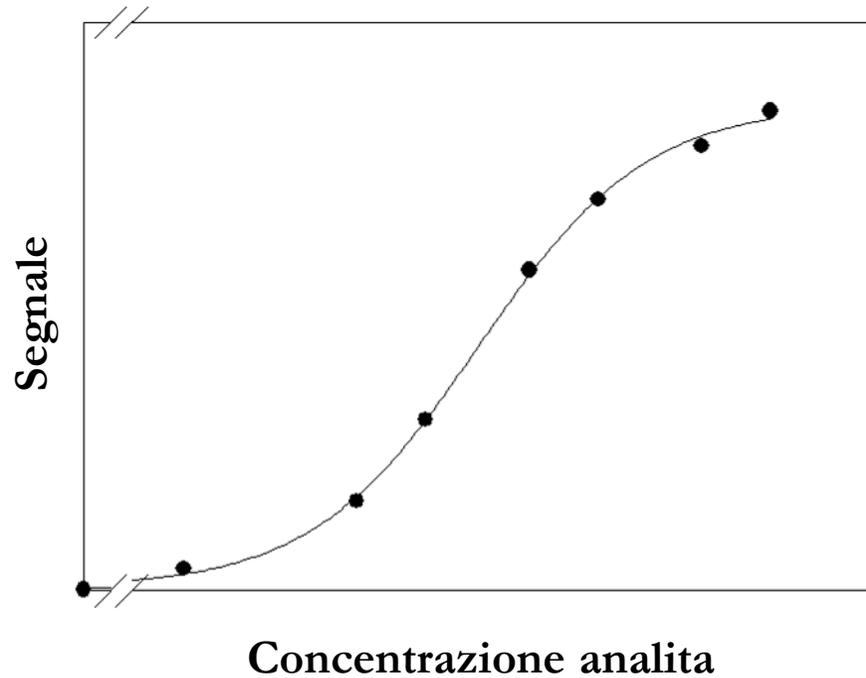
Ab di cattura anti
antigene non target



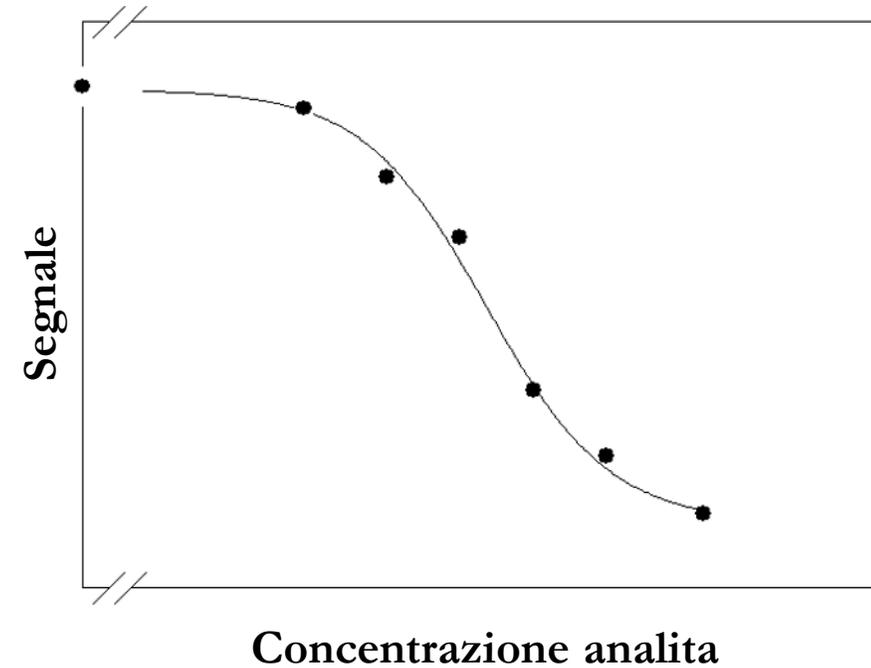
Analita

Differenza di sensibilità tra saggi competitivi e non competitivi

Formato non competitivo



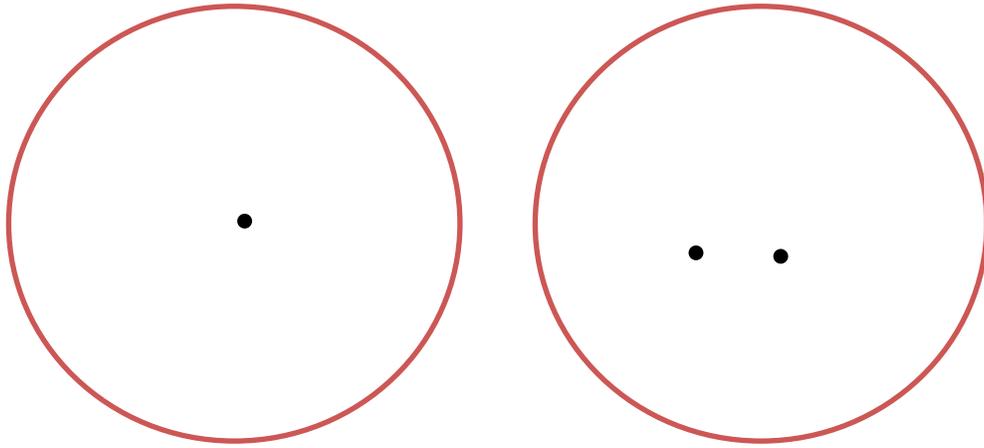
Formato competitivo



$$y = S_{\min} + \frac{(S_{\max} - S_{\min})}{1 + (x / IC_{50})^{-HillSlope}}$$

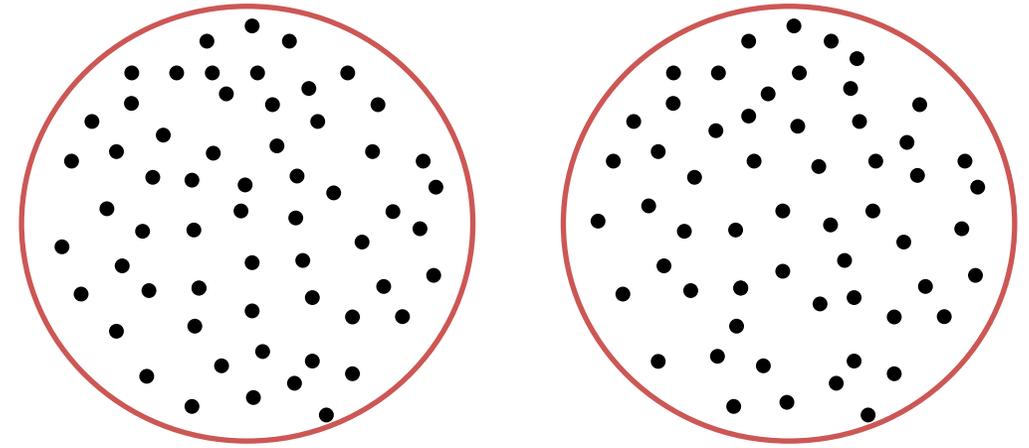
Differenza di sensibilità tra saggi competitivi e non competitivi

Formato non competitivo



$\Delta = 1$

Formato competitivo



n=60

n=57

$\Delta = 3$

REASSURED criteria

Real-time connectivity

Ease specimen collection

Affordable

Sensitive

Specific

User-friendly

Rapid and robust

Equipment-free / Environmentally friendly

Deliverable to end-users



Fatturato mondiale dei LFIA	
Anno	Milardi (US\$)
2019	5.98
2027	10.36



Global Lateral Flow Assay Market Size by Type, by Technique, by Application, by End-user, by Geography and Forecast. (<https://www.verifiedmarketresearch.com/product/lateral-flow-assay-market/>)



H. Kettler, K. White, S. Hawkes, UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. (2004)

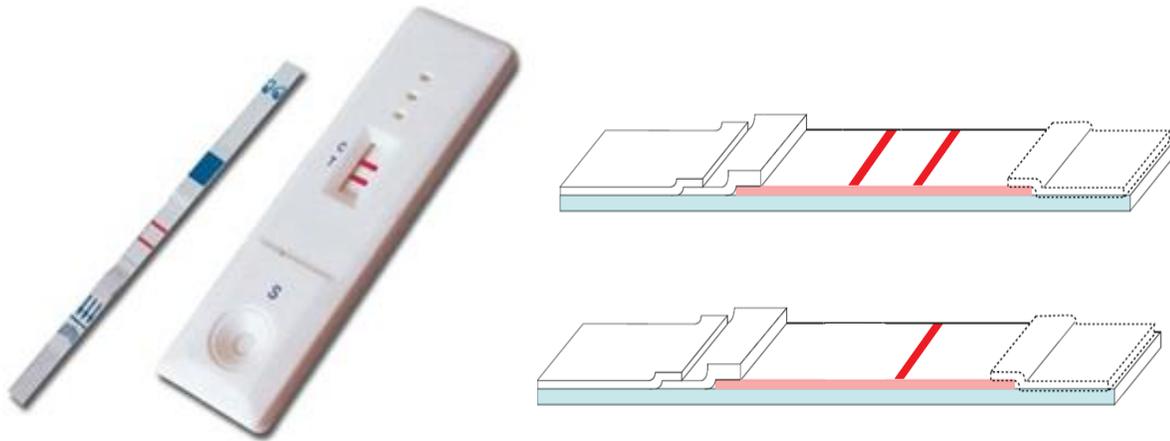
K.J. Land, D.I. Boeras, X.-S. Chen, A.R. Ramsay, R.W. Peeling, *Nat. Microbiol.* 2019, 4, 46–54.

Principali limitazioni dei classici LFIA

I LFIA forniscono principalmente una risposta qualitative ed in genere sono caratterizzati da una sensibilità peggiore rispetto a test come ELISA e PCR.

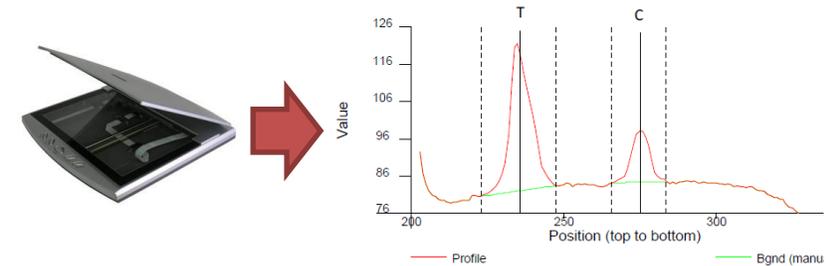
Risultati qualitativi

LOD 1-10 ng/mL



Risposta sì/no

Risultati quantitativi

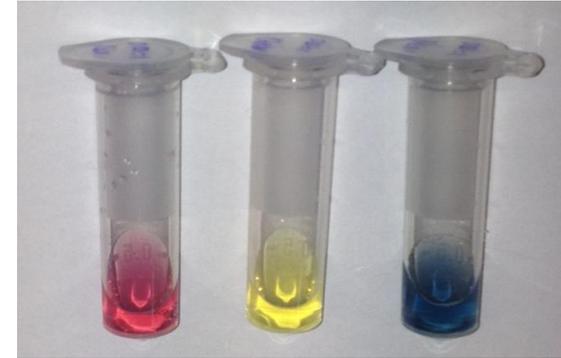
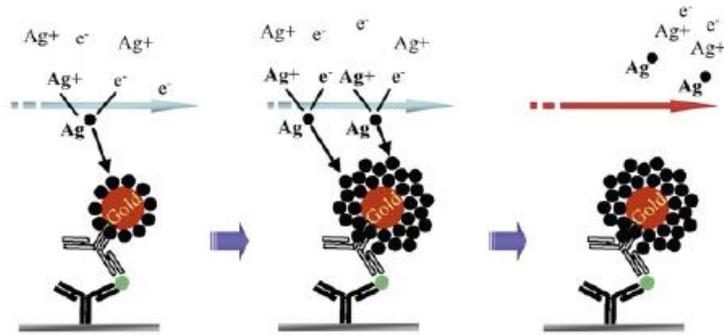


Strategie per ottenere una nuova generazione di lateral flow immunoassay

- Migliore sensibilità
- Quantificazione
- Rivelazione simultanea di più analiti

Miglioramento delle prestazioni analitiche dei LFIA

Incremento dei segnali mediante processi chimici e/o utilizzo di nuovi marcatori colorimetrici

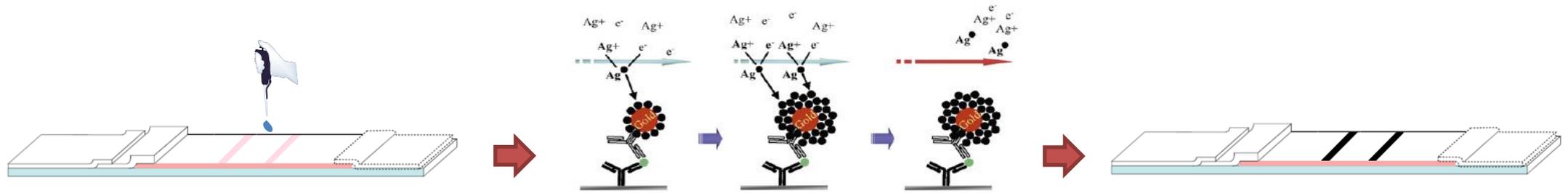


Utilizzo di sistemi di lettura



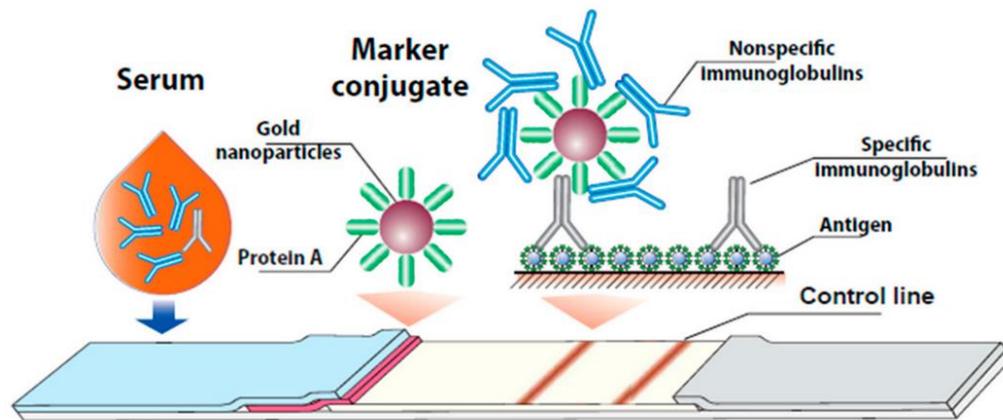
Miglioramento delle prestazioni analitiche dei LFIA

Silver enhancement

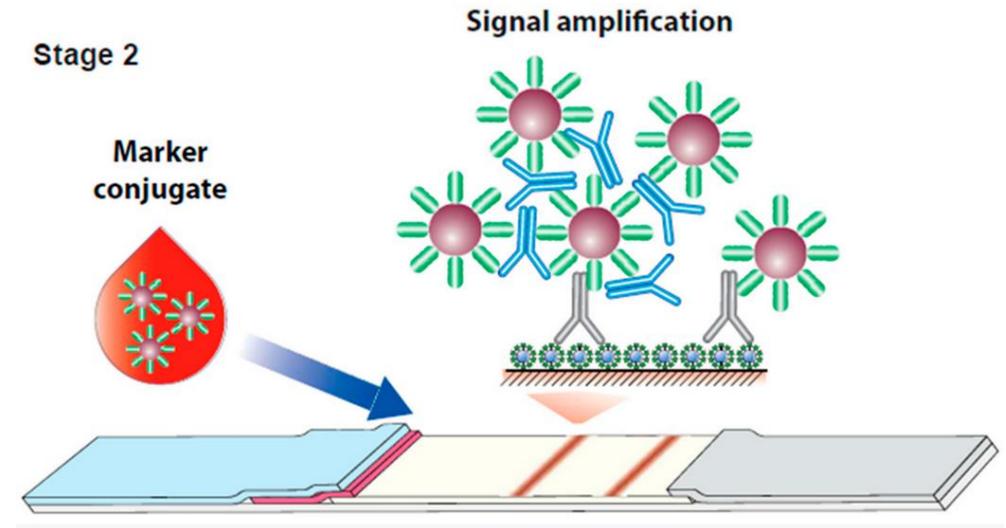


L. Anfossi, F. Di Nardo, C. Giovannoli, C. Passini, C. Baggiani, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 9859-9867.

Stage 1



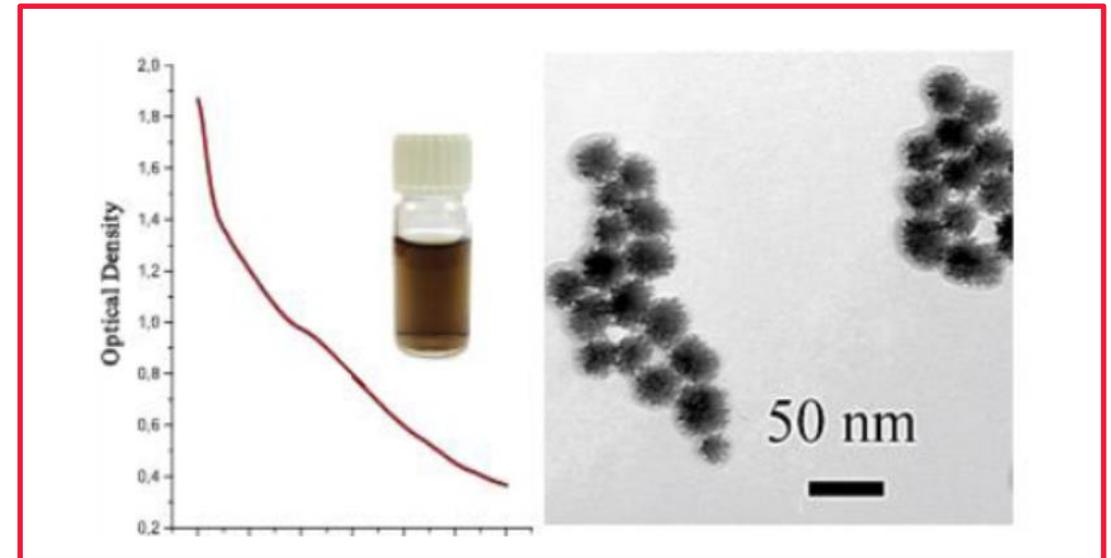
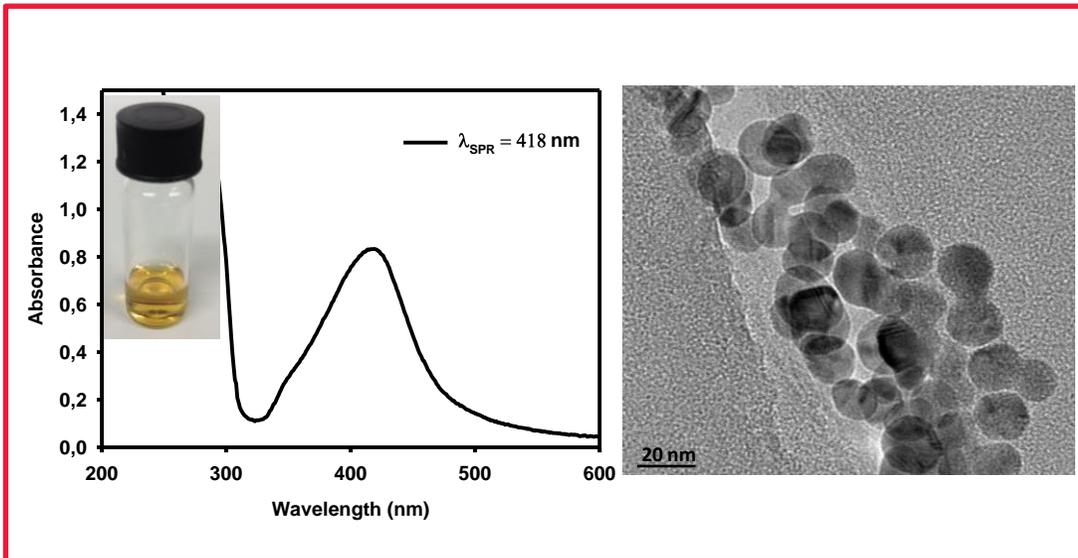
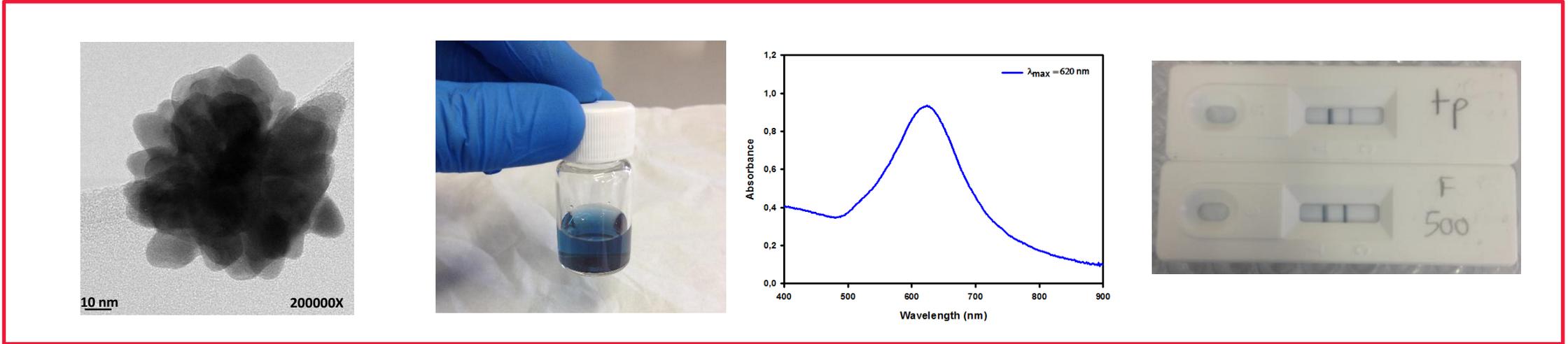
Stage 2



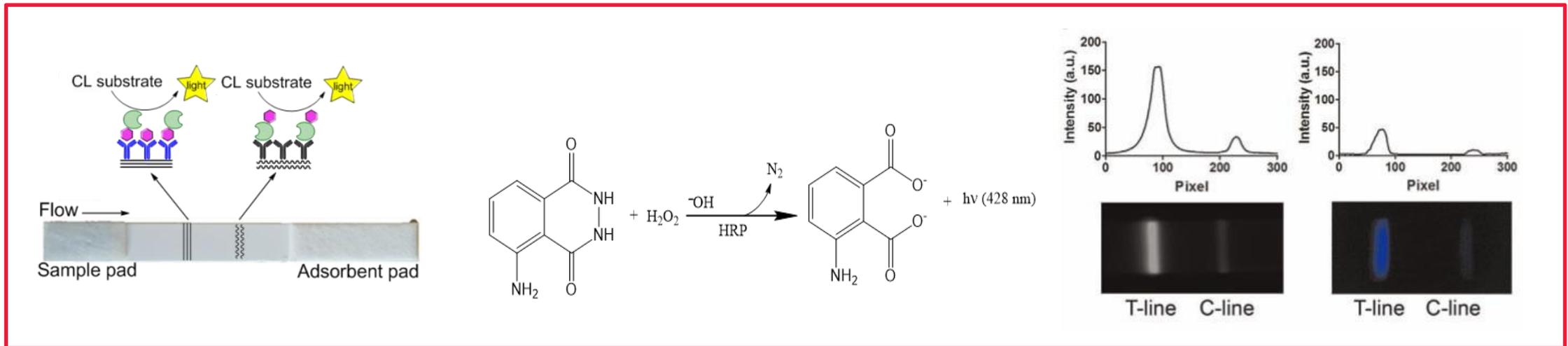
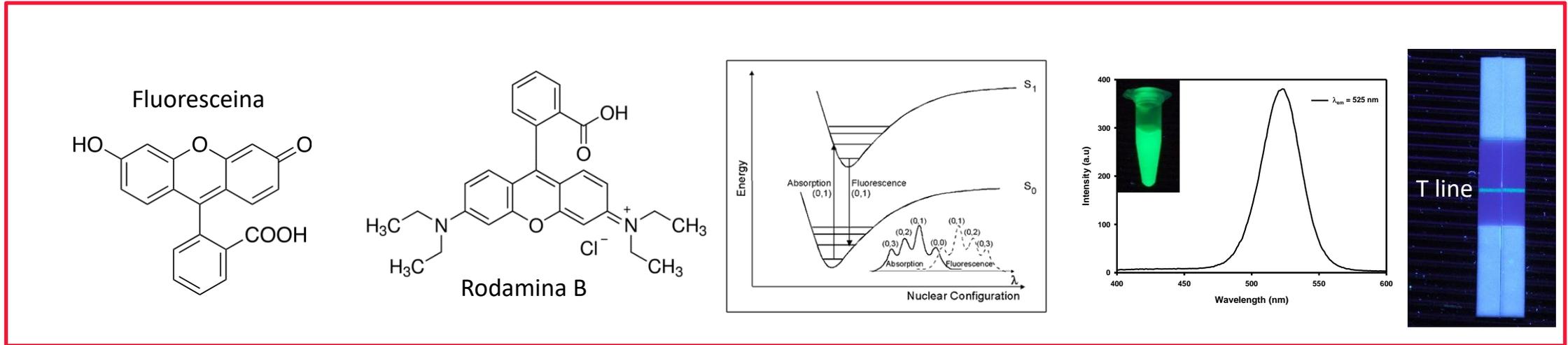
D.V. Sotnikov, N.A. Byzova, A.V. Zherdev, Y. Xu, B.B. Dzantiev. *Biosensors* **2022**, *12*, 434.



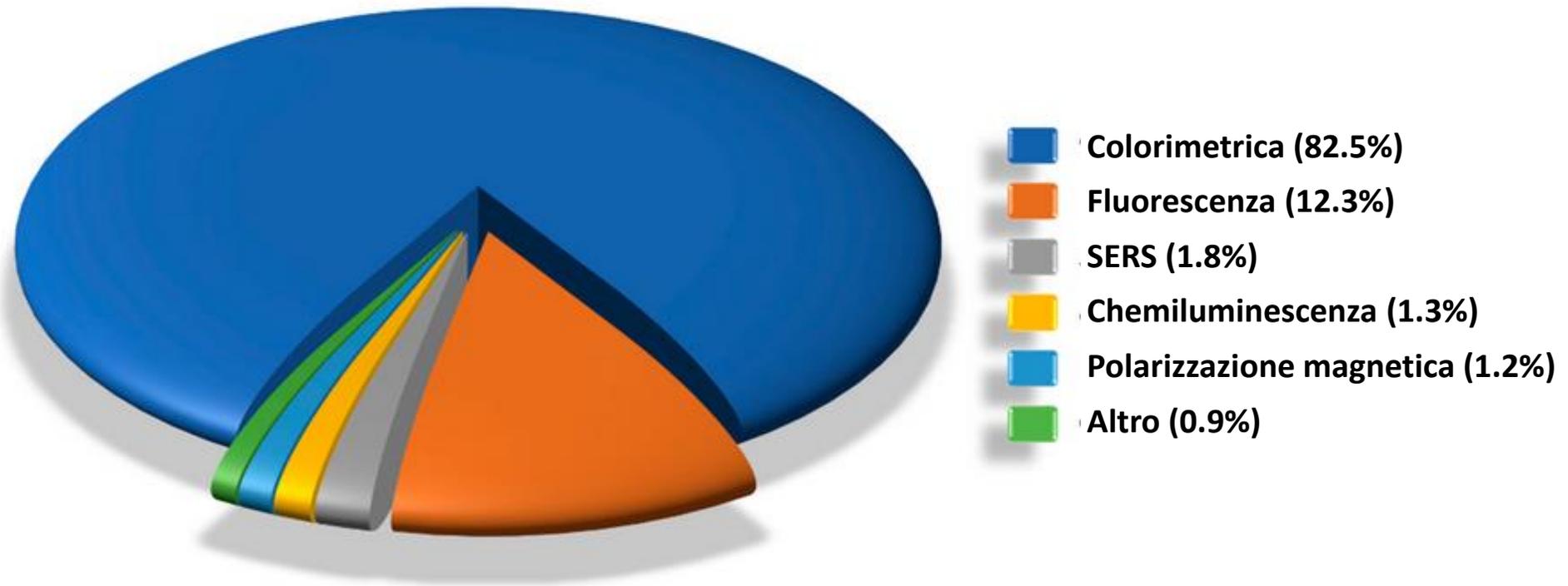
Miglioramento delle prestazioni analitiche dei LFIA



Miglioramento delle prestazioni analitiche dei LFIA

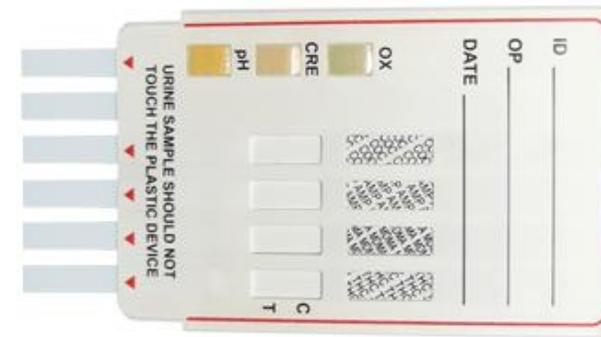


Metodi di rivelazione più utilizzati in LFIA (pubblicazioni scientifiche dal 2010 al 2019 compresi):



* Di Nardo, F.; Chiarello, M.; Cavallera, S.; Baggiani, C.; Anfossi, L. *Sensors* **2021**, 21, 5185.

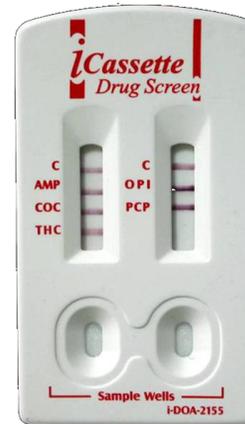
L'analisi simultanea di più analiti su uno stesso dispositivo consente di ridurre ulteriormente tempi e costi di analisi.



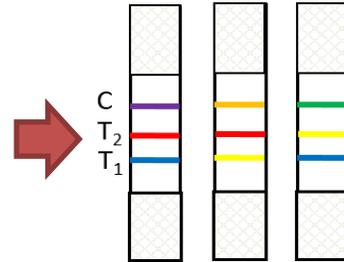
Utilizzo di più linee di Test su una stessa striscetta



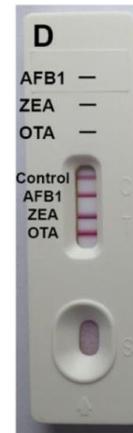
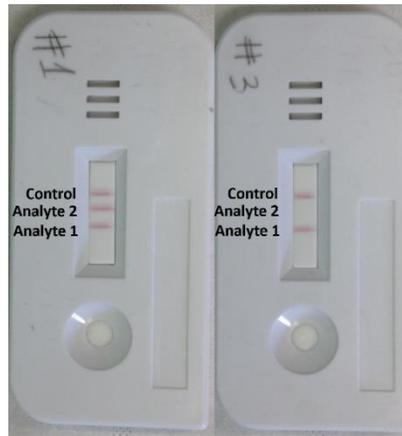
Combinazione di strisce, ognuna con più linee di Test



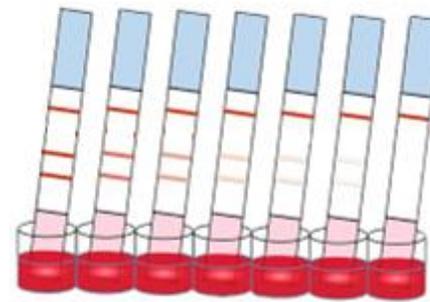
Marcatori caratterizzati da colori differenti



Cassette



Dipstick



Vantaggi e svantaggi dei LFIA



- Rapidità di analisi
- Rivelazione ad occhio nudo
- Semplicità d'uso
- No strumentazione e reagenti pericolosi
- No personale specializzato
- Analisi in situ
- Piccoli volumi di campione necessari
- Pretrattamento del campione limitato o non necessario
- Facilità di produzione su larga scala
- Costi di produzione e vendita relativamente modesti
- Buona shelf-life (12-24 mesi)
- In genere non richiede la conservazione a 4°C



- Tempi di sviluppo
- Investimento iniziale (strumentazioni, bioreagenti, materiali)
- Lungo processo di scelta dei bioreagenti
- Prestazioni analitiche peggiori rispetto ai metodi di laboratorio
- Minori possibilità di quantificazione

LFIA: facili da utilizzare, ma non altrettanto semplici da sviluppare!!



Bioreagenti: anticorpi, coniugati, omologhi dell'analita

Materiali: membrane, pads, backing, scatoline di plastica

Ottimizzazione del sistema: formato del saggio, quantità dei bioreagenti, tempo di analisi, trattamento dei materiali...

Grazie per l'attenzione!



&



contatto: fabio.dinardo@unito.it