

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle
contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte**

**Il laboratorio opera dal 2004 nel
controllo delle contaminazioni da
aflatossina M1 e B1**

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

L'AFLATOSSINA M1 UN PROBLEMA PER IL LABORATORIO

VALORI DI CONTAMINAZIONE PARI O INFERIORI A
50 ng/Kg

1 ng = 1 miliardesimo di grammo = 0.000000001g

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

Quali sono le performances dei metodi di analisi a livelli così bassi di contaminazione ?

A livello di 50 ng/Kg lo scarto tipo di Riproducibilità σ_R è pari a 11 ng/Kg

**L'incertezza calcolata è per questo livello pari a ± 22 ng/Kg (45 % del valore)
(METODICA HPLC/FLD)**

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

ANNO	LATTE VACCINO	LATTE IN POLVERE	LATTE OVINO	LATTE CAPRINO	TOTALE
2005	124		12		136
2006	25		58	3	86
2007	6	1	51		58
2008	10		46	1	57
2009	9		52		61
2010	13		40	4	57
2011	6		41	5	52
2012	18		45	13	76
2013	197		185	73	455
2014	58		164	65	287
Totale complessivo	466	1	694	164	1325

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

**Metodi di analisi:
Metodi chimico fisici :
HPLC/FLD
LC/MS/MS**

**Metodi biologici immunoenzimatici:
Immunocromatografia
ELISA**

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

HPLC- M1 latte e latte in polvere

Riferimento

Norma ISO 14501: 2007 Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content- Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high –performance liquid chromatography

Limite di rilevamento

8 ng/l derivati $\mu\text{g/Kg}$

Ripetibilità sr

5 ng/l per un livello di 80 ng/l

Recupero medio

80%

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

Descrizione del metodo

L'Aflatossina M1 è estratta da un'aliquota di campione mediante il passaggio attraverso una colonna di immunoaffinità che contiene anticorpi specifici legati a una matrice solida.

Nel passaggio attraverso la colonna gli anticorpi legano selettivamente l'aflatossina M1 presente nel campione formando un complesso antigene-anticorpo.

Tutti gli altri componenti del campione sono eliminati dalla colonna mediante lavaggi con acqua.

L'aflatossina viene poi eluita dalla colonna, recuperata e infine misurata mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico.

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Metodologia HPLC

Vantaggi

Ottima sensibilità

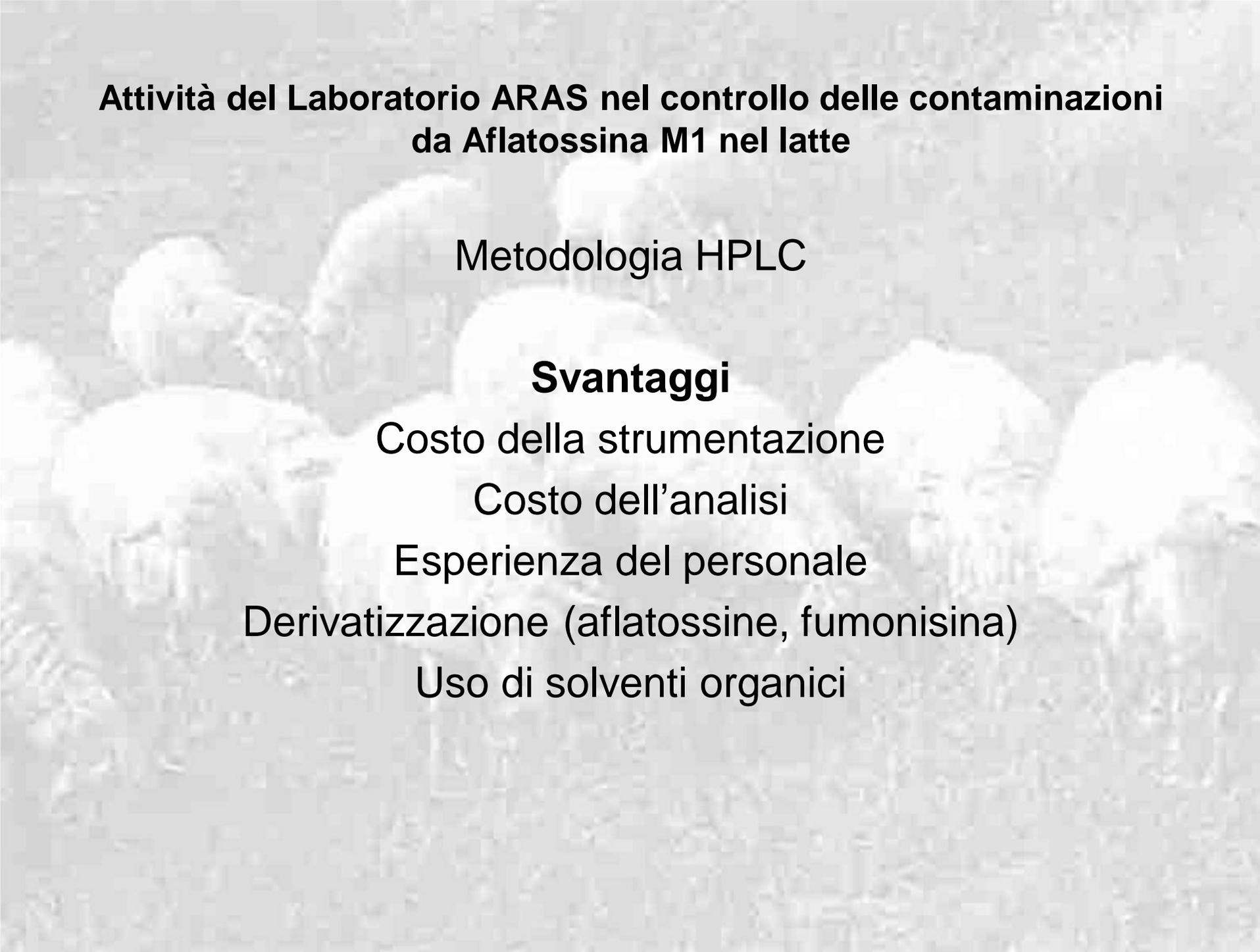
Ottima selettività

Buona ripetibilità

Tempi di analisi relativamente brevi

Metodi ufficiali disponibili (Norma ISO 14501:2007)

Possibilità di automatizzazione



**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni
da Aflatossina M1 nel latte**

Metodologia HPLC

Svantaggi

Costo della strumentazione

Costo dell'analisi

Esperienza del personale

Derivatizzazione (aflatossine, fumonisina)

Uso di solventi organici

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

LC/MS/MS

Tecnica analitica basata sull'utilizzo della [cromatografia liquida](#) insieme alla [spettrometria di massa](#). Il cromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore

Si utilizzano generalmente spettrometri a multistadio (MS/MS) basati su analizzatori di massa a triplo quadrupolo e con modalità di acquisizione *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

**NON E' NECESSARIA UNA FASE
PRELIMINARE DI PURIFICAZIONE**

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

LC/MS/MS

Vantaggi

Simultanea analisi di più micotossine

Buona sensibilità

Costituisce metodo di conferma

Non è necessaria la derivatizzazione

Svantaggi

Effetti matrice

Alta esperienza del personale

Costi elevati della strumentazione

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Campionamento
Estrazione
Purificazione
Rivelazione

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Estrazione

**_ Per trasferire la tossina dal campione solido
ad un solvente**

**Per rimuovere almeno in parte gli interferenti
della matrice**

Latte

sgrassatura

Alimenti zootecnici

**estrazione dei campioni macinati con misture
di acetonitrile-acqua o metanolo –acqua**

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

Purificazione o clean-up in colonne di immunoaffinità

L'estratto è caricato su colonna

Le tossine si legano agli anticorpi

Le sostanze indesiderate vengono lavate via con opportune soluzioni

Le tossine vengono eluite con solvente

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Rivelazione con fluorimetro

Risultato quantitativo

E' un valore ottenuto utilizzando una curva di
taratura

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni

da Aflatossina M1 nel latte

METODI DI SCREENING E/O RAPIDI

- Elevato numero di campioni per die
- Interesse ad individuare un livello soglia (ad esempio limite legale)
- Diversità delle matrici da analizzare
 - Differenti sostanze da ricercare
 - Rapidità di risposta
 - Sensibilità accettabile
 - Bassa cross-reattività
 - Contenimento dei costi
 - Esperienza del personale
 - **Possibilità di utilizzo *in-situ***

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

Principi teorici dei metodi immunocromatografici

LFD competitivo

L'LFD competitivo si basa sulla competizione della micotossina presente nel campione con i siti attivi di un recettore anticorpale marcato per i siti attivi di un complesso coniugato micotossina - recettore. La linea test contiene un complesso coniugato - micotossina immobilizzato alla membrana che lega il recettore non legato per formare un complesso coniugato micotossina-recettore colorato.

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

La linea di controllo include un anticorpo specifico legato alla membrana che si lega con il recettore marcato.

Il legame comporta una colorazione della banda. Se il segnale nella linea test è mancante o più debole come intensità, il test indica che l'analita è presente (test positivo). Se la linea test è chiaramente visibile, vuol dire che il campione non contiene la micotossina

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Metodi rapidi immunocromatografici

Vantaggi

Rapidità di esecuzione

Non è necessaria la purificazione

Basso costo della apparecchiatura

Facile da usare

Non necessaria alta qualifica del personale

Discreta esattezza

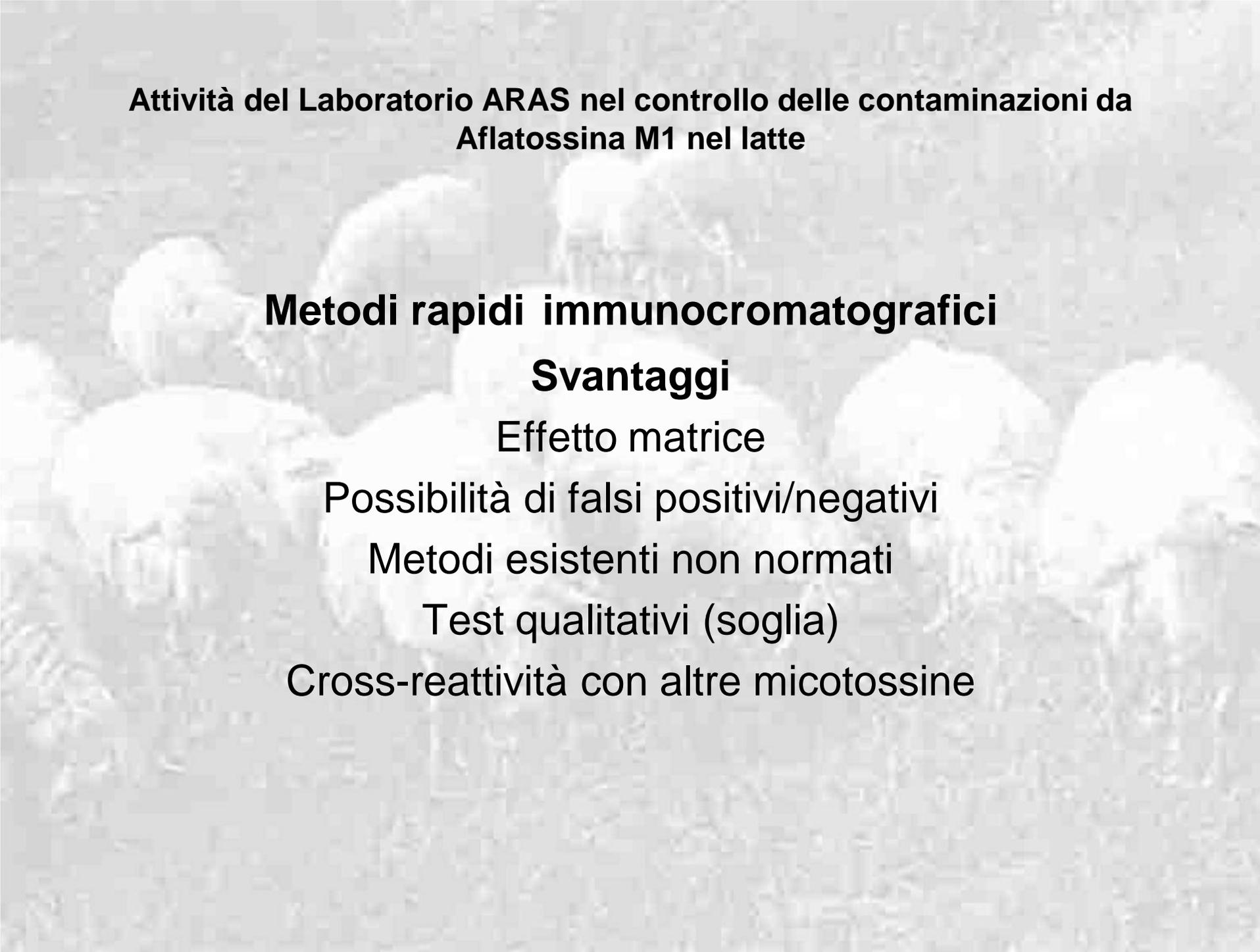
Buona sensibilità (limiti di legge)

Costi operativi medio-bassi

Uso limitato di solventi organici

Validi per test di screening

Possibilità di essere utilizzati in loco



**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

Metodi rapidi immunocromatografici

Svantaggi

Effetto matrice

Possibilità di falsi positivi/negativi

Metodi esistenti non normati

Test qualitativi (soglia)

Cross-reattività con altre micotossine

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ISO 14675:2003 Milk and milk products -- Guidelines for a
standardized description of competitive enzyme
immunoassays -- Determination of aflatoxin M1 content
PER ANALISI DI SCREENING

Preparazione del campione
Saggio immunoenzimatico
Lettura colorimetrica

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

La determinazione si basa su un test competitivo ELISA

Il supporto solido della reazione è costituito da una micropiastra con strip divisibili ricoperte con aflatossina M1

Identificazione di un particolare anticorpo mediante legame con antigene specifico

Evidenza del complesso antigene-anticorpo indice della presenza dell'anticorpo cercato

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

1. **Allestimento dei pozzetti:** diluente in ciascun pozzetto, analita standard (antigene) immobilizzato sul supporto
2. **Reazione di competizione :** campione inserito nel pozzetto insieme ad anticorpo specifico per l'analita. L'antigene (campione) compete con l'antigene immobilizzato nel legare l'anticorpo
3. Incubazione temp. Amb 30 minuti
4. Lavaggio per rimuovere i complessi Ag-Ac in soluzione
5. **Legame del complesso marcato anticorpo – enzima:** inserimento nel pozzetto di un anticorpo marcato con l'enzima che va a legarsi all'anticorpo primario

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

6. Rimozione dei complessi in soluzione

7. **Reazione cromogenica:**

addizione di un reagente incolore che genera una reazione colorimetrica prodotta dall'enzima legato al complesso Ag-Ac immobilizzato sul substrato.

Incubazione a temp. amb 30 min reazione inibita mediante addizione di reagente acido

8. **Dosaggio lettura spettrofotometrica** : intensità di colore invers. prop. Alla concentrazione di analita

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

ELISA

Vantaggi

Preparazione del campione semplice
Equipaggiamento mediamente costoso
Alta sensibilità
Valida per screening
Analisi simultanea di molti campioni

**Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da
Aflatossina M1 nel latte**

ELISA

Svantaggi

Cross-reattività con altre micotossine
(specificità)

Effetti matrice

Presenza di falsi positivi/negativi

Richiede analisi di conferma

Esperienza del personale

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

RING TEST

Il laboratorio attua regolarmente la verifica della qualità delle analisi, sia attraverso una partecipazione costante a *proficiency test* (AIA , Progetto Trieste) sia

attraverso l'uso di materiali con livello di contaminazione noto
(materiali di riferimento CERTIFICATI oppure materiali da proficiency test commercializzati dopo
la conclusione del round)

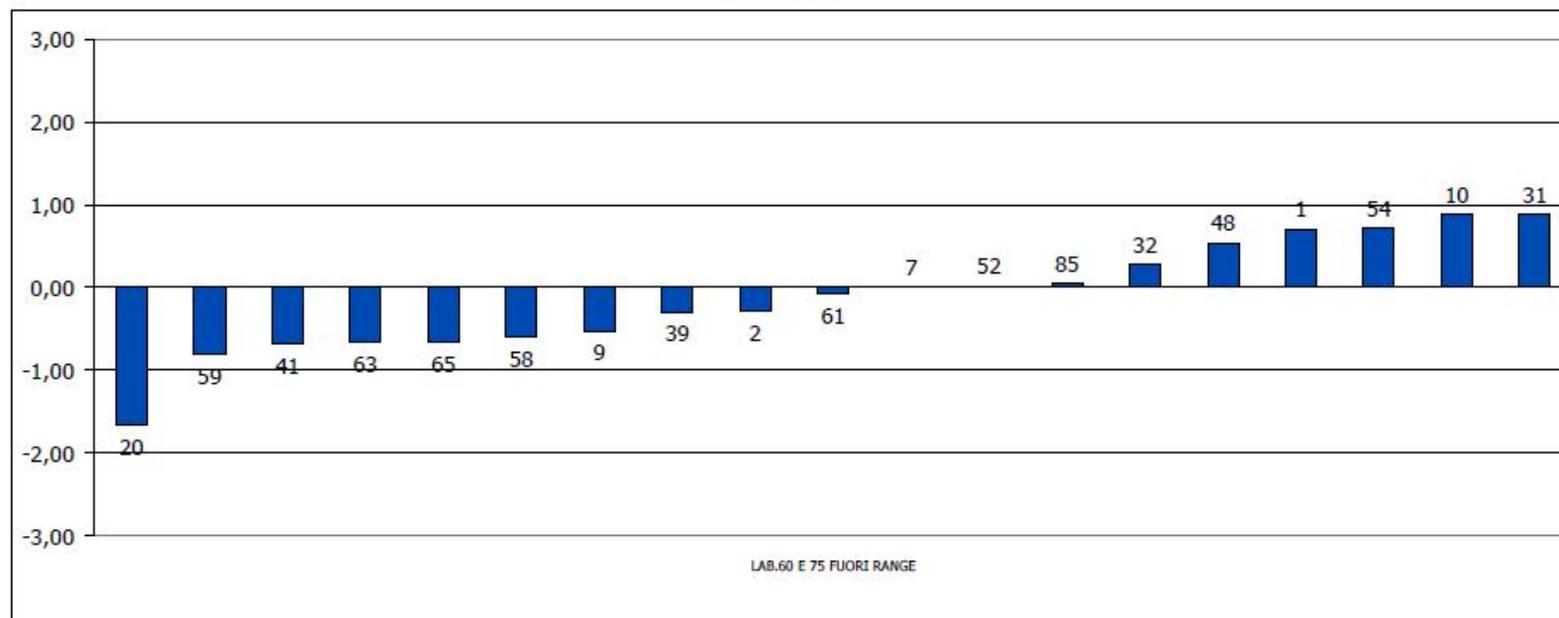
Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte



RING TEST
AFATOSSINA M1
SETTEMBRE 2014

Z SCORE - HPLC

Z-SCORE LABORATORI



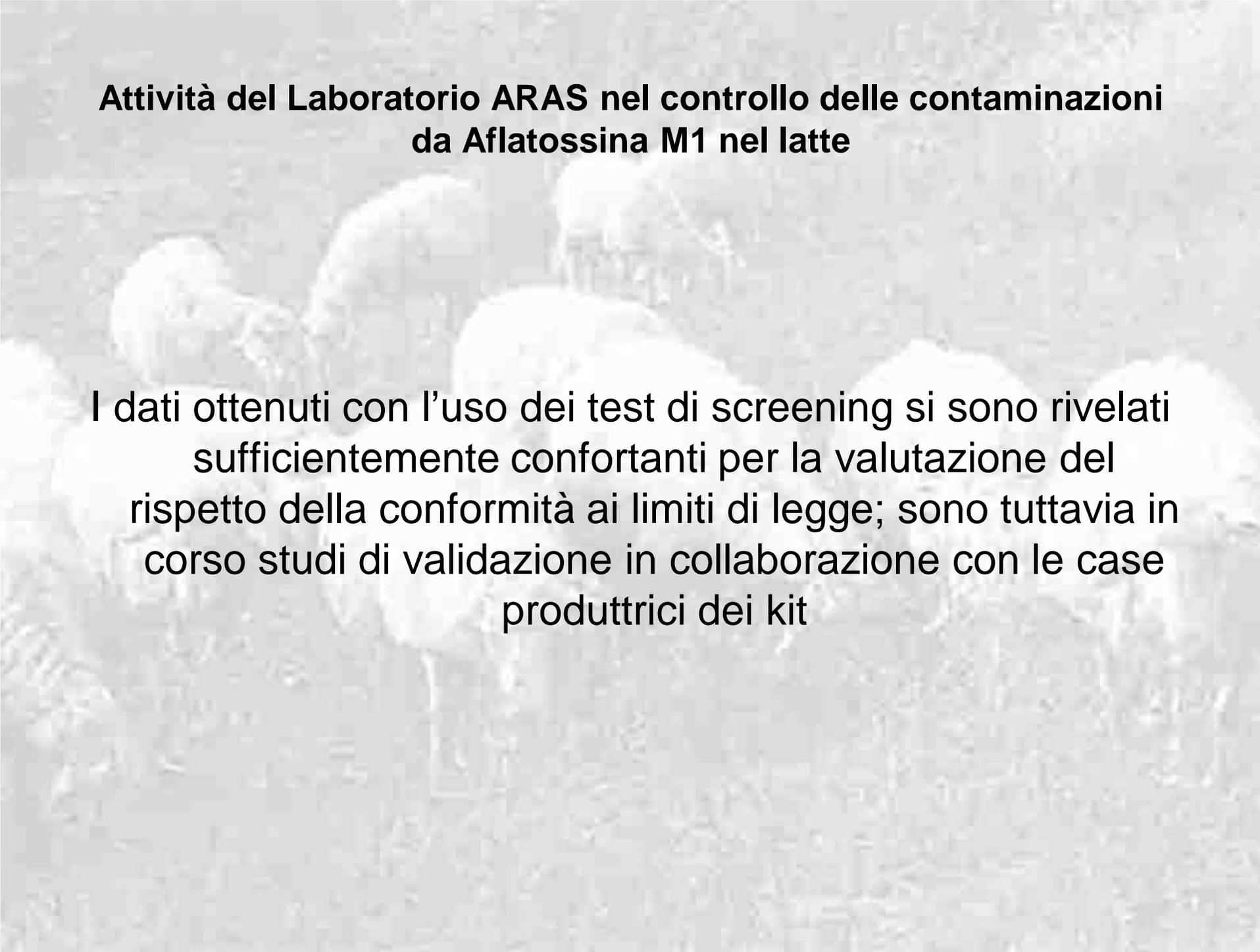
Laboratorio ARAS n. 10

Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

L'utilizzo dei test di screening sul latte ovino ha permesso di ottenere i seguenti risultati:

- Riduzione dei costi
- Verifica della conformità ai limiti di legge

L'ARAS con il suo laboratorio e l'assistenza tecnica può contribuire alla creazione di una rete di monitoraggio regionale per il controllo delle contaminazioni da aflatossina



Attività del Laboratorio ARAS nel controllo delle contaminazioni da Aflatossina M1 nel latte

I dati ottenuti con l'uso dei test di screening si sono rivelati sufficientemente confortanti per la valutazione del rispetto della conformità ai limiti di legge; sono tuttavia in corso studi di validazione in collaborazione con le case produttrici dei kit