

LINEA GUIDA DEGLI ISTITUTI ZOOPROFILATTICI SPERIMENTALI PER LA VALIDAZIONE INTRA- LABORATORIO DEI METODI DI PROVA DI CONFERMA DELLE MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Loredana Annunziata (a), Alberto Biancardi (b), Giancarlo Biancotto (c), Giannina Chessa (d),
Pasquale Gallo (e), Marilena Muscarella (f), Ivan Pecorelli (g), Alessandro Rosso (h),
Rosanna Spatola (i), Alessandro Ubaldi (l)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

(g) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

(h) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle d'Aosta, Asti

(i) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(l) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Introduzione

I Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) hanno redatto una linea guida per la validazione dei metodi di prova di conferma delle micotossine negli alimenti di origine animale (1), per definire un approccio armonizzato in conformità alla normativa vigente. I metodi di prova per la determinazione delle micotossine devono rispettare i requisiti previsti dal Reg. CE 401/2006 (2), e Reg. CE 1881/2006 (3); inoltre, devono essere validati determinando le prestazioni analitiche indicate nel Reg. CE 882/2004, allegato III (4). La linea guida rappresenta un approccio integrato, e prevede anche alcuni criteri di rendimento opzionali definiti dalla Decisione 2002/657/CE (5).

Il Reg. CE 401/2006 non indica i limiti di rivelazione dei metodi di prova, ma il Reg. CE 882/2004 prevede di calcolare limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD) e il limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) del metodo. Inoltre, il Reg. CE 401/2006 prevede in maniera opzionale la possibilità di calcolare il limite di decisione $CC\alpha$ (Decisione 2002/657/CE), solo per tenere conto dell'incertezza di misura per valutare la conformità/non conformità del campione.

Lo scopo della linea guida è quello di definire uno schema generale di validazione dei metodi di prova di conferma per l'analisi delle micotossine, per integrare i requisiti previsti dalle norme e indicare uno schema applicativo semplice nell'ambito della rete degli IZS

Questo approccio armonizzato favorisce il confronto delle prestazioni dei metodi di prova e la loro trasferibilità tra i laboratori.

Prestazioni dei metodi di prova

I livelli di validazione, per ogni analita, sono: $0,5 - 1 - 1,5 \times \text{limite massimo (LM)}$.

Sono eseguite almeno 2 sessioni analitiche ad almeno due settimane di distanza l'una dall'altra per la stima della precisione e del recupero del metodo, secondo lo schema: per ogni seduta analitica 6 ripetizioni per livello.

Variare, se possibile, alcuni fattori, (es. operatore, lotti di reagenti, strumento) in modo che la variabilità dei risultati sia influenzata dal maggior numero di fattori possibile, a parità di procedura analitica

I dati ottenuti usando lo Standard Interno (SI) portano a risultati già corretti per il recupero. Il recupero effettivo del metodo può essere calcolato soltanto mediante l'utilizzo di una standardizzazione esterna, eventualmente con rette in matrice per i metodi con rivelazione in spettrometria di massa, oppure mediante materiale di riferimento certificato (*Certified Reference Material*, CRM).

Criteri di rendimento

I criteri di rendimento comuni per i metodi di conferma sono:

- conferma mediante co-cromatografia
- larghezza del picco cromatografico a metà dell'altezza massima entro il 90-110%
- tempo di ritenzione: $\pm 2,5\%$ per cromatografia liquida (LC), $\pm 0,5\%$ per gas-cromatografia (GC)
- uso, se è disponibile, di un SI.

Cromatografia liquida-fluorimetria e cromatografia liquida- Diode Array Detector

Per i metodi di cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelatore fluorimetrico o con rivelatore *Diode Array* (*Diode Array Detector*, DAD) i criteri sono:

- rivelazione UV/VIS a scansione totale: λ_{max} nello spettro dell'analita = λ_{max} dello standard di taratura ± 2 nm. La differenza osservata tra i due spettri non è superiore, in alcun punto, al 10% dell'assorbanza dello standard di taratura.
- rivelazione fluorimetrica (FLD): si applica alle molecole che presentano fluorescenza nativa e alle molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivatizzazione.

Cromatografia liquida-spettrometria di massa e gascromatografia-spettrometria di massa

È adottato il criterio dei punti di identificazione (*Identification Point*, IP) introdotto dalla Decisione 2002/657/CE, secondo il quale ad ogni ione diagnostico è attribuito un coefficiente. Per le sostanze di categoria B come le micotossine sono necessari 3 IP per la conferma in spettrometria di massa (MS), secondo lo schema seguente.

Tecnica MS	IP per ione
Spettrometria di massa a bassa risoluzione (LR)	1,0
LR-MS ⁿ ione precursore	1,0
LR-MS ⁿ prodotti di transizione	1,5

Linearità della risposta strumentale

Per valutare la linearità della risposta strumentale possono essere seguite queste indicazioni:

- *Curve di taratura in solvente*: sono calcolate riportando la [Conc] vs rapporto segnale dell'analita/segnale dello standard interno (SI), se si utilizza uno standard interno di riferimento quantitativo, oppure [Conc] vs segnale dell'analita negli altri casi. Iniettare per tre volte almeno 4 soluzioni a diversa concentrazione; nella fase di elaborazione della retta si può aggiungere, inoltre, il punto (0;0). I punti sono scelti tenendo conto dei livelli di validazione scelti e del campo di applicazione del metodo.
- *Rivelazione mediante MS*: per il calcolo delle curve di taratura utilizzare la ionizzazione che dà il miglior rapporto segnale/rumore (S/N).

Per descrivere la formula matematica della curva di taratura calcolata utilizzare il metodo dei minimi quadrati e riportare il valore del coefficiente di correlazione (r^2). Il laboratorio stabilisce il criterio di accettabilità del valore di r^2 .

Specificità

Per definizione la specificità è equivalente alla selettività ed è la capacità del metodo di non risentire della presenza di interferenti o di altri componenti diversi dall'analita in esame.

La specificità del metodo è valutata analizzando in modo indipendente almeno 20 bianchi campione, che siano rappresentativi delle matrici previste dal Piano Nazionale Residui, e dalla legislazione vigente per gli alimenti di origine animale; è suggerito lo schema seguente:

- Latte: 20 campioni di latte a scelta tra le specie animali di maggiore interesse del laboratorio ai fini dei controlli ufficiali eseguiti con maggior frequenza.
- Latte per lattanti e latte di proseguimento: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili.
- Alimenti per lattanti e di proseguimento, alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili, esclusi quelli a base di pesce, di frutta e di vegetali.
- Formaggi: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili
- Muscolo: 20 campioni di muscolo suino.

Verificare l'assenza di interferenti significativi nell'intervallo di tolleranza massima definita per il tempo di ritenzione dell'analita rispetto ad un campione fortificato. È ammesso che al massimo il 5% dei campioni analizzati dia un segnale significativo interferente con la rivelazione e/o identificazione dell'analita. Ciò significa che l'errore β del metodo è $<5\%$, e la presenza dell'analita nel campione è rivelata con una probabilità $> 95\%$.

Esattezza

Per quanto riguarda l'esattezza, si consiglia di seguire queste indicazioni:

- eseguire l'analisi quantitativa per ogni sessione analitica
- calcolare il recupero per ogni prova effettuata, per tutti i livelli di fortificazione
- calcolare il recupero medio e il suo scarto tipo per ogni livello di validazione, e verificare che i valori del recupero medio ottenuti soddisfino i criteri riportati nella legislazione, in funzione del livello di fortificazione effettuato

Precisione

È espressa mediante alcuni parametri:

- *in condizioni di ripetibilità*
 - s_r : scarto tipo o deviazione standard calcolata
 - ripetibilità: $r = 2,8 \times s_r$
 - deviazione standard relativa (*Relative Standard Deviation*) $RSD_r = (s_r/\text{valore medio}) \times 100$
- *in condizioni di riproducibilità*
 - s_R : scarto tipo o deviazione standard calcolata
 - riproducibilità: $R = 2,8 \times s_R$
 - deviazione standard relativa $RSD_R = (s_R/\text{valore medio}) \times 100$
 - riproducibilità intra-laboratorio S_r : è misurata all'interno dello stesso laboratorio, con lo stesso metodo, sullo stesso materiale da saggio, da differenti operatori, strumenti, ad intervalli di tempo relativamente lunghi.

Per il calcolo eseguire l'analisi quantitativa per ogni sessione analitica, poi verificare la normalità dei dati ottenuti ed escludere eventuali outliers.

Per ogni sessione di lavoro e ogni livello di fortificazione calcolare il valore medio, lo scarto tipo (s_r) e l' RSD_r .

Effettuare, per ciascun livello, un'analisi della varianza (ANOVA) tra le sedute di validazione. Calcolare, quindi, lo scarto tipo di ripetibilità (s_r) e di riproducibilità intra-laboratorio (S_r).

Calcolare i valori di RSD di ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio

Verificare che i valori di RSD_r soddisfino i criteri riportati nella legislazione, in funzione del livello di fortificazione effettuato.

Limite di rivelazione

Il LOD è la minima quantità rivelabile in base al rapporto segnale/rumore (S/N):

$$LOD = 3,3 \times s_a / b \quad \text{oppure} \quad LOD = 3,3 \times \sigma_B / b$$

dove:

a = intercetta retta media dei recuperi

b = coefficiente angolare retta media dei recuperi

s_a = scarto tipo dell'intercetta

σ_B = scarto tipo del segnale dei bianchi campione

Limite di quantificazione

Il LOQ è la capacità del metodo di eseguire una misurazione quantitativa.

È verificato sperimentalmente, durante lo sviluppo del metodo, eseguendo 6 prove di recupero dell'analita ad una concentrazione uguale o superiore a :

$$LOQ = 5 \times s_a / b \quad \text{oppure} \quad LOQ = 5 \times \sigma_B / b$$

Incertezza

L'incertezza di misura standard dei metodi idonei ai fini del controllo ufficiale deve essere inferiore alla massima incertezza di misura standard calcolata mediante la formula:

$$U_f = \sqrt{[(LOD/2)^2 + (\alpha C)^2]}$$

dove:

U_f = incertezza massima di misura standard ($\mu\text{g/kg}$)

LOD = limite di rivelazione del metodo ($\mu\text{g/kg}$)

C = concentrazione di interesse ($\mu\text{g/kg}$)

α = fattore numerico funzione di C secondo lo schema riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Fattore numerico α in funzione della concentrazione C da utilizzare nel calcolo di U_f

C ($\mu\text{g/kg}$)	α
≤ 50	0,20
51-500	0,18
501-1000	0,15
1001-10 000	0,12
$\geq 10 000$	0,10

Limiti del Reg. CE 401/2006

I valori di precisione raccomandati (Tabella 2) dal Regolamento n. 401/2006/CE sono calcolati mediante l'equazione di Horwitz:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} = (s_R / \text{valore medio}) \times 100$$

dove: C = frazione di massa espressa come potenza adimensionata di 10.

Tabella 2. Esempi di RSD_R

Concentrazione	RSD_R raccomandato (%)	RSD_r raccomandato ($0,66 \times RSD_R$) (%)
0,025 $\mu\text{g/kg}$	78,8	52,0
0,050 $\mu\text{g/kg}$	71,0	46,9
0,100 $\mu\text{g/kg}$	64,0	42,2
0,450 $\mu\text{g/kg}$	51,0	33,7

Esempio applicativo

Risultati di 6 misure dell'Aflatossina M_1 nel latte :

valore medio = 46,0 pg/g (ng/kg)

scarto tipo $s_r = \pm 7,0 \text{ pg/g}$

Applicando le equazioni descritte in precedenza:

RSD_R (riproducibilità) raccomandato = 71,9%

$$RSD_r \text{ raccomandato} = 0,66 \times RSD_R = 0,66 \times 71,9\% = 47,5\%$$

$$\text{Scarto tipo di ripetibilità raccomandato} = s_r = RSD_r \times (\text{valore medio})/100 = 0,4745 \times 46 = 21,8 \text{ pg/g (da confrontare con } \pm 7,0 \text{ pg/g)}$$

I valori di RSD_R massimo e RSD_r massimo calcolati sono non realistici e inapplicabili.

In alternativa, il laboratorio può utilizzare l'approccio di Thompson, utilizzando, per concentrazioni $< 0,12 \text{ mg/kg}$ l'equazione:

$$RSD_R \text{ (riproducibilità)} = 23,0\%$$

Esempio applicativo

$$RSD_R \text{ (riproducibilità) massimo} = 2 \times 23,0\% = 46,0\%$$

$$RSD_r \text{ (ripetibilità) massimo} = 2 \times 0,66 \times RSD_R = 2 \times 0,66 \times 23,0\% = 30,4\%$$

$$\text{Scarto tipo di ripetibilità massimo} = s_r = RSD_r \cdot \text{valore}_{\text{medio}}/100 = 0,304 \times 46 = 14,0 \text{ pg/g}$$

(da confrontare con il valore $\pm 7,0 \text{ pg/g}$ ottenuto sperimentalmente)

Conclusioni

La linea guida degli IZS consente un approccio armonizzato alla validazione e alla definizione delle prestazioni analitiche dei metodi prova per l'analisi delle micotossine. Questo approccio rende anche più facile la trasferibilità dei metodi tra diversi laboratori.

Sono stati integrati i requisiti previsti dal Reg. CE 882/2004 (norma orizzontale) con quelli del Reg. CE 401/2006 (norma verticale), indicando criteri ben definiti per la valutazione della specificità, della precisione, del calcolo di LOD e LOQ, della linearità della risposta strumentale.

La linea guida è parte integrante delle procedure del sistema qualità aziendale degli IZS, e in alcuni Istituti è stata estesa anche alla validazione dei metodi di prova per l'analisi delle micotossine negli alimenti ad uso umano e ad uso zootecnico.

Bibliografia

1. Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. *Linea guida per la validazione intra-laboratorio dei metodi di prova di conferma per la determinazione delle Sostanze di Categoria B - SEZIONE 4 – MICOTOSSINE*. 2007.
2. Unione Europea. Regolamento 401/2006/CE of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal L* 70, 9 marzo 2006.
3. Unione Europea. Regolamento 1881/2006/CE of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal L* 364, 20 dicembre 2006.
4. Unione Europea. Regolamento 882/2004/CE of 29 April 2004, on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules, *Official Journal L* 191, 28 maggio 2004.
5. Unione Europea. Decisione 2002/657/CE of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal L* 221, 17 agosto 2002.