VALIDAZIONE DI UN METODO ELISA QUANTITATIVO PER LA RICERCA DI AFLATOSSINA M_1 NELLE MATRICI LATTE, FORMAGGIO E BURRO

Alberto Biancardi, Alessandro Moretti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia

Introduzione

Classificata dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogeno di classe 2B, l'aflatossina M_1 è un metabolita ossidrilato dell'aflatossina B_1 e come tale è presente nel latte e nei prodotti derivati. Desta particolare attenzione e preoccupazione la sua presenza nel latte e l'effetto di concentrazione nel trasferimento da latte a formaggio per interazione con la componente proteica. Nell'attività routinaria del laboratorio di controllo risulta di notevole importanza la produttività analitica ossia la possibilità di testare un numero elevato di campioni in tempi utili e ragionevoli. Da questo punto di vista la tecnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) costituisce un valido strumento per l'analisi quantitativa sia in termini di sensibilità e specificità ma anche di accuratezza e precisione (1).

Facendo seguito a risultati precedentemente pubblicati sul confronto ELISA *vs.* HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (2), lo scopo del presente lavoro è la validazione e l'applicazione routinaria del metodo ELISA per la ricerca e la determinazione quantitativa di aflatossina M_1 sulle matrici latte, formaggio e burro in un ampio intervallo di concentrazioni, anche di molto superiori ai limiti di tolleranza normati e/o consigliati per le matrici prese in esame. Per quanto riguarda la matrice latte il Regolamento (CE) 1881/2006 stabilisce un limite di tolleranza di 0,050 μg/kg per il latte di produttori e 0,025 μg/kg per il latte destinato alla prima infanzia (3). Quanto ai derivati del latte, in particolare i formaggi, attualmente sono in vigore limiti suggeriti di 150 ng/kg e 275 ng/kg in relazione ai coefficienti di concentrazione 3,0 e 5,5 per i formaggi a pasta tenera e per i formaggi a pasta dura rispettivamente (Nota del Ministero della Salute pr. DGISAN 28454 del 3/7/2013).

Materiali e metodi

Reagenti

Il kit ELISA utilizzato per la determinazione quantitativa dell'aflatossina M_1 è stato fornito da TECNA (I'screen AFLA M_1) e contiene: micropiastra a 96 pozzetti adsorbiti con anticorpi anti-aflatossina M_1, soluzioni standard di aflatossina M_1 pronte per l'uso (1,5 mL) a 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L di aflatossina M_1, coniugato enzimatico (14 mL), tampone di lavaggio concentrato 20X (50 mL), tampone di estrazione (60 mL), diluente del campione ovvero tampone latte (12 mL), soluzione di sviluppo (14 mL), soluzione d'arresto (8 mL) contenente acido solforico 2 M.

L'acqua bidistillata, deionizzata e filtrata su 0,2 μm è stata prodotta mediante apparecchiatura Milli-Q (Millipore).

Le Matrici di Riferimento Certificate (MRC) sono state fornite da FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) e da AIA (Associazione Italiana Allevatori).

Preparazione del campione per analisi ELISA

La preparazione del campione per analisi ELISA per ogni matrice è stata la seguente:

- *matrice LATTE*
  Trasferire 10 mL in provetta da centrifuga; centrifugare per 10 min a 3000 rpm; filtrare su carta e usare la parte sgrassata direttamente nel saggio. Il fattore di diluizione è pari a 1.

- *matrice FORMAGGIO*
  Pesare mediante bilancia 2,00 g di campione in provettone PP da 50 mL munito di tappo a vite. Aggiungere 20 mL di diclorometano e mantenere su agitatore per 30 min. Filtrare su carta e trasferire 5 mL del filtrato in provetta conica PP da 15 mL. Evaporare a secco in corrente di azoto a 40°C ± 5°C e riprendere il residuo con 750 µL di tampone di estrazione. Aggiungere quindi 2 mL di n-esano e procedere allo sgrassaggio agitando vigorosamente su vortex per 2 min. Centrifugare per 10 min a 3000 rpm; eliminare quindi la fase organica sovrastante mediante aspirazione con l'ausilio della pompa meccanica per il vuoto. Trasferire 50 µL della fase acquosa in provetta conica PP e aggiungere 450 µL di diluente del campione. Miscelare vigorosamente su vortex e quindi centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Il fattore di diluizione è pari a 15.

- *matrice BURRO*
  Pesare mediante bilancia 2,00 g di campione in provettone PP da 50 mL munito di tappo a vite. Aggiungere 20 mL di diclorometano e mantenere su agitatore per 30 min. Filtrare su carta e trasferire 5 mL del filtrato in provetta conica PP da 15 mL. Evaporare a secco in corrente di azoto a 40°C ± 5°C e riprendere il residuo con 750 µL di tampone di estrazione. Precedere quindi con lo sgrassaggio: aggiungere 2 mL di n-esano e agitare vigorosamente su vortex per 2 min. Centrifugare per 10 min a 3000 rpm; eliminare quindi la fase organica sovrastante mediante aspirazione con l'ausilio della pompa meccanica per il vuoto. Ripetere l'intera operazione di sgrassaggio una seconda volta. Trasferire 100 µL della fase acquosa in provetta conica PP e aggiungere 170 µL di diluente del campione. Miscelare vigorosamente su vortex e quindi centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Il fattore di diluizione è pari a 4.

Analisi ELISA

Deporre nei rispettivi pozzetti 100 µL di ogni standard e di ogni campione. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 45 min a temperatura ambiente (18÷25°C). Svuotare il contenuto dei pozzetti e addizionare in ciascuno 260 µL della soluzione di lavaggio; svuotare e rimuovere ogni residuo della soluzione di lavaggio capovolgendo la micropiastra più volte su un foglio di carta assorbente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre tre volte. Addizionare 100 µL del coniugato enzimatico per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 min a temperatura ambiente (18÷25°C). Procedere con i quattro lavaggi come indicato sopra. Addizionare poi 100 µL della soluzione di sviluppo per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 min a temperatura ambiente (18÷25°C). Bloccare la reazione enzimatica aggiungendo 50 µL di soluzione d'arresto per pozzetto. Misurare l'assorbanza a 450 nm.

La *modalità di calcolo* è stata la seguente: riportando l'assorbanza in funzione delle concentrazioni 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L delle soluzioni standard, generare la curva di

calibrazione su 7 livelli mediante apposito programma informatico (Foglio di calcolo I'screen M_1 TECNA). Per interpolazione, si risale alla concentrazione incognita espressa in ng/L. Moltiplicare il valore ottenuto per il fattore di diluizione (1 per il latte, 15 per il formaggio e 4 per il burro).

Risultati e discussione

Il metodo è stato validato sulle matrici latte, formaggio e burro. Il campo di validazione è 5÷100 ng/kg per la matrice latte, 75÷475 ng/kg per la matrice formaggio e 20÷80 ng/kg per il burro. I parametri di validazione sono: specificità, limite di quantificazione (*Limit of Quantification,* LOQ), accuratezza e precisione e stima dell'incertezza di misura.

La specificità è stata valutata mediante l'applicazione dell'intero metodo di prova a 8 campioni/matrice non contenenti l'analita (bianchi). Attraverso la curva di calibrazione è stata verificata l'assenza di aflatossina M_1. Il metodo si è quindi dimostrato essere specifico.

Il LOQ è stato fissato a 5 ng/kg, 75 ng/kg e 20 ng/kg per le matrici latte, formaggio e burro rispettivamente. Ogni singolo LOQ è stato verificato sperimentalmente sulle tre diverse matrici: uno stesso campione "bianco", in sei repliche indipendenti, è stato drogato al LOQ prescelto. Per la valutazione dell'accuratezza e della precisione sono state fatte prove replicate nel campo di applicazione del metodo a diversi livelli di concentrazione utilizzando sia matrici opportunamente drogate che matrici di riferimento certificate, laddove disponibili. I risultati sono riportati nelle Tabelle 1, 2, 3.

Tabella 1. Risultati validazione matrice LATTE

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***	z-score medio
LOQ (spiked 5 ng/kg)	5,1	0,72	14,2	102 (n=6)	-
MRC Test Veritas (58,45 ng/kg; σp 12,86)	66,7	2,58	3,87	114 (n=6)	0,64
MRC FAPAS (31,9 ng/kg; σp 7)	36,3	2,2	6,2	114 (n=10)	0,63
MRC FAPAS (34,1 ng/kg; σp 7,7)	37,1	1,9	5,0	109 (n=10)	0,39
Spiked (95 ng/kg)	90,5	2,95	3,26	95 (n=6)	-
COMPLESSIVO	-	9,87	9,20	108 (n=38)	-

*DS= Deviazione Standard;
** CV=Coefficiente di Variazione;
***REC= recupero

Tabella 2. Risultati validazione matrice FORMAGGIO

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***	z-score medio
LOQ (spiked 76 ng/kg)	79,8	5,74	7,19	105 (n=6)	-
Spiked (152 ng/kg)	153,2	6,49	5,24	101 (n=6)	-
Spiked (304 ng/kg)	295,8	19,50	6,59	97 (n=6)	-
Spiked (475 ng/kg)	486,2	23,91	4,92	102 (n=6)	-
MRC AIA (331,13 ng/kg; σ_p 61,58)	349,3	9,13	2,62	105 (n=6)	0,30
COMPLESSIVO	-	5,88	5,75	102 (n=30)	-

*DS= Deviazione Standard;
** CV=Coefficiente di Variazione;
***REC= recupero

Tabella 3. Risultati validazione matrice BURRO

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***
LOQ (spiked 20,9 ng/kg)	20,5	2,07	10,12	98 (n=6)
Spiked (39,9 ng/kg)	43	2,61	6,06	108 (n=6)
Spiked (60,8 ng/kg)	60,8	5,84	9,61	100 (n=6)
Spiked (80,75 ng/kg)	83,8	3,31	3,95	104 (n=6)
COMPLESSIVO	-	8,29	8,10	102 (n=24)

*DS= Deviazione Standard;
** CV=Coefficiente di Variazione;
***REC= recupero

Al livello di drogaggio pari 95 ng/kg, prima dell'esecuzione del test ELISA, i campioni sono stati diluiti 1:3 con il tampone latte in modo da rientrare nel range di massima linearità di risposta del kit, centrato sul valore IC50, ovvero B/B0 50% (mediamente sui 30 ng/kg). I recuperi al livello di drogaggio più alto (95 ng/kg) e al livello più basso (LOQ) sono risultati praticamente quantitativi. Dal confronto mediante ANOVA degli *z-score* ottenuti per le tre diverse MRC non è stata evidenziata una differenza significativa (P= 0,094).

I recuperi ottenuti ai cinque livelli considerati sono stati confrontati mediante ANOVA; non esiste una differenza statisticamente significativa (P=0,09). Il recupero complessivo calcolato su 30 dati è risultato quantitativo (102%). La precisione dei dati, espressa come CV%, è del tutto accettabile (<10%). I risultati migliori sono stati ottenuti proprio sulla MRC con uno z-score medio (n=6) pari a 0,30 e un CV=2,62%.

Dal confronto mediante ANOVA dei recuperi ottenuti ai quattro livelli considerati non è emersa una differenza statisticamente significativa (P=0,19). Complessivamente il recupero è quantitativo e pari a 102% (n=24) con una ottima dispersione dei dati (CV=8,10%).

Il metodo si è dunque dimostrato anzitutto quantitativo, ma anche preciso e accurato per le tre matrici trattate; la manipolazione del campione è minima e ciò riduce notevolmente la probabilità di introdurre errori casuali e/o sistematici. È inoltre un metodo veloce, con tempi e costi di analisi ridotti. In tal senso presenta una notevole produttività.

Sebbene non strettamente richiesta per un metodo di screening, l'incertezza estesa relativa è stata stimata (approccio bottom-up) ed è riportata nella Tabella 4.

Tabella 4. Incertezza di misura relativa

Matrice	Campo di validazione (ng/kg)	Incertezza estesa relativa	Gradi di libertà (ν)	Fattore di copertura (K)
LATTE	5÷100	20,6%	75	1,99
FORMAGGIO	75÷475	22,3%	45	2,01
BURRO	20÷80	33,1%	36	2,03

I risultati ottenuti sono in linea con i criteri di rendimento fissati dal vigente Regolamento (UE) 519/2014 (4).

Nell'applicazione routinaria il metodo si è dimostrato essere accurato, come si evidenzia dalle carte di controllo degli *z-score* riportate di seguito sulle matrici latte e formaggio, e relative ad un periodo di attività di 20 mesi.

Per avere un dato oggettivo di affidabilità, sono stati considerati i dati di controllo di qualità (N= 158 per la matrice latte; N= 31 per la matrice formaggio) prodotti dal laboratorio nell'arco di

20 mesi di attività routinaria (da gennaio 2018 ad agosto 2019). Nella carta di controllo (Figura 1) relativa alla matrice latte è riportato l'andamento degli *z-score* su sei diverse MRC in un intervallo di concentrazione da 9 a 60 ng/kg. Per quanto riguarda la matrice formaggio è stata utilizzata la sola MRC disponibile alla concentrazione di 331,13 ng/kg (Figura 2). È bene sottolineare che siamo in condizioni di massima riproducibilità: 20 mesi, operatori diversi, lotti diversi a parità di tipologia di kit. Ogni punto rappresenta il controllo interno di un batch di analisi di screening. La distribuzione degli *z-score* è mediamente centrata nella fascia ±1 per entrambe le matrici. Non è stato possibile fare altrettanto con la matrice burro, in quanto non sono disponibili MRC.

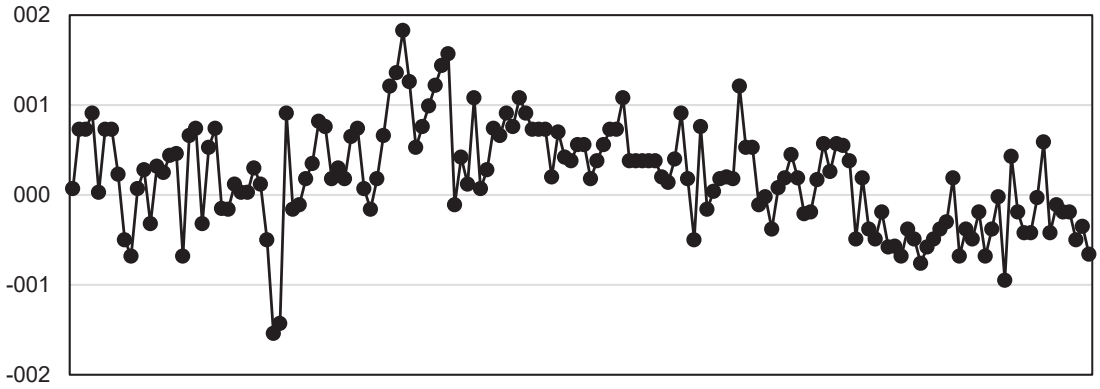

Figura 1. Carta di controllo degli *z-score* su matrice LATTE (n. 158)

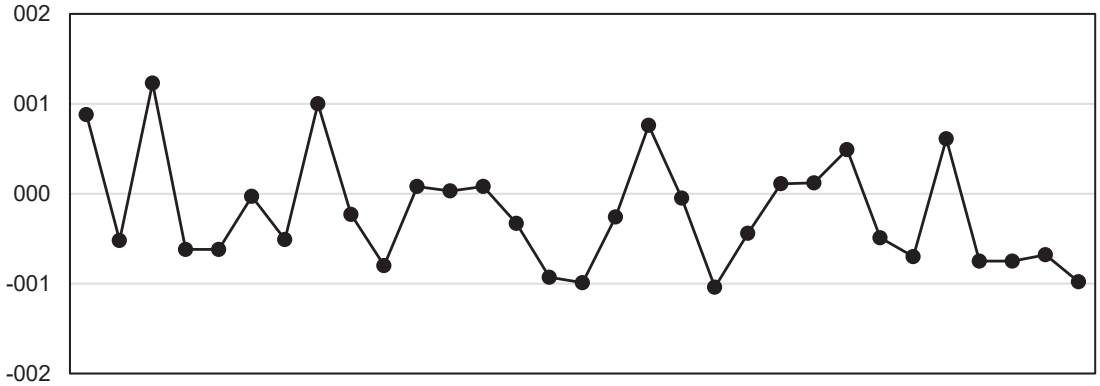

Figura 2. Carta di controllo degli *z-score* su matrice FORMAGGIO (n. 3)

Ad ulteriore riprova dell'attendibilità del dato quantitativo ELISA, su 11 campioni di latte di routine, è stata eseguita la determinazione sia con metodo ELISA che con cromatografia liquida accoppiata con spettroscopia di massa tandem (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) come metodo di conferma (5) in condizioni di ripetibilità intermedia, ossia stesso operatore e stessa strumentazione in un arco temporale di 2 mesi. I risultati sono riportati in Tabella 5. Si può constatare che il dato di conferma LC-MS/MS cade nell'intervallo

di incertezza di misura calcolato per il dato ELISA. Infatti, dal confronto mediante ANOVA dei 2 gruppi non si evidenzia una differenza statisticamente significativa (P=0,62).

Tabella 5. Confronto ELISA *vs.* LC-MS/MS su matrice LATTE

Risultato ELISA (ng/kg)	Incertezza estesa (ELISA)	Risultato LC-MS/MS (ng/kg)
141	29	126
18	4	17
66	14	63
78	16	67
72	15	62
67	14	56
92	19	83
48	10	42
70	14	63
68	14	75
53	11	52

Conclusioni

Data l'elevata potenzialità delle determinazioni ELISA in termini di produttività analitica, si è voluto validare un metodo ELISA per la ricerca e la determinazione *quantitativa* di aflatossina M_1 sulle matrici latte, formaggio e burro. Utilizzando sia campioni drogati che matrici di riferimento, il metodo è stato validato su un ampio intervallo di concentrazioni, anche superiori ai limiti normati e/o consigliati per le matrici prese in esame. Infatti il campo di validazione è per la matrice latte 5÷100 ng/kg, per la matrice formaggio 75÷475 ng/kg e per la matrice burro 20÷80 ng/kg. Il recupero complessivo è stato 108% (CV=9,2%) per il latte, 102% (CV=5,8%) per il formaggio e 102% (CV=8,1%) per il burro. È stata inoltre calcolata l'incertezza di misura pari a 20,6% per la matrice latte, 22,3% per la matrice formaggio e 33,1% per la matrice burro.

Il metodo si è dimostrato idoneo in termini di sensibilità, precisione e accuratezza anche a concentrazioni di aflatossina M_1 relativamente alte; è attualmente applicato nell'attività di analisi routinaria. Oltre alla produttività analitica, tale metodo presenta interessanti potenzialità e ben si presta a possibili applicazioni, quali ad esempio studi di trasferimento dell'aflatossina M_1 dal latte ai prodotti derivati seguendo le varie fasi di lavorazione e maturazione del prodotto caseario.

Bibliografia

1. ISO 14675. *Milk and milk products- Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays- Determination of aflatoxin M_1 content*. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
2. Biancardi A, Aimo C, Piazza P, Piro R. Tecniche di screening e conferma: il caso aflatossina M1. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *IV Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/18). p. 8-15.

3. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.
4. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 147 del 17 maggio 2014.
5. Biancardi A, Dall'Asta C. A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Add. & Contam* 2013; 30(2); 318-88.