

# **CELER AFLA B<sub>1</sub>: UN ELISA VELOCE E PRATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B<sub>1</sub> NELLE DERRATE ALIMENTARI**

Francesca Diana, Vanessa Bacer, Barbara Puppini, Lidija Persic, Maurizio Paleologo  
Tecna srl, Trieste

## **Introduzione**

Le Aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) sono metaboliti tossici e cancerogeni prodotti principalmente dalle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, che possono contaminare svariate derrate alimentari e mangimi. Questi funghi si sviluppano sia in campo che durante lo stoccaggio, qualora si creino le condizioni ideali di temperatura (25°C) e di umidità dell'aria (pari o superiore all'85%) (1, 2). Di conseguenza, la contaminazione da Aflatossine può verificarsi sia prima che dopo la raccolta (3). La tossicità causata da tali tossine, detta aflatossicosi, può essere sia di tipo acuto che cronico (1, 4), e si manifesta principalmente a livello del fegato, causando necrosi, cirrosi e carcinomi (5, 6). Le Aflatossine sono state classificate dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) tra i carcinogeni del gruppo I (7). Tra le quattro molecole, l'AFB<sub>1</sub> è la più abbondante e la più tossica. A causa di questi severi effetti sulla salute, la Comunità Europea, così come la *US Food and Drug Administration*, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità (8) e la *Food and Agriculture Organisation* (FAO) (9) hanno fissato dei tenori massimi per le Aflatossine B e G.

La necessità dell'applicazione dei limiti di legge ha portato allo sviluppo di diversi metodi analitici per la determinazione delle Aflatossine negli alimenti. Tra questi, i saggi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) risultano dei metodi di screening veloci, accurati ed economici, che permettono l'analisi di un elevato numero di campioni in un'unica seduta analitica.

Il presente lavoro descrive le prestazioni del kit *Celer AFLA B<sub>1</sub>*, un immunosaggio competitivo diretto per la determinazione quantitativa dell'AFB<sub>1</sub>. Il kit permette la determinazione dell'Aflatossina in campioni di cereali, frutta a guscio e frutta secca, nonché in matrici complesse come germe di mais e mangimi. Si tratta di un saggio di facile e rapido utilizzo, con un intervallo di dosaggio in linea con le direttive europee in merito ai tenori massimi di AFB<sub>1</sub> permessi nel cibo destinato all'alimentazione umana (10) così come nei mangimi (11).

## **Materiali e metodi**

### **Saggio ELISA per la determinazione dell'Aflatossina B<sub>1</sub>**

Il kit *Celer AFLA B<sub>1</sub>* è un ELISA competitivo diretto per la determinazione dell'Aflatossina B<sub>1</sub>. Il saggio viene effettuato su micropiastra di polistirene precedentemente adsorbita con anticorpi anti-Aflatossina B<sub>1</sub>. Durante una prima incubazione avviene una competizione fra le molecole di Aflatossina libere, contenute nelle soluzioni standard o nei campioni, e l'Aflatossina legata all'enzima, per i siti di legame dell'anticorpo anti-Aflatossina adsorbito ai

pozzetti della micropiastra. Segue la fase di lavaggio della micropiastra per eliminare tutto ciò che non si è legato in maniera specifica alla fase solida. Il legame dell'enzima all'anticorpo si rileva mediante l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore, il quale viene convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato. Dopo aver bloccato la reazione enzimatica, l'assorbanza viene misurata con un lettore colorimetrico di micropiastre a 450 nm. I segnali di assorbanza ottenuti vengono trasformati in segnale di assorbanza relativo % ( $OD/OD$  dello standard zero  $\times 100 = B/B_0\%$ ). I risultati sono stati elaborati con il software Magellan (Tecan). Per la curva standard possono essere impiegate l'elaborazione punto a punto, la retta di regressione lineare o la *cubic spline*, senza significative differenze nei dosaggi.

## Campioni

Sono stati analizzati campioni di cereali (mais, germe di mais), mangimi, nocciole, noci, arachidi, pistacchi, uvetta, fichi secchi. Sono stati impiegati campioni di riferimento FAPAS, campioni fortificati e campioni naturalmente contaminati.

I campioni sono stati estratti per 3 minuti con soluzioni metanoliche e successiva filtrazione (Whatman n. 1), secondo quanto riportato per ciascuna matrice nel libretto di istruzioni del kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub>.

## Risultati

### Caratteristiche del saggio

Il kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> è un ELISA specifico per la determinazione quantitativa dell'AFB<sub>1</sub>, l'unico presente sul mercato. La Tabella 1 mostra i valori di *cross*-reattività nei confronti delle altre Aflatossine B e G. Con questo saggio è possibile analizzare campioni di cereali, frutta a guscio e frutta secca, nonché matrici complesse come germe di mais e mangimi. È un saggio di facile e rapido utilizzo: i campioni vengono estratti con soluzioni metanoliche senza necessità di purificazioni; l'esecuzione del test è semplice, le determinazioni vengono eseguite in singolo e sono richiesti in totale per l'analisi solo quindici minuti.

**Tabella 1. Cross-reattività del kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> provata su 3 sedute analitiche**

Composto	Cross-reattività %
AFB <sub>1</sub>	100
AFB <sub>2</sub>	5 ± 1
AFG <sub>1</sub>	19 ± 1
AFG <sub>2</sub>	<1

La Figura 1 riporta la curva di taratura media del kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> (n. = 38 sedute analitiche), che dimostra l'elevata riproducibilità del saggio, nonostante l'impiego di soluzioni standard ad elevato contenuto di metanolo. L'intervallo di misura del saggio, da 1 a 40 µg/kg, si adatta all'analisi di tutti i prodotti destinati all'alimentazione umana, in quanto i tenori massimi di contaminazione di AFB<sub>1</sub> previsti (10) sono compresi tra 2 e 8 µg/kg, fatta eccezione per gli alimenti per l'infanzia, per i quali il limite è stato posto a 0,1 µg/kg. In maniera analoga, il kit

*Celer* AFLA B<sub>1</sub> si dimostra particolarmente adatto come metodo di screening per i mangimi, per i quali i limiti di legge rientrano nell'intervallo 5-20 µg/kg (11).

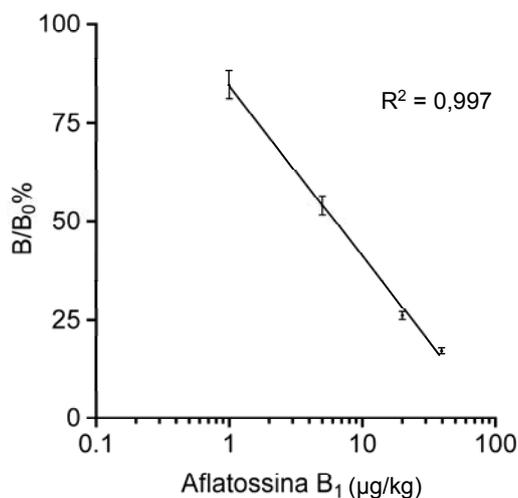


Figura 1. Curva di taratura media su 38 sedute analitiche del saggio *Celer* AFLA B<sub>1</sub>

### Limite di rivelazione e specificità del saggio

Il limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD) del kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> è stato determinato per le matrici mais, fichi secchi, uvetta, nocciole, pistacchi, secondo il criterio descritto per i test quantitativi per l'Aflatossina nella USDA/GIPSA Program Notice FGIS-PN 04-15 (12). Venti campioni negativi per ciascuna matrice sono stati analizzati nel saggio e dal valore medio dei B/B<sub>0</sub> meno 2 deviazioni standard è stato ottenuto un valore di LOD di 1 µg/kg per tutte le matrici considerate. Secondo la medesima normativa USDA/GIPSA il LOD deve essere inferiore o uguale a 3 µg/kg.

La specificità del saggio ottenuta per le stesse matrici è riportata nella Tabella 2. La probabilità di rilevare dei falsi positivi con il kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> è pari a zero per la frutta secca e la frutta a guscio e del 5,5% per i campioni di mais.

Tabella 2. Specificità del saggio *Celer* AFLA B<sub>1</sub> provata su 20 campioni negativi

Matrice	Specificità (%)
Mais	94,5
Fichi secchi	100,0
Uvetta	100,0
Nocciole	100,0
Pistacchi	100,0

### Sensibilità del saggio

La sensibilità del kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub>, intesa come limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ), è stata determinata verificando quale fosse la minor concentrazione di

AFB<sub>1</sub> rilevabile dal saggio con una probabilità del 95%. Il LOQ è stato determinato per le matrici mais, fichi secchi, uvetta, nocciole, pistacchi e i valori ottenuti sono riportati nella Tabella 3.

**Tabella 3. LOQ del saggio Celer AFLA B<sub>1</sub> su 20 campioni addizionati**

Matrice	LOQ (µg/kg)
Mais	1
Fichi secchi	2
Uvetta	2
Nocciole	1
Pistacchi	1

### Accuratezza e precisione del saggio

Il kit *Celer* AFLA B<sub>1</sub> è stato validato sulle matrici mais, germe di mais, mangimi, frutta secca e frutta a guscio.

Nelle Tabelle 4 e 5 sono riportati i risultati di accuratezza, in termini di valori di recupero %, e di precisione dei dosaggi, in condizioni di ripetibilità e di riproducibilità, espressa in termini di deviazione standard relativa (coefficiente di variazione, CV%).

Il recupero medio per il mais è risultato essere del 124±22% e del 91±21%, rispettivamente per i campioni di riferimento FAPAS e per i campioni fortificati.

I recuperi ottenuti per le altre matrici sono: 91±21% per i campioni di germe di mais naturalmente contaminati; 108±20% per i mangimi di riferimento FAPAS; 98±18% per la frutta a guscio e 113±18% per la frutta secca.

**Tabella 4. Accuratezza e precisione (CV%) del saggio Celer AFLA B<sub>1</sub> nel dosaggio di campioni di mais di riferimento FAPAS e fortificati.**

Campioni di mais	Valore assegnato (range di accettabilità o addizionato (µg/kg))	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD, n = 9)	Recupero % (media ± SD, n = 9)	CV %*	
				Intra-Saggio	Inter-Saggio
<b>Materiali di riferimento</b>					
T0481	1,27 (0,71-1,83)	1,9 ± 0,3	149 ± 22	5,6 ± 1,5	13,1
T0497	3,91 (2,19-5,63)	4,3 ± 0,2	109 ± 6	3,7 ± 3,5	2,8
T0473	4,66 (2,61-6,71)	5,8 ± 0,8	125 ± 17	6,8 ± 5,3	8,2
T04105	5,21 (2,92-7,50)	5,8 ± 0,5	112 ± 9	3,5 ± 0,7	15,3
			Recupero % (media ± SD, n = 36): 124 ± 22		
<b>Materiali fortificati</b>					
Mais pool 5	1	1,2 ± 0,1	123 ± 14	10,0 ± 1,1	16,0
	2	1,7 ± 0,1	86 ± 5	4,5 ± 1,1	3,7
	5	3,9 ± 0,5	79 ± 11	4,1 ± 1,2	8,2
	10	7,7 ± 0,7	77 ± 7	4,1 ± 2,5	2,7
			Recupero % (media ± SD, n = 36): 91 ± 21		

\* CV% intrasaggio: 3 determinazioni per ogni campione, media CV± SD di 3 sedute analitiche; CV% intersaggio: 1 determinazione per ogni campione in 3 sedute analitiche

**Tabella 5. Accuratezza e precisione del saggio Celer AFLA B<sub>1</sub> nel dosaggio di diverse matrici naturalmente contaminate, fortificate o di riferimento (FAPAS)**

Campioni	Valore assegnato (range di accettabilità o addizionato (µg/kg)	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD, n = 9)	Recupero % (media ± SD, n = 9)	CV %*	
				Intra-Saggio	Inter-Saggio
<b>Germe di mais naturalmente contaminato</b>					
Germe 1	9,93*	10,4 ± 2,7	105 ± 27	6,3 ± 3,6	26,5
Germe 2	22,97*	20,7 ± 2,1	90 ± 9	5,1 ± 2,9	10,9
Recupero % germe di mais (media ± SD, n = 18): 97 ± 21					
<b>Mangimi di riferimento</b>					
T0478	7,28 (4,08-10,48)	9,6 ± 0,8	123 ± 11	3,8 ± 2,3	9,0
T0491	11,30 (6,40-16,30)	11,9 ± 1,8	105 ± 16	5,2 ± 1,9	12,1
T04102	18,10 (1,20-26,10)	15,4 ± 0,9	85 ± 5	2,8 ± 1,6	3,9
T0486	22,97 (12,86-33,08)	24,8 ± 2,5	108 ± 11	6,1 ± 3,3	2,0
Recupero % mangimi (media ± SD, n = 36): 108 ± 20					
<b>Frutta a guscio fortificata e di riferimento</b>					
Nocciola 1	20,00	17,2 ± 1,4	86 ± 7	3,9 ± 5,1	ND
Nocciola 2	11,67	11,7 ± 2,6	100 ± 22	4,5 ± 0,5	ND
Pistacchio 1	8,00	7,8 ± 1,2**	97 ± 15	ND	ND
Pistacchio 2	1,16	1,6 ± 0,1**	134 ± 7	ND	ND
Pistacchio 3	1,70	2,1 ± 0,2**	121 ± 11	ND	ND
Arachide T0484	1,54 (0,86-2,22)	1,4 ± 0,1	93 ± 6	6,1 ± 3,8	ND
Noce T04117	4,35 (2,44-6,27)	6,83	157	ND	ND
Recupero % frutta a guscio (media ± SD, n = 25): 98 ± 18					
<b>Frutta secca fortificata e di riferimento</b>					
Fico 1	2	1,9 ± 0,2**	95 ± 11	10,8	ND
Fico 2	2,1	2,9 ± 0,2**	133 ± 8	6,1	ND
Fico T0483	4,36 (2,44-6,28)	4,9 ± 0,0	114 ± 1	0,3	ND
Recupero % frutta secca (media ± SD, n = 6): 113 ± 18					

ND: non determinato; \*: media di 3 analisi in HPLC in tre diversi laboratori; \*\*: media di due determinazioni

Complessivamente, i recuperi per il mais addizionato nel range 2-10 µg/kg, il germe di mais e la maggior parte dei mangimi e della frutta a guscio rientrano nell'intervallo 70-110%, come richiesto nella direttiva 98/53/CE per i metodi di analisi per il controllo ufficiale (13). Tutti i valori di recupero ottenuti per i campioni contaminati con quantità di AFB<sub>1</sub> pari o superiore a 5 µg/kg rientrano nei requisiti del *United States Department of Agriculture's (USDA) Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (GIPSA)* (12).

Per quanto riguarda la precisione, i valori di CV% intra- e inter-saggio sono risultati conformi, per tutti i campioni considerati, a quanto richiesto nella medesima direttiva CE (13) e ai criteri USDA-GIPSA (12).

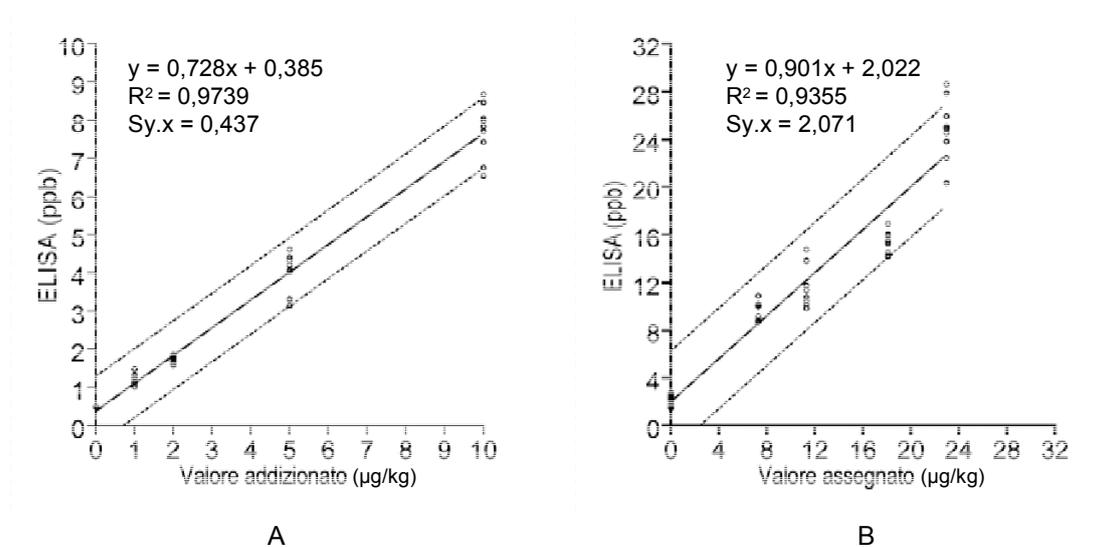
Nella Tabella 6 sono riportati i risultati della partecipazione con il kit *Celer AFLA B<sub>1</sub>* a due studi interlaboratorio organizzati dall'Associazione Italiana Allevatori nel corso del 2008 e del 2009. I bassi valori di *z-score* ottenuti sono indice di elevata accuratezza dei dosaggi nella matrice mais.

**Tabella 6. Risultati della partecipazione di Tecna con Celer AFLA B<sub>1</sub> a due ring test organizzati dall'Associazione Italiana Allevatori**

Identificativo ring test	Campioni di mais	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)			z-score
		Valore aggiunto	Valore assegnato*	Dosaggio con Celer AFLA B <sub>1</sub>	
Ottobre 2008	1	0	0,03	< 1	-
	2	40	36,85	43,67	0,63
	3	20	19,36	22,99	0,73
	4	12	11,41	13,39	0,62
Marzo 2009	1	8	10,81	9,9	- 0,30
	2	40	36,97	37,29	0,02
	3	20	20,78	20,18	- 0,09
	4	0	0,10	< 1	-

\*: valore assegnato come media dei risultati di rispettivamente 18 e 12 partecipanti con metodo HPLC.

La Figura 1 mostra i grafici di correlazione ottenuti rispettivamente per i campioni di mais fortificati (Figura 1 A) e per i mangimi di riferimento FAPAS (Figura 1 B). Per il mais, una buona correlazione ( $R^2 = 0,9739$ ) si accompagna ad un basso effetto matrice e ad una limitata dispersione dei dati ( $Sy.x = 0,437$ ). Per i mangimi, a causa dall'eterogeneità dei campioni analizzati, si osserva un effetto matrice superiore e una maggiore dispersione dei dati ( $Sy.x = 2,071$ ), nonostante la buona correlazione ottenuta ( $R^2 = 0,9355$ ).



**Figura 2. Correlazione tra valore di Aflatossina B<sub>1</sub> aggiunto in campioni di mais (A) o assegnato in campioni di mangimi (B) e determinazione nel saggio Celer AFLA B<sub>1</sub>**

## Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che *Celer* AFLA B<sub>1</sub>, unico kit rapido specifico per l'AFB<sub>1</sub> attualmente sul mercato, permette un'analisi accurata e precisa su diversi tipi di matrici. Il suo intervallo di misura in linea con i limiti di legge, unito a semplicità e rapidità nell'esecuzione dell'analisi, rendono questo kit un metodo di screening adatto all'analisi di materiali destinati sia all'alimentazione umana che animale.

## Bibliografia

1. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: risks in Plant, Animal and Human Systems*. Ames, IA: CAST; 2003.(Task force report 139)
2. Dorner JW. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):203-8.
3. Scudamore KA, Banks JN. The fate of mycotoxins during cereal processing. In: Barug D, van Egmond H, López-García, van Osenbruggen T, Visconti A (Ed.). *Meeting the mycotoxin menace*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2004. p165-81.
4. Shephard GS. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):146-51.
5. Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah N-A, Ofori-Adjei D, Jolly P, Johnson N, Taylor J, Marroquin-Cardona A, Xu L, Tang L, Wang J-S. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of a clay: a review. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):134-45.
6. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1994;34:135-172.
7. World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 82. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. Lyon, France: IARC Press; 2002.
8. World Health Organisation. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives..* Geneva: WHO; 2002. (WHO Technical Report Series 906).
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003*. Rome: FAO; 2004. (FAO Food and Nutrition paper 81).
10. Unione Europea. Regolamento della Commissione Europea (CE) 19 dicembre 2006, n. 1881/2006. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L364:5-24.
11. Unione Europea. Direttiva della Commissione Europea 31 ottobre 2003, n. 2003/100/CE. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L285:33-37.
12. United States Department of Agriculture; Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration; Federal Grain Inspection Service. *Performance evaluation criteria for aflatoxin test kits*. Program Notice FGIS-PN-04-15 del 16 giugno 2004.
13. Unione Europea. Direttiva della Commissione Europea 16 luglio 1998, n. 98/53/CE. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L201:93-101