

VALUTAZIONE E CONFRONTO DELLE CARATTERISTICHE ANALITICHE DI TEST RAPIDI PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE

Nataschia Guarducci (a), Christoph von Holst (b), Ivan Pecorelli (c), Rita Bibi (c), Michelangelo Pascale (a), Biancamaria Ciasca (a), Antonio F. Logrieco (a), Veronica M.T. Lattanzio (a)
(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia
(b) European Commission, DG Joint Research Centre, Geel, Belgio
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italia

Introduzione

L'aflatossina B₁ (AFB₁, IARC gruppo 1) è un contaminante dei mangimi che pertanto rappresentano una potenziale fonte di esposizione al rischio per gli animali da allevamento, e di conseguenza per l'uomo.

I dati della *European Food Safety Authority* (EFSA) indicano che il latte è l'unico alimento di origine animale in cui si osserva un *carry over* significativo della AFB₁, dove si ritrova nella sua forma de-idrossilata, l'aflatossina M₁ (AFM₁).

La presenza di AFM₁ nel latte di vacca, ma anche di bufala, capra, pecora, può essere considerata un indice della vulnerabilità della filiera. La normativa vigente in ambito comunitario fissa un limite massimo consentito di 50 ng/kg per l'AFM₁ nel latte e di 25 ng/kg negli alimenti per lattanti (1).

In Italia inoltre, le linee guida del Ministero della Salute (2) indicano un livello di attenzione pari a 0,040 µg/kg. Quando questo valore viene superato l'operatore deve informare l'autorità competente entro 12 ore e proporre un'azione correttiva.

L'entrata in vigore del Regolamento comunitario e più generalmente i requisiti richiesti nel settore della contrattualistica, che vincolano i lotti a contenuti definiti di AFM₁, rende necessario effettuare numerosi controlli per verificare la conformità del latte. Esiste pertanto la necessità da parte degli operatori del settore lattiero/caseario di dotarsi di strumenti di autocontrollo, per ottenere in tempi brevi indicazioni quantitative sulla eventuale contaminazione, consentendo un rapido processo decisionale.

Quando validati in accordo con linee guida ufficiali, come quelle definite nel Regolamento (UE) 519/2014 (3), i metodi di screening semiquantitativo possono essere utilizzati a supporto del già consolidato sistema europeo dei controlli per la sicurezza alimentare, che è basato principalmente su tecniche sofisticate che richiedono strumentazione costosa e personale esperto.

Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare e confrontare le prestazioni analitiche degli immunosaggi commerciali attualmente più diffusi per la determinazione rapida dell'AFM₁ nel latte, ovvero test immunocromatografici a flusso laterale (*Lateral Flow Device*, LFD) e test enzimatici (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

Materiali e metodi

Saggio immunocromatografico

Il saggio immunocromatografico utilizzato in questo studio (AFLA M₁-V, Vicam, a Waters Business) è basato sull'approccio competitivo indiretto. L'intensità del colore sviluppato in corrispondenza della linea test (T) e della linea di controllo (C) viene misurata da un lettore ottico. Il rapporto T/C viene convertito in concentrazione di AFM₁ (µg/kg) attraverso una curva di calibrazione fornita dal produttore. Per le analisi, 200 µL di latte vengono aggiunte alla fiala contenente i reagenti e posti sotto agitazione su un vortex per 15 secondi. Quindi viene inserito lo strip dopo aver posizionato la fiala in un incubatore. Il campione viene lasciato migrare per 10 min, a 40°C. Dopo la corsa, lo strip viene immediatamente posizionato all'interno del lettore per la lettura e l'interpretazione del risultato.

Saggio ELISA

Per le analisi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) è stato utilizzato il test *I'screen AFLA M₁ milk* (Tecna, Eurofins). Per le analisi, 100 µL di latte vengono aggiunti nel pozzetto e incubati per 45 min a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio del pozzetto si procede con l'aggiunta di 100 µL di soluzione di coniugato AFM₁-enzima, seguita da una incubazione per 15 min. Segue un secondo lavaggio del pozzetto e l'aggiunta della soluzione di substrato per lo sviluppo del colore. Dopo un tempo di incubazione di 15 min si procede con l'aggiunta della soluzione di stop. I risultati vengono letti mediante un lettore di micropiastre ELISA.

Risultati e discussione

Le prestazioni analitiche quali precisione (ripetibilità e precisione intermedia), valore soglia (*cut-off*), percentuale di falsi sospetti e falsi negativi sono state valutate per ciascun immunosaggio attraverso uno studio di validazione effettuato a livelli di AFM₁ di 0, 25, 50, 75 ng/kg, fissando la concentrazione bersaglio (*Screening Target Concentration*, STC) a 50 ng/kg. Gli esperimenti di validazione sono stati organizzati secondo un disegno Nested, suddivisi in 2 giorni, utilizzando campioni di latte di vacca proveniente da 3 diversi produttori, analizzati in condizioni di ripetibilità. Il disegno sperimentale è stato ripetuto per i 4 livelli di concentrazione suddetti. I risultati sono riportati in Tabella 1.

I due immunosaggi hanno mostrato caratteristiche analitiche simili in termini di *cut-off* (37,7 ng/kg e 39,4 ng/kg per LFD e ELISA rispettivamente), percentuale di falsi sospetti per campioni non contaminati (< 0,1% in entrambi i test) e falsi negativi per campioni contenenti AFM₁ a valori al di sopra della STC (0,3 % per entrambi i test). La percentuale di falsi sospetti per campioni contaminati a 25 ng/kg (25% della STC) è risultata di 3% e 23% per LFD e ELISA rispettivamente. Valori confrontabili sono stati ottenuti anche per la precisione intermedia (espressa come deviazione standard relativa, RSD_R), che per tutti i livelli di validazione è risultata essere ≤ 19% per LFD e ≤ 24 per ELISA.

I due immunosaggi validati sono stati confrontati nell'analisi di campioni di latte di vacca contaminati da AFM₁ nell'intervallo compreso tra n.d. (< 0,5 ng/kg) e 60 ng/kg (Figura 1).

Tabella 1. Caratteristiche analitiche degli immunosaggi, determinate in accordo con le linee guida descritte nel Regolamento (UE) 519/2014

Campioni	Caratteristiche	LFD	ELISA
Bianchi	Risposta media (ng/kg)	4,2	3,9
	RSD _r * (%)	93	31
	RSD _R ** (%)	140	53
	Tasso di Falsi Sospetti (%)	0,0	0,0
50% STC (25 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	23,2	33,4
	RSD _r (%)	26	12
	RSD _R (%)	32	24
	Tasso di Falsi Sospetti (%)	3	25
STC (50 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	53,1	65,4
	RSD _r (%)	12	24
	RSD _R (%)	17	24
150% STC (75 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	85,6	128,7
	RSD _r (%)	16	21
	RSD _R (%)	19	22
	Tasso di Falsi Negativi (%)	0,4	0,2
CUT OFF (ng/kg)		37,7	39,7

*RSD_r: deviazione standard relativa delle misure effettuate in condizioni di ripetibilità

**RSD_R: deviazione standard relativa delle misure effettuate in condizioni di precisione intermedia

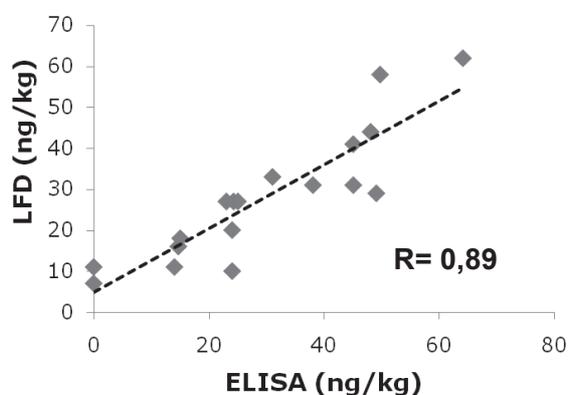


Figura 1. Correlazione tra i risultati ottenuti, per un set di campioni di latte di vacca naturalmente contaminati da AFM₁, mediante analisi LFD e ELISA

È stato inoltre osservato un buon accordo tra i risultati ottenuti con i due immunosaggi validati e quelli ottenuti con la metodica di riferimento riportata nei metodi ufficiali dell'AOAC (4) relativamente all'analisi di campioni di latte di vacca contaminati da AFM₁ nell'intervallo compreso tra n.d. (< 0,5 ng/kg) e 60 ng/kg.

Conclusioni

Nel corso di questo studio sono state valutate e confrontate le prestazioni analitiche degli immunosaggi commerciali attualmente più diffusi per la determinazione rapida dell'AFM₁ nel latte, ovvero test immunocromatografici a flusso laterale (LFD) e test enzimatici (ELISA). I due saggi, sottoposti a validazione in accordo con le linee guida definite nel Regolamento (UE) 519/2014, hanno mostrato caratteristiche analitiche soddisfacenti confermando la loro idoneità allo scopo di effettuare misure in autocontrollo per la determinazione rapida dell'AFM₁ nel latte a livelli di contaminazione prossimi ai limiti massimi ammissibili. Infine occorre considerare che negli ambiti di applicazione dei metodi di screening semiquantitativo, la valutazione della idoneità allo scopo include non solo le suddette prestazioni analitiche, ma anche parametri di natura pratica come rapidità, facilità di implementazione da parte di utenti inesperti. Per esempio per quanto riguarda i tempi di analisi, il test ELISA richiede circa 80 minuti ma consente di analizzare fino a 96 campioni contemporaneamente, risultando quindi più idoneo per laboratori che gestiscono un numero molto elevato di campioni al giorno. Al contrario il test LFD è particolarmente appropriato a laboratori che gestiscono un numero minore di campioni (i test si eseguono uno alla volta) ma necessitano di risposte in pochi minuti. Per quanto riguarda la portabilità, il test LFD è dotato di lettore portatile e curva di calibrazione sotto forma di QR code, pertanto può essere effettuato anche in stalla, mentre il test ELISA richiede un minimo di attrezzatura da laboratorio, inoltre la costruzione della curva di calibrazione è affidata all'operatore. A parità di prestazioni analitiche, la scelta del test più appropriato è da effettuarsi sulla base di esigenze specifiche dell'operatore.

Bibliografia

1. 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.
2. Italia. Ministero della Salute. Contaminazione da aflatossine nel mais e nella catena alimentare. *Nota prot. 0000855-P-16/01/2003*.
3. Europa. Regolamento (UE) N. 519/2014 della Commissione del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 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* L147/29 del 17.05.2014.
4. Analysis of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2000.08-2004. In: *Aflatoxin M1 in Liquid Milk. Immunoaffinity Column by Liquid Chromatography*. Rockville, MD: AOAC International; 2004. p. 1-3.