



ASSOCIAZIONE REGIONALE ALLEVATORI DELLA LOMBARDIA
26013 Crema - Via Kennedy, 30 - tel. 0373 89701 - fax 0373 81582
Indirizzo internet: www.aral.lom.it – e- mail: info@aral.lom.it
Codice Fiscale 82004330795 P.IVA 00934210196

Valutazione delle prestazioni analitiche del Test Quick Afla M₁ confrontato con metodo HPLC

Nicoletta Rizzi, Serena Vailati, Elisa Grandi, Massimo Battaglia

Associazione Regionale Allevatori della Lombardia – Crema CR

INTRODUZIONE

La ditta Astori Tecnica di Poncarale (BS) che produce e distribuisce internazionalmente il test Quick Afla M₁ Strip per la determinazione della aflatossina M₁ ha incaricato il nostro laboratorio di analisi di compiere uno studio di valutazione delle prestazioni analitiche del test. Lo studio si è svolto negli anni 2016/2017.

DESCRIZIONE DEL TEST

Il test permette una determinazione dell'Aflatossina M₁ in campioni di latte crudo intero o sgrassato, in soli 10 minuti e senza l'ausilio di incubatori, la ditta inoltre garantisce risultati indipendenti dalla temperatura dei campioni.

Quick Afla M₁ Strip Test può essere interpretato ad occhio nudo per un risultato di tipo qualitativo. In alternativa, quando associato al lettore portatile RDS-1500 PRO, anch'esso proposto da Astori Tecnica, il test fornisce risultati quantitativi (risoluzione: 0,1 ppt). Questo lettore permette di interpretare immediatamente l'esito della striscia-test, fornendo il valore di Aflatossina M₁ in ppt e memorizzando data, ora, nome o codice del campione, concentrazione dell'analita e immagini della striscia-test intera e delle singole linee del test e del controllo; i risultati con tutti i dati e le immagini vengono mantenuti nella scheda di memoria dello strumento ma possono essere scaricate su PC grazie

al cavo e al software forniti. Il lettore non richiede calibrazioni periodiche in funzione del lotto del test ma contiene un'unica curva di calibrazione sulla base della quale il produttore realizza e standardizza tutti i lotti di Quick Afla M₁ Strip Test.

MATERIALI E METODI

L'obiettivo del presente studio era verificare l'applicabilità del test ad analisi rapide della concentrazione di Aflatossina M₁ in campioni di latte crudo con finalità di screening valutando l'accuratezza e la linearità del test tramite la comparazione dei risultati ottenuti con il metodo HPLC accreditato presso il nostro laboratorio e con l'utilizzo del Test associato al lettore RDS-1500 PRO.

Per questo scopo, abbiamo selezionato 79 campioni di latte vaccino crudo che all'analisi con HPLC hanno dato valori compresi tra 9 e 280 ppt.

Metodo HPLC

La cromatografia in fase liquida a elevate prestazioni (High Performance Liquid Chromatography) è la tecnica di riferimento per l'analisi delle aflatossine, data la sua elevata sensibilità e specificità analitica. Questo metodo permette di effettuare in pochi minuti separazioni di miscele anche molto complesse, determinandone la composizione quantitativa. Il metodo necessita di personale qualificato, di apparecchiature complesse e di preparazione del campione.

Il campione da analizzare viene prima purificato in una colonnina di immunoaffinità e successivamente è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile. Alla fine della colonna è applicato un rivelatore e un computer che permettono un'analisi in continuo del liquido in uscita dalla colonna e quindi di quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.

Il metodo applicato è AOAC 2000.08 che utilizza come rivelatore per l'analisi dell'aflatossina M₁ il fluorimetro.

Per l'analisi dell'aflatossina M₁ sono state utilizzate le seguenti condizioni cromatografiche:

- 1- Colonna: Cromasil 100 C18 (250 × 4,6 mm; 5 μ);
- 2- Fase mobile: 65% H₂O; 25% CH₃CN; 10% CH₃OH;
- 3- Flusso: 0,8 ml/min;
- 4- T° colonna: 30°C

- 5- Lunghezza d'onda_{ECC} 360 nm; Lunghezza d'onda_{EM} 420 nm; eccitazione/emissione
- 6- Tempo di corsa: 15 minuti
- 7- Volume iniettato: 50 μ l.

Il nostro laboratorio ha accreditato l'analisi HPLC sul latte nel 2003 mantenendola sempre attiva da allora.

Lateral Flow

I dispositivi lateral flow (LFD), spesso denominati "strip", sono metodi analitici immunocromatografici. I reagenti si trovano normalmente incorporati nel dispositivo, rendendo le strip idonee per un'analisi da campo, grazie alla loro praticità d'uso da parte di chiunque e in qualunque situazione. Se supportati da un sistema di lettura strumentale permettono di avere un risultato semi quantitativo.

Un tipico LFD è formato da un "sample pad" dove viene depositato il campione, un "coniugante pad" in cui è adsorbito il tracciante, una membrana dove avviene la reazione di legame del saggio sul quale ci sono due siti attivi, uno per il test e uno di controllo, ed infine da un "absorbent pad" responsabile della direzione del flusso attraverso la membrana. Quando il campione viene caricato sul sample pad, si muove verso il coniugante pad e solubilizza il tracciante (generalmente un anticorpo anti-analita adsorbito a particelle di oro colloidali). Il flusso del liquido si muove per capillarità attraverso la membrana verso le zone dove sono depositati i reagenti anidri delle sue linee reattive.

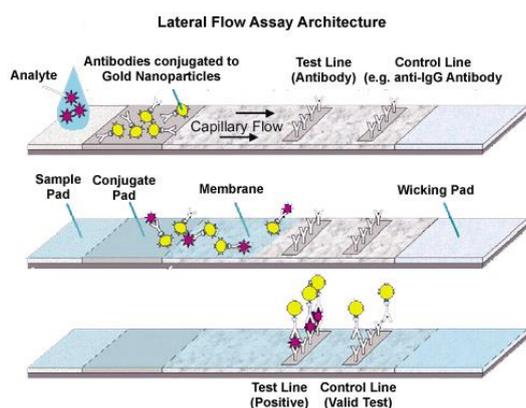


Figura 1: Architettura Lateral Flow

In un saggio di tipo sandwich, la linea del test è costituita da un anticorpo di cattura, in un saggio di tipo competitivo è costituita da un coniugato analita-proteina definito competitor. Se nel campione non è presente l'analita di interesse, allora l'anticorpo marcato con oro colloidale lega il coniugato della linea di test e precipita formando una banda colorata. Se invece il campione contiene il contaminante, questo sequestra l'anticorpo riducendone la capacità di legarsi alla linea di test, con la

conseguente riduzione dell'intensità della banda colorata. Grazie all'absorbent pad, il flusso di liquido continua anche quando la membrana è completamente umida verso la linea di controllo, costituita da anticorpi di cattura che legano il tracciante indipendentemente dalla concentrazione dell'analita nel campione. Nel caso in cui la linea di controllo non si sia colorata al termine del saggio, il test è da considerarsi non valido.

Le linee di test e di controllo sono visibili chiaramente ad occhio nudo. Per evitare però differenze nell'interpretazione soggettiva del risultato e per consentire la quantificazione del campione è necessario impegnare appositi lettori (rifrattometri o elaboratori di immagini).

Quick Afla Strip M1 Test: un competitive lateral flow

In questo studio di valutazione è stato testato il test Quick Afla M₁ Strip che sulla striscia test lega un anticorpo monoclonale altamente specifico anti-Aflatossina M₁ a particelle d'oro colloidali.



Figura 2: Quick Afla M1 Strip Test

Il campione di latte (200 µl) è dispensato in un apposito pozzetto di reazione in plastica trasparente, dove vengono posti in sospensione i reagenti liofilizzati che ricoprono il fondo del pozzetto stesso; la risospensione porta ad una colorazione rosa uniforme del campione. Il latte è incubato per 5 minuti per permettere all'anticorpo anti-Aflatossina M₁ legato alle particelle d'oro di fissarsi all'Aflatossina M₁ eventualmente presente nel campione. La striscia-test viene quindi inserita nel pozzetto di reazione con le frecce rivolte in basso, in modo che il campione venga assorbito per capillarità.

Se gli anticorpi delle particelle d'oro si sono fissate all'Aflatossina M₁ presente nel campione, queste particelle passeranno oltre la T-line e raggiungeranno la Linea del Controllo (C-line). Un'intensità della T-line maggiore della C-line indica un risultato inferiore a 50 ng/kg; viceversa un'intensità della T-line inferiore della C-line indica un risultato positivo e superiore a 50 ng/kg. Se le due linee mostrano un'intensità uguali e indistinguibili ad occhio nudo, il risultato è pari a circa 50 ng/kg.

Qualora si rendesse visibile solo la C-line e non la T-line, il risultato sarà allora da interpretare come fortemente positivo (superiore a 300-400 ng/kg).

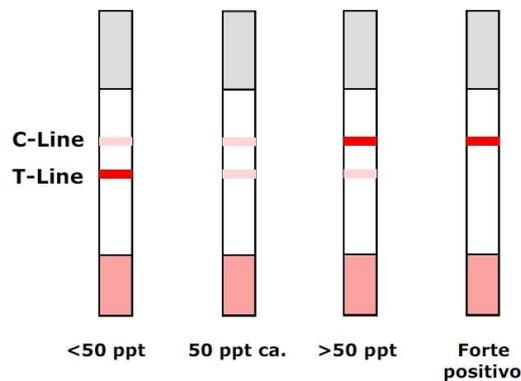


Figura 3: Risposte analitiche delle Strip Test in base alla concentrazione di AFM1

Interpretazione visiva

Le istruzioni presenti nella confezione forniscono le seguenti indicazioni:

Al termine del secondo periodo di incubazione, osservare visivamente la striscia-test e le bande comparse sulla stessa.

- **T-line più intensa di C-line:** la concentrazione di Aflatoxina M₁ nel campione è inferiore a 50 ng/kg.
- **Stessa intensità di T-line e C-line:** la concentrazione di Aflatoxina M₁ nel campione è pari a circa 50 ng/kg.
- **T-line meno intensa di C-line:** la concentrazione di Aflatoxina M₁ nel campione è superiore a 50 ng/kg.
- **T-line assente, solo C-line visibile:** la concentrazione di Aflatoxina M₁ nel campione è molto elevata (pari o superiore a 300-400 ng/kg).

Modalità operative

Il latte liquido di qualsiasi tipologia (fresco, pastorizzato, UHT, microfiltrato, crudo, intero, parzialmente scremato, scremato, ecc.) viene utilizzato tal quale. Le fasi dell'analisi sono:

- Prelevare il test dal frigorifero e portarlo a temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) per almeno 10 minuti.
- Prendere l'esatto numero di pozzetti di reazione e di strisce-test necessarie. Aprire i pozzetti e fissarli nel telaio fornito.
- Mescolare bene il campione di latte.
- Prelevare 200 μl di campione di latte utilizzando la micropipetta da 200 microlitri fornita sulla quale sia stato già inserito fermamente un nuovo puntale.
- Dispensare tali 200 μl di latte sul fondo di un pozzetto di reazione già posizionato nel telaio fornito.



Figura 4: Esecuzione del test

- Utilizzando la pipetta con lo stesso puntale, aspirare e dispensare nuovamente il contenuto del pozzetto al suo interno per circa 8-10 volte, in modo da distribuire e miscelare il liofilizzato di particelle d'oro nel latte. Il campione dovrebbe assumere una colorazione rosa uniforme.
- Lasciare ad incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.

- Prelevare una striscia-test e porla nel pozzetto avendo cura di mantenere le frecce orientate verso il basso. La striscia-test deve rimanere nel pozzetto in posizione verticale, in modo che l'estremo della striscia tocchi il fondo del pozzetto (Figura 5).



Figura 5: Posizionamento delle Strip Test

- Lasciare ad incubare per 5 minuti, a temperatura ambiente.
- Estrarre la striscia-test dal pozzetto, porla su una superficie orizzontale ed interpretare i risultati entro 5 minuti seguenti, ad occhio nudo o mediante il lettore opzionale RDS-1500 PRO Strip Reader.

Il test Quick Afla M₁ Strip combinato al lettore portatile di strisce-test RDS-1500 PRO fornisce risultati semi quantitativi nell'ambito compreso tra 10 e 350 ng/kg circa di Aflatossina M₁ nel latte. Dopo aver eseguito il test la striscia, per essere letta, viene inserita nell'apposito alloggiamento del lettore.

Il lettore misura l'intensità delle bande colorate comparse sulla striscia e rapporta il loro valore in base a letture precedenti di campioni a titolo noto (curva di calibrazione pre-installata sul lettore, ottenuta con analisi eseguite con metodi HPLC o ELISA) fornendo un dato espresso in ng/kg (ppt) di Aflatossina del campione. Il risultato in ppt verrà immediatamente mostrato sullo schermo insieme all'immagine ingrandita delle bande colorate sulla striscia stessa.



Figura 6: Lettore RDS-1500 PRO per l'interpretazione delle Strip Test e stampante opzionale

I risultati ottenuti con RDS-1500 PRO sono oggettivi poiché forniti dallo strumento, inoltre il lettore mantiene in memoria i risultati che possono essere scaricati su PC grazie ad un software di gestione dati fornito in dotazione.

Il lettore interpreta automaticamente il risultato mostrando sullo schermo un'immagine ingrandita delle bande colorate comparse sulla striscia e fornendo l'esito con un valore espresso in ppt.

RISULTATI

Il test Quick Afla M₁ Strip contiene tutto ciò che serve per l'esecuzione del test e non richiede l'intervento di personale altamente qualificato o di essere eseguito strettamente in un laboratorio.

La tabella n.1 sottostante elenca schematicamente i valori di Aflatossina M₁ in ng/kg (ppt) ottenuti mediante HPLC e con il Quick Afla M₁ Strip Test.

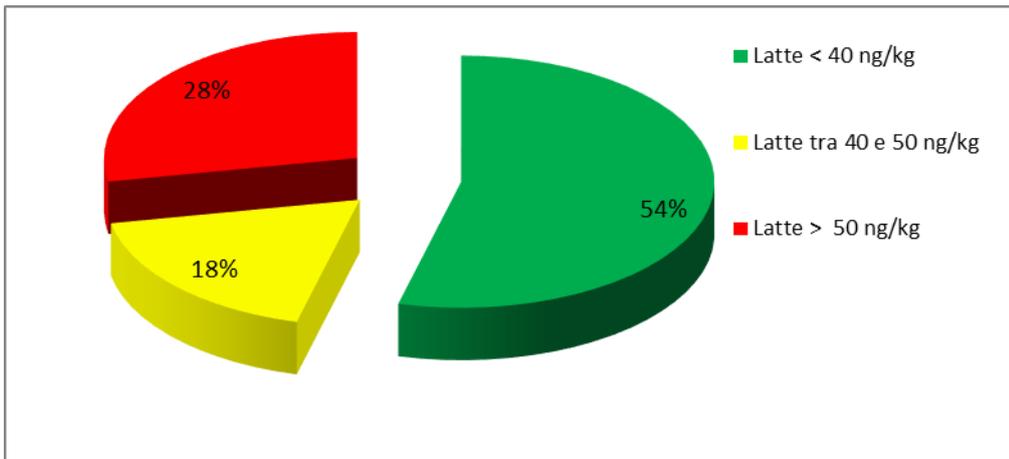
Tabella 1: Aflatossina M₁ ottenuta con il metodo HPLC e QUICK Afla M₁

N.	HPLC ng/kg	QUICK AFLA M ₁ ng/kg
1	9	21,9
2	10	28,3
3	11	21,1
4	12	25,2
5	15	20,4
6	16	22,2
7	17	21,5
8	17	21

N.	HPLC ng/kg	QUICK AFLA M₁ ng/kg
9	17	27,9
10	18	26
11	18	27,7
12	19	17,6
13	20	28,2
14	20	19,7
15	21	22,2
16	23	35,1
17	24	25,4
18	24	16,1
19	24	23,9
20	25	25,4
21	25	25,4
22	25	34,3
23	26	25,1
24	28	34,7
25	28	46,3
26	29	32,7
27	29	25,4
28	29	31
29	29	33,2
30	31	34
31	33	42,3
32	33	29,6
33	33	43,5
34	34	34,4
35	35	36,7
36	36	42,7
37	37	45,1
38	38	32,7
39	38	26,1
40	38	43,3
41	38	42
42	38	35,1
43	39	60,9
44	40	41,4
45	41	52,8
46	41	36
47	41	46,4
48	42	46,3
49	42	57,2

N.	HPLC ng/kg	QUICK AFLA M₁ ng/kg
50	42	45,3
51	45	59,3
52	46	50,6
53	46	34
54	46	44,7
55	46	42,6
56	48	52,8
57	49	37,2
58	51	33,5
59	52	51
60	52	49,9
61	53	58
62	53	58,2
63	54	44,2
64	60	51,2
65	61	75,8
66	61	76,1
67	66	50,8
68	68	85
69	68	94,3
70	70	66,9
71	72	56,9
72	73	60,5
73	85	191,3
74	91	107,7
75	123	110,9
76	182	207
77	199	240,7
78	250	214
79	280	260,4

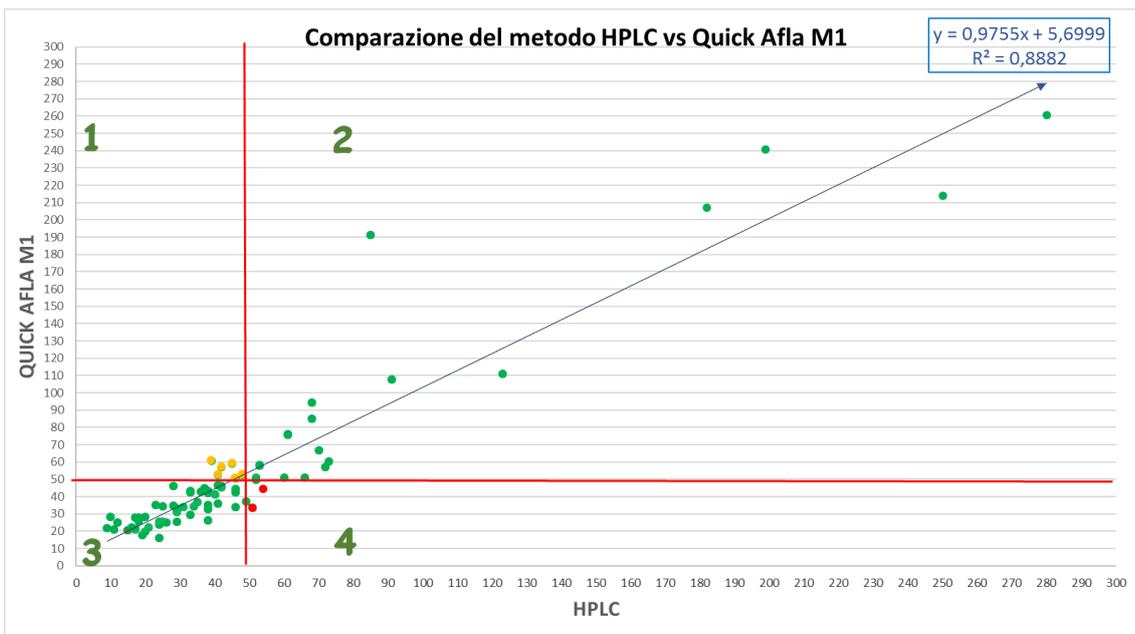
Grafico 1: Distribuzione dei campioni analizzati



Nel grafico 1 sono riportate le distribuzioni percentuali dei campioni testati in HPLC nell'ambito della presente prova in diverse classi di interpretazione.

- < 40 ng/kg
- Tra 40 ng/kg e 50 ng/kg
- > 50 ng/kg

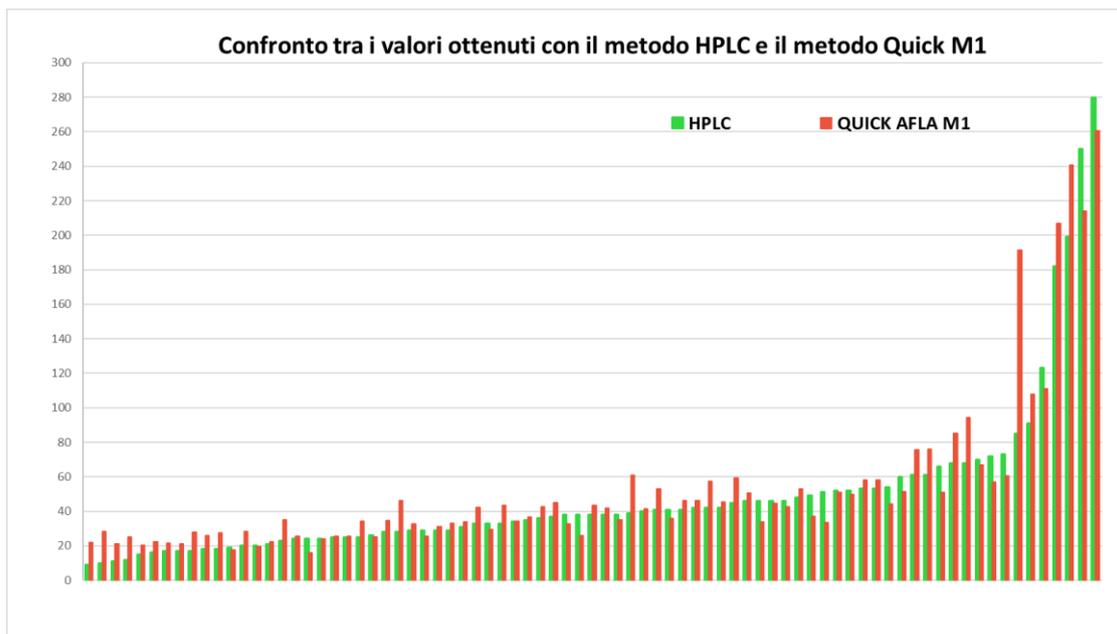
Grafico 2



Nel grafico 2 vengono comparati tutti i valori ottenuti con metodo HPLC e Quick Afla M₁ Strip Test, sul grafico è visibile la linea di tendenza e l'equazione della relazione: la linea di tendenza ottenuta mostra un valore di R² pari a 0.8882.

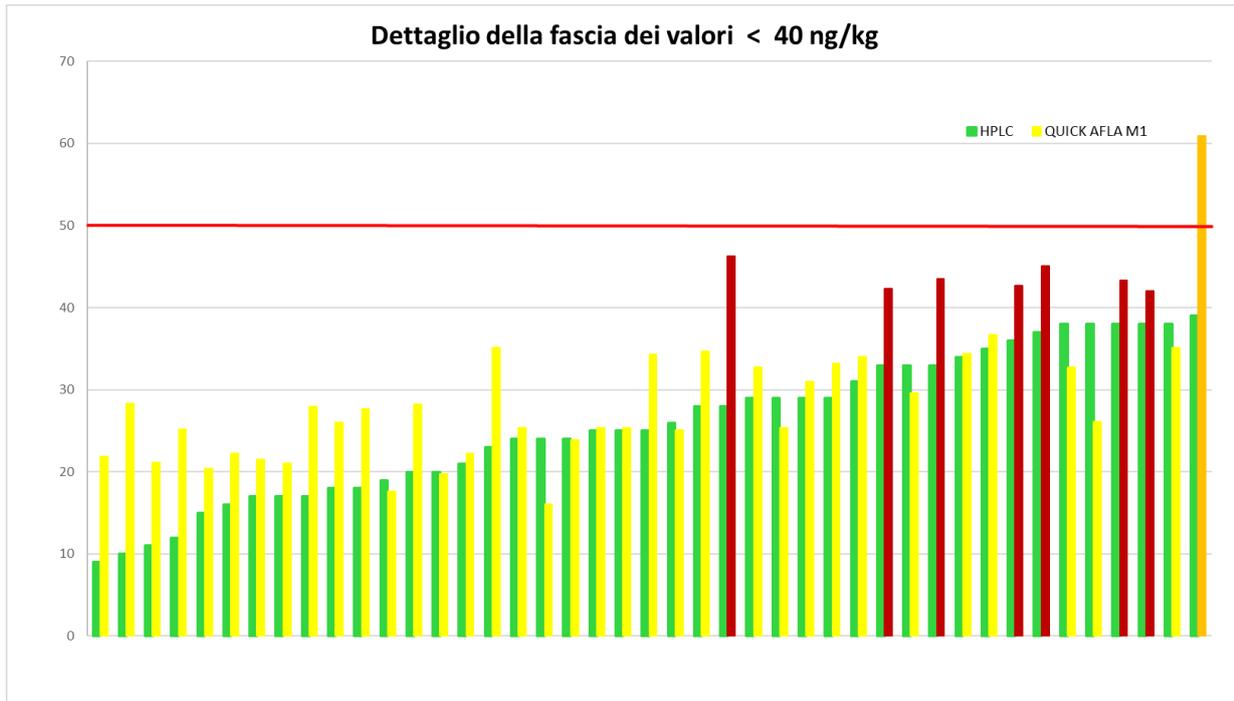
I valori sono stati suddivisi in 4 quadranti in base al valore di legge di **50 ng/kg**: i quadranti 2 e 3 indicano che i dati ottenuti con i due metodi sono inferiori (quadrante 3) o superiori al limite di legge (quadrante 2); il quadrante 1 indica che i valori ottenuti sono risultati superiori al limite di legge con il test Quick Afla M₁ Strip ed inferiori con il metodo HPLC; il quadrante 2 indica che i valori ottenuti sono risultati inferiori al limite di legge con il test Quick Afla M₁ Strip e superiori con il metodo HPLC;

Grafico 3



Nel grafico 3 vengono riportati i valori ottenuti con metodo HPLC e Quick Afla M₁ Strip in grafico ad istogramma

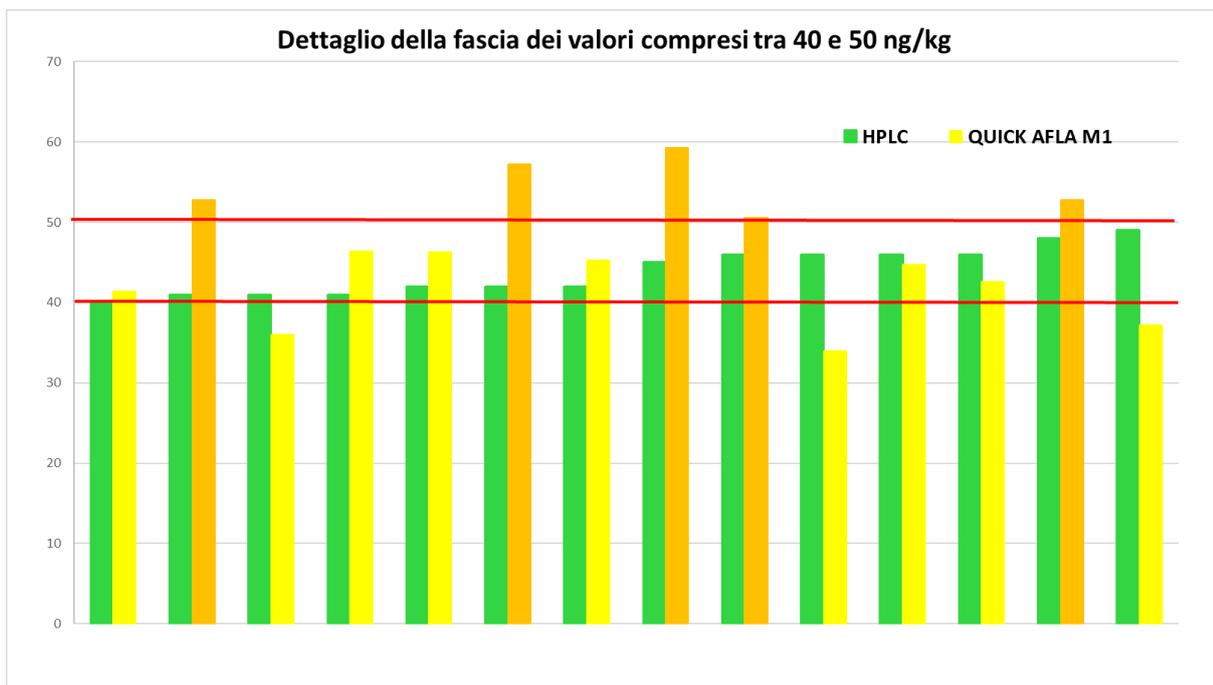
Grafico 4



Nel grafico 4 si riportano i valori compresi nell'intervallo < 40 ng/kg dell'HPLC; per una maggior evidenza grafica, sono stati colorati in marrone i valori che in base al test Quick Afla M₁ Strip sono risultati > 40 ng/kg.

In arancione si segnala un campione che risulta > 60 ng/kg per il test Quick Afla M₁ Strip ma < 40 ng/kg in metodo HPLC.

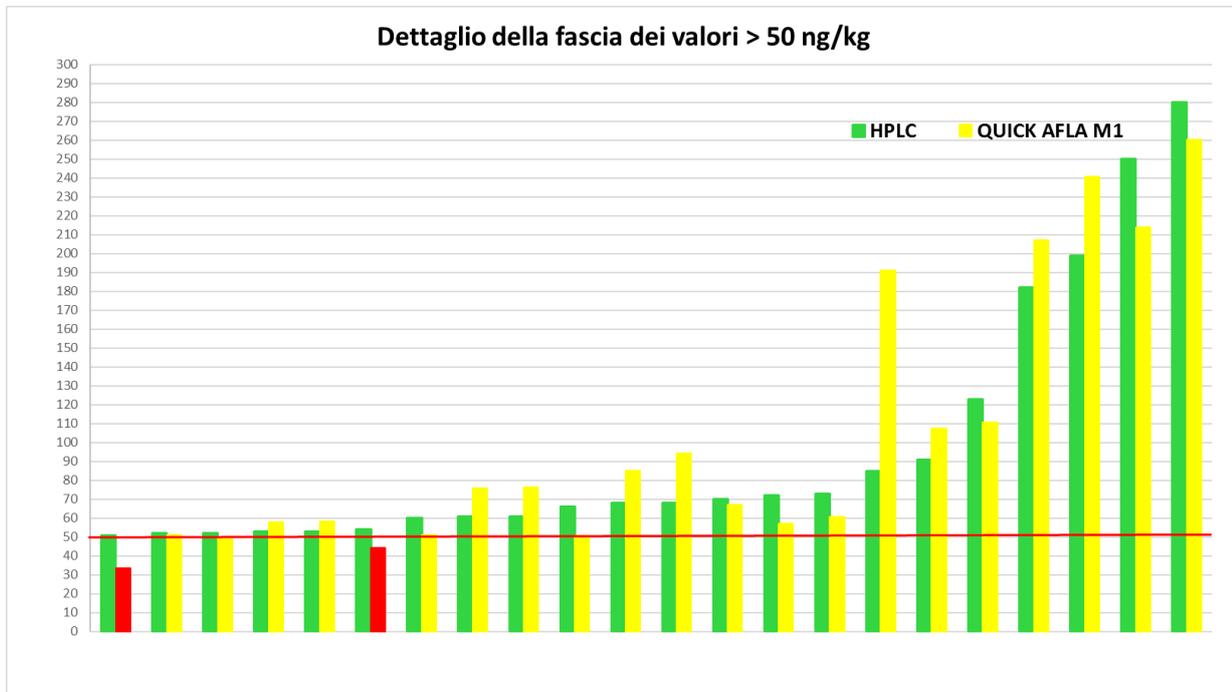
Grafico 5



Nel grafico 5 si riportano i valori compresi nell'intervallo 40-50 ng/kg, (limite di legge 50 ng/kg).

Sono riportati in arancione i campioni che sono risultati superiori al limite di legge con il test Quick Afla M₁ Strip, ma inferiori con HPLC.

Grafico 6



Nel grafico 6 si riportano i valori > 50 ng/kg; in rosso i due campioni che risultano superiori al limite di legge in HPLC ma con il test Quick Afla M₁ Strip un campione risulta nella fascia tra 40 e 50 ng/kg mentre l'altro in fascia < 40 ng/kg.

Per i valori al di sopra di 60 ng/kg, tutti i risultati sono superiori al limite di legge.

CONCLUSIONI

Il problema riguardante la contaminazione da aflatossine nel settore zootecnico investe non solo gli alimenti, e quindi la coltivazione o l'acquisto di materie prime, ma tutta la filiera produttiva.

La possibilità di utilizzare un test rapido e di facile esecuzione permette di valutare la qualità di partite di latte in tempi brevissimi. Questo è particolarmente importante in alcune situazioni lavorative come, ad esempio, l'immissione in cisterne di latte in fase produttiva (latte alimentare, formaggi, yogurt, ecc.) o quando si debba valutare se caricare del latte in cisterne di raccolta.

Si può ritenere che Quick Afla M₁ Strip Test in esame possa essere utilizzato per un primo screening di valutazione rapida del livello di contaminazione del latte.

Naturalmente nell'ambito dei processi di autocontrollo e di scambio commerciale i risultati degli eventuali test rapidi vanno confermati con metodi HPLC o ELISA eseguiti presso laboratori accreditati per tali prove al fine di definire correttamente il valore di aflatossina nel latte.