



# SEMINARIO

## AIA Laboratori e 20° ARAL SATA

Sostenibilità dell'azienda da latte: corretto uso del farmaco, ambiente, reddito

30-31 GENNAIO 2018

### Uso di solventi non organici nell'analisi delle micotossine

**M. Gkanas**, Ch. Chatzoglou, K. Badra, Ch. Tzaridou, A.N. Ntantasios, G. Papageorgiou and S.D. Athanasiou

Dipartimento di Ricerca e Sviluppo



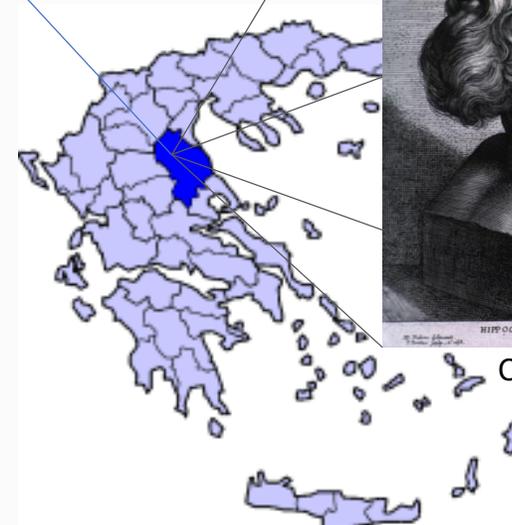


**PROGNOSIS**  
**BIOTECH**

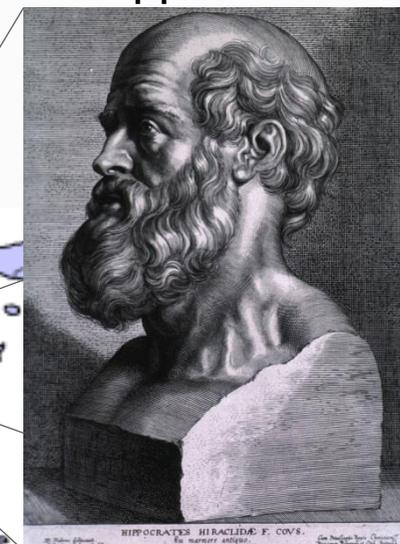


- un'azienda biotecnologica innovativa, situata in Grecia centrale, nella città di Larissa
- specializzata nello sviluppo di diagnostica in vitro per la Sicurezza Alimentare ma anche nella fabbricazione e nel marketing di prodotti diagnostici e di laboratorio

Larissa



Ippocrate



Considerato "il padre della medicina"





PROGNOSIS  
BIOTECH



- Il catalogo dei nostri prodotti comprende: test ELISA e test lateral flow per le micotossine e l'adulterazione del latte
- In cosa Prognosis Biotech è diversa? «Ogni prodotto è il risultato di una ricerca per l'innovazione»

- Aflatossina M1
- Aflatossina B1
- Aflatossine totali
- Ocratossina
- Deossinivalenolo
- Zearalenone
- Fumonisine
- T-2/HT-2 tossine
- Adulterazione del latte





PROGNOSIS  
BIOTECH



- Progettiamo i nostri processi in modo che i nostri prodotti siano:

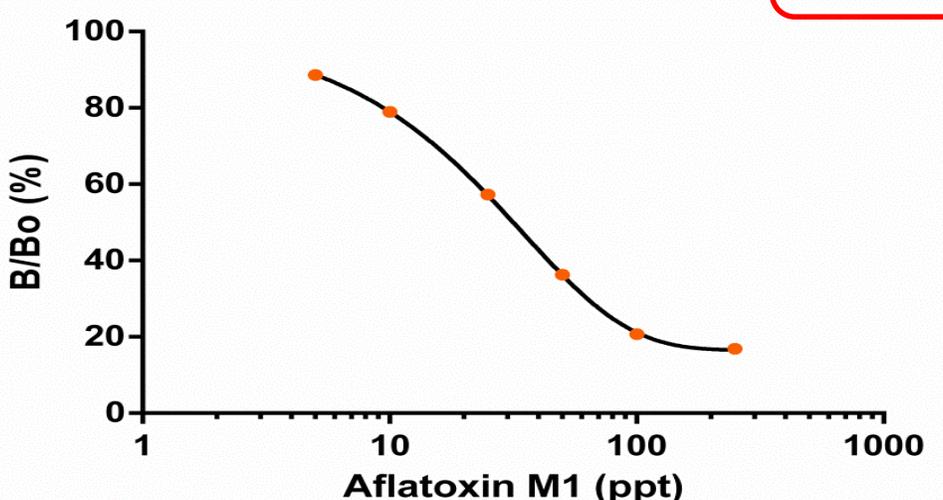
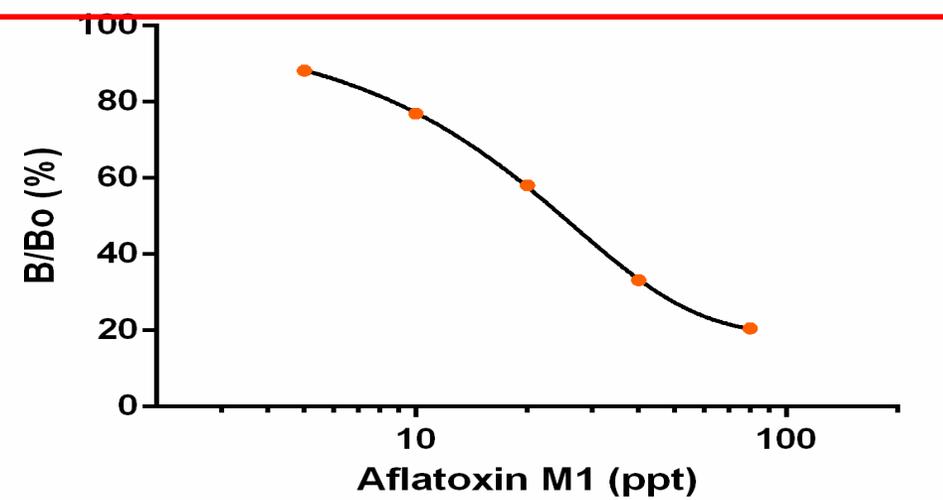


Prognosis Biotech è stata la prima azienda ad usare i reagenti pronti all'uso in Europa (Dal 2011)



# Prodotti per l'analisi di Aflatossina M1 (Limite EU)



	<b>M1 Extra Sensitive (ES)</b>		<b>M1 Baby Food (BF)</b>	
	Sono conformi alla ISO 14675:2003 Sono immunoenzimatici competitivi			
Tempo di saggio	75min (45-15-15min)			
Intervallo	0-250ppt		0-80ppt	
LOD	2ppt		1.6ppt	
				



# Recovery di campioni di latte

Il basso effetto matrice è stato confermato dal recovery di campioni sottoposti a spike

dopo spike con aflatossina M1 in tre livelli: 25, 50 e 75ppt

Campioni	Numero di Lotti Diversi Usati	Recovery Media	CV
Latte omogeneizzato	3	99.83%	7.10%
Latte crudo scremato	3	99.00%	6.18%
Latte crudo intero	3	97.93%	5.34%
<b>Media</b>		<b>98.92%</b>	



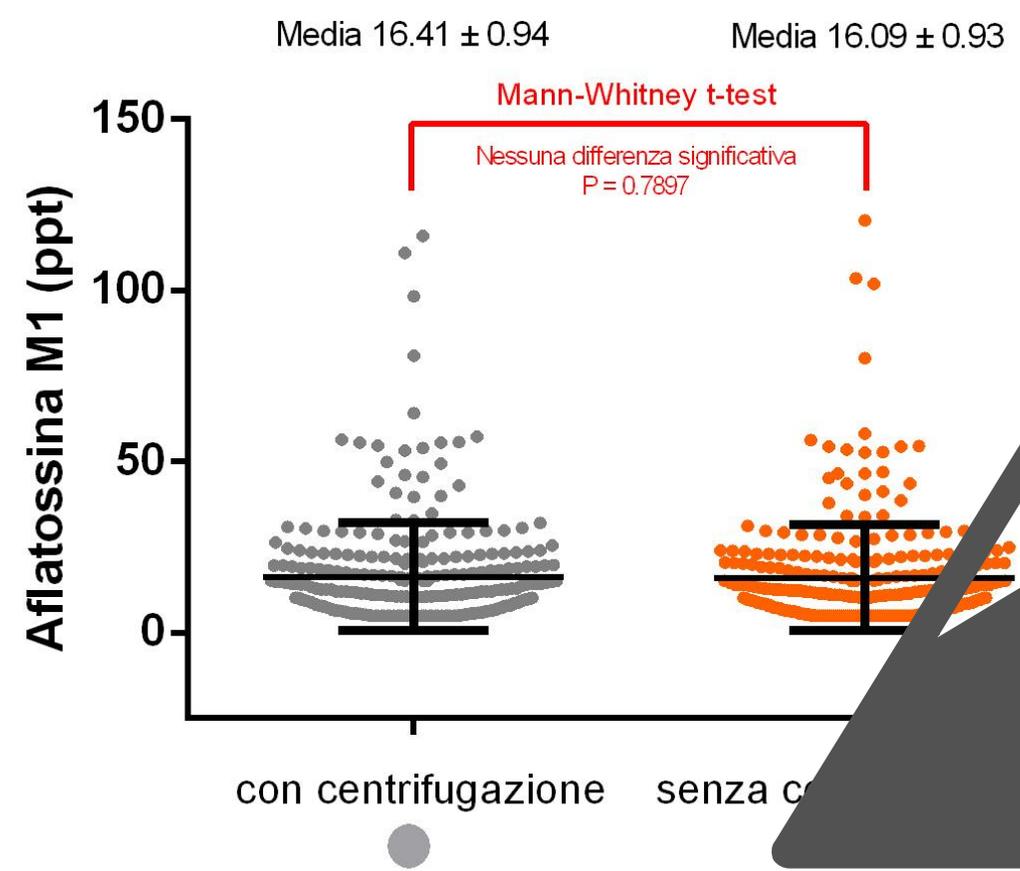
Il risultato più degno da notare è, che il latte crudo scremato e quello intero hanno una recovery ed una CV simile, dandoci la possibilità di evitare il passaggio di centrifugazione per quanto riguarda il latte vaccino



# Recovery di campioni di latte

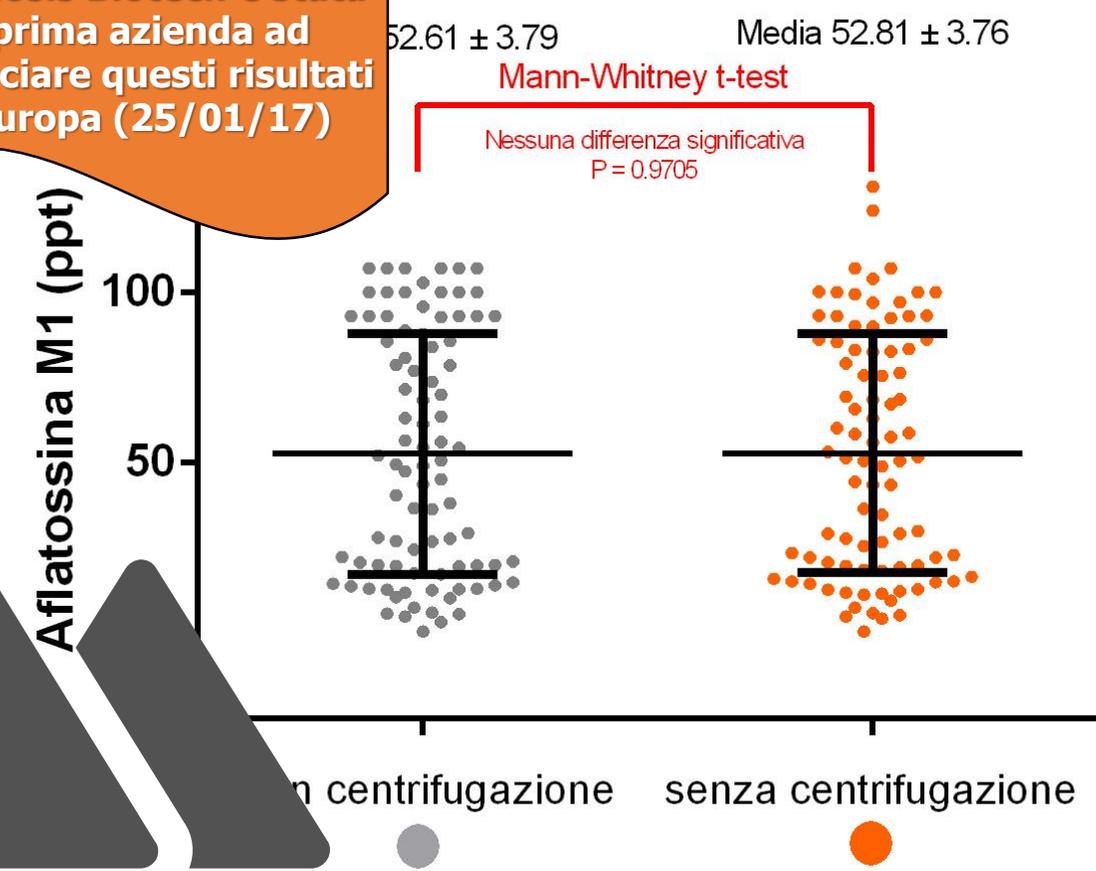


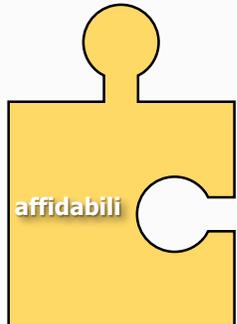
## Latte crudo bovino (n=280)



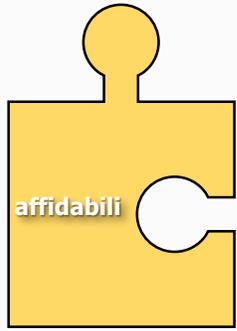
Prognosis Biotech è stata la prima azienda ad annunciare questi risultati in Europa (25/01/17)

## Latte crudo di pecora (n=160)

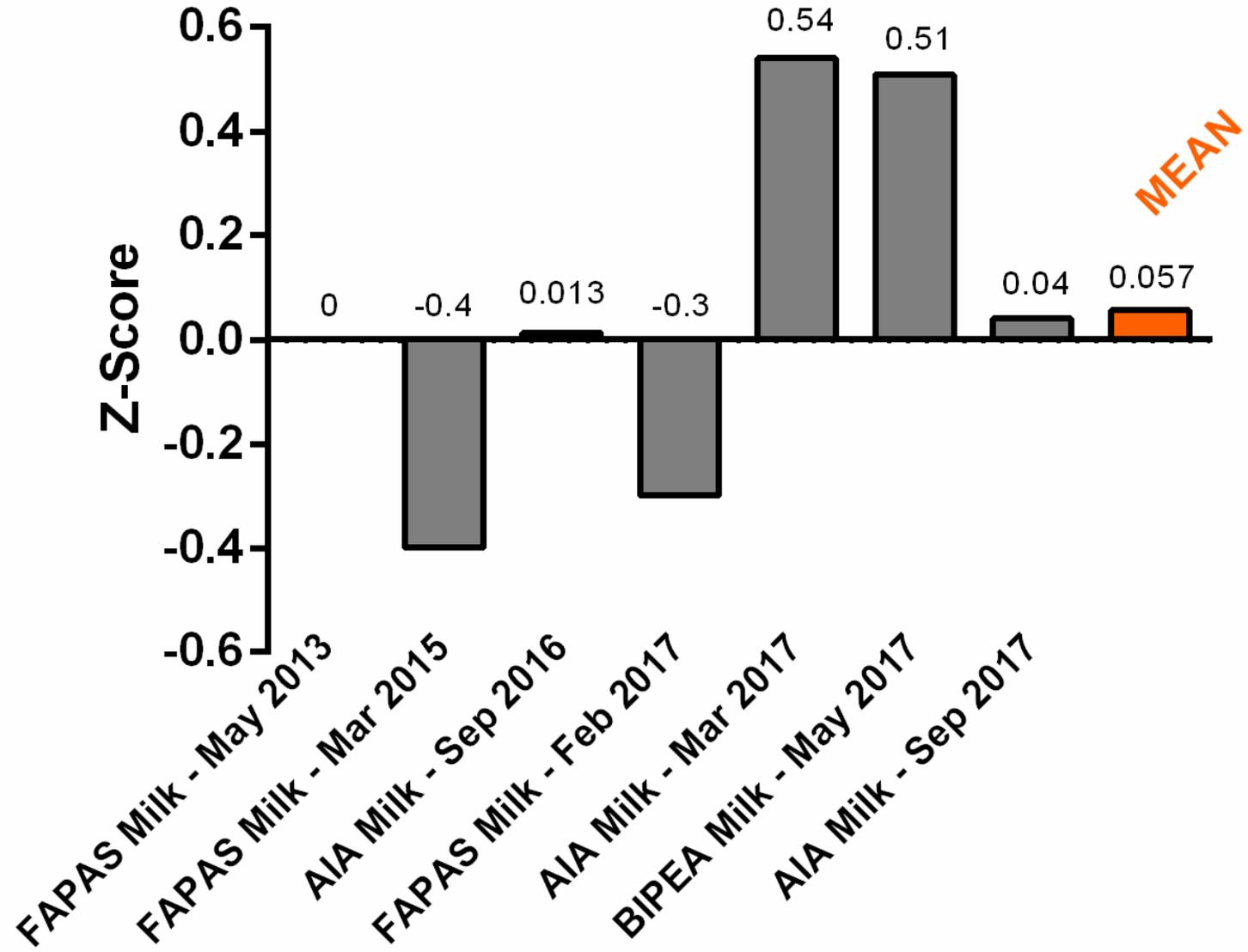


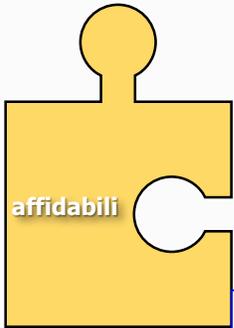


<b>Ring Tests (2013-Oggi)</b>	<b>Numero di Laboratorio</b>	<b>Valori Assegnati (ng/kg)</b>	<b>Risultati (ng/kg)</b>	<b>Z-score</b>
FAPAS Proficiency Test 04217 Aflatoxin M1 in Milk Powder May-June 2013	38	11.4	11.5	0
FAPAS Proficiency Test 04259 Aflatoxin M1 in Milk Powder March-May 2015	23	9.3	10.2	-0.4
A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 270916 Aflatoxin M1 in Lyophilized Milk Settembre 2016	70	8.63	8.48	0.013
		20.27	19.31	
		33.10	32.79	
		50.25	51.66	
FAPAS Proficiency Test 04308 Aflatoxin M1 in Milk Powder February-April 2017	24	5.1	5.5	-0.3
A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 280317 Aflatoxin M1 in Lyophilized Milk March 2017	7	19.10	20.70	0.54
		10.47	11.80	
		30.98	35.17	
		44.08	46.83	
BIPEA Proficiency Test 01-0431 Aflatoxin M1 in Milk May 2017	-	95.8	110.5	0.51
A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 260917 Aflatoxin M1 in Lyophilized Milk Settembre 2017	61	50.30	49.27	0.04
		18.02	17.28	
		27.28	26.67	
		10.42	9.52	



# Ring Tests

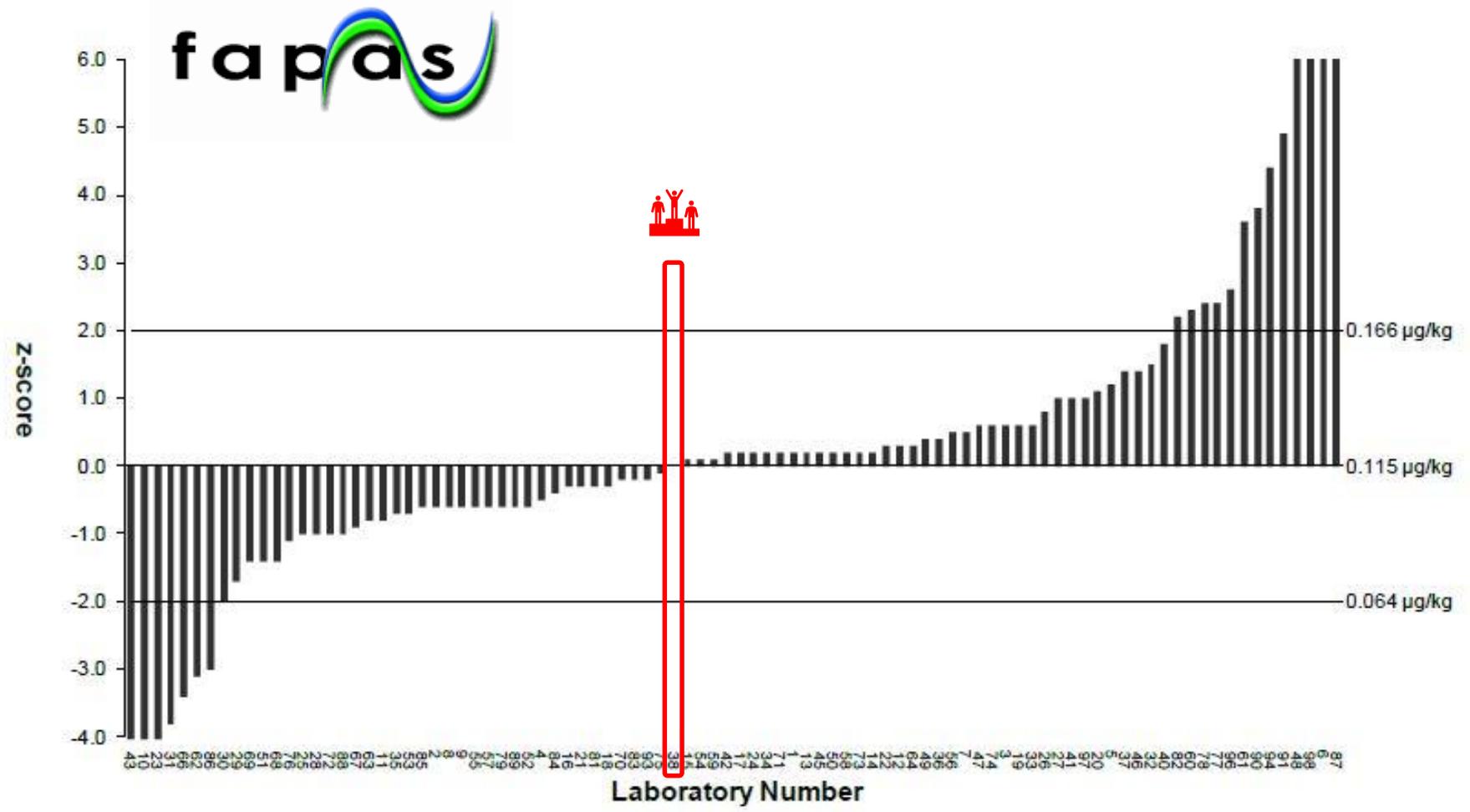




# Ring Tests

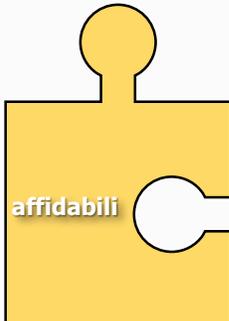
FAPAS Proficiency Test 04217 Aflatoxin M1 in Milk Powder May-June 2013

FAPAS® Report 04217



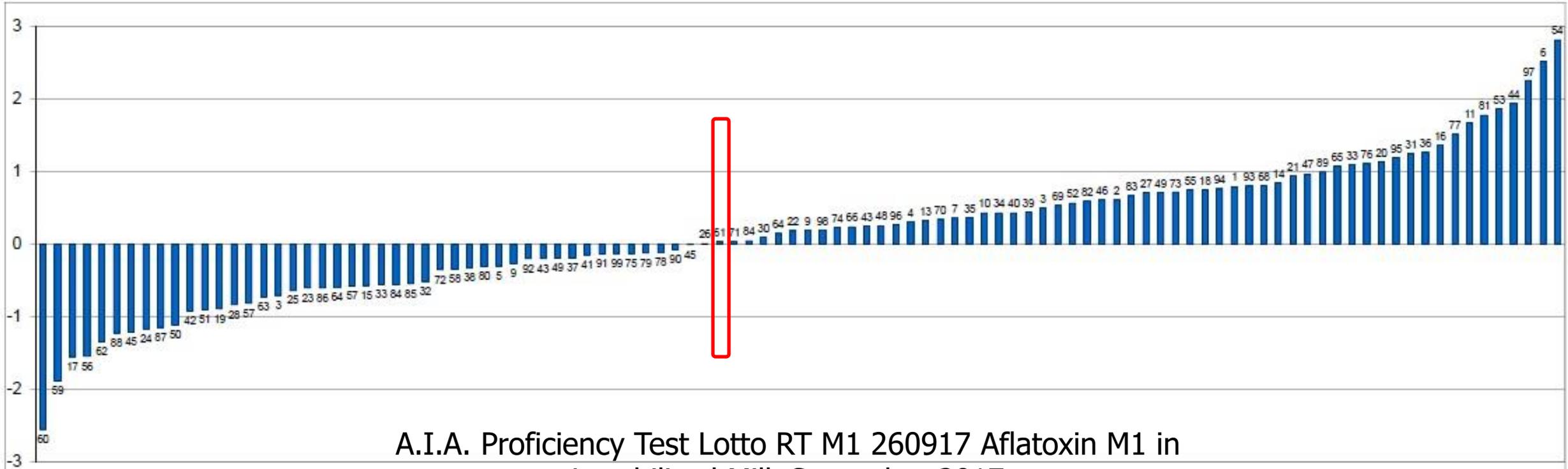


# Ring Tests

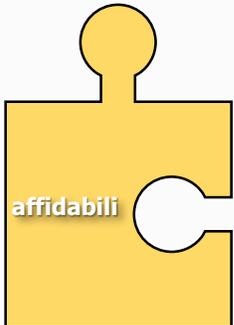


RING TEST  
AFLATOSSINA M1  
SETTEMBRE '17

## Z SCORE - ELISA ED HPLC



A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 260917 Aflatoxin M1 in Lyophilized Milk Settembre 2017



# Ring Tests

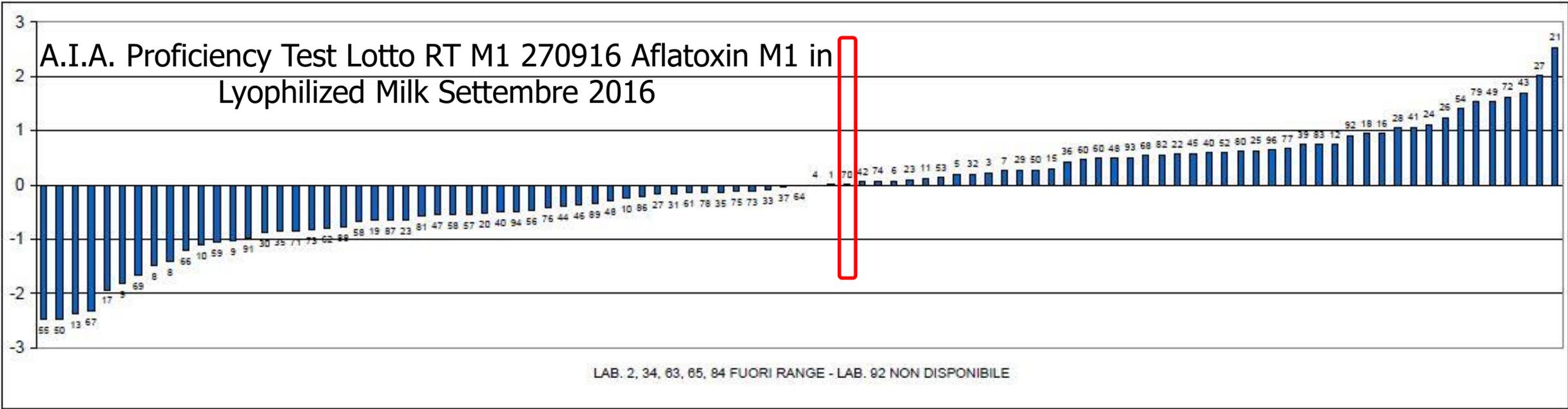


RING TEST  
AFATOSSINA M1  
SETTEMBRE '16

## Z SCORE - ELISA ED HPLC

### Z-SCORE LABORATORI

A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 270916 Aflatoxin M1 in  
Lyophilized Milk Settembre 2016



LAB. 2, 34, 63, 65, 84 FUORI RANGE - LAB. 92 NON DISPONIBILE



# Analisi dello yogurt



Preparazione

Metodo ProGnosis  
per yogurt

0.5ml di H<sub>2</sub>O

1g di yogurt

1.5ml di Buffer

Vortex

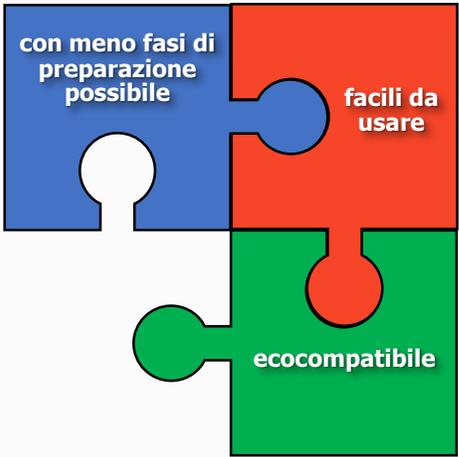
Con questo buffer la miscela finale è compatibile per il test immunoenzimatico e può essere utilizzata direttamente nei micropozzetti

- Fattore di diluizione: 3
- LOQ: 15ppt

Test ELISA



# Analisi dello yogurt da bere



Preparazione

Metodo Prognosis  
per yogurt da bere

1g di yogurt  
da bere

1ml di Buffer

Vortex

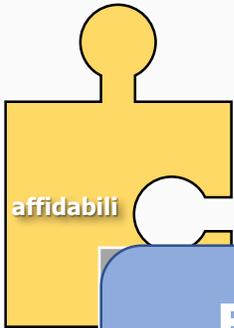


- Fattore di diluizione: 2
- LOQ: 15ppt

Test ELISA



# Recovery di campioni di Yogurt e Yogurt da bere



E per quanto riguarda il recovery dei campioni sottoposti a spike?

	Campioni Testati per Lotto (n)	Numero di Lotti Diversi Usati	Recovery Media	CV	
Yogurt negativi (bianchi) spiked con Aflatossina M1 in tre livelli: 75, 150 e 225ppt	Yogurt greco vaccino	8	3	96.20%	7.46%
	Yogurt di latte vaccino intero	8	3	96.00%	8.27%
	Yogurt di latte ovino intero	8	3	102.73%	8.67%
	<b>Media</b>			<b>98.31%</b>	
Yogurt da bere negativi (bianchi) spikati con Aflatossina M1 in tre livelli: 50, 100 e 150ppt	Ayran	8	3	108.34%	3.15%
	Kefir	8	3	105.46%	5.46%
	<b>Media</b>			<b>106.90%</b>	

# Riassunto campioni di Yogurt e Yogurt da bere



affidabili

	<b>Metodo Prognosis per Yogurt</b>	<b>Metodo Prognosis per Yogurt da Bere</b>	<b>Metodo tradizionale</b>
<b>Recovery</b>	98.31%	106.90%	60-90%
<b>Fattore di diluizione</b>	3	2	≥5
<b>LOQ Test ELISA</b>	15	10	≥25
<b>Tempo di preparazione</b>	<5 min		≥60 min
<b>Uso di solventi organici / Apparecchiature</b>	NO		Sì

**In combinazione con il fatto della non necessità di impiego di solventi organici e qualsiasi strumentazione, è ovvio che questo protocollo costituisce uno strumento prezioso nell'analisi dei campioni di yogurt**



# Analisi di campioni di formaggio



## Metodo Pepsina

### Preparazione

2.5g di campione di formaggio    25ml soluzione di Pepsina



Tutta la notte / 42°C

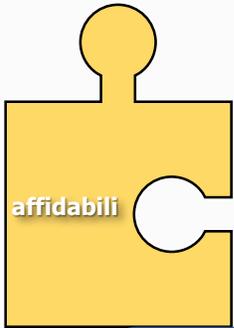


- Fattore di diluizione: 20
  - LOQ: 100ppt
- Numero migliore

### Test ELISA



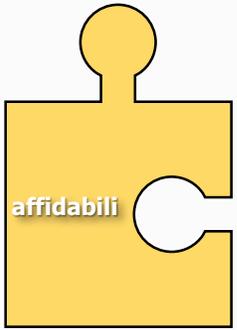
# Recovery di campioni di formaggio



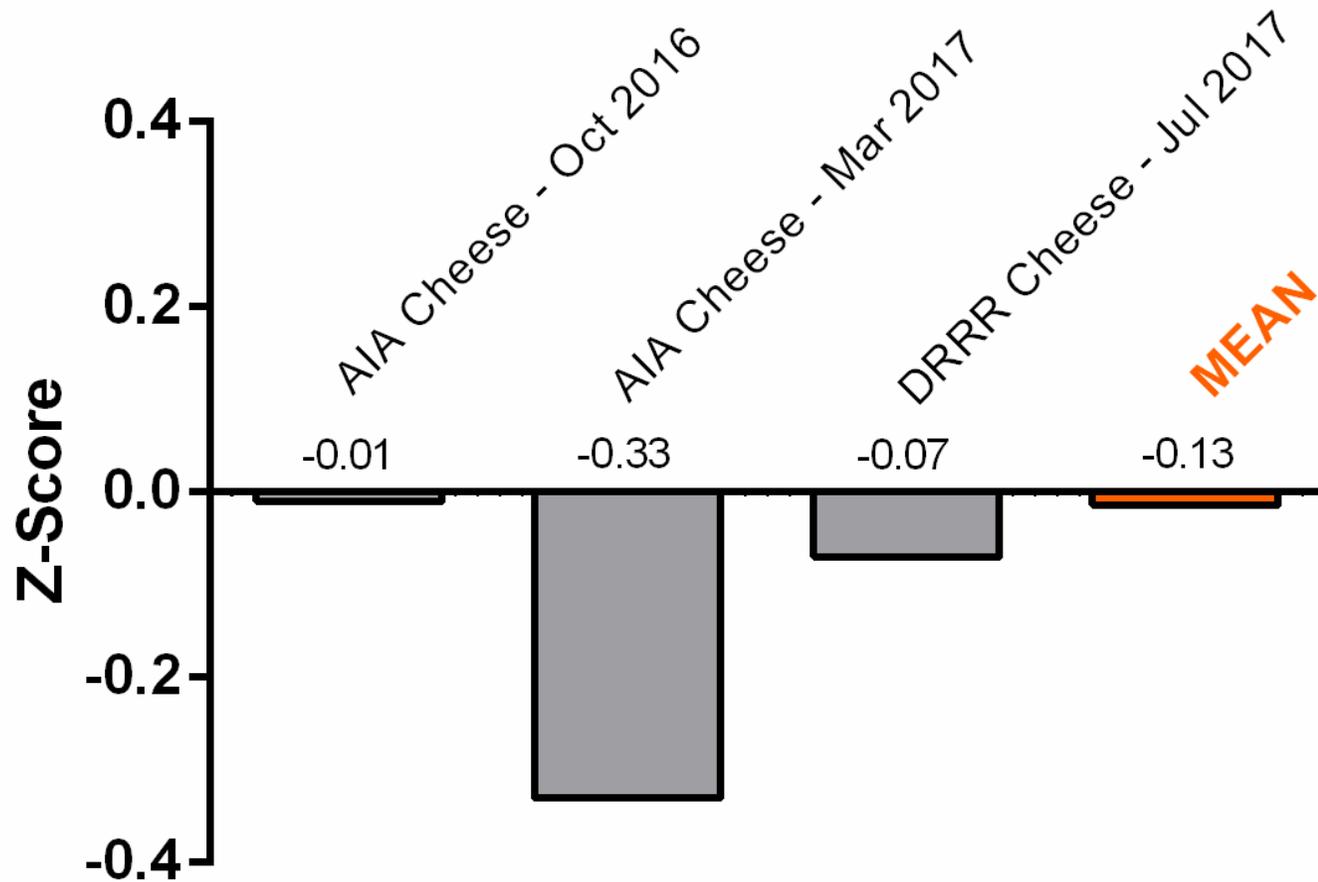
Guardiamo ora il recovery per campioni di formaggio spiked

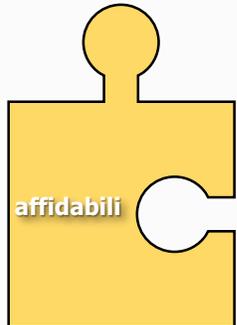
(c) spikati con aflatossina M1 in tre livelli: 250, 500 e 750ppt

		Numero di Lotti Diversi Usati	Recovery Media	CV
Formaggio a pasta dura	8	3	97.98%	9.08%
Formaggio a pasta semidura	8	3	92.13%	6.37%
Formaggio a pasta molle	8	3	96.58%	7.03%
<b>Media</b>			<b>95.56%</b>	7.49%



# Ring Tests

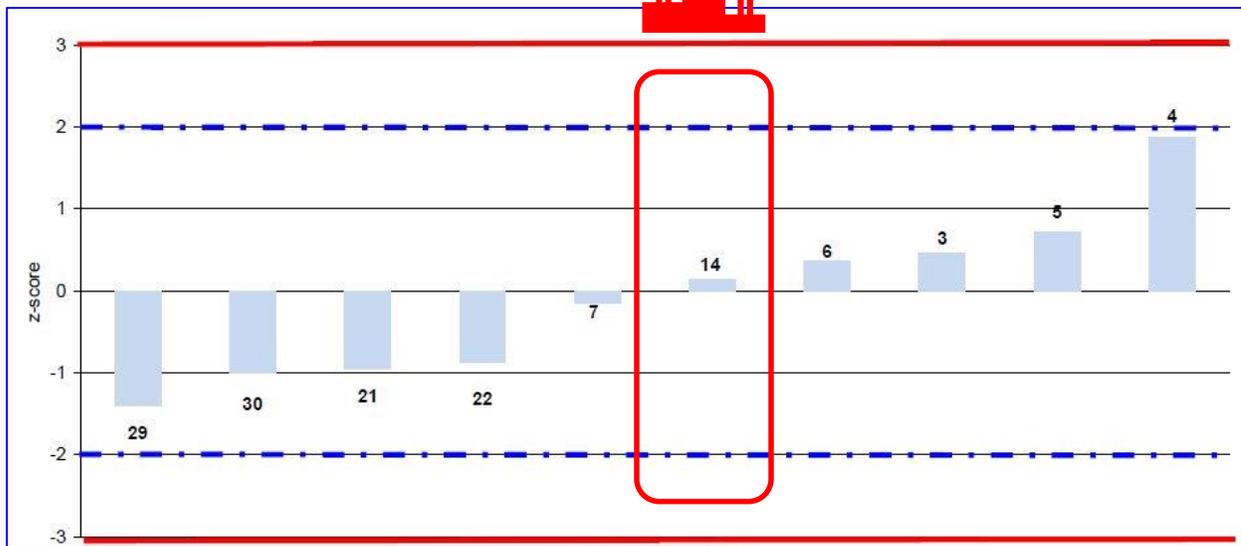




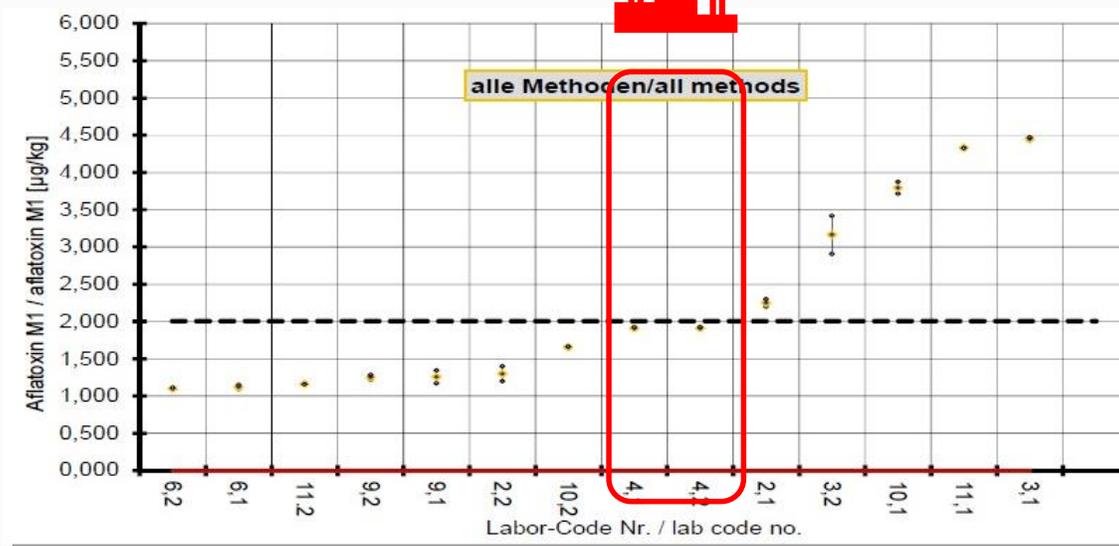
# Ring Tests



In questi casi, abbiamo ottenuto il risultato migliore



A.I.A. Ring Test Lotto RTF M1 251016  
Aflatossina M1 nel Formaggio Ottobre 2016



DRRR Proficiency Test RVEP 170073 Aflatoxin  
M1 in Processed Cheese 18.07.2017



# Prodotti per l'analisi di micotossine in grani, cereali e ingredienti per l'alimentazione animale



## Bio-Shield B1 ES

Test	Valore assegnato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Z-score
FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 04319 Multi Mycotoxins in Maize August - September 2017	4.69	5.12	0.4

## Bio-Shield Total ES

Test	Valore Asegnato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Z-score
BIPEA 31b 154 Mycotoxins - Cereals - Bran - 02-3631 - April 2017	28.0	21.5	-0.90

## Bio-Shield ZON

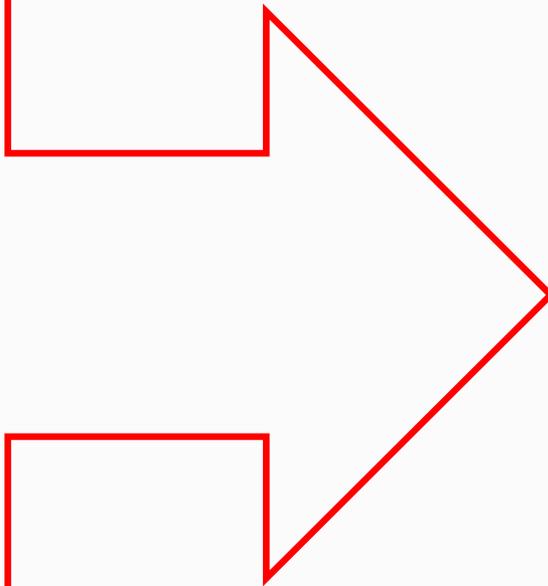
Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 04319 Multi Mycotoxins in Maize August - September 2017	107	109.69	0.1

## Bio-Shield Fumonisin

Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
BIPEA 31c 9 Mycotoxins - Baby Food - 09 - 3931 - June 2017	87	105	0.77

## Bio-Shield T-2/HT-2

Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
BIPEA 31b 155 Mycotoxins - Ground Rye Sample 01 - 5131 June 2017	163	181	0.42



~~Metanolo 70%~~



**Buffer  
ecocompatibile**

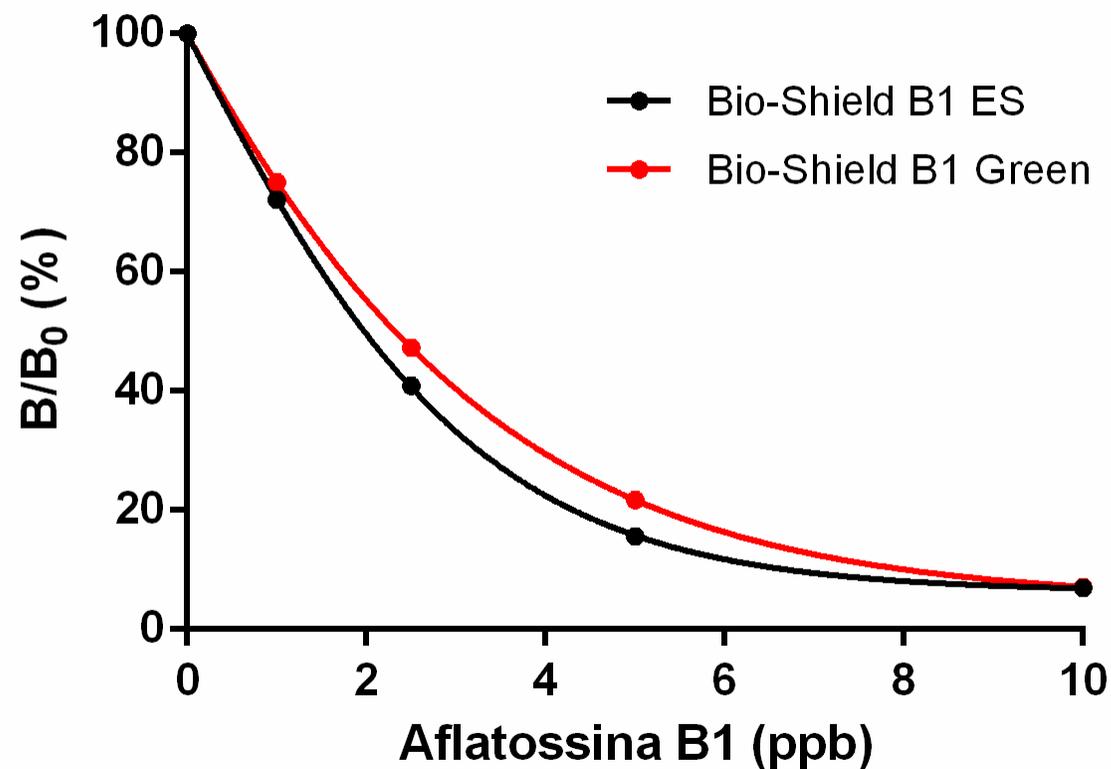


# ELISA per l'Aflatossina B1



 <b>BIO-SHIELD</b>	<b>B1 Extra Sensitive (ES)</b>	<b>B1 Green</b>
	Sono immunoenzimatici competitivi	
Tempo di saggio	20min (10-5-5min)	
Intervallo	0-10ppb	
LOD	0.2ppb	0.25ppb
LOQ	0.5ppb	0.6ppb
IC <sub>50</sub>	1.1 - 4.2ppb	1.3 - 4.9ppb
Recovery	98.1%	102.2%

### ELISA per Aflatossina B1



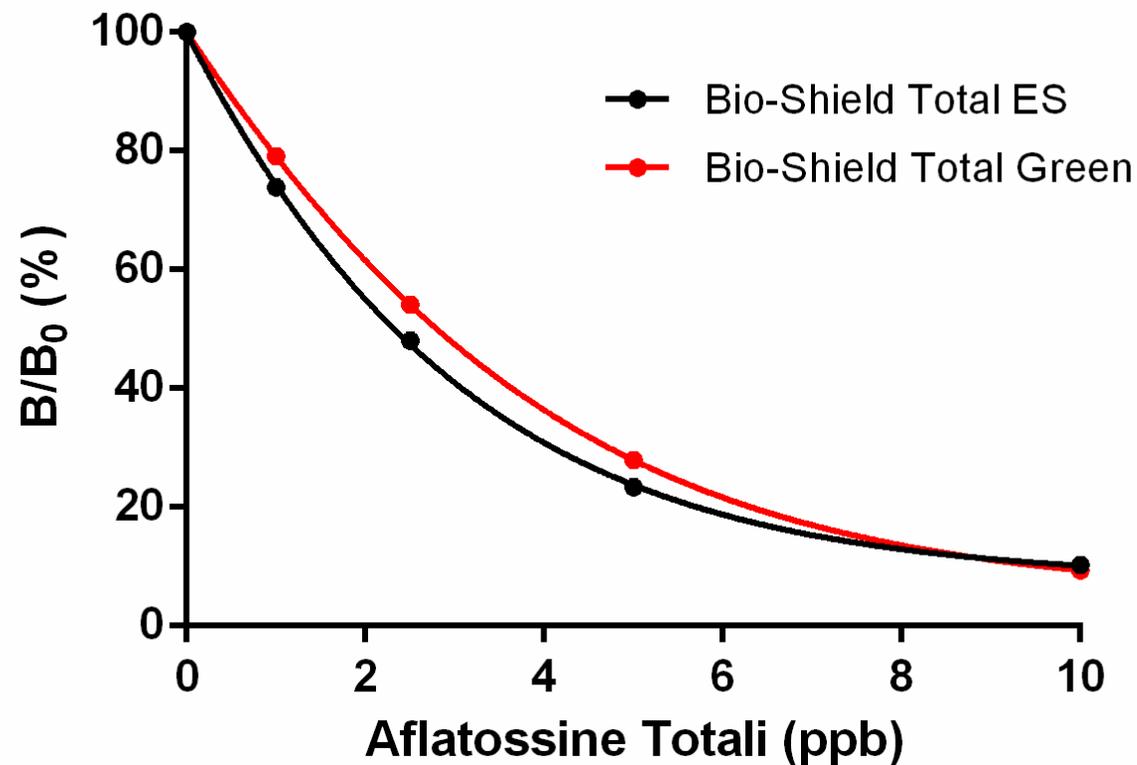


# ELISA per l'Aflatossine totali



 <b>BIO-SHIELD</b>	<b>Total Extra Sensitive (ES)</b>	<b>Total Green</b>
	Sono immunoenzimatici competitivi	
Tempo di saggio	20min (10-5-5min)	
Intervallo	0-10ppb	
LOD	0.2ppb	0.25ppb
LOQ	0.6ppb	0.7ppb
IC <sub>50</sub>	1.1 - 4.3ppb	1.3 - 5.1ppb
Recovery	98.7%	101.2%

### ELISA per Aflatossine Totali



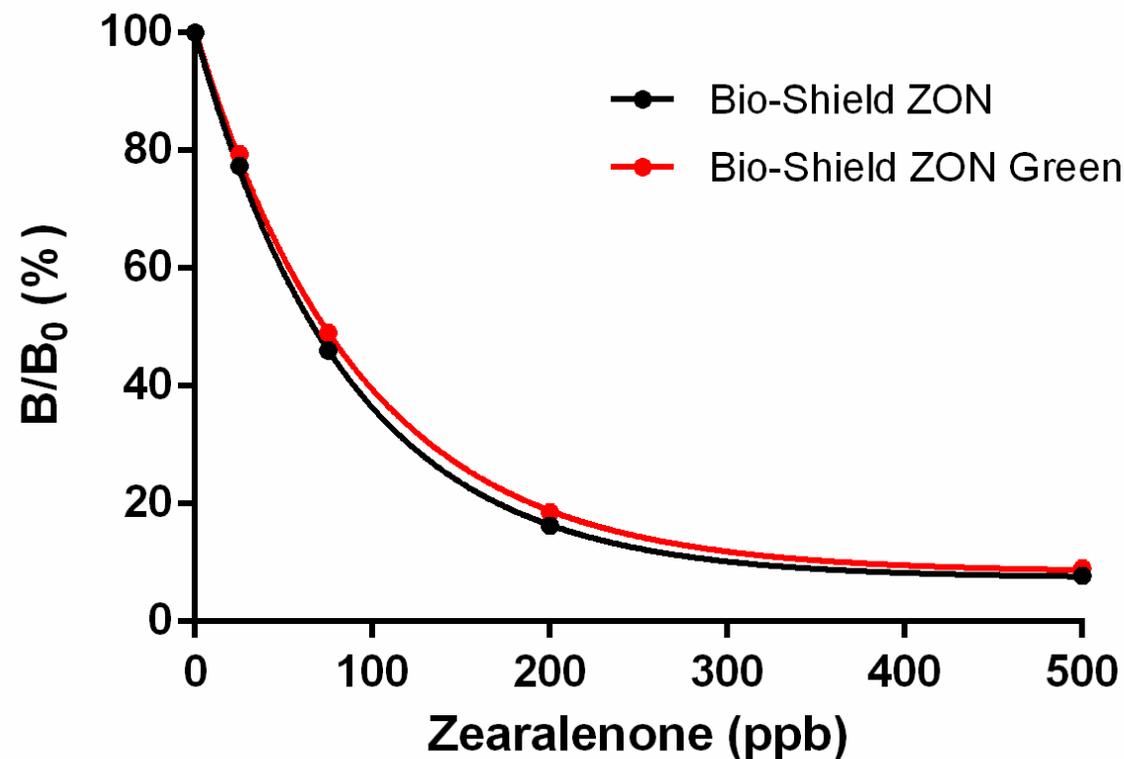


# ELISA per la Zearalenone



 <b>BIO-SHIELD</b>	<b>ZON</b>	<b>ZON Green</b>
	Sono immunoenzimatici competitivi	
Tempo di saggio	15min (10-5min)	20min (10-5-5min)
Intervallo	0-500ppb	
LOD	5ppb	5.5ppb
LOQ	7.5ppb	8.2ppb
IC <sub>50</sub>	20 - 100ppb	22 - 110ppb
Recovery	99.9%	96.4%

## ELISA per Zearalenone



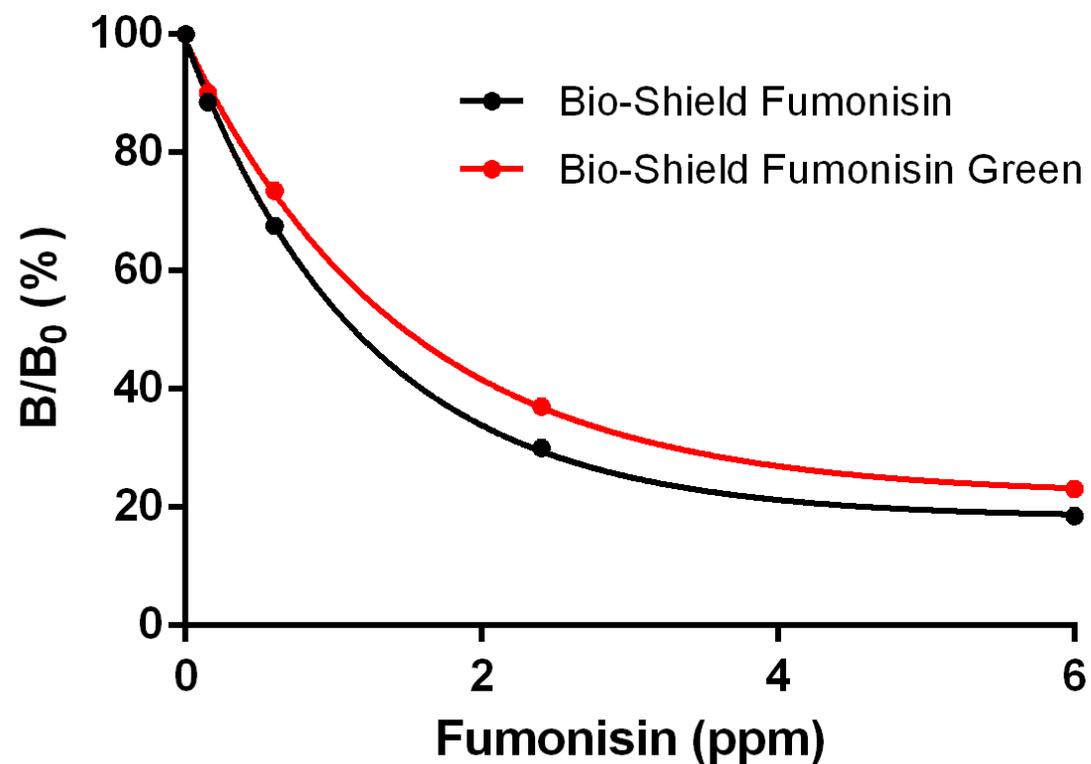


# ELISA per la Fumonisina



 <b>BIO-SHIELD</b>	<b>Fumonisin</b>	<b>Fumonisin Green</b>
	Sono immunoenzimatici competitivi	
Tempo di saggio	15min (10-5min)	15min (10-5min)
Intervallo	0-6ppm	
LOD	0.05ppm	5.5ppb
LOQ	0.1ppm	8.2ppb
IC <sub>50</sub>	0.36 - 1.43ppm	0.47 - 1.86ppm
Recovery	105%	117%

### ELISA per Fumonisina

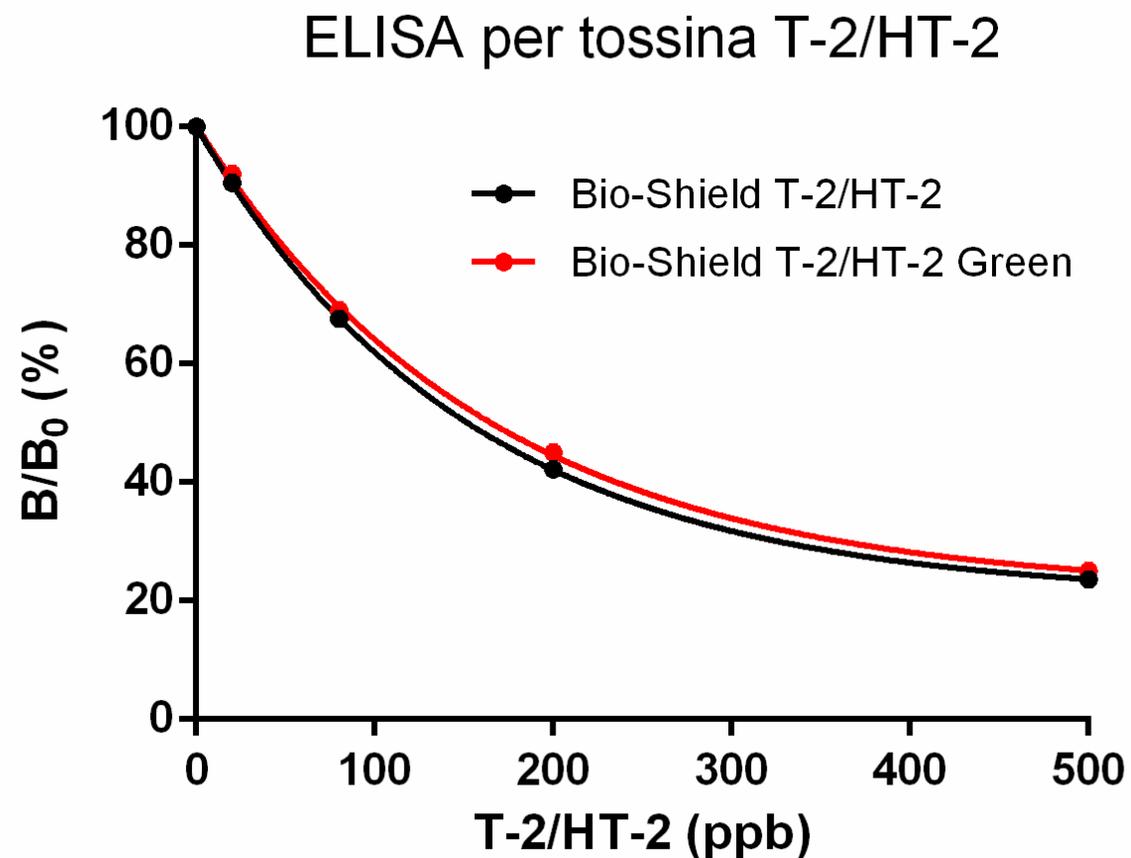




# ELISA per le tossine T-2/HT-2



 <b>BIO-SHIELD</b>	<b>T-2/HT-2</b>	<b>T-2/HT-2 Green</b>
	Sono immunoenzimatici competitivi	
Tempo di saggio	15min (10-5min)	30min (20-5-5min)
Intervallo	0-500ppb	
LOD	5ppb	5.5ppb
LOQ	10ppb	11ppb
IC <sub>50</sub>	40 - 160ppb	45 - 180ppb
Recovery	96.4%	84%





# Prodotti per l'analisi di micotossine in grani, cereali e ingredienti per l'alimentazione animale



## Bio-Shield B1 ES

Test	Valore assegnato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Z-score
FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 04319 Multi Mycotoxins in Maize August - September 2017	4.69	5.12	0.4

## Bio-Shield Total ES

Test	Valore Asegnato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Z-score
BIPEA 31b 154 Mycotoxins - Cereals - Bran - 02-3631 - April 2017	28.0	21.5	-0.90

## Bio-Shield ZON

Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 04319 Multi Mycotoxins in Maize August - September 2017	107	109.69	0.1

## Bio-Shield Fumonisin

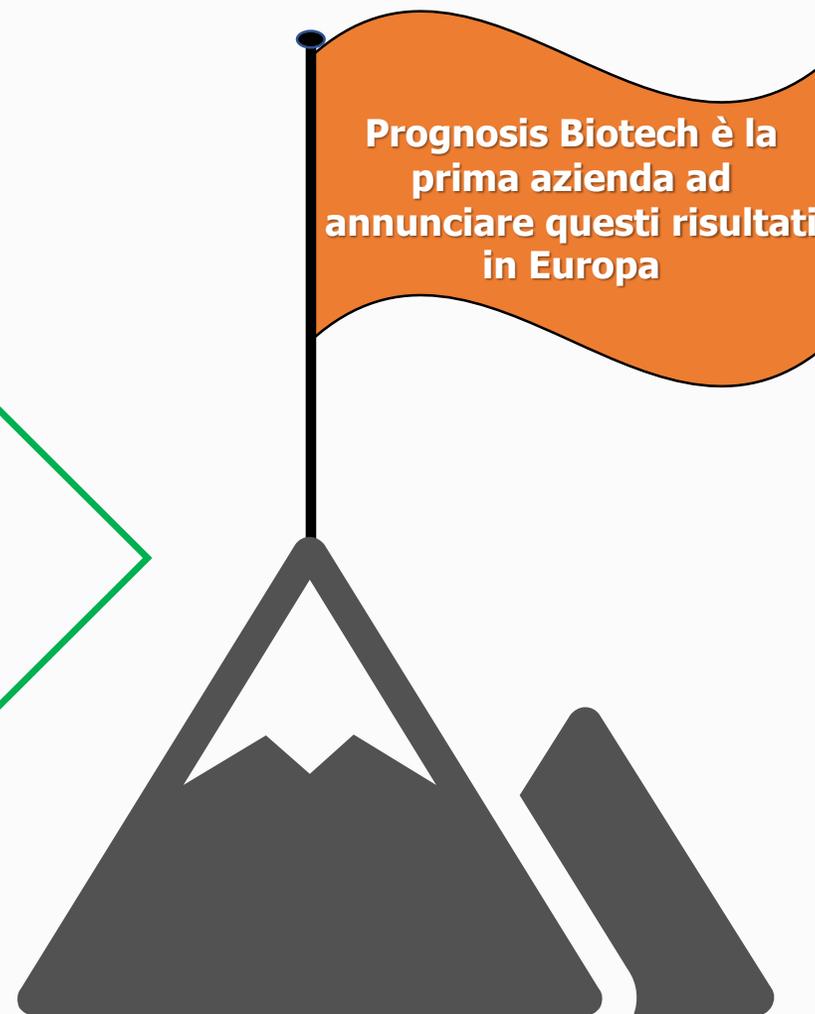
Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
BIPEA 31c 9 Mycotoxins - Baby Food - 09 - 3931 - June 2017	87	105	0.77

## Bio-Shield T-2/HT-2

Test	Valore assegnato(µg/kg)	Risultato(µg/kg)	Z-score
BIPEA 31b 155 Mycotoxins - Ground Rye Sample 01 - 5131 June 2017	163	181	0.42

**Bio-Shield Green**

Prognosis Biotech è la prima azienda ad annunciare questi risultati in Europa



Grazie mille per l'attenzione



Dipartimento di Ricerca  
e Sviluppo (ELISA Team)

