



SEMINARIO

AIA Laboratori e 19° ARAL SATA

Nuove tecnologie analitiche e strumenti innovativi al servizio della consulenza

24-25 GENNAIO 2017

Nuovi approcci nella preparazione del campione per la quantificazione di Aflatossina M1 nei derivati del latte

G. Papageorgiou, Ch. Tsaridou, K. Badra, Ch. Chatzoglou, N. Natsaridis, A.N. Ntantasios and **S.D. Athanasiou**

Dipartimento di Ricerca e Sviluppo



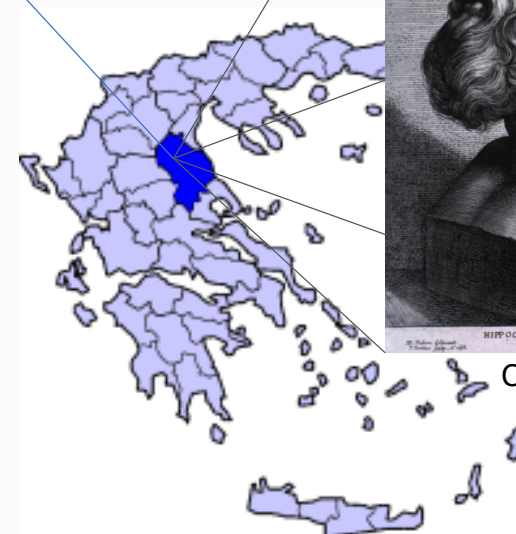


PROGNOSIS
BIOTECH

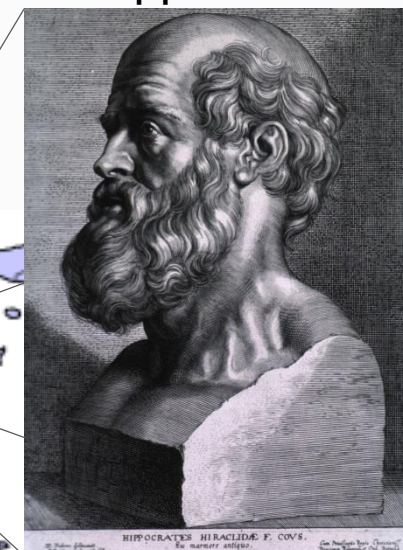


- un'azienda biotecnologica innovativa, situata nella Grecia centrale, nella città di Larissa
- specializzata nello sviluppo di diagnostica in vitro per la Sicurezza Alimentare ma anche nella fabbricazione e nel marketing di prodotti diagnostici e di laboratorio

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
- Progettiamo i nostri processi in modo che i nostri prodotti siano **affidabili, facili da usare e rispettino l'ambiente**
- 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
- Adulterazione del latte





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

100µl/pozzetto di standard e campioni

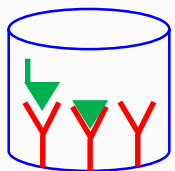


Incubazione 45min



4 lavaggi

100µl/pozzetto di Soluzione di Rilevazione



Incubazione 15min



4 lavaggi

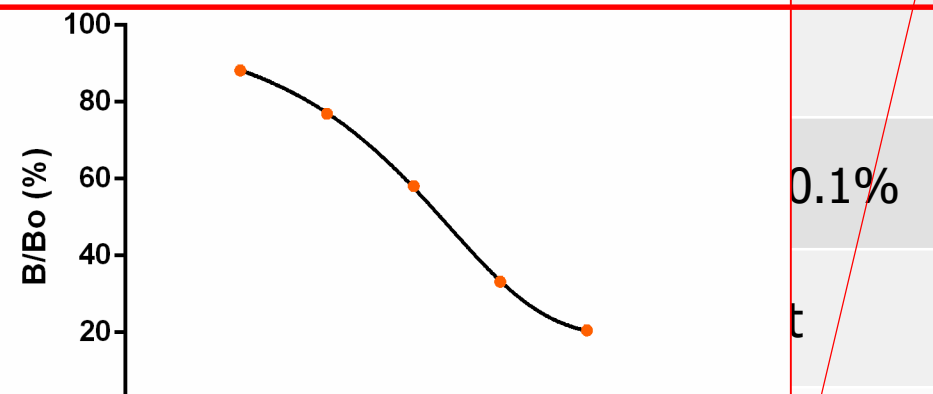
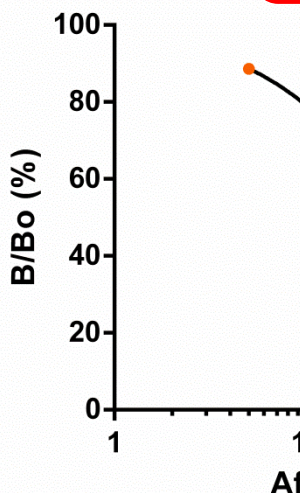
100µl/pozzetto del Substrato TMB

Incubazione 15min



100µl/pozzetto di Soluzione di Stop

BIO-SHIELD	M1 Extra Sensitive (ES)	M1 Baby Food (BF)
	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
		0.1%



Cosa possiamo dire dei parametri di precisione?



Parametri di Precisione

Oltre ai fattori ben noti, ci sono anche altri fattori nascosti che compongono il metodo



Motore



L'effetto matrice dipende dalle proprietà dell'anticorpo come

- il legante specifico
- l' orientamento
- la conformazione

Ingranaggi

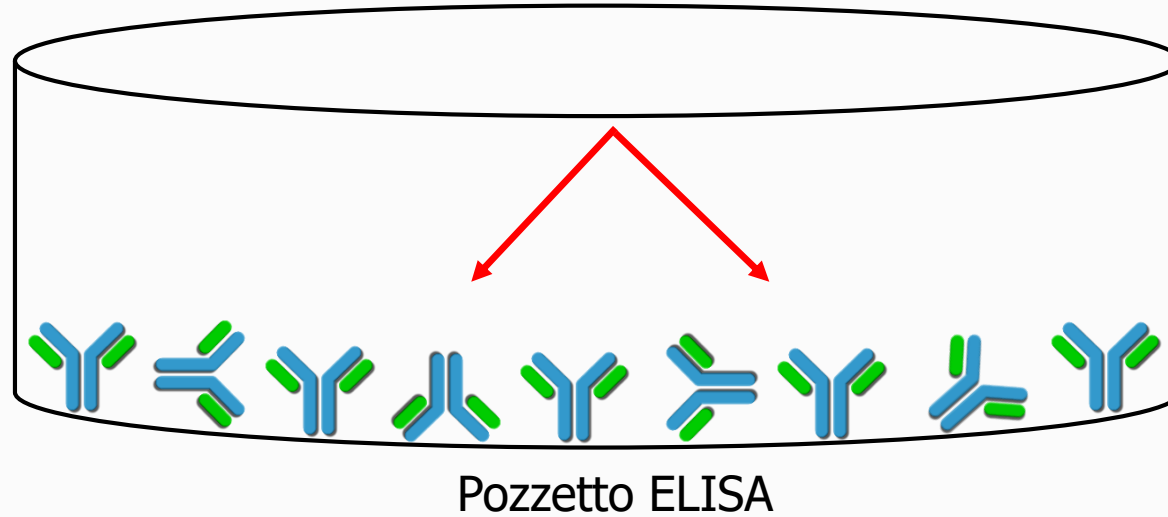


L'orientamento dell'anticorpo



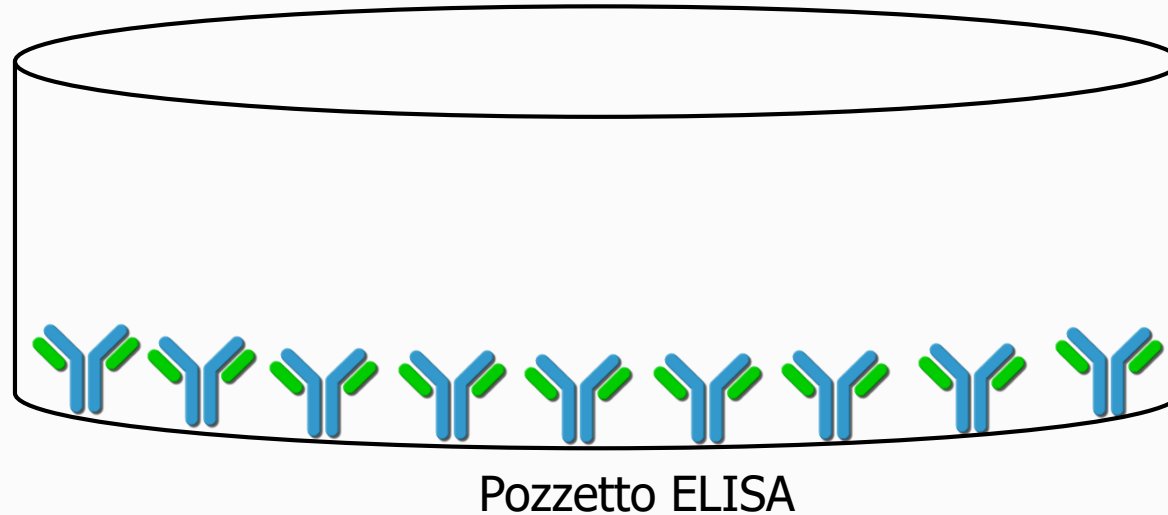
Un effetto matrice il più basso possibile

Coating tradizionale



- Gli anticorpi hanno tutti un orientamento casuale, mentre la maggior parte rimane inattiva

Coating "manipolato"



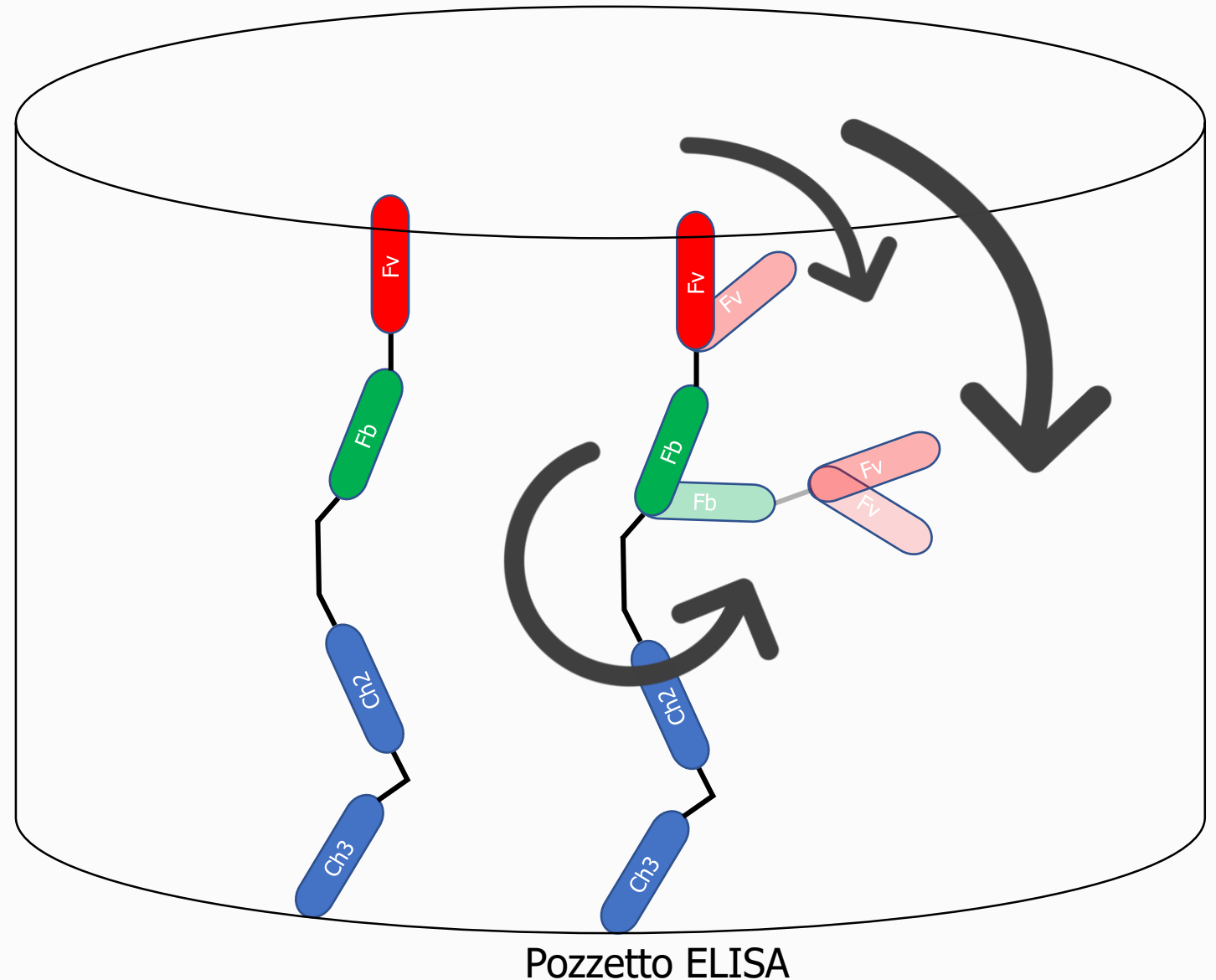
- Gli anticorpi possono avere, un'attività legante ottimale



La conformazione dell'anticorpo

In più, è importante che gli anticorpi abbiano una conformazione particolare. Questo può avvenire grazie all'utilizzo di uno specifico stabilizzante per coating che

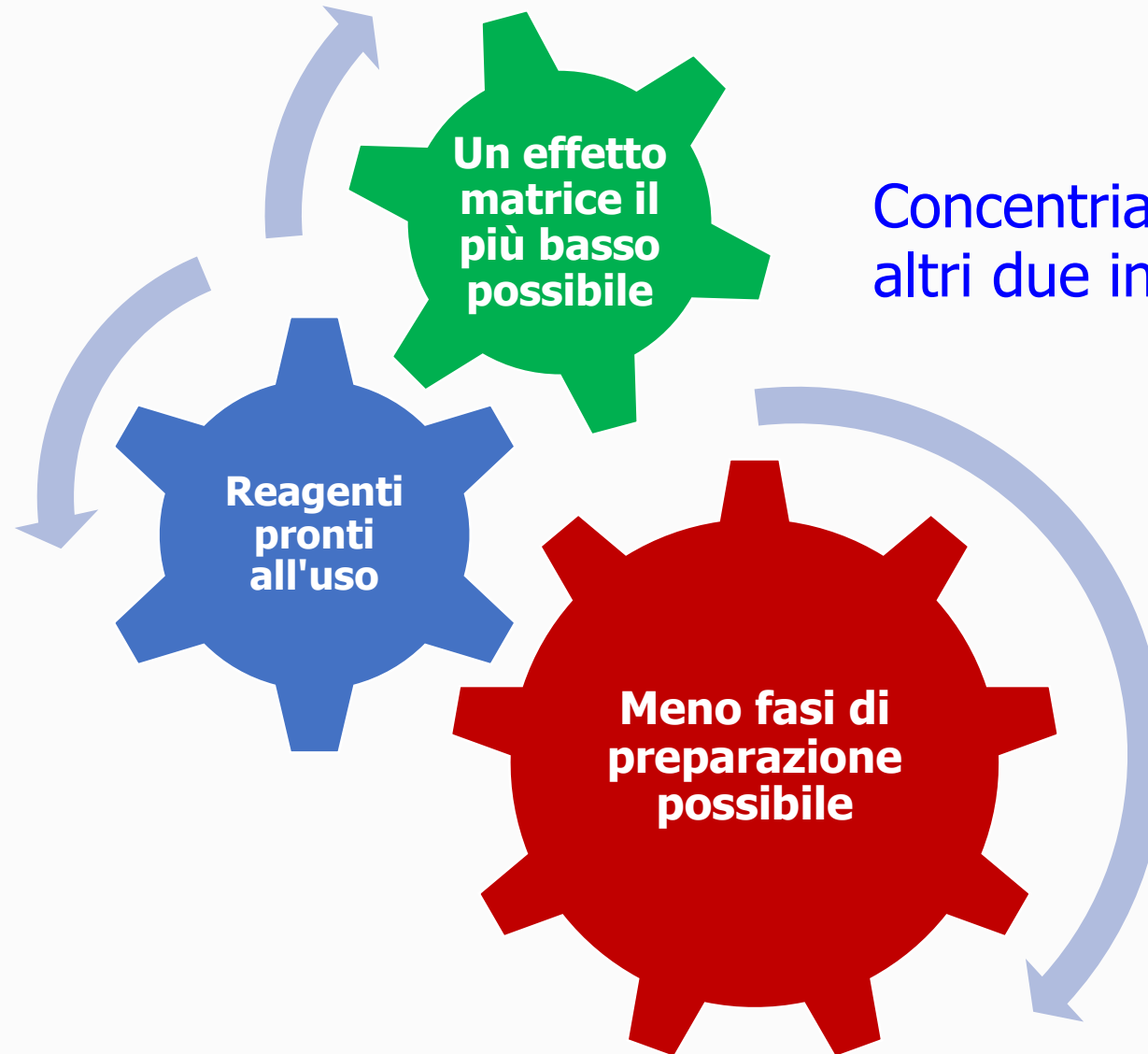
1. Ristabilisce la corretta conformazione degli anticorpi presenti
2. Mantiene la corretta conformazione durante lo stoccaggio del kit





Parametri di Precisione

Tutti i reagenti dei nostri metodi sono pronti all'uso



Concentriamoci quindi sugli altri due ingranaggi



Analisi dello yogurt



Meno fasi di preparazione possibile

Metodo Prognosis per yogurt

Preparazione

Metodo tradizionale

1g di yogurt

0.5ml di H₂O

1.5ml di Buffer

Vortex



100µl

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

Ovviamente avevamo pensato anche di miscelare il buffer con l'acqua per ottenere una soluzione pronta all'uso, ma ci siamo prima posti il problema di un'elevata diluizione nel caso dello yogurt da bere

Test ELISA

- Fattore di diluizione: 3
- LOQ: 15ppt

- Fattore di diluizione: 5
- LOQ: 25ppt

Riposo 5min

Incubazione 15min

Legittimazione

10min



Analisi dello yogurt da bere



Preparazione

Metodo Prognosis per yogurt da bere

Metodo tradizionale

La cosa più importante però è che non usiamo il metanolo

5ml di Metanolo

1g di yogurt da bere

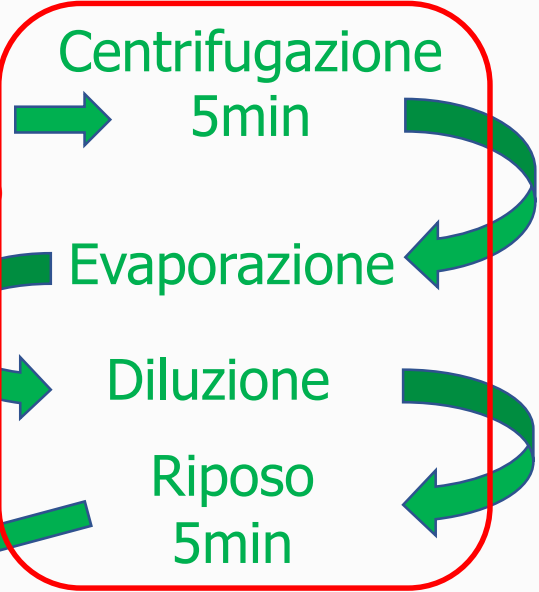
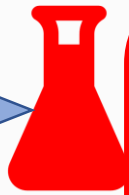
1ml di Buffer

Vortex



100µl

In entrambi i due casi, rispetto ai metodi tradizionali, evitiamo il processo di centrifugazione, quello di evaporazione ed il tempo di riposo della soluzione finale



Test ELISA

- Fattore di diluizione: 2
- LOQ: 15ppt

- Fattore di diluizione: 5
- LOQ: 25ppt



Recovery di campioni di Yogurt e Yogurt da bere

E per quanto riguarda la recovery dei campioni spikati?

	Campioni Testati per Lotto (n)	Numero di Lotti Diversi Usati	Recovery Media	CV	
Yogurt negativi (bianchi) spikati 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%
	Media			98.31%	
Yogurt da bere negativi (bianchi) spikati con Aflatossina M1 in tre livelli: 50, 100 e 150ppt	Ayran			108.34%	3.15%
	Kefir			105.46%	5.46%
	Media			106.90%	

Come si può notare, sono entrambi risultati eccellenti



Un effetto matrice il più basso possibile



Riassunto campioni di Yogurt e Yogurt da bere

	Metodo Prognosis per Yogurt	Metodo Prognosis per Yogurt da Bere	Metodo tradizionale
Recovery	98.31%	106.90%	60-90%
Fattore di diluizione	3	2	≥5
LOQ Test ELISA	15	10	≥25
Tempo di preparazione	<5 min		≥60 min
Uso di solventi organici / Apparecchiature	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 DCM

Preparazione

Metodo Pepsina

2g di campione di formaggio 0.5ml di DCM

2.5g di campione di formaggio 25ml soluzione di Pepsina

30min / 25°C



Tutta la notte / 42°C

- 0.5ml MetOH
- 0.5ml H₂O
- 2ml Esano

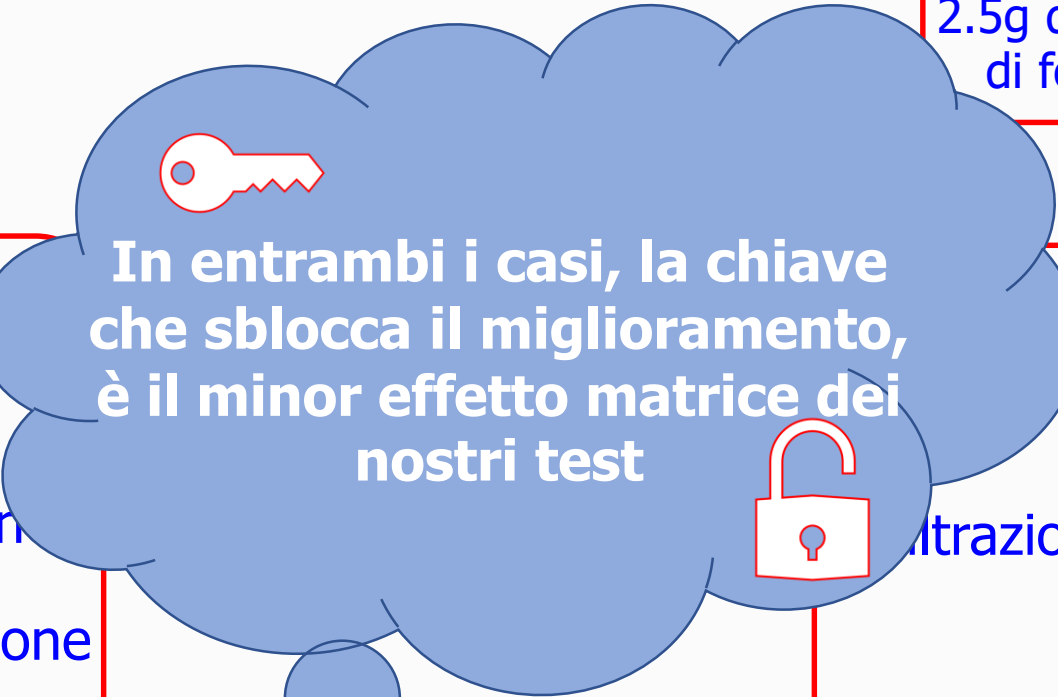
Centrifugazione 10min

Evaporazione

Centrifugazione 10min

Diluizione

- Fattore di diluizione: 10
- LOQ: 50ppt



Centrifugazione

Concentrazione

Diluizione

Test ELISA

- Fattore di diluizione: 20
- LOQ: 100ppt

Numero migliore

Un effetto matrice il più basso possibile

Recovery di campioni di formaggio



Guardiamo ora la recovery per campioni di formaggio spikati

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

Campione	Campioni Testati per Lotto (n)	Numero di Lotti Diversi Usati	Metodo DCM – LOQ: 50ppt		Metodo Pepsina – LOQ: 100ppt	
			Recovery Media	CV	È più facile e dà, comunque risultati eccellenti	
Formaggio a pasta dura	8	3	96.77%	6.64%	97.98%	9.08%
Formaggio a pasta semidura	8	3	86.83%	4.79%	92.13%	6.37%
Formaggio a pasta molle	8	3	98.71%	9.17%	96.58%	7.03%
Media			94.10%	6.87%	95.56%	7.49%

Ring Test

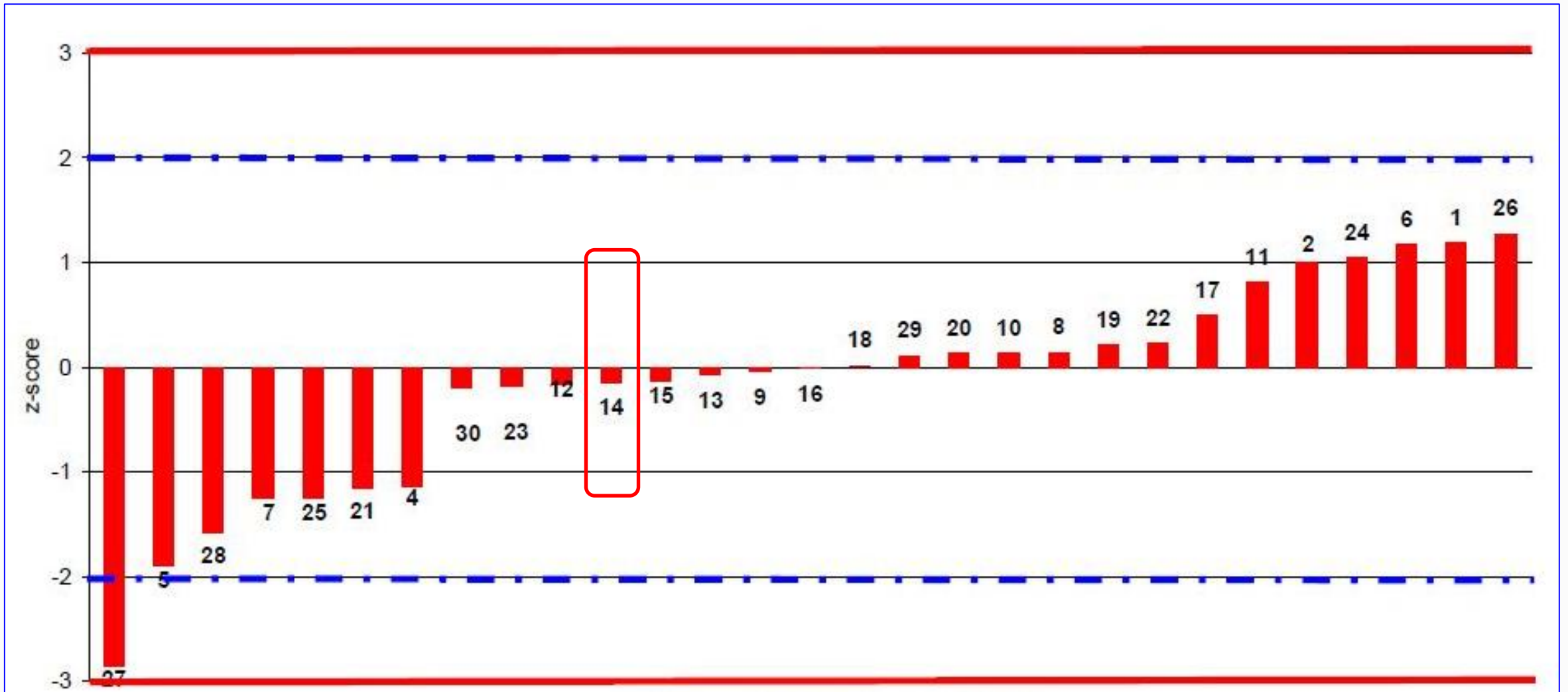
Test	Numero di Laboratorio	Valori Assegnati (ng/kg)	CV
A.I.A. Ring Test Lotto RTF M1 251016	14	331.13	5
Aflatossina M1 nel Formaggio Ottobre 2016		36.26	14

Da notare inoltre che, in entrambi i casi il CV è praticamente lo stesso nonostante il diverso fattore di diluizione



Ring Test

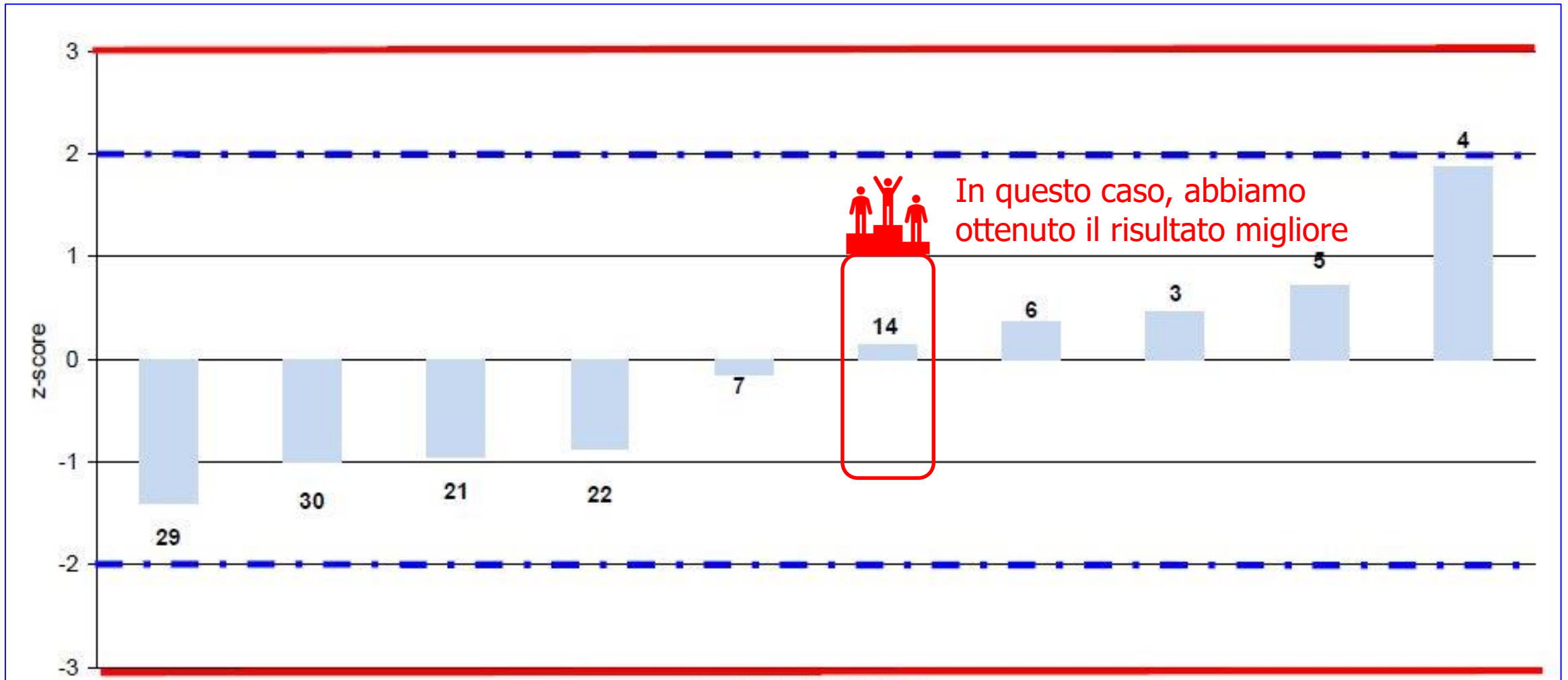
Formaggio 1





Ring Test

Formaggio 2





Recovery di campioni di latte

Un effetto matrice il più basso possibile

Il basso effetto matrice è stato inoltre confermato dalla recovery di campioni di latte spikati

Campioni (n) spikati con aflatossina M1 in tre livelli: 25, 50 e 75ppt				
Campione	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%	
Media		98.92%		

Il risultato più degno di nota 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

Test	Num Labo			
A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 270916 Aflatoxin M1 in Lyophilized Milk Settembre 2016	70	20.27	19.31	0.013
		33.10	32.79	
		50.25	51.66	



Un effetto matrice il più basso possibile

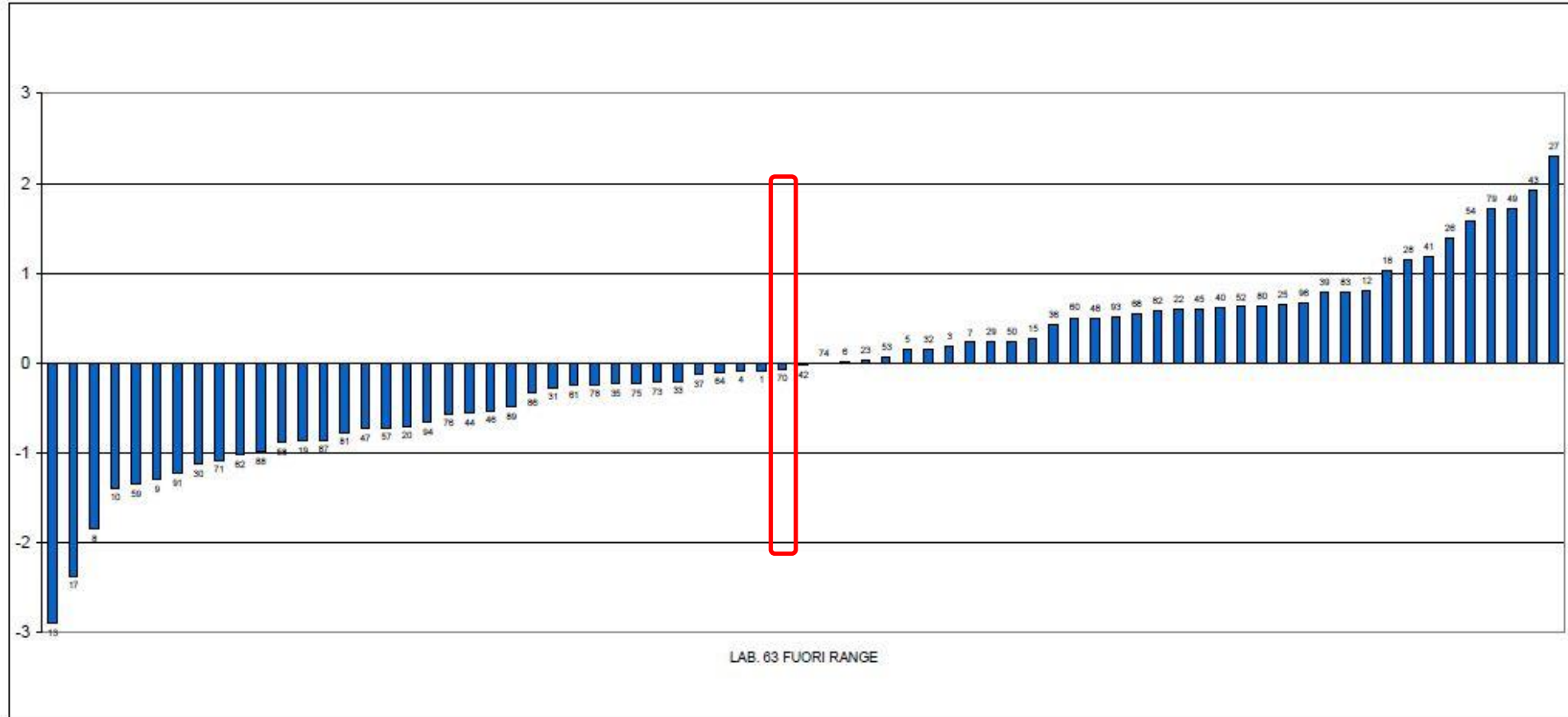
Ring Test



RING TEST
AFATOSSINA M1
SETTEMBRE '16

Z SCORE - ELISA

Z-SCORE LABORATORI



LAB. 63 FUORI RANGE

FREQUENZE % CLASSI Z-SCORE ELISA



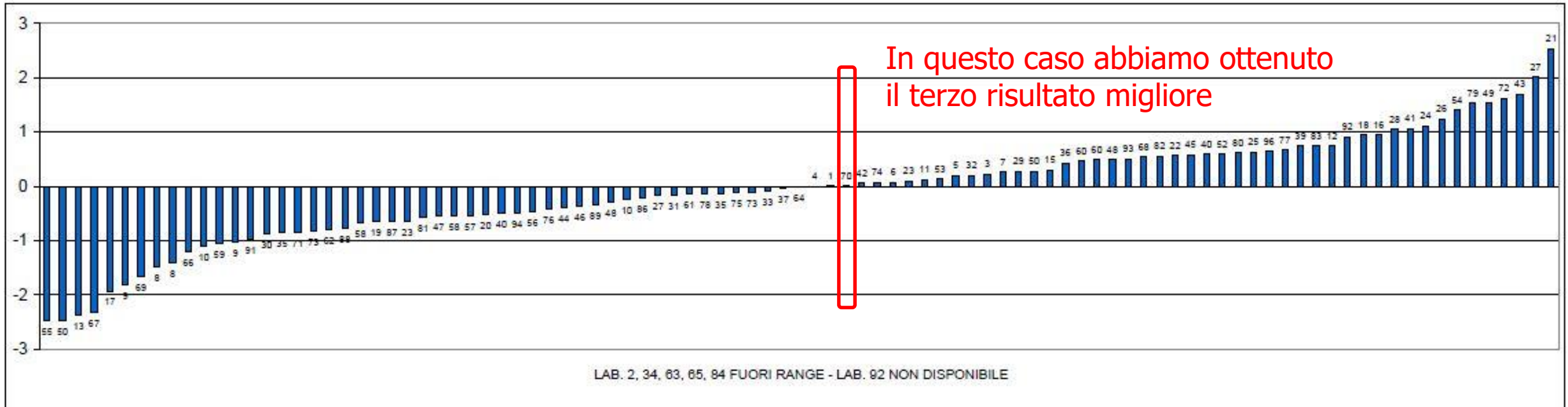
Ring Test



RING TEST
AFLATOSSINA M1
SETTEMBRE '16

Z SCORE - ELISA ED HPLC

Z-SCORE LABORATORI





Recovery di campioni di latte in polvere



In conclusione passo a mostrarvi i valori di recovery per campioni di latte in polvere FAPAS e VERITAS

		Campioni Testati per Lotto (n)	Numero di Lotti Diversi Usati	Recovery Media	CV
FAPAS Reference Material Milk Powder TET025RM	10.30ng/kg	8	3	96.01%	4.07%
VERITAS MI1460-1/CM Progetto Trieste 2014, II round mycotoxin 2014	40.67ng/kg	8	3	102.13%	5.28%
Media				99.07%	

Questi risultati concordano con i risultati ottenuti nei Ring Test FAPAS

Ring Test

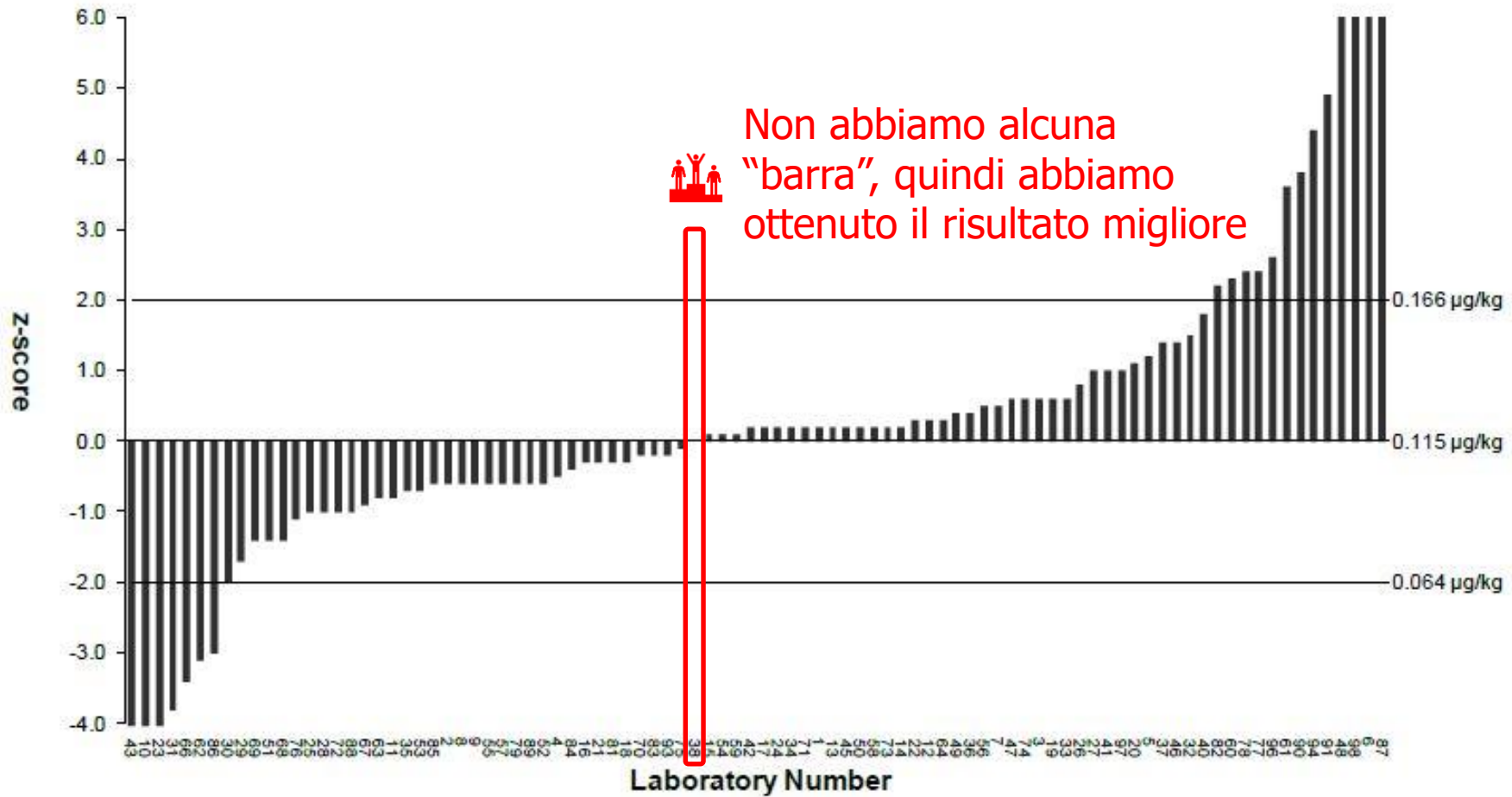
Test	Numero di Laboratorio	Valori Assegnati (ng/kg)	Risultati (ng/kg)	Z-score
FAPAS Proficiency Test 04217 Aflatoxin M1 in Milk Powder Mag-Giu 2013	38	115	114	0.0
FAPAS Proficiency Test 04259 Aflatoxin M1 in Milk Powder Mag-Giu 2015	23	102	93	-0.4



Ring Test 2013



FAPAS® Report 04217

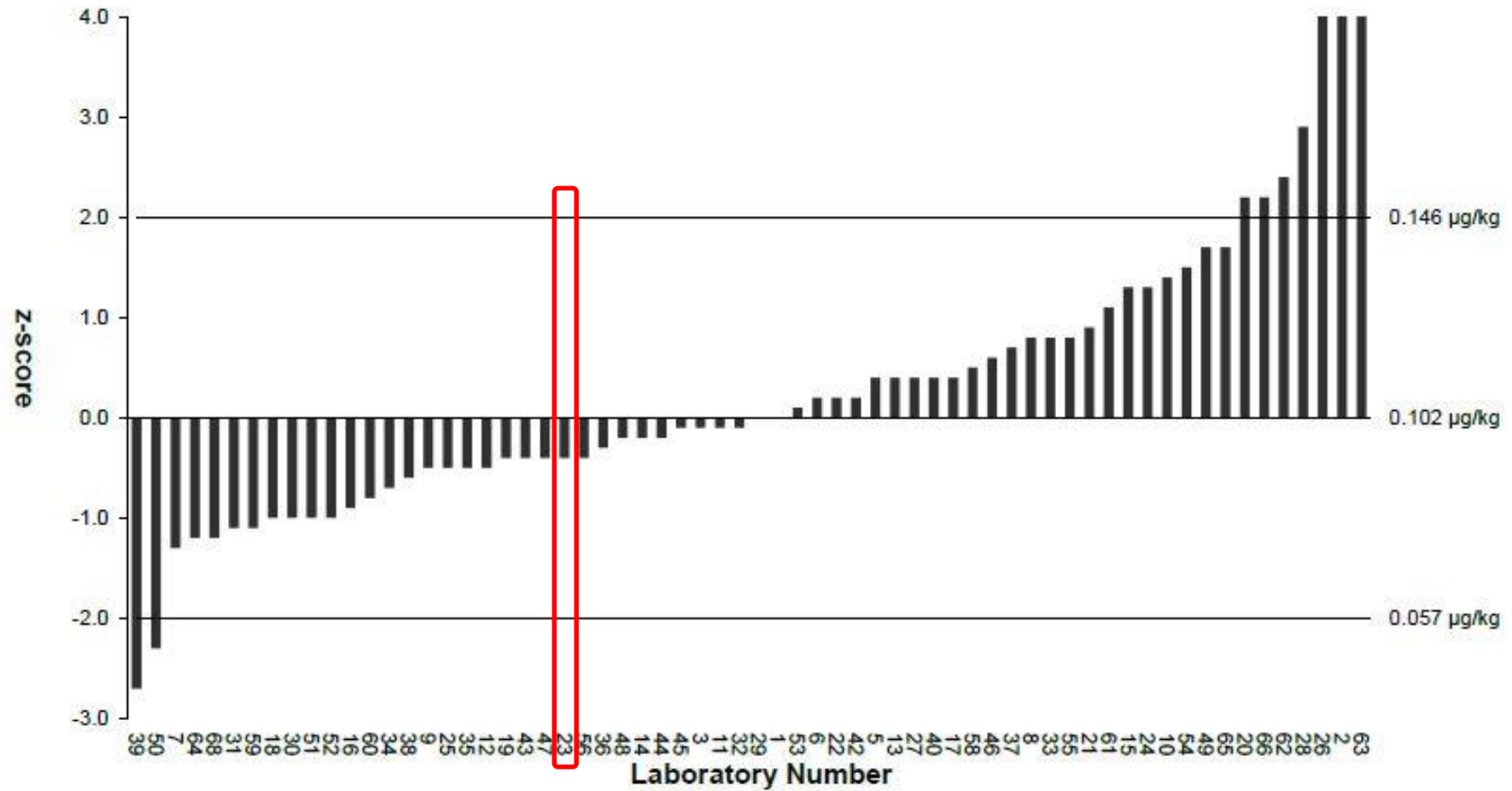




Ring Test 2015



FAPAS® Report 04259



Grazie mille per l'attenzione



Dipartimento di Ricerca
e Sviluppo (ELISA Team)

