

CARLO BRERA*, FRANCESCA DEBEGNACH*, BARBARA DE SANTIS*,
ELENA PANNUNZI*, CLARA BERDINI*, ELISABETTA PRANTERA*,
MARINA MIRAGLIA*

Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali

I. INTRODUZIONE

I composti chimici noti con il nome di micotossine sono sostanze ad azione tossica prodotte, in particolari condizioni ambientali, da numerose specie di funghi filamentosi microscopici (Krogh, 1987; Smith, 1998; CAST, 2003).

A causa dell'elevata diffusione e tossicità delle micotossine, del numero crescente di derrate alimentari riconosciuto passibile di contaminazione, dell'impatto sanitario, economico, commerciale ed etico di questi tossici, le Autorità competenti di molti paesi attualmente considerano il problema delle micotossine fra le priorità in tema di sicurezza alimentare.

Da un punto di vista normativo, i limiti massimi ammissibili per le principali micotossine nei prodotti alimentari sono riportati, a livello comunitario, nel Regolamento CE/1881/2006 e per le sole fusariotossine nel più recente Regolamento CE/1126/2007.

Per quanto riguarda la valutazione del livello di tossina nei prodotti alimentari, ciascuna fase della sequenza analitica è affetta da un errore sperimentale che non è equamente ripartito tra i diversi passaggi (campionamento, preparazione del campione e analisi quantitativa).

A causa della distribuzione della contaminazione delle micotossine fortemente eterogenea nelle derrate alimentari, il campionamento rappresenta una fonte di errore molto rilevante. Pertanto, la individuazione di piani di campionamento adeguati allo scopo rappresenta il punto di partenza per ottenere dati analitici affidabili (Miraglia, 2008; Whitaker, 2006).

La preparazione del campione rappresenta un passaggio a volte fortemente

* *Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità*

sottostimato nella valutazione dell'errore totale dell'analisi, e un non adeguato trattamento del campione può portare a scarsa ripetibilità ed esattezza nelle analisi. L'errore associato alla preparazione del campione è fortemente correlato alla granulometria del campione dopo la macinazione, che a sua volta dipende dal grado di omogeneità che si ottiene. Infatti, la varianza associata alla preparazione del campione è strettamente dipendente dalle dimensioni delle unità particellari costituenti il campione macinato. Pertanto, per ridurre la varianza o si diminuiscono quanto più possibile le dimensioni delle particelle nella fase di macinazione (granulometria fine), aumentando di conseguenza il numero di particelle per unità di massa, o si aumenta la grandezza del campione da destinare all'analisi.

L'analisi quantitativa delle micotossine, e di conseguenza la sua ottimizzazione, rappresenta a sua volta una fase cruciale dell'intero processo volto alla determinazione della contaminazione presente nei prodotti alimentari. La scelta del metodo più indicato per lo scopo prefissato (*fit for purpose*) costituisce il primo elemento da valutare per una corretta quantificazione. La disponibilità di metodi ufficiali cui fare riferimento, corredati di informazioni statistiche e parametri in grado di permettere la valutazione delle *performance* del metodo stesso, è di fondamentale importanza. I criteri di rendimento (*performance*) che un metodo deve avere per garantire la necessaria affidabilità sono indicati nel Regolamento CE/401/2006, insieme con i metodi di campionamento da adottare per il controllo ufficiale.

Il controllo sulla intera filiera produttiva impone l'analisi delle micotossine in punti diversi della lavorazione e spesso sono operatori privi di una adeguata formazione a dover eseguire analisi per la valutazione della merce. Diventa quindi molto importante affiancare metodologie robuste ma complesse, come la determinazione in HPLC, con metodi rapidi e di più semplice gestione (*user friendly*), che permettano anche il coinvolgimento di personale non altamente qualificato.

Attualmente, a livello comunitario, i metodi di riferimento validati disponibili sono quelli pubblicati sotto forma di norme o *standard* dal Comité Européen de Normalisation (CEN). Attualmente tutti i metodi CEN disponibili per la determinazione delle micotossine sono metodi di analisi in HPLC.

Manca la disponibilità, a livello comunitario, di studi di validazione su metodi immunoenzimatici quantitativi (kit ELISA) che possano rappresentare una valida alternativa alle metodiche tradizionali purché si dimostrino sufficientemente sensibili, precisi, accurati, selettivi e robusti.

Il progetto interregionale MICOCER (MICOtossine dei CEReali), Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni ce-

realicole nazionali, nasce con lo scopo, tra gli altri, di fornire un quadro complessivo del livello di contaminazione da micotossine nel mais e nei frumenti attraverso l'acquisizione di informazioni diffuse, comparabili e rappresentative delle diverse condizioni di coltivazione. Pertanto, al fine di garantire la affidabilità dei risultati provenienti dalle analisi dei laboratori coinvolti nello studio di monitoraggio, si è resa necessaria la condizione di valutare preventivamente l'efficienza del metodo e dei laboratori coinvolti, attraverso l'organizzazione di studi interlaboratorio di validazione. Dato l'elevato numero di campioni previsto dal progetto nello studio di monitoraggio è stato scelto di utilizzare per le analisi metodi di *screening* immunoenzimatici.

La validazione di un metodo è il processo utilizzato per confermare che la procedura analitica impiegata per uno specifico test risponda a requisiti di qualità in un campo di concentrazione precedentemente individuato, per un determinato analita e per talune matrici. I risultati ottenuti dal processo di validazione sono utilizzati per giudicare la qualità, l'attendibilità e la consistenza dei risultati analitici ottenuti (ISO 17025:2005).

Durante l'intero periodo di svolgimento delle attività del progetto sono stati organizzati tre studi di validazione interlaboratorio, uno per la determinazione delle fumonisine (FBs) in campioni di mais e due per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero.

2. STUDIO INTERLABORATORIO PER LA VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO (DON) IN CAMPIONI DI GRANO TENERO (2006/2007 E 2008/2009)

Nel corso del progetto MICOCER sono stati organizzati due studi di validazione per la determinazione del deossinivalenolo in campioni di grano tenero con lo scopo di valutare l'efficienza del metodo e dei laboratori direttamente coinvolti nelle analisi di monitoraggio previste in seno al progetto. Il primo studio collaborativo è stato organizzato nel periodo 2006/2007.

I laboratori che hanno partecipato al primo studio (in numero di 10) sono stati gli stessi partecipanti al progetto.

Il primo studio di validazione ha fornito risultati soddisfacenti in termini di *performance* anche se il basso numero di laboratori partecipanti non ha permesso di considerare lo studio conclusivo dal punto di vista della validazione. Allo scopo di verificare e sostanziare i risultati ottenuti durante il primo studio interlaboratorio è stato organizzato un secondo studio interlaboratorio in chiusura di progetto (2008/2009). Tale studio ha previsto anche il coinvolgimento di laboratori, pubblici e privati, esterni al progetto.

Nella intera progettazione e organizzazione degli studi si è fatto riferimento alle linee guida dell'AOAC (AOAC International, 2002).

2.1 *Laboratori partecipanti (2006/2007)*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott.ssa Marzia Cattaneo
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott. Roberto Comitti
R-Biopharm Italia S.r.l. – Cerro al Lambro (MI)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE), Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagirone (CT)
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVITER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)
- Dott.ssa Valeria Terzi
CRA-Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale (GPC), Fiorenzuola d'Arda (PC)
- Dott. Alberto Verderio
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari
- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza

2.2 *Laboratori partecipanti (2008/2009)*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott. Nicola Berardo
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo

- Dott.ssa Annamaria Colombo
Molini Valente Nova S.p.a. – Felizzano (AL)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE),
Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagi-
rone (CT)
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari
- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza
- Dott. Luca Plizzari
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle
varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott. Bernhard Reck
R-Biopharm AG – Darmstadt-Germany
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVI-
TER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)
- Dott.ssa Elisabetta Silvestrini
pH S.r.l. – Tavarnelle Val di Pesa (FI)
- Dott.ssa Valeria Terzi
CRA-Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vege-
tale (GPC), Fiorenzuola d'Arda (PC)

2.3 *Materiali*

I livelli di contaminazione dei materiali sono stati opportunamente scelti sulla base della normativa comunitaria vigente (Regolamento CE/1226/2007) al fine sia di ottenere una informazione congrua con i livelli di contaminazione presumibilmente riscontrabili nelle produzioni cerealicole oggetto dello studio, sia di valutare l'efficienza dei laboratori in un intervallo di concentrazioni comprendente i limiti di legge.

Per la determinazione del DON, su ciascuno dei materiali da fornire ai laboratori, è stato utilizzato un metodo HPLC validato con rivelazione UV.

Al fine di imputare lo scostamento dal valore di riferimento dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al solo errore di analisi e non alla disomogeneità del livello di contaminazione nei campioni, si è reso necessario con-

durre, preliminarmente all'invio dei campioni e per ciascun materiale, sia uno studio di omogeneità, che uno studio di stabilità dell'analita.

Studio di omogeneità. Per testare l'omogeneità di ciascun materiale sono state effettuate due serie di analisi da 10 campioni, prelevati in due differenti giornate. È stata valutata sia la omogeneità tra i campioni (*between samples*) formanti il *batch* da inviare ai partecipanti, che quella all'interno dei campioni contenuti in sacchetti (*within samples*). I risultati ottenuti sono stati valutati con il test ANOVA, secondo i criteri previsti dalle linee guida dell'AOAC.

I test di omogeneità per lo studio 2006/2007 sono stati condotti su 4 materiali; sul materiale non contaminato (Materiale 2) sono state effettuate solo le ripetizioni di analisi per verificare che la contaminazione fosse effettivamente minore del limite di quantificazione (LQ). In tabella 1 sono riportati i valori di contaminazione da DON nei 5 materiali utilizzati nello studio.

I test di omogeneità per lo studio 2008/2009 sono stati condotti su 6 materiali, di cui quattro naturalmente contaminati e due materiali di riferimento. In tabella 2 sono riportati i valori di contaminazione da DON nei 6 materiali utilizzati nello studio.

Studio di stabilità. Prima dell'invio ai partecipanti sono state poi analizzate due serie da 10 campioni prelevati a distanza di 2 mesi da ciascun materiale. Inoltre, dopo il ricevimento dei risultati da parte dei partecipanti è stata effettuata una terza serie di analisi sul materiale residuo di ogni livello di concen-

| MATERIALE | LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DON ($\mu\text{g/kg}$) |
|-------------|--|
| Materiale 1 | 1820 |
| Materiale 2 | < LQ |
| Materiale 3 | 161 |
| Materiale 4 | 813 |
| Materiale 5 | 1514 |

Tab. 1 *Livelli di contaminazione da DON nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2006/2007)*

| MATERIALE | LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DON ($\mu\text{g/kg}$) |
|-------------|--|
| Materiale 1 | < LQ |
| Materiale 2 | 191 |
| Materiale 3 | 2934 |
| Materiale 4 | 800 |
| Materiale 5 | 1062 |
| Materiale 6 | 1323 |

Tab. 2 *Livelli di contaminazione da DON nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2008/2009)*

trazione per verificare la stabilità alla conclusione dello studio. Anche in questo caso il test ANOVA ha confermato la stabilità dei materiali utilizzati.

Per ogni materiale i partecipanti hanno condotto le analisi in doppio cieco (*blind duplicate*).

2.4 Principio del metodo

Oltre ai materiali ogni laboratorio partecipante ha ricevuto un protocollo di lavoro riportante le istruzioni da seguire scrupolosamente e senza deviazioni e le schede da compilare relative alla ricezione dei materiali e alla trascrizione dei risultati ottenuti. Il protocollo di analisi con il saggio immunoenzimatico quantitativo è stato fornito direttamente dalla R-Biopharm Rhône Ltd, che ha fornito anche i kit.

Come precedentemente indicato, il metodo da sottoporre a validazione è stato un metodo immunoenzimatico competitivo (RIDASCREEN® DON).

Il metodo allegato al kit, riportato nelle istruzioni inviate ai partecipanti, indica di estrarre con 25 mL di acqua 5.0 g di campione macinato agitando per 3 minuti. Il campione viene filtrato su filtro Whatman No. 1. Per ogni pozzetto si impiegano 50 µL di estratto.

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono coattati con anticorpi di cattura diretti contro anticorpi anti-deossinivalenolo. Vi si aggiungono gli standard o i campioni, il coniugato deossinivalenolo-enzima e gli anticorpi anti-deossinivalenolo. Il DON libero e quello coniugato competono per i siti di legame degli anticorpi (immunodosaggio enzimatico competitivo). Contemporaneamente gli anticorpi anti-DON vengono immobilizzati dagli anticorpi di cattura. L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato/cromogeno nei pozzetti, l'enzima coniugato legato converte il cromogeno di colore rossastro in un pozzetto azzurro. L'aggiunta di un reagente-stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. L'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di DON nel campione.

2.5 Risultati e discussioni

Prima dell'analisi statistica sui risultati ricevuti dai laboratori partecipanti sono stati individuati ed eliminati gli eventuali valori anomali o *outliers*. L'eliminazione degli *outliers* è un processo iterativo che si arresta, e la ripetibilità e riproducibilità vengono calcolate sui laboratori restanti, se vengono eliminati più di 2/9 dei partecipanti o se nessun partecipante viene eliminato. Sono

stati utilizzati due test per l'eliminazione degli *outliers*, il *test di Cochran* (misura della variabilità intra-laboratorio) e il *test di Grubbs* (misura della variabilità inter-laboratorio).

I parametri del metodo ottenuti per lo studio interlaboratorio 2006/2007 sono riportati nella tabella 3, quelli relativi allo studio 2008/2009 sono riportati in tabella 4.

Al fine di una più chiara lettura della tabella si fa presente che i valori riportati nelle caselle ombreggiate sono quelli che presentano un valore maggiore del valore limite indicato nel Regolamento CE/401/2006 e riportato a fianco delle tabelle.

Confrontando il valore di riferimento ottenuto in HPLC con il valore assegnato, ottenuto come mediana dei risultati dei partecipanti, si può notare che il metodo immunoenzimatico tende a sovrastimare il dato ottenuto in HPLC. Per una migliore visualizzazione di questa tendenza si riporta anche il grafico dell'andamento del kit contro il valore di riferimento (figg. 1 e 2).

| PARAMETRI | DON (µg/kg) | | | | | | |
|--|-------------|------|------|------|------|-------------------|-----------|
| Materiale | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| Valore assegnato | 2243 | < LQ | 185 | 1008 | 1937 | | |
| Valore di riferimento | 1820 | < LQ | 161 | 813 | 1514 | | |
| Anno del test interlaboratorio | 2007 | | | | | | |
| Numero di laboratori | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | | |
| Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli <i>outliers</i> | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | | |
| Numero di <i>outliers</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | |
| Numero di risultati accettati | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | | |
| Numero di repliche | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | |
| Media, µg/kg | 2375 | < LQ | 183 | 981 | 2021 | | |
| Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg | 141 | – | 15 | 48 | 200 | > 100-≤ 500 ≥ 500 | |
| Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), % | 5.9 | – | 8.2 | 4.9 | 9.9 | | ≤ 20 ≤ 20 |
| Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg | 395 | – | 42 | 134 | 560 | | |
| Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg | 692 | – | 31 | 231 | 582 | ≤ 40 ≤ 40 | |
| Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), % | 29.1 | – | 16.9 | 23.5 | 28.8 | | |
| Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg | 1938 | – | 87 | 647 | 1630 | | |
| Recupero, % | 130 | – | 113 | 121 | 133 | 60-110 70-120 | |

Tab. 3 Performance di precisione – Determinazione del DON in campioni di grano (2006/2007)

| PARAMETRI | DON (µg/kg) | | | | | |
|--|-------------|------|------|------|------|------|
| Materiali | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Valori assegnati | < LOQ | 213 | 3299 | 1055 | 992 | 1572 |
| Valori di riferimento | < LOQ | 191 | 2934 | 800 | 1062 | 1323 |
| Anno del test interlaboratorio | 2008 | | | | | |
| Numero di laboratori | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli outliers | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Numero di outliers | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Numero di risultati accettati | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Numero di repliche | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Media, µg/kg | | 211 | 3380 | 1013 | 998 | 1540 |
| Deviazione standard di ripetibilità S _p , µg/kg | | 36 | 505 | 137 | 172 | 330 |
| Deviazione standard relativa di ripetibilità RSD _p , % | | 17.3 | 15.0 | 13.6 | 17.3 | 21.4 |
| Limite di ripetibilità r (r = 2,8*S _p), µg/kg | | 101 | 1414 | 384 | 482 | 924 |
| Deviazione standard di riproducibilità S _R , µg/kg | | 67 | 524 | 239 | 185 | 363 |
| Deviazione standard relativa di riproducibilità RSD _R , % | | 31.6 | 15.5 | 23.5 | 18.6 | 23.5 |
| Limite di riproducibilità R (R = 2,8*S _R), µg/kg | | 188 | 1467 | 669 | 518 | 1016 |
| Recupero, % | | 111 | 115 | 127 | 94 | 116 |

| | |
|-------------|--------|
| > 100-≤ 500 | > 500 |
| ≤ 20 | ≤ 20 |
| ≤ 40 | ≤ 40 |
| 60-110 | 70-120 |

Tab. 4 *Performance di precisione – Determinazione del DON in campioni di grano (2008/2009)*

Nelle figure la linea continua rappresenta la retta a 45°, la linea tratteggiata l'andamento del kit ELISA verso il dato HPLC. La pendenza delle rette mette in evidenza una sovrastima del kit rispetto ai valori di riferimento determinati in HPLC in entrambi gli studi di validazione organizzati.

Per quanto attiene la ripetibilità e la riproducibilità del metodo, è stato ottenuto, per lo studio di validazione del 2006/2007, per tutti e cinque i livelli di contaminazione, un pieno accordo con i parametri di riferimento fissati dal Regolamento CE/401/2006.

Nel secondo studio organizzato nel 2008/2009, la ripetibilità e la riproducibilità del metodo si sono confermate aderenti ai criteri indicati nel Regolamento, eccedendo leggermente i valori di ripetibilità riportati in un solo caso.

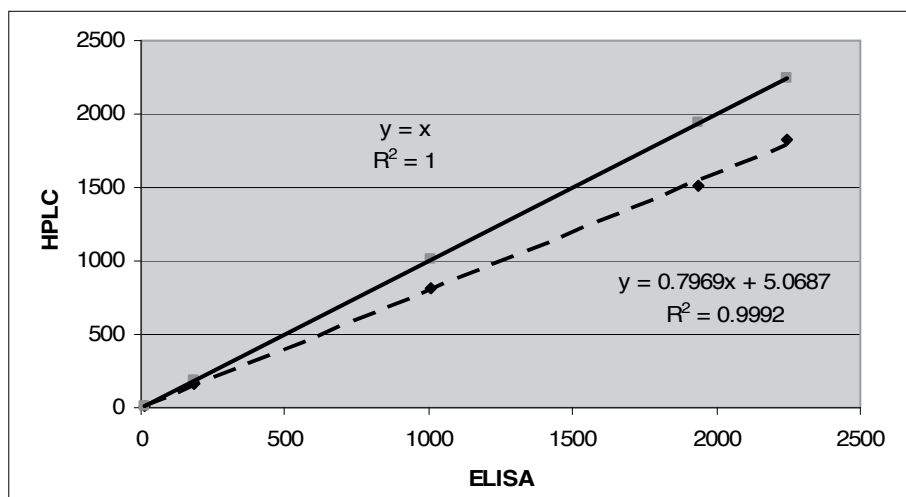


Fig. 1 Andamento del kit ELISA rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero (2006/2007)

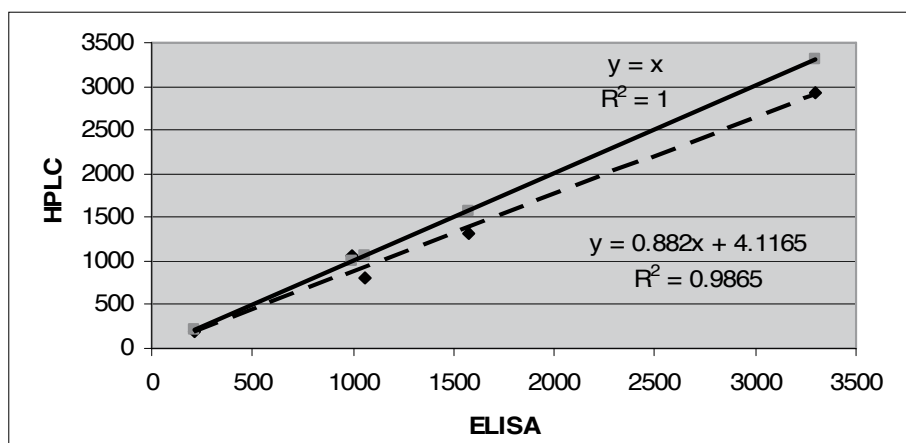


Fig. 2 Andamento del kit ELISA rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero (2008/2009)

Infine, i valori di recupero ottenuti dai laboratori hanno messo in evidenza una leggera sovrastima per tutti i livelli di contaminazione oggetto dello studio. Tale sovrastima è risultata maggiore dei criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE/401/2006 per tutti i livelli dello studio 2006/2007 e per due materiali nello studio 2008/2009.

2.6 Conclusioni

Durante la fase di progettazione del primo studio di validazione purtroppo non è stato possibile ampliare il numero dei laboratori partecipanti offrendo la possibilità a laboratori esterni al progetto di prendere parte allo studio. Il numero dei laboratori coinvolti pertanto è risultato essere basso ed eliminati gli *outliers* il numero dei partecipanti si è ridotto ulteriormente. Il numero dei risultati accettati è stato di sei, mentre il numero minimo dei laboratori indicato nelle linee guida dell'AOAC è di otto. Per questo motivo non è stato possibile riferirsi a questo studio collaborativo come a un vero e proprio studio di validazione, ciò nonostante i risultati ottenuti sono stati egualmente utilizzati per estrapolare informazioni utili al lavoro previsto nel progetto, in particolare si sono verificate le *performance* del metodo valutando l'affidabilità dei risultati forniti per il monitoraggio.

Al fine di poter verificare i buoni risultati ottenuti durante il primo studio interlaboratorio ne è stato organizzato un secondo ampliando il numero di partecipanti. L'analisi statistica dei dati ottenuti conferma le buone *performance* del metodo immunoenzimatico, che presenta, rispetto al dato di riferimento determinato in HPLC, solo una leggera sovrastima. È necessario comunque sottolineare che i parametri di riferimento del Regolamento CE/401/2006 si riferiscono a valori risultanti da studi interlaboratorio effettuati con metodi HPLC, che notoriamente presentano un più alto grado di precisione ed esattezza.

3. STUDIO INTERLABORATORIO PER LA VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELLE FUMONISINE B₁ E B₂ IN CAMPIONI DI MAIS (2007/2008)

Come il precedente studio sul DON, anche questo secondo studio interlaboratorio è stato finalizzato oltre che alla validazione di un metodo immunoenzimatico, anche alla valutazione della efficienza dei laboratori. Le indagini analitiche in questo caso hanno riguardato la determinazione delle fumonisine B₁ e B₂ in campioni di mais. Lo studio è stato organizzato nel periodo 2007/2008.

Tuttavia, poiché il numero di laboratori impiegati nello studio di monitoraggio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero si è dimostrato inferiore a quello riportato nelle linee guida dell'AOAC, in questo secondo studio, si è ampliato il numero dei partecipanti a laboratori esterni rivolgendosi sia al pubblico che a quello privato, cercando così di coinvolgere diverse realtà coinvolte nella analisi delle micotossine. Il requisito richiesto è stato una pregressa esperienza nell'analisi delle micotossine nei prodotti ali-

mentari, in particolare attraverso l'impiego di analisi immunoenzimatiche (kit ELISA). Allo studio di validazione hanno infine preso parte 14 laboratori.

Al fine di determinare una correlazione tra *performance* dei laboratori e validità del kit immunoenzimatico, lo studio è stato eseguito mediante l'impiego di due kit immunoenzimatici (kit A e kit B) forniti da due differenti produttori (R-Biopharm Rhône Ltd e Tecna S.r.l.). L'analisi statistica è stata effettuata per fornire indicazioni sulla verifica della efficienza del metodo, in particolare della precisione, attraverso la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità.

3.1 *Laboratori partecipanti*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott. Enrico Battisti
Molino Favero – Padova
- Dott. Nicola Berardo
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo
- Dott.ssa Laura Bertotto
Molino F.lli Peila – Valperga (TO)
- Dott. Alberto Biancardi
IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna “Bruno Umbertini” – Brescia
- Dott. Giancarlo Biancotto
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)
- Dott. Brandolini
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott.ssa Isabella Cavezzali
NDF-Gruma – Geggia (VE)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE), Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagirone (CT)
- Dott. Maurizio Paleologo
Tecna S.r.l. – Trieste
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari

- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza
- Dott. Bernhard Reck
R-Biopharm AG – Darmstadt-Germany
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVI-
TER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

3.2 Materiali

Sempre in accordo con quanto indicato nelle linee guida dell'AOAC sono stati preparati 5 materiali a diversi livelli di contaminazione. I materiali da 1 a 4 erano naturalmente contaminati, mentre il materiale 5 era un materiale di riferimento. Nella tabella 5 sono riportati i valori di contaminazione da fumonisine (FBs = $FB_1 + FB_2$) nei 5 materiali utilizzati nello studio.

Per ogni materiale le analisi sono state condotte, con entrambi i kit, in doppio cieco (*blind duplicate*); ogni partecipante ha quindi ricevuto 20 campioni/materiali per l'analisi delle fumonisine.

Studio di omogeneità. Per testare l'omogeneità di ogni materiale sono state analizzate due serie da 10 campioni prelevati in due differenti giornate. I risultati ottenuti sono stati valutati con il test ANOVA. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4; essendo il valore dell' α calcolato per tutti i materiali

| MATERIALE | LIVELLO DI CONTAMINAZIONE FBS ($\mu\text{g/kg}$) |
|-------------|--|
| Materiale 1 | 10558 |
| Materiale 2 | 862 |
| Materiale 3 | 27335 |
| Materiale 4 | 2723 |
| Materiale 5 | 3036 |

Tab. 5 Livelli di contaminazione da fumonisine (FBs = $FB_1 + FB_2$) nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2007/2008)

| MATERIALE | FBS ($\mu\text{g/kg}$) | α_{CRIT} | α_{CALC} |
|-------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Materiale 1 | 10558 | 0.05 | 0.47 |
| Materiale 2 | 862 | 0.05 | 0.49 |
| Materiale 3 | 27335 | 0.05 | 0.92 |
| Materiale 4 | 2723 | 0.05 | 0.31 |

Tab. 6 Risultati dello studio di omogeneità dei materiali impiegati nello studio interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

maggiore del valore dell' α critico, è stata rifiutata l'ipotesi di differenza tra le due serie di risultati, con conseguente conferma dell'omogeneità dei materiali. In tabella 6 sono indicati solo i risultati dei 4 materiali per i quali si è effettuato lo studio di omogeneità, omettendo, per ovvie ragioni, il materiale di riferimento. Per la determinazione delle fumonisine in ciascuno dei materiali da fornire ai laboratori, è stato utilizzato un metodo HPLC validato con rivelazione spettrofluorimetrica e derivatizzazione pre-colonna.

I livelli di riferimento dei materiali sono stati opportunamente scelti sulla base della normativa comunitaria vigente (Regolamento CE/1226/2007) al fine sia di ottenere una informazione congrua con i livelli di contaminazione presumibilmente riscontrabili nelle produzioni cerealicole oggetto dello studio sia di valutare l'efficienza dei laboratori in un intervallo di concentrazioni comprendente i limiti di legge.

Studio di stabilità. Prima dell'invio ai partecipanti, per ciascun materiale, sono state analizzate due serie da 10 campioni prelevati a distanza di 2 mesi. Inoltre, dopo il ricevimento dei risultati da parte dei partecipanti è stata effettuata una terza serie di analisi sui materiali residui per verificare la stabilità alla conclusione dello studio. Anche in questo caso il test ANOVA ha confermato la stabilità dei materiali utilizzati per lo studio.

3.3 Principio del metodo

Il metodo, come nel caso del DON, è un immunodosaggio enzimatico competitivo per entrambi i kit impiegati nello studio (RIDASCREEN® Fumonisine, R-Biopharm Rhône Ltd; Celer FUMO, Tecna S.r.l.). L'estrazione delle fumonisine dal campione è stata eseguita su 5.0 g di matrice; il solvente di estrazione impiegato è una soluzione metanolo/acqua 70/30 (v/v).

3.4 Risultati e discussioni

Prima dell'analisi statistica sui risultati sono stati individuati ed eliminati gli eventuali *outliers* mediante l'impiego dei test di *Cochran* (misura della variabilità intra-laboratorio) e di *Grubbs* (misura della variabilità inter-laboratorio).

I valori individuati come *outliers* sono ugualmente riportati nelle tabelle dei risultati (tabb. 7 e 8) ma sono stati opportunamente evidenziati.

Dall'analisi delle tabelle dei risultati si può notare che gli *outliers* nel loro insieme sono distribuiti su materiali diversi a conferma della omogeneità dei singoli materiali.

| | MATERIALE 1 V.A. = 11854 V.R. = 10558 | | MATERIALE 2 V.A. = 796 V.R. = 862 | | MATERIALE 3 V.A. = 26898 V.R. = 27335 | | MATERIALE 4 V.A. = 3629 V.R. = 2723 | | MATERIALE 5 V.A. = 3478 V.R. = 3036 | |
|---|---|-------|---|--------|---|---------|---|------|---|--------|
| lab | C | T | A | O | D | M | B | N | E | P |
| 1 | 11420 | 9310 | 710 | 564 | 26700 | 24960 | 1940 | 2230 | 3880 | 2570 |
| 2 | 15580 | 13100 | 850 | 684 | 27260 | 25030 | 3760 | 3940 | 3880 | 3850 |
| 3 | 10285 | 13013 | 983 | 1313 | 32780* | 36015* | 3380 | 3640 | 3515 | 3985 |
| 4 | 16680 | 12460 | 420** | 1670** | 3710** | 27400** | 2380 | 4420 | 4080 | 2020 |
| 5 | 8960* | 2910* | 551 | 749 | 27030 | 21370 | 3110 | 3050 | 2710 | 2690 |
| 6 | 13220 | 10770 | 676 | 716 | 37740 | 35890 | 3820 | 4290 | 1780 | 1950 |
| 7 | 8416 | 15008 | 678 | 832 | 24384 | 31648 | 2144 | 3728 | 3648 | 2936 |
| 8 | 10780 | 11850 | 900 | 860 | 31240 | 32620 | 4150 | 4150 | 3760 | 3880 |
| 9 | 8610 | 16050 | 647 | 898 | 19910 | 16210 | 4080 | 6610 | 6720** | 2790** |
| 10 | 11213 | 10780 | 748 | 914 | 27200 | 29030 | 3765 | 3730 | 3590 | 3570 |
| 11 | 10460 | 10380 | 803 | 834 | 28100 | 27200 | 3310 | 3410 | 3470 | 3280 |
| 12 | 13170 | 12420 | 1970* | 1340* | 22150 | 24730 | 2410 | 1730 | 4500 | 3840 |
| 13 | 11820 | 16380 | 660 | 1020 | 32840 | 35780 | 5470 | 4250 | 2640 | 4040 |
| 14 | 12310 | 12630 | 710 | 710 | 27360 | 21150 | 4550 | 3890 | 3960 | 4500 |
| * Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Grubbs | | | | | | | | | | |
| ** Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Cochran | | | | | | | | | | |

Tab. 7 Risultati ottenuti con il kit A ($\mu\text{g/kg}$) – Studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

| | MATERIALE 1 V.A. = 11854 V.R. = 10558 | | MATERIALE 2 V.A. = 796 V.R. = 862 | | MATERIALE 3 V.A. = 26898 V.R. = 27335 | | MATERIALE 4 V.A. = 3629 V.R. = 2723 | | MATERIALE 5 V.A. = 3478 V.R. = 3036 | |
|---|---|---------|---|------|---|---------|---|------|---|------|
| lab | L | U | H | R | G | S | F | Q | I | V |
| 1 | 7850 | 9630 | 810 | 1130 | 26670 | 35130 | 2500 | 1580 | 2370 | 2120 |
| 2 | 13850 | 15190 | 375* | 830 | 36310 | 41040 | 2710 | 3000 | 3390 | 4830 |
| 3 | 12760 | 15470 | 913 | 1450 | 32720 | 36155 | 2820 | 4210 | 4040 | 5450 |
| 4 | 10720 | 12840 | 910 | 1030 | 30520** | 53760** | 2350 | 3760 | 4450 | 3990 |
| 5 | 4510 | 7860 | 375* | 375* | 26430 | 35500 | 375* | 375* | 375* | 860 |
| 6 | 17450 | 16360 | 1260 | 1260 | 43660 | 39710 | 3480 | 4160 | 4410 | 2030 |
| 7 | 2530** | 11950** | 1020 | 375* | 30470 | 33140 | 2760 | 3440 | 2530 | 3860 |
| 8 | 13900 | 14370 | 910 | 1000 | 39360 | 38700 | 3380 | 3350 | 4370 | 4940 |
| 9 | 12410 | 11210 | 1220 | 1640 | 27920 | 19440 | 2660 | 2830 | 2240 | 3230 |
| 10 | 10750 | 11050 | 810 | 1010 | 25480 | 25980 | 3580 | 3910 | 3615 | 3720 |
| 11 | 12130 | 13070 | 1160 | 820 | 36100 | 34910 | 1990 | 2140 | 2850 | 4920 |
| 12 | 11070 | 10980 | 950 | 770 | 28040 | 26000 | 2170 | 2260 | 3570 | 3790 |
| 13 | 16520 | 14290 | 1300 | 1020 | 41390 | 37000 | 3400 | 4760 | 4320 | 5020 |
| 14 | 13970 | 11650 | 375 | 375 | 35200 | 31310 | 2620 | 1940 | 4210 | 2660 |
| * I risultati <LQ sono stati numericamente riportati come LQ/2 | | | | | | | | | | |
| ** Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Cochran | | | | | | | | | | |

Tab. 8 Risultati ottenuti con il kit B ($\mu\text{g/kg}$) – Studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

Nei dati riportati dal laboratorio 12 si è notato che invertendo i risultati ottenuti per il materiale 2 con i due diversi kit il valore non risulta più essere un *outlier*. Non avendo però riscontrato nessuna evidenza che rafforzasse l'ipotesi di un errore nella compilazione dei risultati né da parte del partecipante, né da parte del laboratorio coordinatore, le successive considerazioni statistiche sono state fatte senza apportare nessuna variazione ai risultati riportati dal partecipante.

Per ogni materiale è stata calcolata la deviazione standard relativa in condizioni di ripetibilità (RSD_r) e riproducibilità (RSD_R); i valori ottenuti sono stati confrontati con i valori indicati nel Regolamento CE/401/2006 e riportati nella tabella 9.

Le *performance* dei due diversi kit sono riportate nelle tabelle 10 e 11.

Al fine di una più chiara lettura delle tabelle si fa presente che i valori riportati nelle caselle ombreggiate sono quelli che presentano un valore maggiore del valore limite indicato nel Regolamento CE/401/2006 e riportato a fianco delle tabelle.

Confrontando il valore di riferimento ottenuto in HPLC con il valore assegnato, calcolato come mediana dei risultati riportati dai partecipanti, si può notare che il metodo immunoenzimatico tende a sovrastimare il dato ottenuto in HPLC. Per una migliore visualizzazione di questa tendenza si riportano i grafici dell'andamento dei due kit contro il valore di riferimento (figg. 3 e 4). Per valutare, la concordanza dei risultati ottenuti con i due diversi kit si riporta anche l'andamento dei due kit (fig. 5).

Nella figura 3 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit A. È possibile notare che le due rette sono praticamente sovrapponibili, mostrando una buona risposta del kit A.

Nella figura 4 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit B. In questo caso la pendenza delle rette mette in evidenza una sovrastima del kit B rispetto ai valori di riferimento determinati in HPLC.

Nella figura 5 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit A verso il kit B. Anche in questo caso le rette evidenziano una maggiore tendenza alla sovrastima del kit B sia rispetto ai valori dell'analisi in HPLC, sia rispetto ai valori del kit A.

| LIVELLO ($\mu\text{g/kg}$) | FUMONISINA B ₁ O B ₂ | | |
|------------------------------|--|------------|-----------|
| | $RSD_r \%$ | $RSD_R \%$ | RECUPERO% |
| ≤ 500 | ≤ 30 | ≤ 60 | 60-120 |
| > 500 | ≤ 20 | ≤ 30 | 70-110 |

Tab. 9 Criteri di rendimento indicati nel Regolamento CE/401/2006

| PARAMETRI | FUMONISINE (B ₁ + B ₂) µg/kg | | | | | |
|--|---|------|-------|------|------|------|
| Materiali | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Valori assegnati | 11854 | 796 | 26898 | 3629 | 3478 | |
| Valori di riferimento | 10558 | 862 | 27335 | 2723 | 3036 | |
| Anno del test interlaboratorio | 2008 | | | | | |
| Numero di laboratori | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli outliers | 13 | 11 | 13 | 14 | 13 | |
| Numero di outliers | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | |
| Numero di risultati accettati | 13 | 11 | 13 | 14 | 13 | |
| Numero di repliche | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| Media, µg/kg | 12235 | 760 | 27936 | 3619 | 3405 | |
| Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg | 2507 | 124 | 2633 | 753 | 603 | |
| Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), % | 20.5 | 16.3 | 9.4 | 20.8 | 17.7 | ≤ 20 |
| Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg | 7020 | 347 | 7372 | 2108 | 1688 | |
| Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg | 2260 | 118 | 5566 | 1065 | 765 | ≤ 30 |
| Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), % | 18.5 | 15.6 | 19.9 | 29.4 | 22.5 | |
| Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg | 6328 | 330 | 15584 | 2982 | 2142 | |
| Recupero, % | 116 | 88 | 102 | 133 | 112 | |

Tab. 10 *Performance di precisione per il kit A – Determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)*

| PARAMETRI | FUMONISINE (B ₁ + B ₂) µg/kg | | | | | |
|--|---|------|-------|------|------|------|
| Materiali | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Valori assegnati | 12205 | 963 | 33846 | 2955 | 3674 | |
| Valori di riferimento | 10558 | 862 | 27335 | 2723 | 3036 | |
| Anno del test interlaboratorio | 2008 | | | | | |
| Numero di laboratori | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | |
| Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli <i>outliers</i> | 13 | 14 | 13 | 14 | 14 | |
| Numero di <i>outliers</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| Numero di risultati accettati | 13 | 14 | 13 | 14 | 14 | |
| Numero di repliche | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| Media, µg/kg | 12379 | 910 | 33222 | 2804 | 3506 | |
| Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg | 1274 | 230 | 3526 | 543 | 857 | |
| Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), % | 10.3 | 25.3 | 10.6 | 19.4 | 24.4 | ≤ 20 |
| Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg | 3567 | 644 | 9873 | 1520 | 2400 | |
| Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg | 2981 | 351 | 6125 | 1041 | 1264 | ≤ 30 |
| Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), % | 24.1 | 38.6 | 18.4 | 37.1 | 36.1 | |
| Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg | 8347 | 983 | 17150 | 2915 | 3539 | |
| Recupero, % | 117 | 106 | 122 | 103 | 115 | |

Tab. 11 *Performance di precisione per il kit B – Determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)*

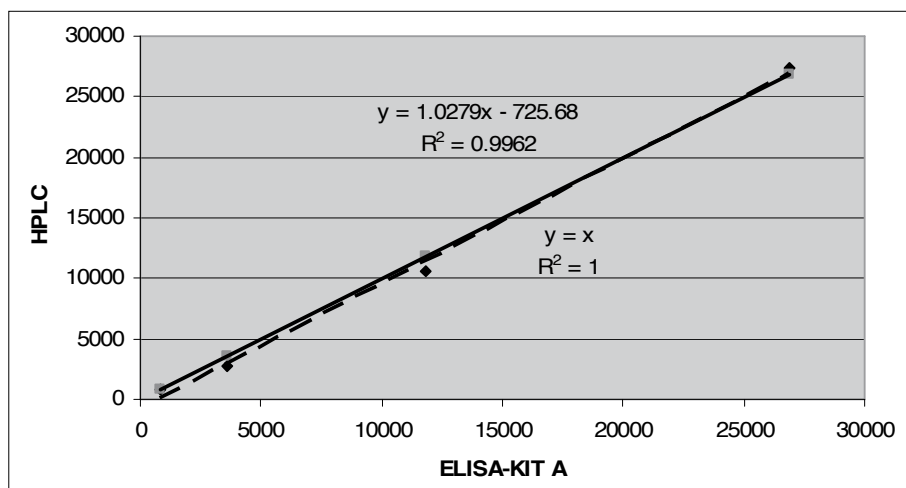


Fig. 3 Andamento del kit A rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

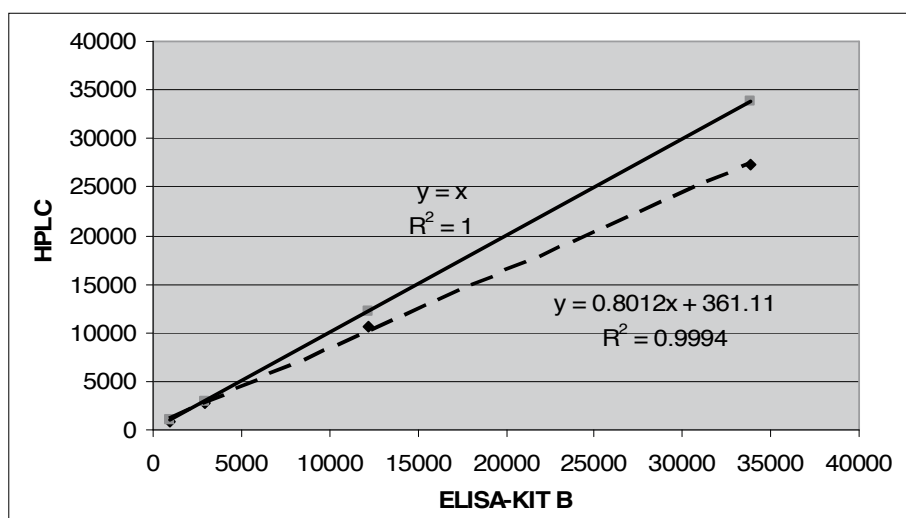


Fig. 4 Andamento del kit B rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

3.5 Conclusioni

Il metodo immunoenzimatico presenta una leggera sovrastima rispetto al dato ottenuto dall'analisi in HPLC.

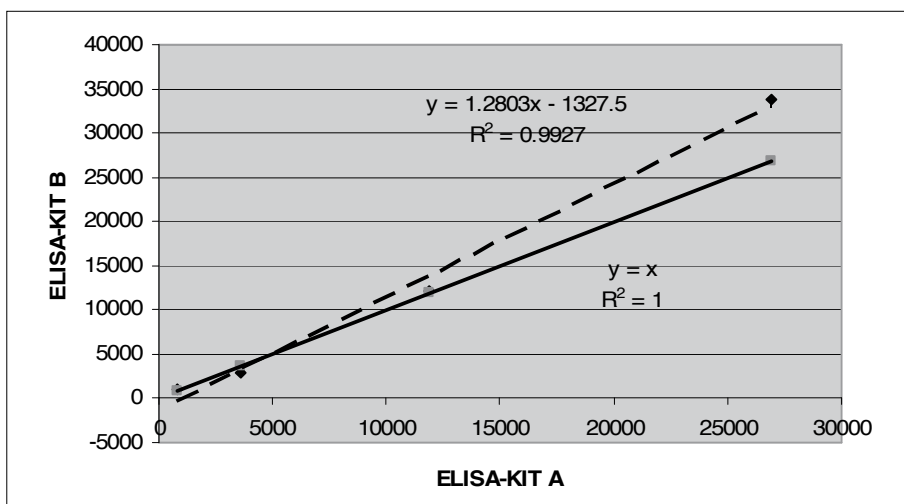


Fig. 5 Andamento del kit A rispetto al kit B per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

Le *performance* dei laboratori coinvolti nel monitoraggio delle fumonisine in campioni di mais, sono risultate affidabili e adeguate allo scopo del progetto. Pertanto, i dati emersi dallo studio interlaboratorio hanno fornito una garanzia di attendibilità dei risultati forniti dai laboratori durante il lavoro di monitoraggio svolto nel corso del progetto.

Confrontando i risultati ottenuti nello studio interlaboratorio con i parametri riportati nel Regolamento CE/401/2006, per entrambi i kit, solo alcuni livelli di contaminazione possono essere considerati validati. Tuttavia i parametri di riferimento riportati nel Regolamento fanno riferimento a metodi di conferma, quindi per un metodo di *screening* come quello testato, i risultati ottenuti si possono ritenere più che soddisfacenti.

4. APPENDICE STATISTICA

Si riportano in questo paragrafo maggiori dettagli circa i test statistici impiegati per l'analisi dei risultati ottenuti negli studi interlaboratorio qui presentati.

4.1 *Modello Anova*

L'analisi della varianza (ANOVA) consente di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi.

L'ipotesi alla base dell'analisi della varianza è che dati p gruppi, sia possibile scomporre la varianza interna ai gruppi (*within*) e varianza tra i gruppi (*between*).

Lo scopo dell'analisi è la convinzione che determinati fenomeni trovino spiegazione in caratteristiche proprie del gruppo di appartenenza. Il confronto si basa sull'idea che se la variabilità interna ai gruppi è relativamente elevata rispetto alla variabilità tra i gruppi, allora probabilmente la differenza tra questi gruppi è soltanto il risultato della variabilità interna.

La variabilità dei dati osservati può essere misurata mediante gli scostamenti dei dati dalla media. La devianza totale è definita nel modo seguente:

$$\bullet \bullet \sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y})^2$$

La devianza totale può essere scomposta nel modo seguente:

$$\bullet \bullet \sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y})^2 = \bullet \sum_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 + \bullet \bullet \sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$$

Il test è basato sul confronto tra la varianza tra trattamenti e la varianza d'errore. Le varianze si ottengono dividendo le devianze per i gradi di libertà.

Avremo quindi:

varianza tra i gruppi $MS(a) = SS(a)/(p - 1)$

varianza d'errore $MS(e) = SS(e)/p(n - 1)$

Dove:

p = numerosità gruppi

n = numerosità campione

Per confrontare le due varianze si utilizza il rapporto: $\frac{MS(a)}{MS(e)}$

4.2 Test di Cochran (*intra-laboratorio*)

Il test di Cochran ha lo scopo di rimuovere i valori dei laboratori che mostrano una variabilità significativamente maggiore tra le analisi replicate fra tutti i laboratori per un dato materiale.

Nel test di Cochran si calcola la varianza all'interno dei laboratori per ciascun laboratorio e si divide la più grande di queste somme per tutte queste varianze. Il quoziente risultante è la "statistica di Cochran" che indica la presenza di un *outlier* che è possibile escludere se il quoziente eccede il valore critico tabulato (tavola di Cochran per $P = 2.5\%$ e L laboratori partecipanti).

4.3 Test di Grubbs (inter-laboratorio)

Il test di Grubbs ha lo scopo di rimuovere i laboratori con le medie estreme. Il test è costituito da due passaggi; si applica prima il test per valori singoli, se non vengono trovati *outlier* si applica il test per coppie di valori (i due valori più alti, i due valori più bassi, il valore più basso e il valore più alto).

Test Grubbs per un valore singolo: si calcola la media di ciascun laboratorio e quindi la deviazione standard delle L medie. Si calcolano la deviazioni standard del set di medie con la media più alta rimossa, si calcolano la deviazioni standard del set di medie con la media più bassa rimossa. Quindi si calcola la percentuale di diminuzione nella deviazione standard come segue:

$$100 * 1 - \frac{S_L}{S} \quad \text{e} \quad 100 * 1 - \frac{S_H}{S}$$

La più alta di queste due percentuali di decrescita è la statistica di Grubbs singola, la quale segnala la presenza di un *outlier* se eccede il valore critico riportato nella tabella della statistica di Grubbs singola per $P = 2.5\%$, due code per L laboratori.

Test di Grubbs per coppie: si procede analogamente, eccetto il calcolo delle deviazioni standard S_{2L} , S_{2H} e S_{HL} , a seguito della rimozione delle due medie più basse, delle due medie più alte e della media più bassa e più alta, dal set originale delle medie.

Si prende la più piccola di queste 3 deviazioni standard e si calcola la corrispondente percentuale di decrescita della deviazione standard dalla originale.

Una coppia di *outlier* secondo Grubbs è presente se un valore selezionato per una percentuale decresce dalla deviazione standard originale calcolata tra le medie originale ed eccede il valore critico presente nella tabella di coppie di valori di Grubbs a $P = 2.5\%$, per L laboratori.

RIASSUNTO

Il progetto interregionale MICOCER (MICOtossine dei CEReali), Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali, nasce con lo scopo, tra gli altri, di fornire un quadro complessivo del livello di contaminazione da micotossine nel mais e nei frumenti, attraverso l'acquisizione di informazioni diffuse, comparabili e rappresentative delle diverse condizioni di coltivazione. Dato l'elevato numero di campioni previsto si è scelto di utilizzare per le analisi delle micotossine un metodo di *screening* immunoenzimatico. Al fine di poter valutare l'efficienza del metodo e dei laboratori coinvolti nello studio di monitoraggio sono stati organizzati degli studi interlaboratorio di validazione.

Durante l'intero periodo di svolgimento delle attività del progetto sono stati organizzati tre studi di validazione interlaboratorio, uno per la determinazione delle fumonisine (FBs) in campioni di mais e due per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero.

L'analisi statistica dei risultati ha evidenziato una tendenza del metodo immunoenzimatico a sovrastimare il dato ottenuto tramite l'analisi in HPLC e utilizzato come valore di riferimento. Tuttavia i metodi si sono dimostrati adeguati allo scopo (monitoraggio di numerosi campioni) e hanno anche mostrato una buona concordanza con i criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE/401/2006.

ABSTRACT

Within the research project MICOCER, financed by Lombardy Region and coordinated by the Italian Agricultural Research Council (CRA), one of the objectives was to depict a scenario of the status of contamination by mycotoxins in Italian maize and wheat commodities, by the acquisition of harmonized and representative information derived from different agricultural practices. ISS Unit was charged to develop interlaboratory studies aimed at evaluating the performance of laboratories involved in the monitoring program and to validate different kits of ELISA test. The immunoenzymatic technique was chosen as screening method for all the analyses, due to the large amount of samples investigated under the study.

During the entire period covered by the project, three different collaborative trials were planned. The first collaborative trial was on deoxynivalenol (DON) determination in wheat samples (2006/2007), the second one was on fumonisins (FBs = FB₁ + FB₂) determination in maize samples (2007/2008), the third, was a new DON determination in wheat samples.

Up to now, the statistical analysis performed underlined an overestimation of the ELISA kits that were used in comparison with the ones obtained from HPLC analysis, considered as the reference value in these validation studies.

However, the applied immunoenzymatic methods well fit for the purpose of the project being able to give satisfactory quantification for the monitoring surveys programmed for the MICOCER project. Also the performance parameters calculated for the collaborative trials were in accordance with those reported in the Regulation CE/401/2006.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC INTERNATIONAL (2002): *Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*, "AOAC Official Methods of Analysis (2002)".
- CAST (2003): *Mycotoxins: risk in plant, animal and human system*, Task force report ISSN 0194; N. 139.
- ISO 17025:2005: *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*, UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.
- KROGH P. (1987): *Mycotoxins in food. Food science and Technology*, Academic Press.

- MIRAGLIA M., DE SANTIS B., PANNUNZI E., DEBEGNACH F., BRERA C. (2008): *Mycotoxin Concentration Data Quality: The Role of Sampling*, "Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade", CABI Publishing, Trowbridge (UK).
- REGOLAMENTO CE/1126/2007: Regolamento (EC) N. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 255/14.
- REGOLAMENTO CE/1881/2006: Regolamento (EC) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 364/5.
- REGOLAMENTO CE/401/2006: Regolamento (EC) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 70/12.
- SMITH J.E., LACEY J., CUERO R., RAMAKRISHNA N., GQALENI N. (1998): *Storage product ecology and mycotoxin formation*, "Mycotoxins and phycotoxins. Developments in chemistry, toxicology and food safety", Alaken, Inc., Fort Collins, CO.
- USDA/GIPSA (2004): *Performance evaluation criteria for aflatoxin test kits*, U.S. Department of Agriculture, 2004.
- WHITAKER T.B. (2006): *Sampling foods for mycotoxins*, «Journal of Food Additives and Contaminants», vol. 23 (1).

