

III CONFERENZA REGIONALE AMBIENTALE

“L’Ambiente e l’alimentazione: micotossine un pericolo invisibile”

“Campionamento ed analisi delle micotossine: aggiornamenti e prospettive”

Carlo Brera

Istituto Superiore di Sanità, Centro Nazionale per
gli Alimenti e per i Rischi Alimentari

"La filiera analitica"

- **Campionamento**
- **Preparazione del campione**
- **Analisi**



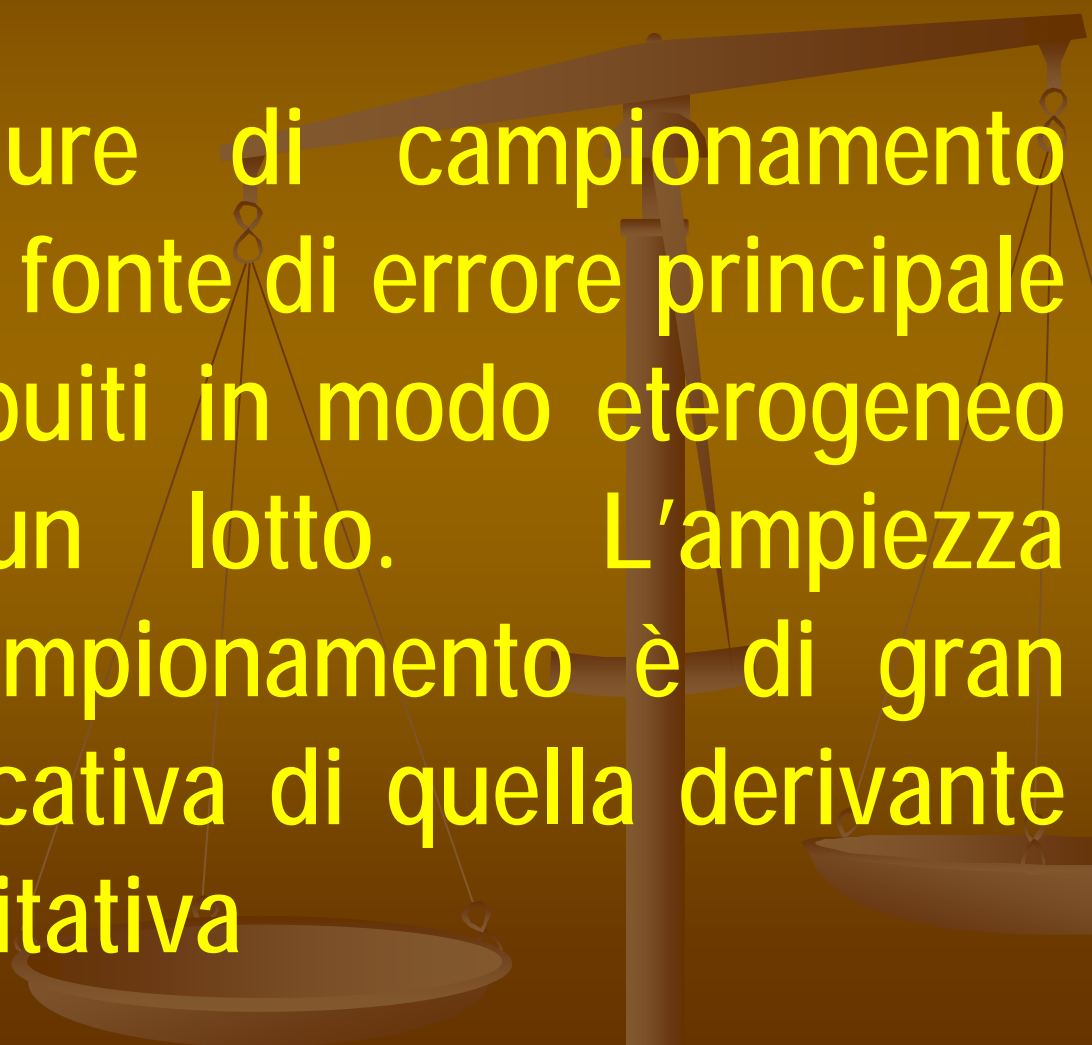
Campionamento: generalità

Indipendentemente dagli obiettivi, raramente in uno studio è possibile esaminare ogni singolo elemento dell'intera popolazione. (risorse economiche limitate, personale, laboratori ecc.);

Pertanto, l'esame di un **campione**, ossia di un numero ridotto di osservazioni, invece dell'intera popolazione consente di superare i problemi ora accennati. Un campione non è altro che un sottoinsieme della popolazione. Scegliere un campione da una popolazione significa effettuare un **«campionamento»**.

Premessa

Errate procedure di campionamento rappresentano la fonte di errore principale per analiti distribuiti in modo eterogeneo all'interno di un lotto. L'ampiezza dell'errore di campionamento è di gran lunga più significativa di quella derivante dall'analisi quantitativa



Distribuzione delle micotossine

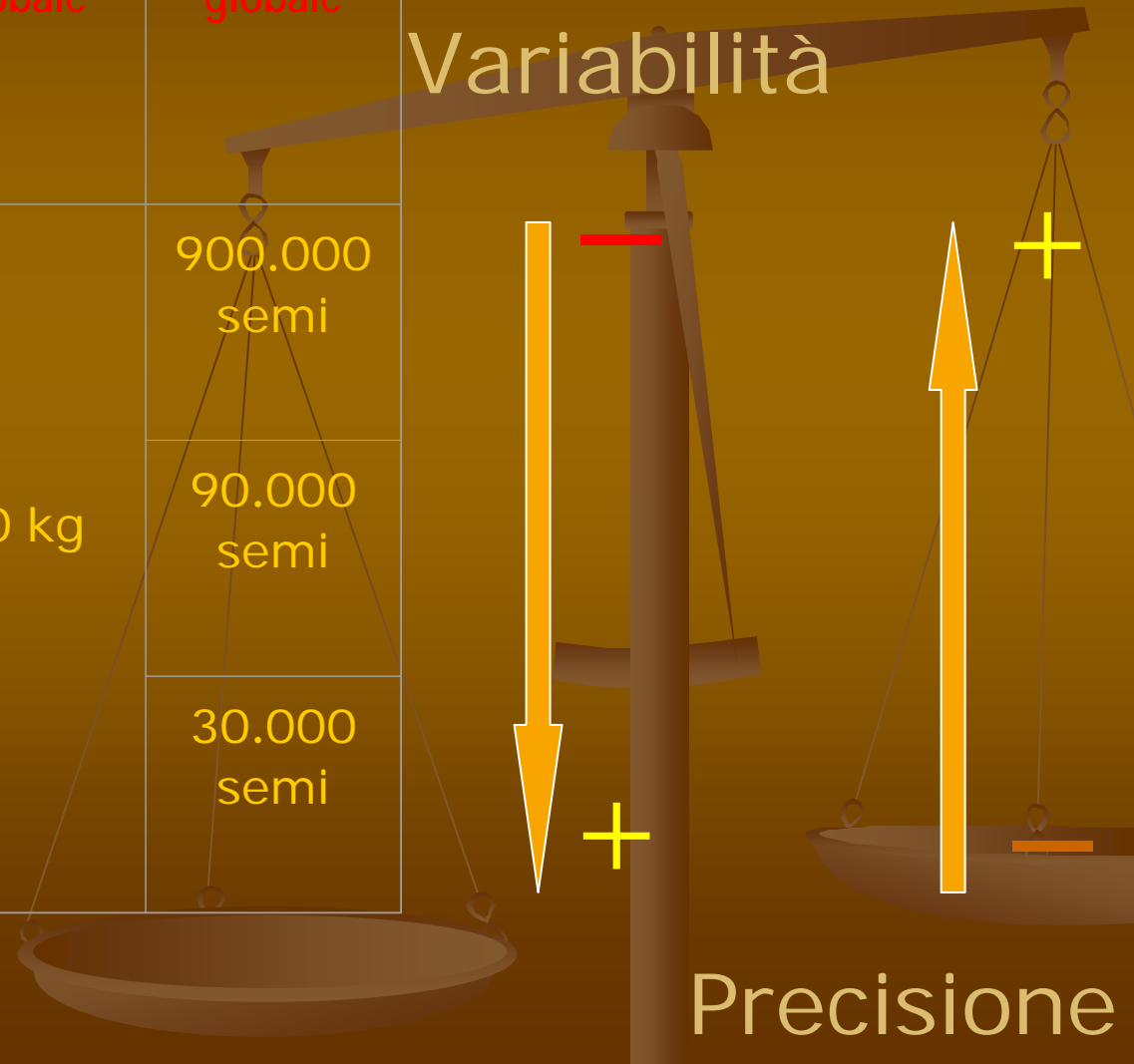
IN CONSIDERAZIONE DELLA PERCENTUALE DI CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE CHE IN MEDIA SI RISCONTRA NELLE MERCI SFUSE, CHE VARIA DALL' 1% AL 3%, E DELLA DISTRIBUZIONE ESTREMAMENTE ETEROGENEA È STATO CALCOLATO UN ERRORE DOVUTO AL RILASCIAMENTO PARI AL

90%



Variabilità / Precisione

Matrice	Numero di chicchi per unità di peso	Campione globale	Campione globale
Grano	30 chicchi per grammo	30 kg	900.000 semi
Mais	3 chicchi per grammo		90.000 semi
Arachidi	1 seme per grammo		30.000 semi



Metodologie per prelevare un campione

La condizione è che ogni campione elementare deve avere la stessa probabilità di essere scelto

(Random sampling).

Campionamento statico

Campionamento dinamico

Campionamento: fonti di errore

Rappresentatività

- Basso numero dei campioni incrementali
- Scarsa rappresentatività dei punti di campionamento
- Inadeguata grandezza del campione globale

Campionamento statico

- Sili
- Vagoni
- Sacchi
- Confezioni



CAMPIONAMENTO STATICO



Campionamento dinamico

- Più semplice da realizzare anche se molto oneroso in termini di tempo e risorse
- Prelievo di campioni elementari da nastri trasportatori
- Utilizzo di campionatori automatici







Si passa

da $\sim 10^9$ chicchi - campionamento

a $\sim 10^6$ chicchi - camp. Globale

a $\sim 10^4$ chicchi - aliquota

a $\sim 50\text{g}$ (camp.per l'analisi)

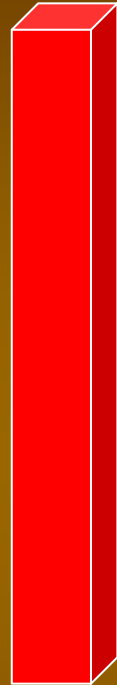
Fattore di riduzione : $\sim 10^7$

Suddivisione dei lotti in sottolotti in funzione del prodotto e del peso del lotto

Prodotto	Peso del lotto (t)	Peso o numero dei sottolotti	Numero di campioni incrementali	Campione aggregato in Kg
Fichi secchi ed altra frutta secca ed essiccata	≥15	15 – 30 t	100	30
	<15	-----	10 – 100*	3 - 30
Arachidi, pistacchi, noci brasiliane ed altre noci	≥500	100t	100	30
	Tra 125 e 500	5 sottolotti	100	30
	Tra 15 e 125	25t	100	30
	< 15	-----	10 – 100*	3 - 30
Cereali	≥1500	500t	100	30
	Tra 300 e 1500	3 sottolotti	100	30
	Tra 50 e 300	100t	100	30
	<50	-----	10-100*	1-10

Campione globale = 30 kg

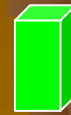
Campioni incrementali
N=100



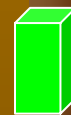
10 kg



ALIQUOTE



ALIQUOTE



ALIQUOTE

Campioni di laboratorio
omogeneizzati e
macinati - 10 kg

Luogo dove avviene il campionamento

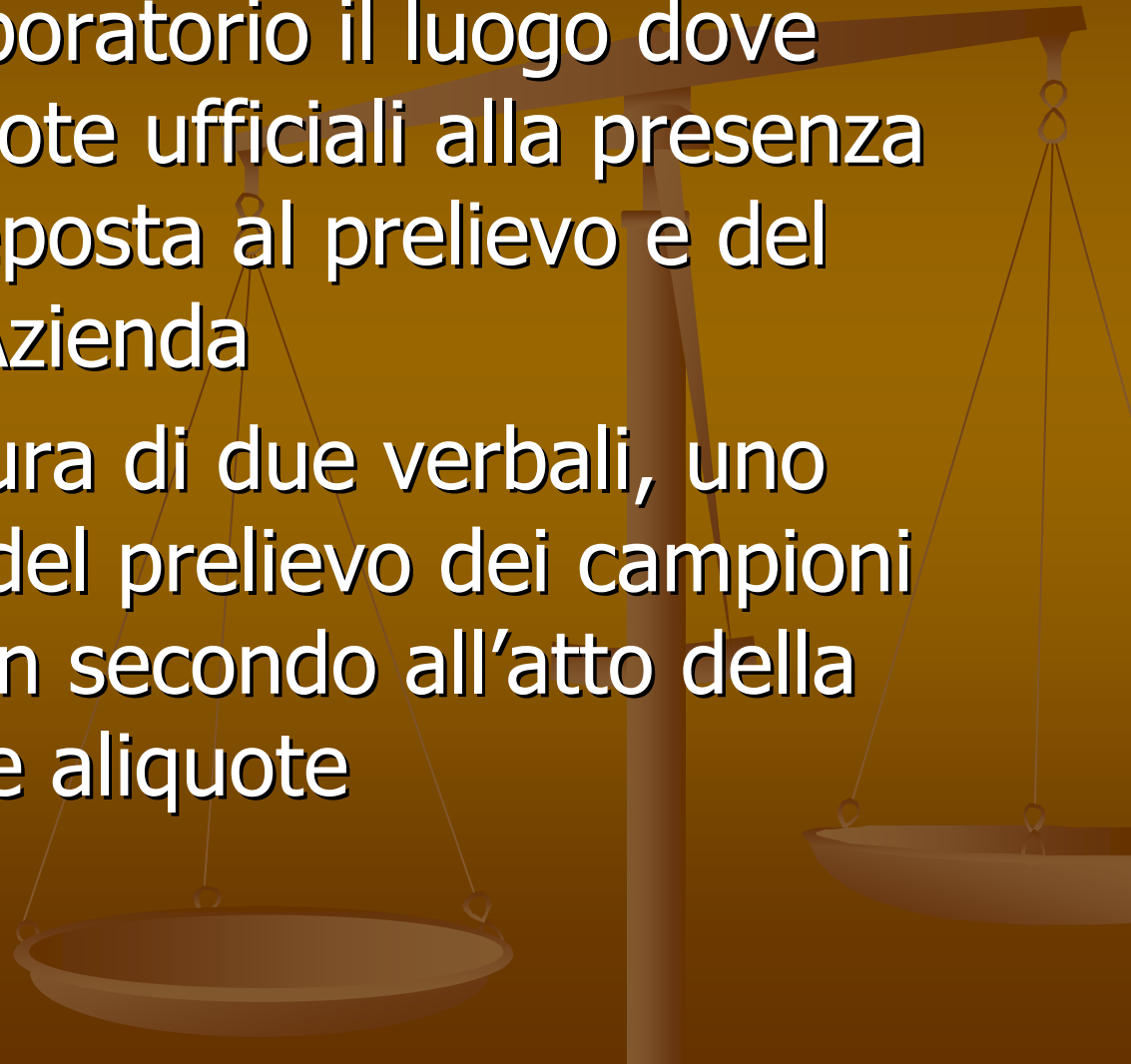
Laboratorio

Schema di campionamento



La procedura pertanto

- individua nel laboratorio il luogo dove formare le aliquote ufficiali alla presenza dell'Autorità preposta al prelievo e del delegato della Azienda
- prevede la stesura di due verbali, uno redatto all'atto del prelievo dei campioni elementari ed un secondo all'atto della formazione delle aliquote



Campionamento al dettaglio



Come prelevare l'aliquota?

CAMPIONI

ELEMENTARI

1.



2.



+



+



+



3.



Aliquote

Art. 6, § 3. NORME GENERALI DA SEGUIRE PER IL PRELIEVO DEI CAMPIONI DA ANALIZZARE

c) Nel caso di sostanze o prodotti **non omogenei** contenuti in **un unico** recipiente e conservati alla rinfusa, se ne prelevano quantità parziali **nella parte superiore centrale e inferiore della massa**, l'insieme delle quantità parziali rappresentative della partita vengono riunite e mescolate per ricavare il campione per l'analisi.

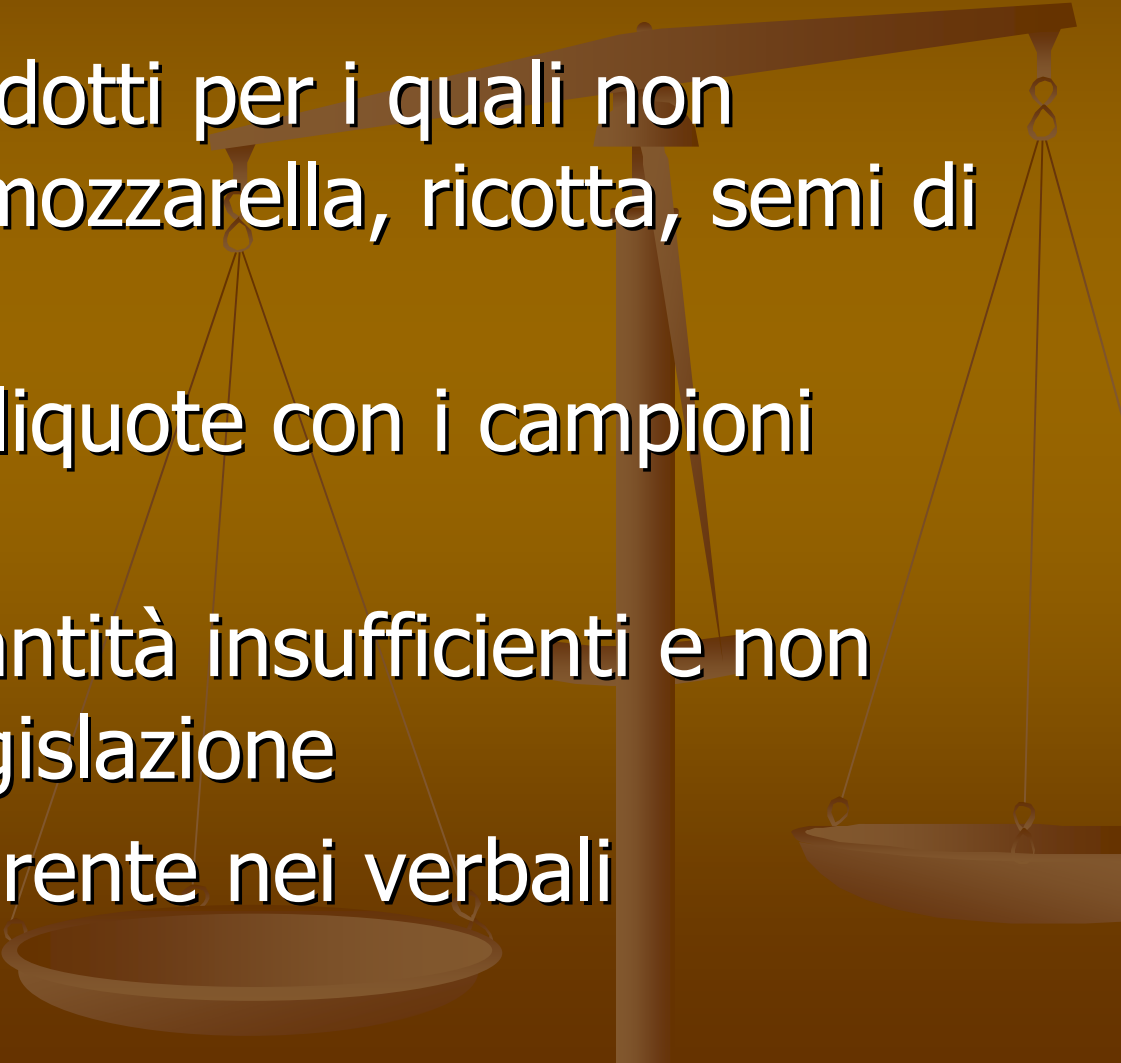
d) Nel caso di sostanze o prodotti **non omogenei** contenuti in **più** recipienti, se ne prelevano quantità parziali da diversi recipienti scelti a caso e rappresentativi della partita; le quantità parziali prelevate vengono riunite e mescolate per ricavare il campione per l'analisi.

e) Nel caso di sostanze o prodotti contenuti in confezioni originali chiuse e quando la natura di tale sostanza o prodotto, e il tipo di controllo analitico da effettuare ne consentano l'apertura si prelevano a caso, da un numero di confezioni rappresentative della partita,

aliquote di sostanza o prodotto dalle quali, **riunite e mescolate**, si ricava il campione per l'analisi.

f) Nel caso di sostanze o prodotti contenuti in confezioni originali chiuse e quando la natura delle sostanze o prodotti, e il tipo di controllo analitico da effettuare **non** ne consentano l'apertura si preleva a caso, dalla partita, **un numero rappresentativo** di confezioni per formare il campione per l'analisi.

Errori nel campionamento al dettaglio

- Campionare prodotti per i quali non esistono limiti (mozzarella, ricotta, semi di zucca, ecc.).
 - Confondere le aliquote con i campioni incrementali
 - Campionare quantità insufficienti e non conformi alla legislazione
 - Compilazione carente nei verbali
- 

NORMATIVA

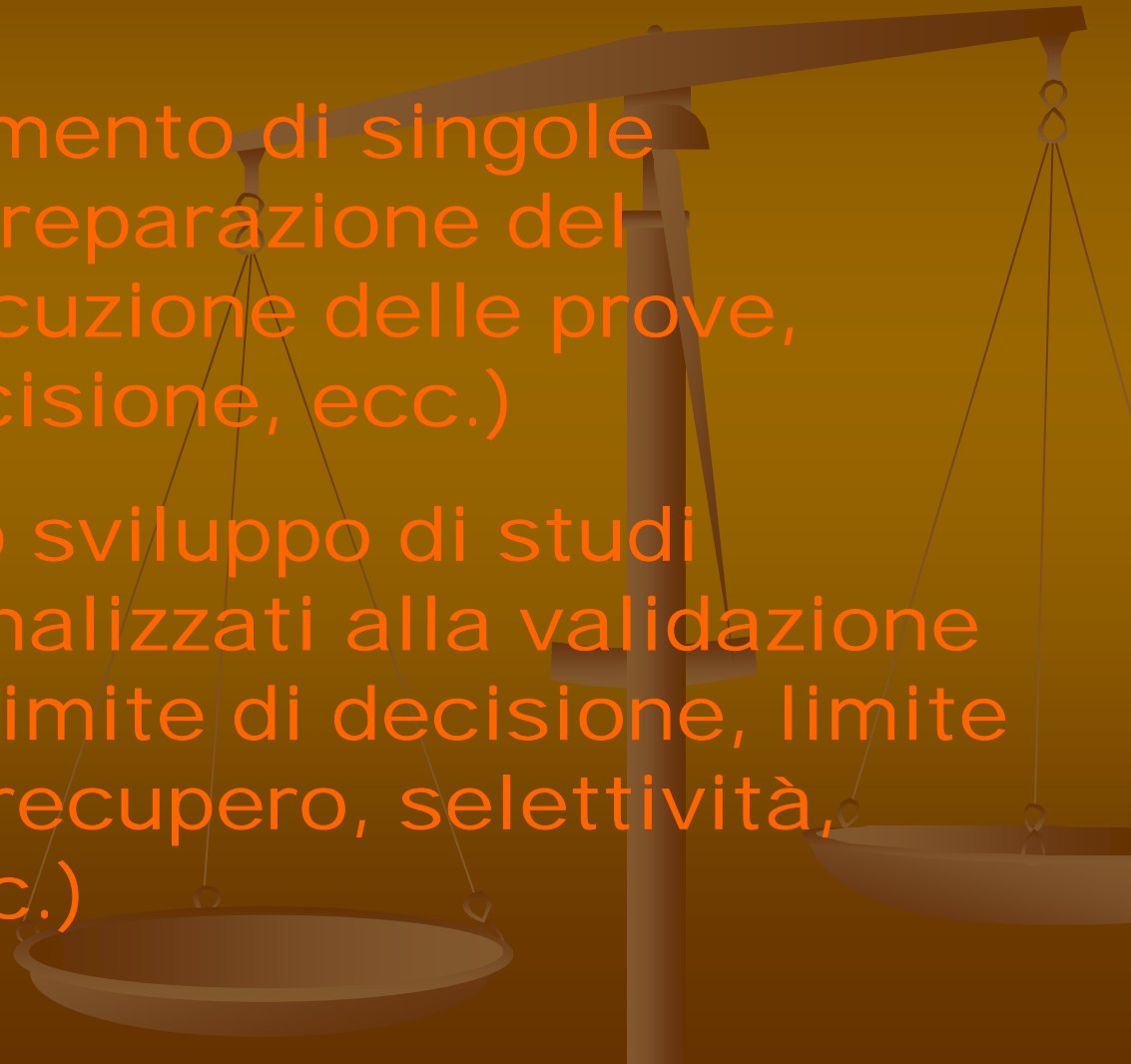


Normativa orizzontale

- 2002/657/CE: Decisione della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati
- Rettifica del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L 191 del 30.4.2004)

Parametri considerati (Decisione 2002/657)

- Criteri di rendimento di singole metodologie (preparazione del campione, esecuzione delle prove, esattezza, precisione, ecc.)
- Elementi per lo sviluppo di studi collaborativi finalizzati alla validazione di un metodo (limite di decisione, limite di rivelazione, recupero, selettività, robustezza, ecc.)



AFLATOSSINE

Normativa CE	Normativa Nazionale
Mais – Direttiva 2003/121/CE del 15.12.2003	Decreto 17 novembre 2004 - (GU n. 9 del 13-1-2005)
Spezie – Direttiva 2002/27/CE del 13 March 2002	Decreto 31 maggio 2003 (GU n. 161 del 14-7-2003)
Cereali, frutta secca – Direttiva 1998/53/CE DEL 16.7.1998	DM 23.12.2000 (GU n. 33 del 09-02-2001)
Prodotti per l'infanzia – Direttiva 2004/43/CE del 13.4.2004	-----
Mangimi – Direttiva 1976/371/CE del 1.3.1976	DM 20.4.1978 (GU 15 giugno 1978, n. 165),

OCRATOSSINA

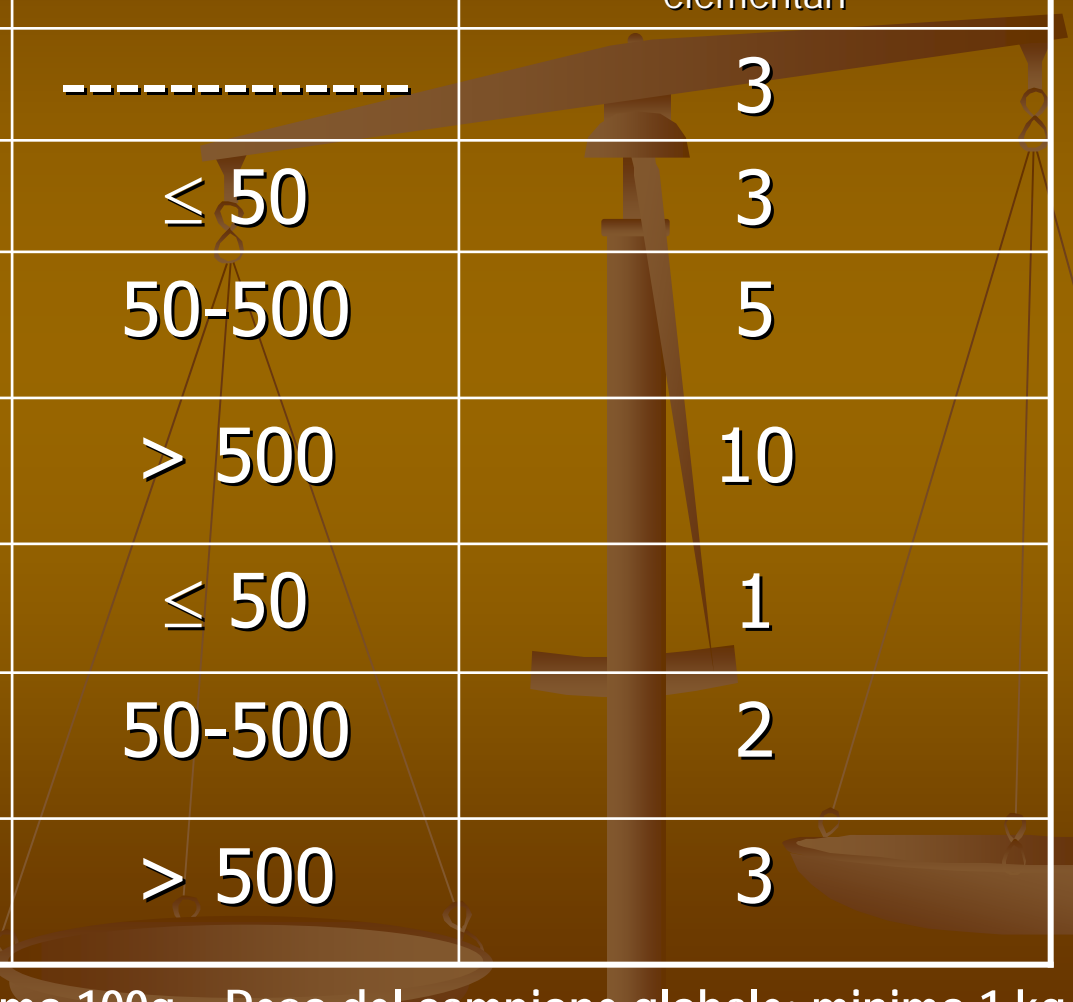
Normativa CE	Normativa Nazionale
<p>Vino, Succo d'uva, Uve secche, Cereali - Direttiva 2005/5/CE del 26.1.2005</p>	
<p>Cereali, Uve secche – Direttiva 2002/26/EC del 13 Marzo 2002</p>	<p>DECRETO 31 maggio 2003 (GU n.167 del 21.07.2003)</p>
<p>Prodotti per l'infanzia – Direttiva 2004/43/CE del 13.4.2004</p>	

SCHEMA DI CAMPIONAMENTO

Matrice	Peso della partita (t)	Peso o numero delle sottopartite	Numero di campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
Caffè torrefatto, caffè torrefatto macinato, e caffè solubile	≥ 15	15-30 t	100	10
	< 15	-----	10-100	1-10
Dettaglio	≤ 0.1 t	-----	10	1

SCHEMA DI CAMPIONAMENTO

Vino e succo d'uva



Matrice	Peso della partita (L)	Numero MINIMO di campioni elementari
SFUSO (succo d'uva e vino)	-----	3
Bott./cfz succo d'uva	≤ 50	3
Bott./cfz succo d'uva	50-500	5
Bott./cfz succo d'uva	> 500	10
Bott./cfz vino	≤ 50	1
Bott./cfz vino	50-500	2
Bott./cfz vino	> 500	3

Peso del campione elementare: minimo 100g – Peso del campione globale: minimo 1 kg

PATULINA

Normativa CE	Normativa Nazionale
<p data-bbox="129 549 896 882">Socchi di frutta, composte di frutta – Direttiva 2003/78/EC dell'11 Agosto 2003</p> <p data-bbox="186 935 858 992"><i>Anche per i prodotti l'infanzia</i></p>	<p data-bbox="1068 549 1709 725">DM 17 novembre 2004 (GU n. 9 del 13-1-2005)</p>

Conformità del lotto

- Conformità della partita o sottopartita alle norme. Se il risultato della prima analisi è meno del 20% superiore o inferiore al tenore massimo, il laboratorio di controllo effettua una ripetizione dell'analisi e calcola la media dei risultati. La partita è conforme se il risultato della prima analisi è di oltre il 20% inferiore al tenore massimo o, qualora si effettui una ripetizione di analisi, se la media è conforme al tenore massimo stabilito dal regolamento 1425/2003 e successive modifiche, tenendo conto dell'incertezza delle misurazioni e delle correzioni di recupero. La partita non è conforme al tenore massimo stabilito dal regolamento 1425/2003 e successive modifiche, se la media corretta per il recupero supera il tenore massimo oltre ogni ragionevole dubbio, tenendo conto dell'incertezza delle misurazioni.

Preparazione del campione



Preparazione del campione: fonti di errore

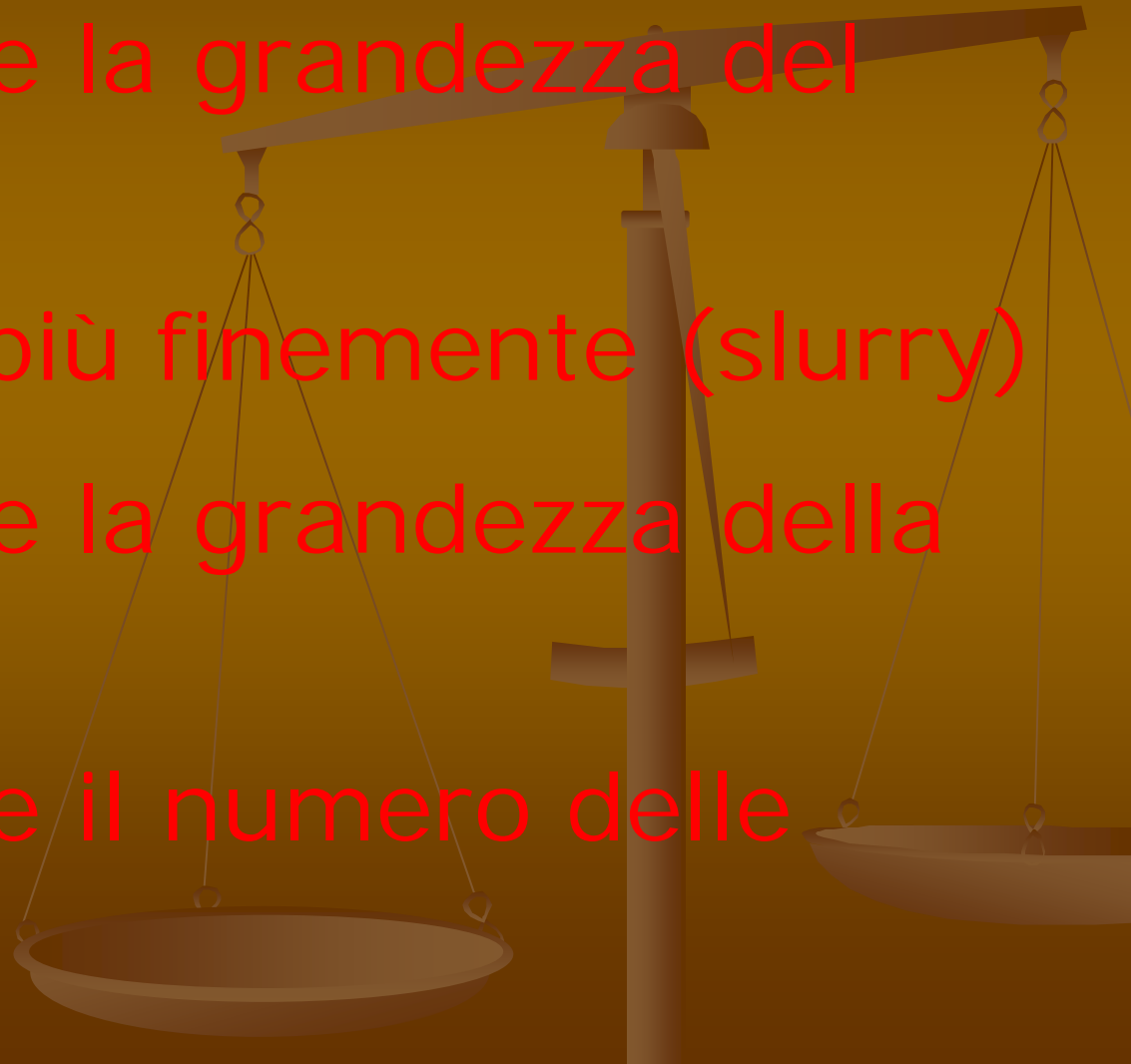
RAPPRESENTATIVITA'

- Scarsa omogeneità della granulometria
- Dimensioni delle parti granulari



Come ridurre la varianza

- Aumentare la grandezza del campione
- Macinare più finemente (slurry)
- Aumentare la grandezza della aliquota
- Aumentare il numero delle aliquote



Rappresentatività

50 grammi di mais NON corrispondono a circa 200-250 chicchi

1. I 50 grammi di mais, se provenienti da un campionamento correttamente effettuato, cioè tramite omogeneizzazione e macinazione del CL, conterranno un eguale numero di frammenti rappresentativi di tutti i chicchi del campione globale (circa 10^6 chicchi)
2. Se invece i 50 grammi di campione sono prelevati nella maniera non corretta sarà contenuto un numero di frammenti rappresentativi di non più di 200-250 chicchi dell'intero campione globale che statisticamente non configura una condizione di rappresentatività

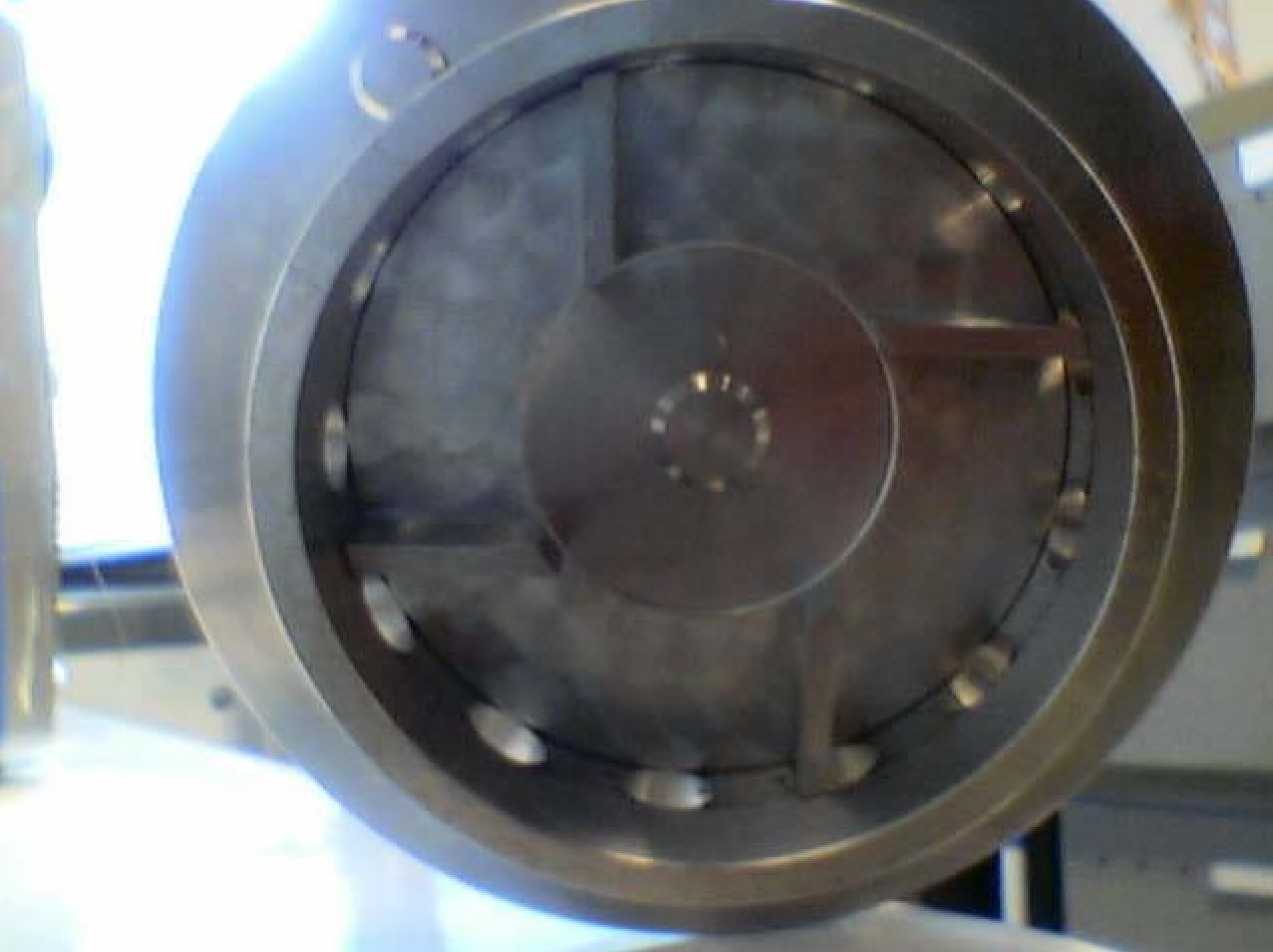
Preparazione del
campione



Preparazione dello
"slurry"







Campione dopo “slurry”





Analisi Quantitativa



Metodi di prova

- Il laboratorio deve utilizzare metodi aggiornati compresi tra:

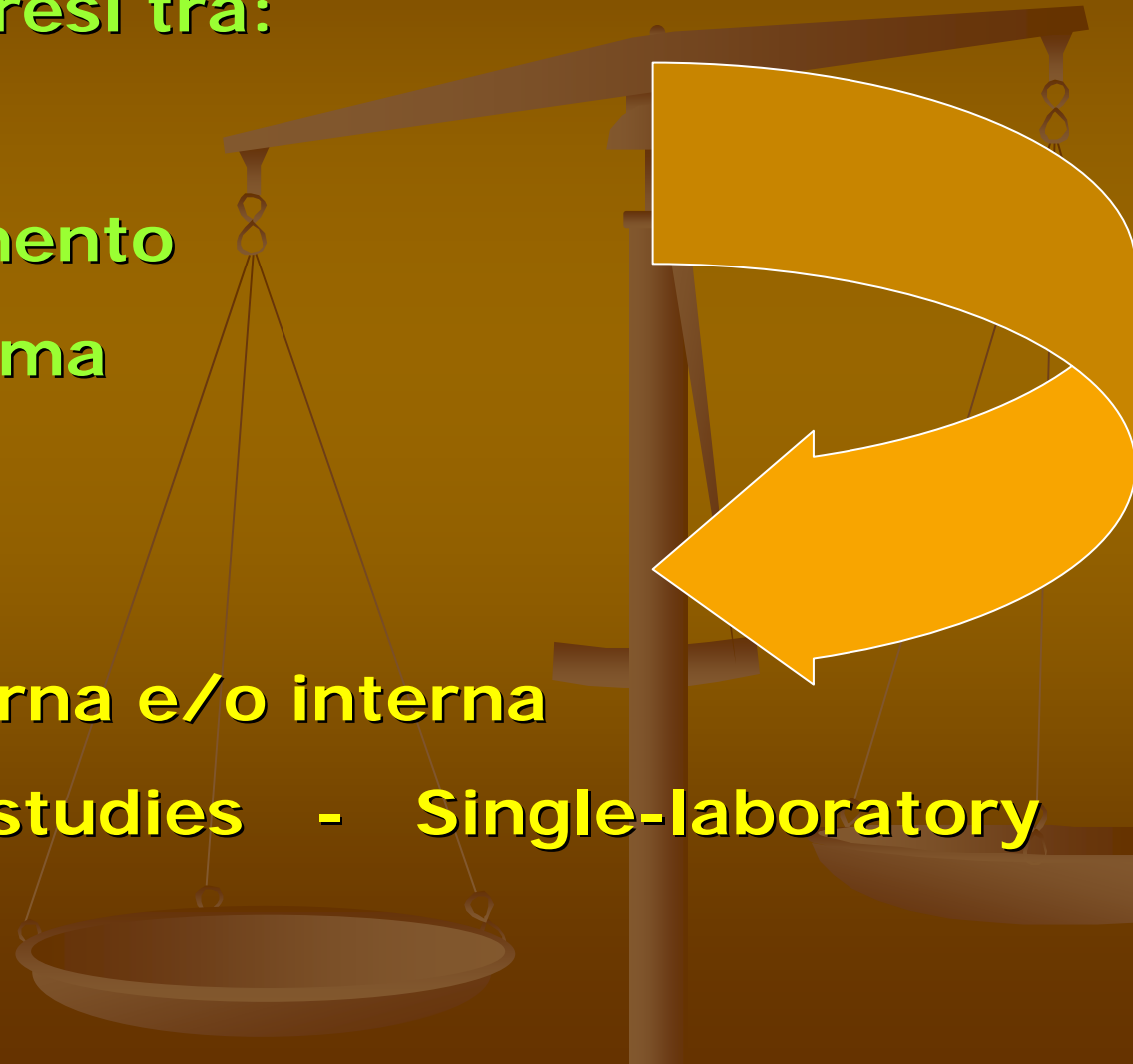
Metodi ufficiali

Metodi di riferimento

Metodi di conferma

Metodi rapidi

- Validazione esterna e/o interna
(Collaborative studies - Single-laboratory validation)



METODI QUANTITATIVI

❖ **METODI CROMATOGRAFICI**
(TLC-HPLC-EC)

❖ **METODI STRUMENTALI**
***(SPETTROFLUORIMETRIA-
FLUORODENSITOMETRIA)***



METODI DI SCREENING

- ☐ ***TEST BIOLOGICI (COLTURE DI CELLULE E TESSUTI, PROVE BIOTOSSICOLOGICHE)***
 - ☐ ***TEST IMMUNOLOGICI (RIA, ELISA, IA)***
 - ☐ ***BIOSENSORI (PRINCIPI OTTICI, ONDE ACUSTICHE SUPERFICIALI, ELETTROCHIMICI)***
 - ☐ ***MICRO - MACRO ARRAY***
 - ☐ ***PCR***
- 
- A large, stylized illustration of a balance scale is positioned on the right side of the slide. The scale is tilted, with the left pan hanging lower than the right pan. The pans are empty. The background is a solid dark brown color.

METODI DI CONFERMA



- TECNICHE IFENATE (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS)**
- **IONIZZAZIONE CON TECNICHE ELETTROSPRAY, TERMOSPRAY, CHIMICA.**
 - **IDENTIFICAZIONE TRAMITE TRAPPOLA IONICA**
 - **QUANTIFICAZIONE TRAMITE TRIPLO QUADRUPOLO (SISTEMA DI RIVELAZIONE MULTIMICOTOSSINA)**
- 

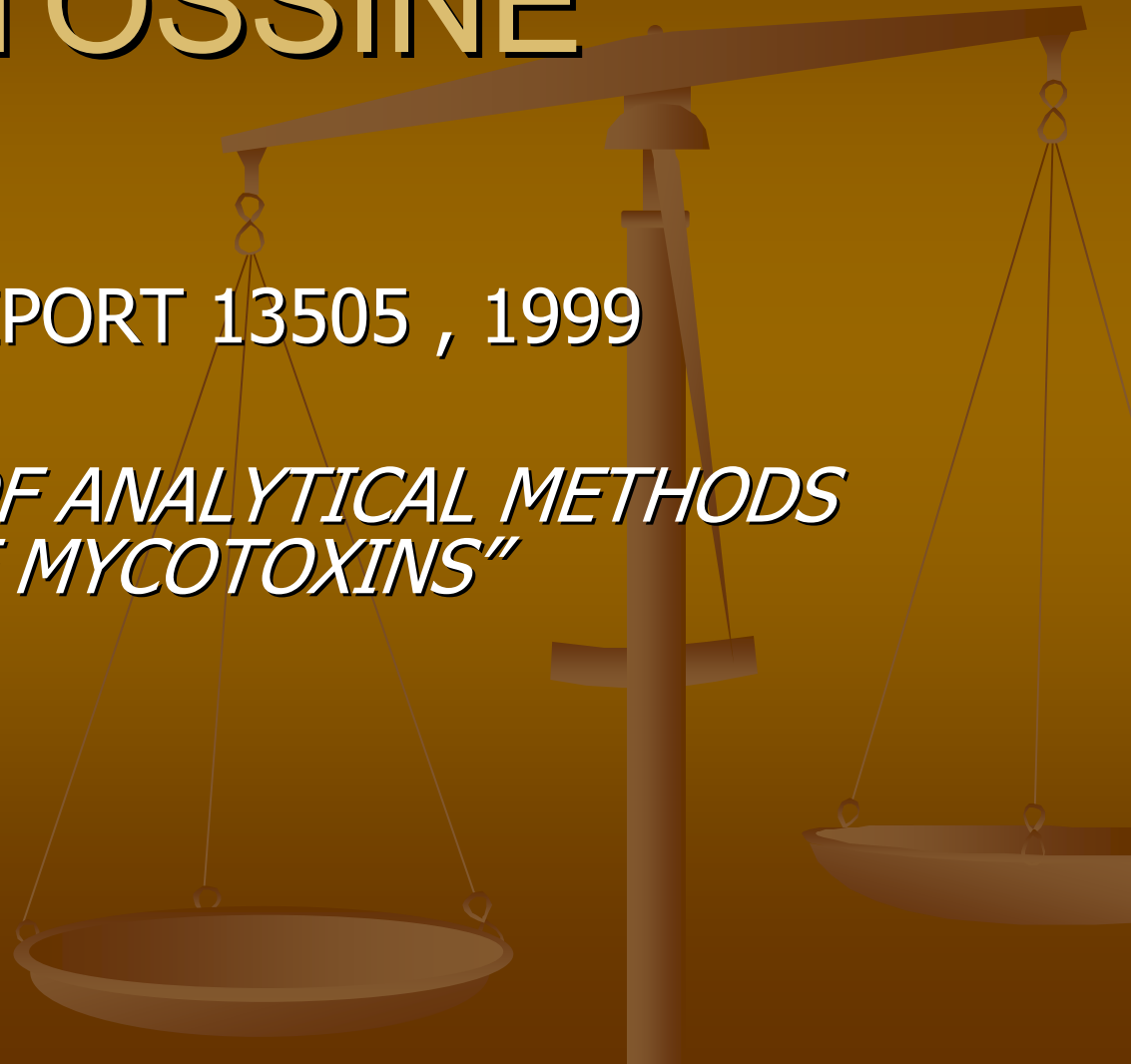
Metodi validati dal CEN

Micotossina	Matrice	Anno
AFB ₁ e TOTALI	Burro di arachidi, pistacchi, fichi secchi e paprika	2003
AFM ₁	Latte in polvere	2003
OTA	Cereali	1996
OTA	Orzo, caffè tostato	2003
OTA	Vino, birra	2004
FB ₁ e FB ₂	Mais e prodotti derivati	2002 SPE 2004 IA

DOCUMENTO CEN BIOTOSSINE

CEN REPORT 13505 , 1999

*"CRITERIA OF ANALYTICAL METHODS
OF MYCOTOXINS"*

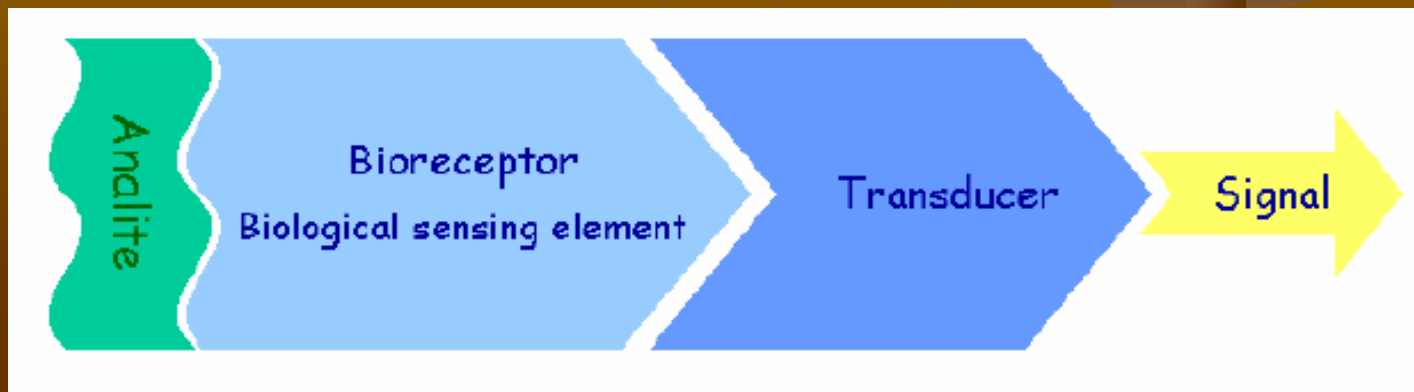


I METODI DEL PROSSIMO FUTURO

- ▶ Metodi multimicotossina
 - ▶ Metodi (semi)automatici
 - ▶ Biosensori
 - ▶ PCR quantitativa
 - ▶ Microarray
- 

BIOSENSORI

Per convenzione, attualmente, il termine è riferito a sensori che incorporano un elemento biologico costituito, ad esempio, da enzimi, anticorpi, acidi nucleici, microorganismi o cellule. In accordo alla definizione di Turner, un *biosensore* è " un dispositivo analitico compatto che incorpora un elemento sensibile di natura biologica integrato ad un trasduttore fisico-chimico. Lo scopo principale di tale dispositivo è quello di fornire un segnale elettrico, analogico o digitale, proporzionale alla concentrazione di un singolo analita o un gruppo di analiti" (Turner, 1987).



PCR

Tecnica altamente sensibile e specifica

✓ permette il controllo delle Plant disease

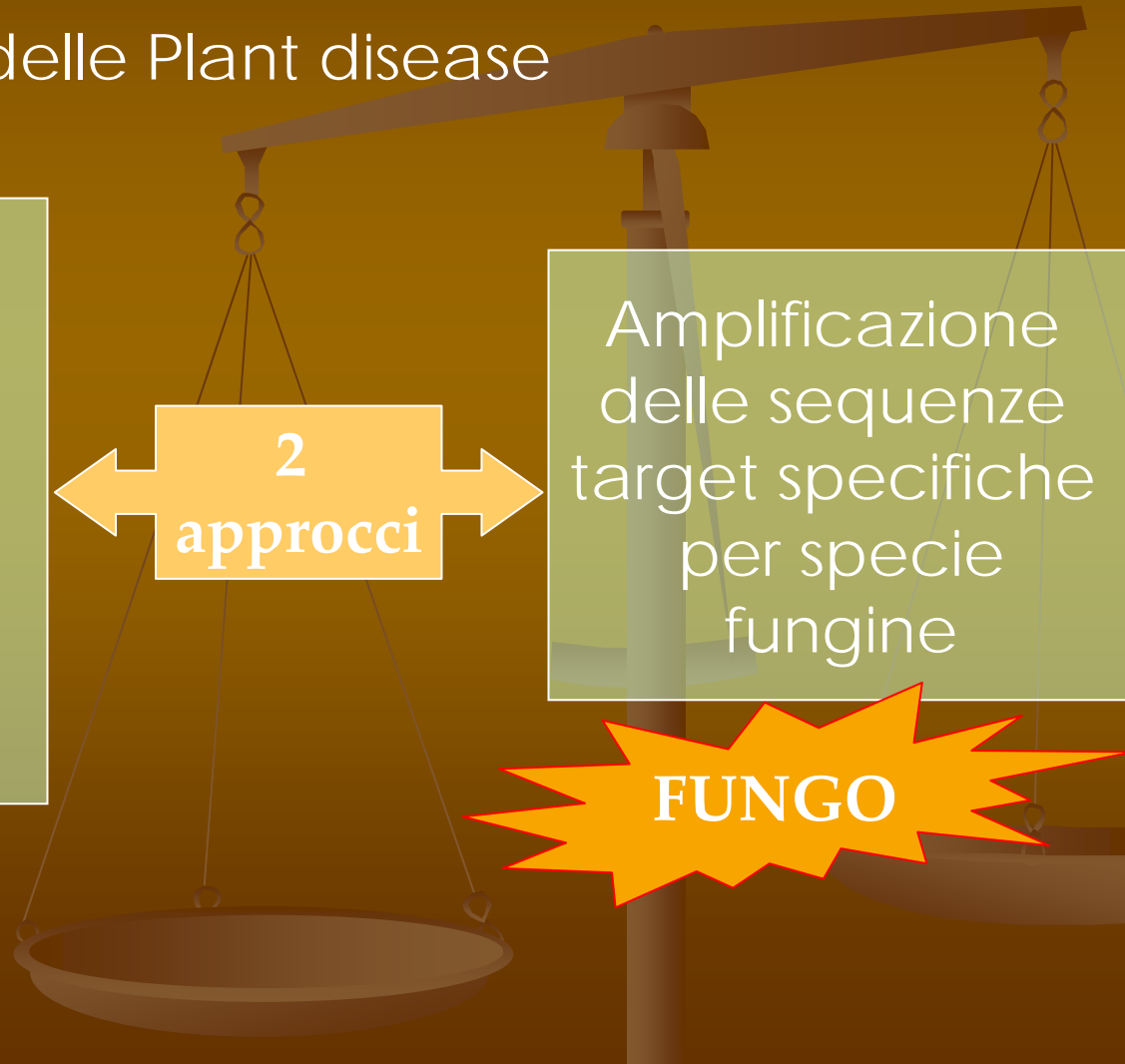
Amplificazione delle
sequenze appartenenti
alla classe di geni
regolatori delle vie per
la biosintesi
della micotossina

MICOTOSSINA

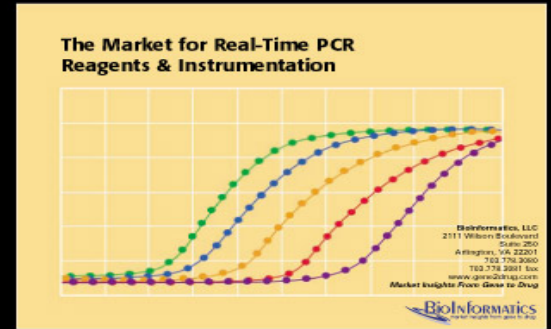
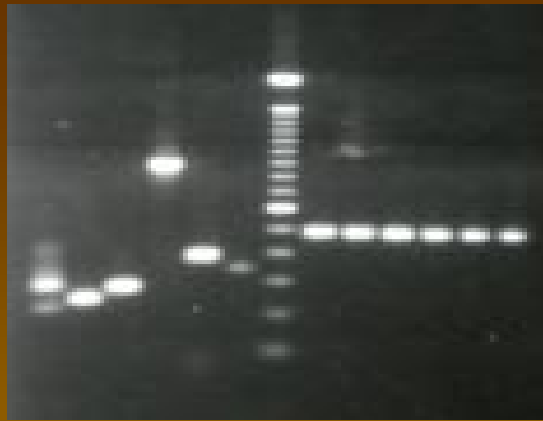
2
approcci

Amplificazione
delle sequenze
target specifiche
per specie
fungine

FUNGO



PCR



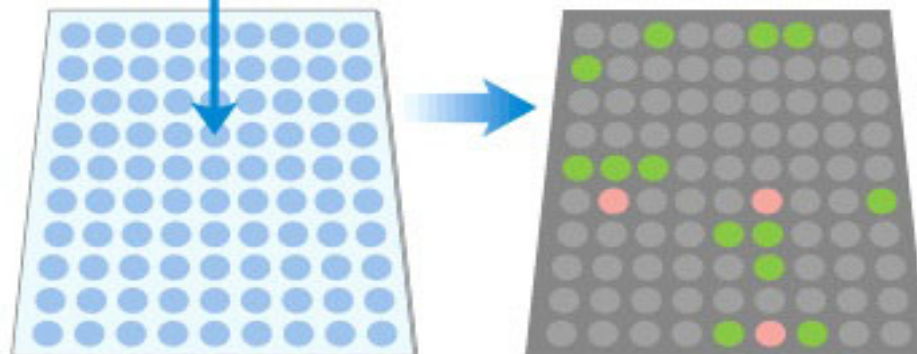
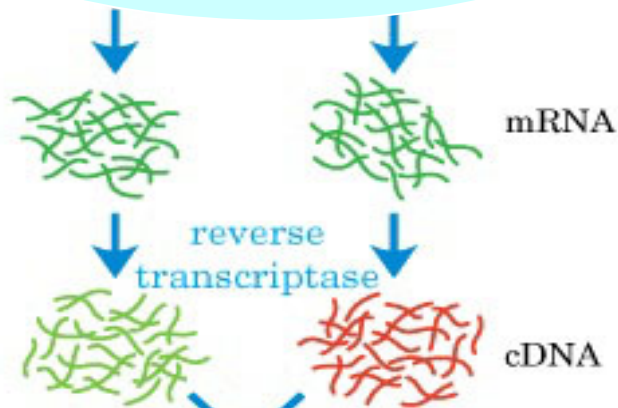
- Estrazione del DNA/mRNA fungino dalla pianta o dall'alimento
- Amplificazione DNA/cDNA

Qualitativa: amplificazione della sequenza target; dal gel elettroforetico si evidenzia la presenza dell'amplificato come positività di reazione.

Quantitativa: Real time PCR; grazie all'emissione di una sonda fluorescente inglobata durante la fase di amplificazione, è possibile quantificare l'amplificato prodotto in PCR

Microarray a cDNA

Estrazione
mRNA dalla pianta o alimento



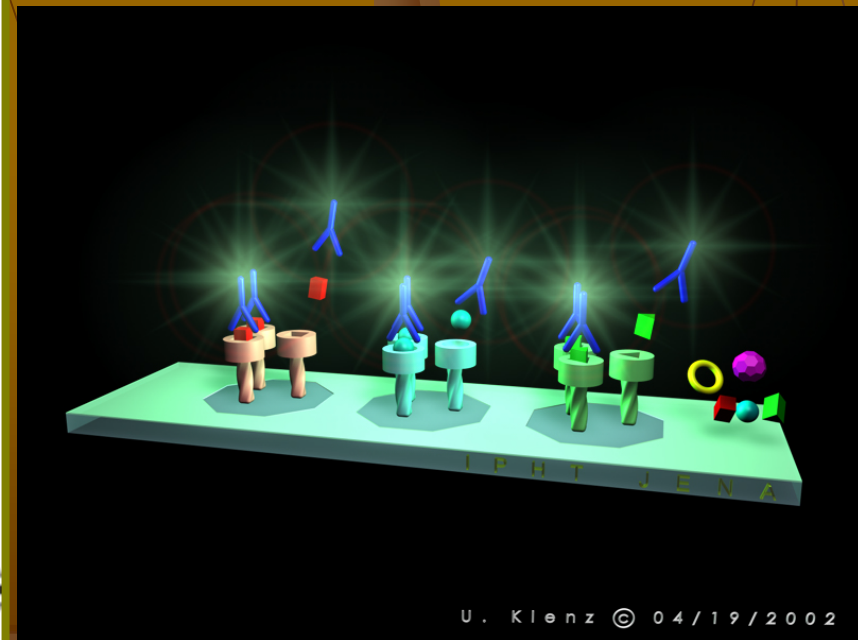
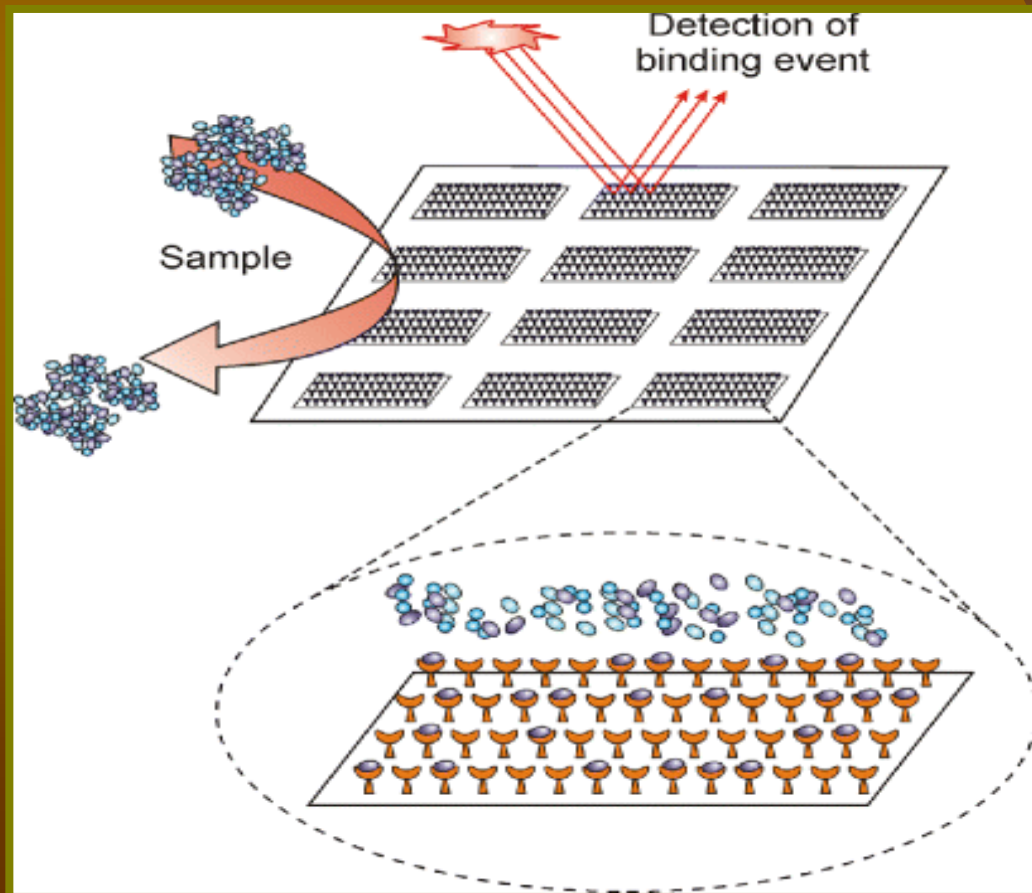
DNA
microarray

Arrays basati su sequenze
specifiche della specie fungina
(screening di funghi) o su
sequenze che codificano per
enzimi implicati nella produzione
di micotossine

- Screening di funghi e di
micotossina sul singolo campione

Microarray di proteina

- ✓analisi SEMIQUANTITATIVA:
- ✓Tecnica multiparametrica sul singolo campione che permette di rilevare TUTTI i funghi tossigeni e/o TUTTE le micotossine per i quali siano stati determinati anticorpi specifici



Procedura standard per la determinazione analitica delle micotossine



ESTRAZIONE DEL CAMPIONE

Omogeneizzare e pesare il campione

Miscelare con il solvente di estrazione (acqua-metanolo o acetonitrile)

Filtrare



DILUIZIONE E FILTRAZIONE

Diluire un'aliquota del campione estratto (acqua o PBS)

Filtrare



IMMUNOAFFINITÀ

Passare il filtrato attraverso la colonna di immunoaffinità

Lavare la colonna con opportuno solvente

Eluire le micotossine con METANOLO o ACETONITRILE



QUANTIFICAZIONE

Iniettare in HPLC

FASE DI ESTRAZIONE

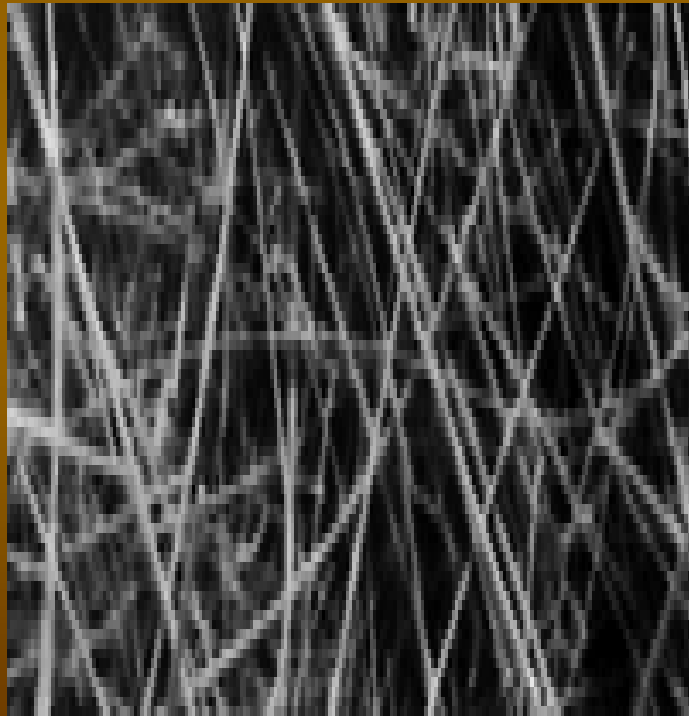
- ❖ **SOLUZIONI ACQUOSE DI SOLVENTI ORGANICI (ALCOL METILICO – ACETONITRILE)**
- ❖ **SOLUZIONI ACQUOSE DI SALI ALCALINI (CLORURO DI SODIO, BICARBONATO DI SODIO)**
- ❖ **SOLVENTI ALOGENATI (DICLOROMETANO, CLOROFORMIO)**



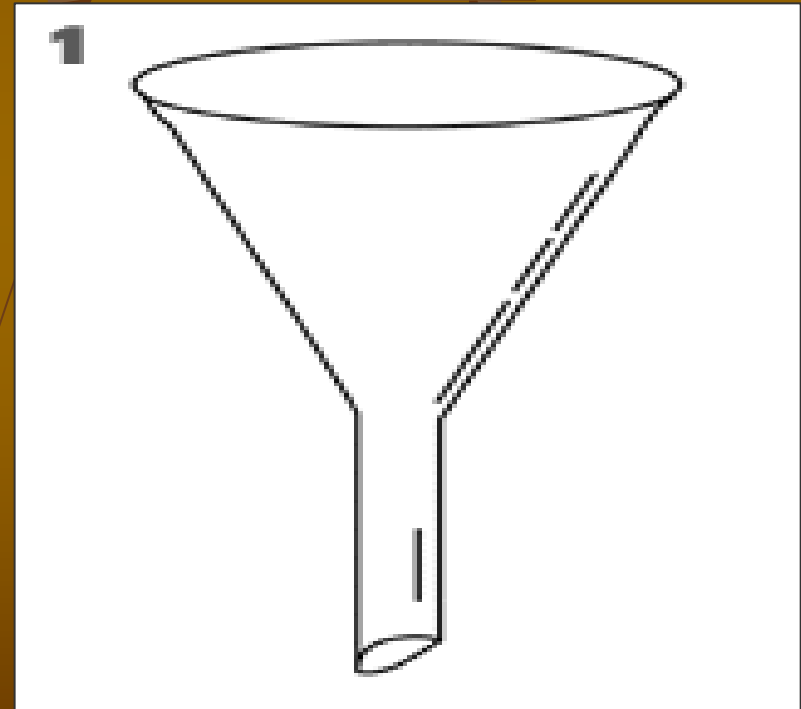
FASE DI ESTRAZIONE

- ❖ **AGITAZIONE CON ULTRATURRAX O BLENDER (3' MAX)**
- ❖ **OMOGENEIZZAZIONE CON AGITATORE A BRACCIA (30'-45')**
- ❖ **CENTRIFUGAZIONE**

FILTRAZIONE

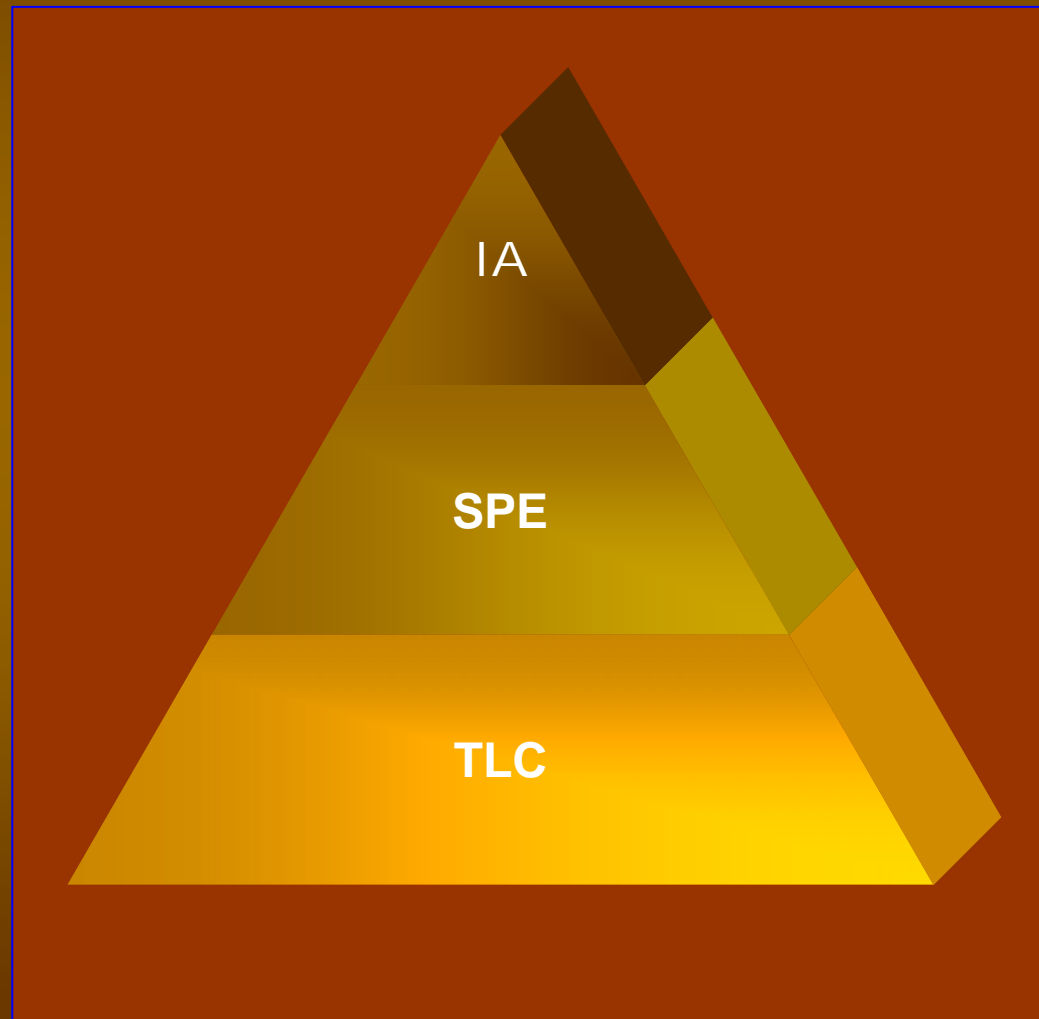


Glass Microfiber (GMF) Filters

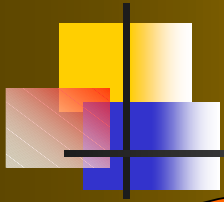


Filtro a pieghe

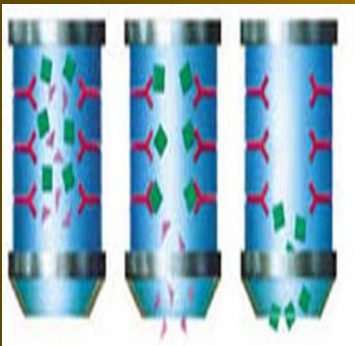
FASE DI PURIFICAZIONE



Purificazione per IA

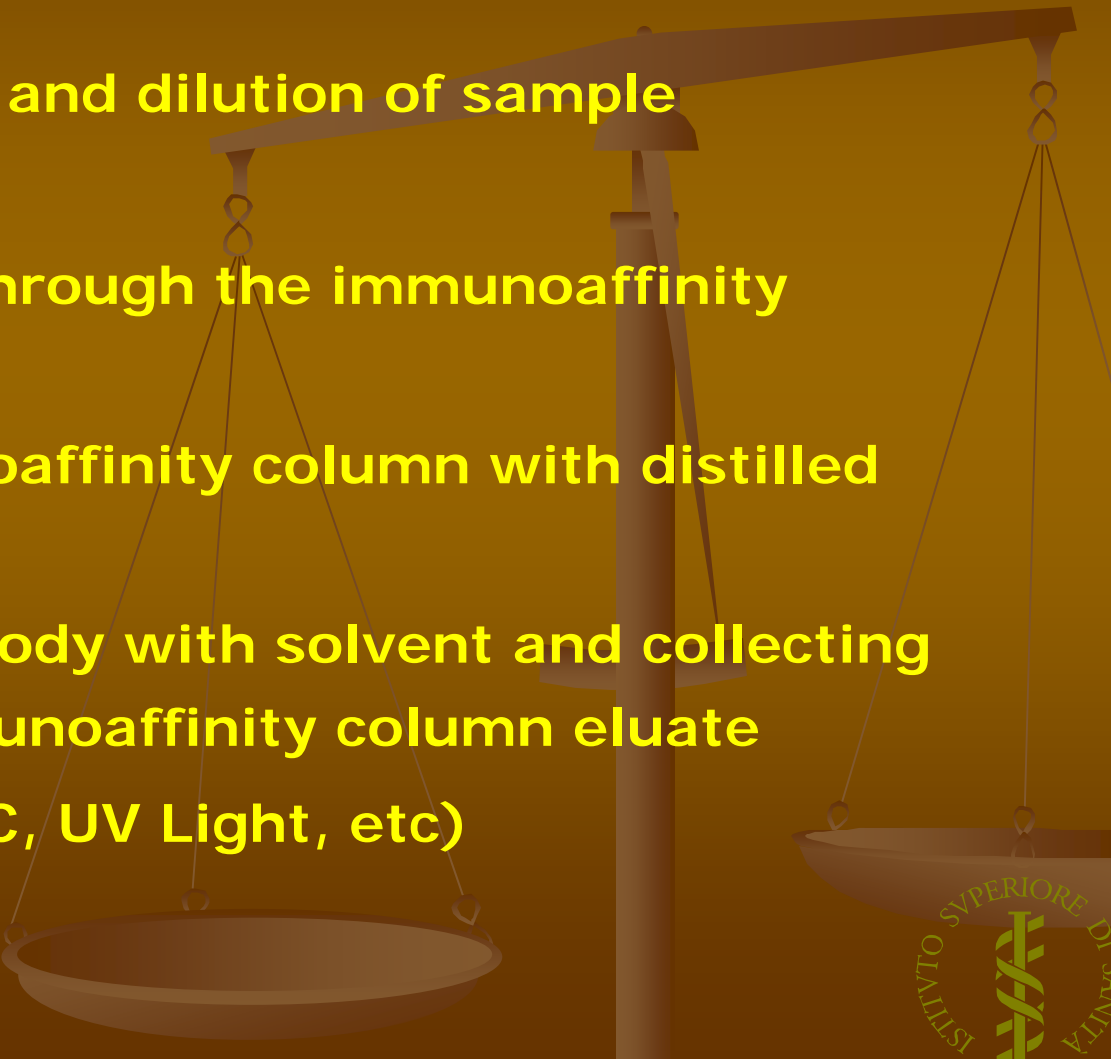


FILTRATO + PBS



HPLC

Basic steps of immunoaffinity column procedure

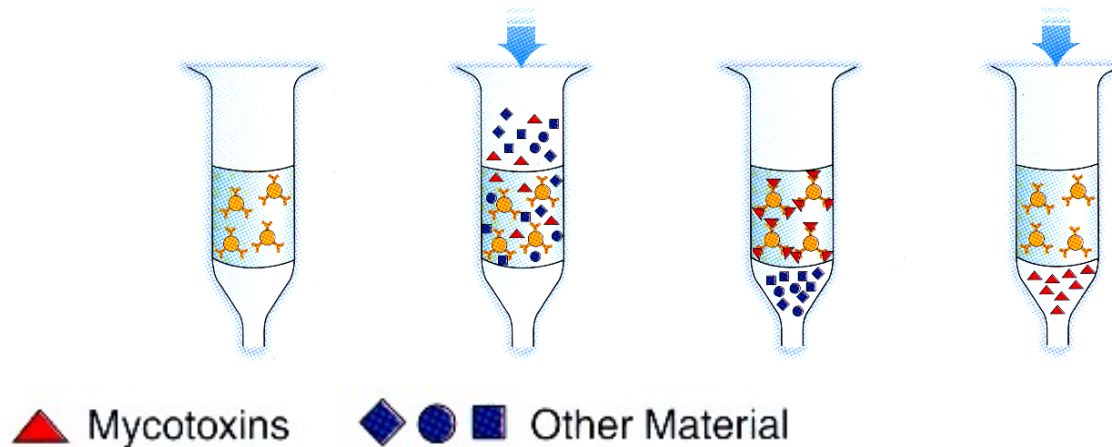
- 
- Blending, extraction and dilution of sample
 - ✧ Filtration
 - ✧ Passage of sample through the immunoaffinity column
 - ✧ Washing the immunoaffinity column with distilled water
 - ✧ Destroying the antibody with solvent and collecting the toxin in the immunoaffinity column eluate
 - ✧ Detection (HPLC, TLC, UV Light, etc)

Rapid Immunoaffinity Columns for **AFLATOXIN** Analysis

Screening & Confirmation

RDT immunoaffinity columns set the international standard for performance

The principle of immunoaffinity column technology



The immunoaffinity column contains a monoclonal antibody which is specific to a particular mycotoxin.

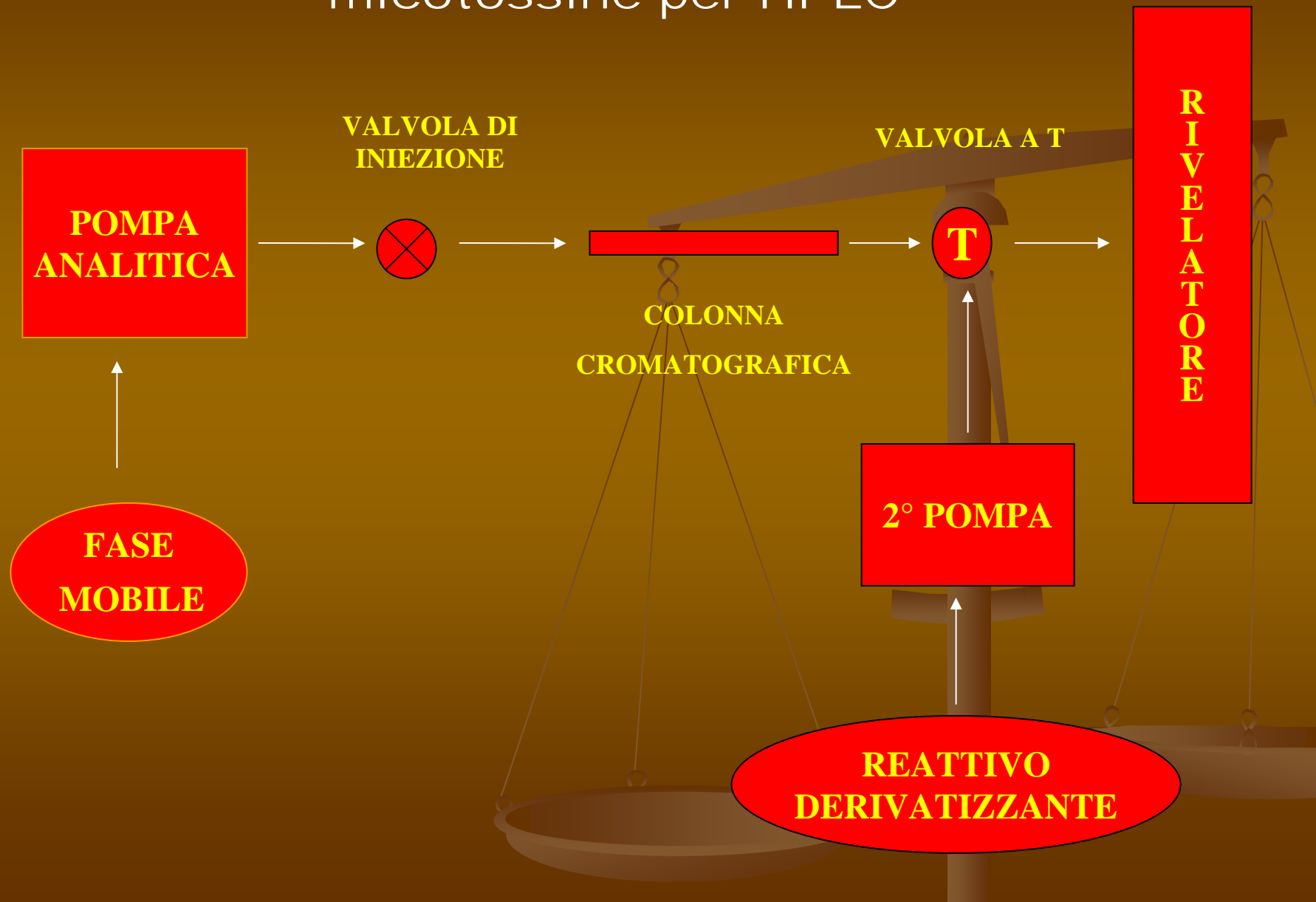
The sample extract containing the mycotoxin is passed through the column.

The antibody isolates and concentrates the mycotoxin and retains it in the column.

Passage of an eluant through the column denatures the antibody and releases the mycotoxin for analysis.

BACK FLUSHING

Schema generale per la valutazione delle micotossine per HPLC



ANALISI QUANTITATIVA (HPLC)

FASI INVERSE C18 – C8 - ENDCAPPED

FASI MOBILI ACQUA - ACETONITRILE - ALCOL METILICO

FLUSSI 0.8 – 1.2 ML/MIN

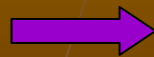
Derivatizzazione delle Aflatossine

PRE-COLONNA



EMIACETALE (acido
trifluoroacetico TFA)

POST-COLONNA



IODIO/BROMO
DERIVATO

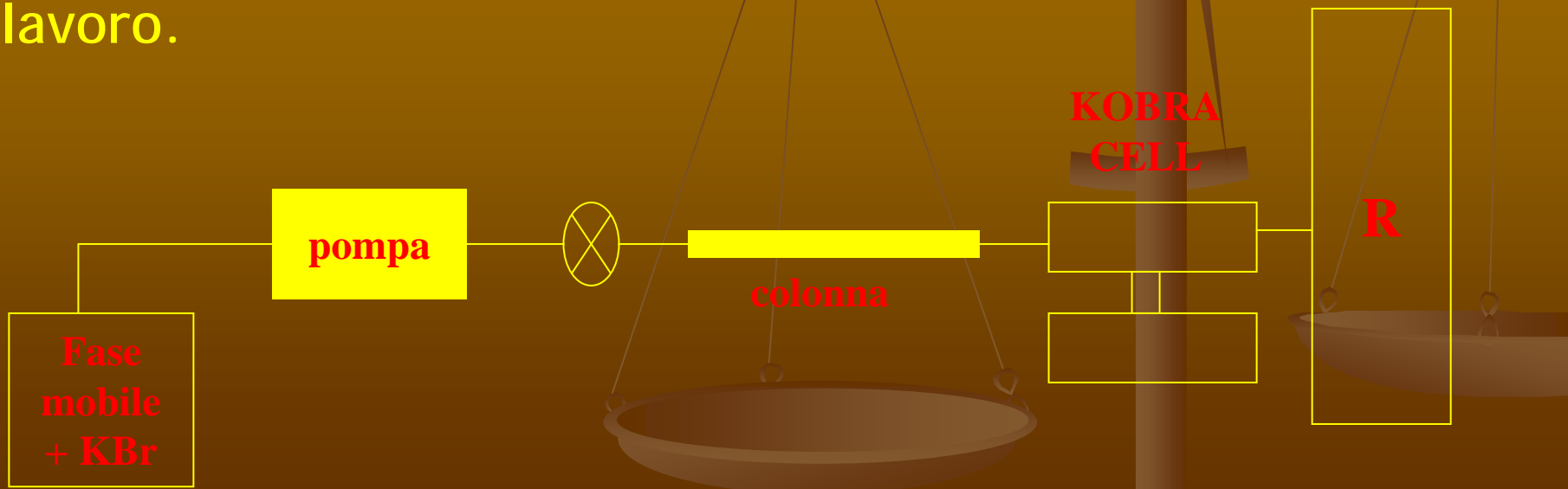
Derivatizzazione post colonna

- ✓ **Formazione dello IODIO derivato utilizzando una soluzione satura di iodio.**
- ✓ **Formazione del BROMO derivato utilizzando:**
 - **Pyridine hydrobromide perbromide (PBPB)***
 - **KOBRA CELL (formazione elettrochimica)**

★ *Dissolvere 25 mg di PBPB in 500 ml di acqua. Mantenendo la soluzione al buio, la si può utilizzare per quattro giorni.*

PRINCIPIO DELLA KOBRA CELL

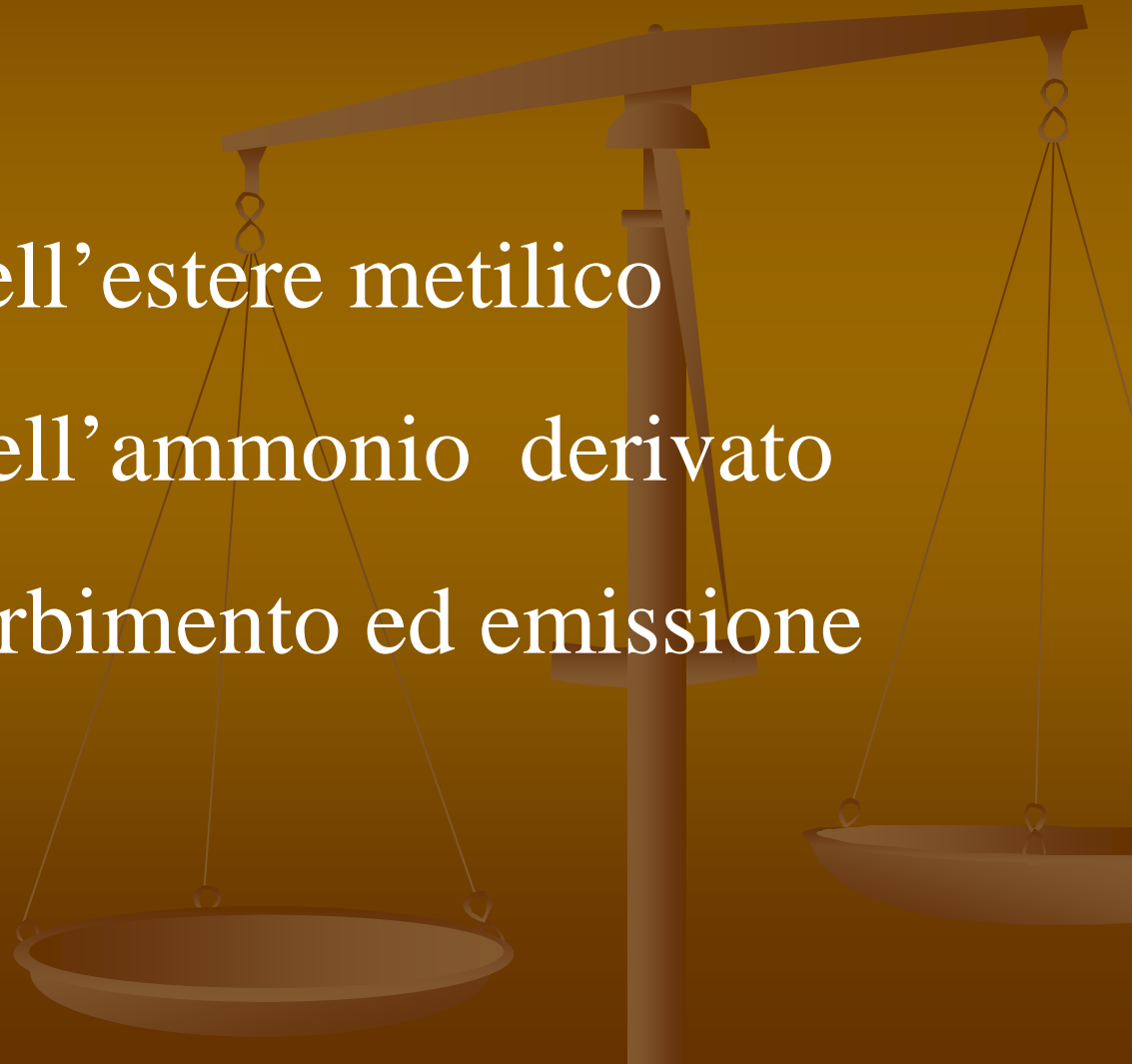
Il principio della tecnica consiste nel far passare nella KOBRA CELL la fase mobile contenente un sale di bromo (precursore dell'agente derivatizzante) e le aflatossine; il sistema genera bromo Elettrochimicamente applicando un potenziale costante agli elettrodi di lavoro.



	Vantaggi	Svantaggi
<p>TFA</p> <p>DERIV. PRE-COLONNA</p> <p>Formazione dell'emiacetale per addizione di acqua al doppio legame furanico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede una sola pompa per HPLC 	<ul style="list-style-type: none"> • Pericolosità dell'acido trifluoroacetico • Scarsa ripetibilità • Possibile perdita di tossine per adsorbimento sul vetro e per eventuale dispersione nell'ambiente
<p>I₂</p> <p>DERIV. POST-COLONNA</p> <p>Soluzione satura di iodio è pompata dalla pompa B (0.7 ml/min), la reazione avviene in un tubo di Teflon termostato (60°C)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Metodica ufficiale per i mangimi Dir. Com. 92/95/CEE GUCE L 327/54 del 13.11.92 • Automatizzazione della procedura • Attendibilità e ripetibilità 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede una seconda pompa HPLC ed un bagno termostatico • E' necessario preparare la soluzione di fresco • La manutenzione e la pulizia delle linee è cruciale onde evitare formazione di cristalli di iodio
<p>PBPB</p> <p>DERIV. POST-COLONNA</p> <p>Soluzione di PBPB (0.05mg/ml) pompata dalla pompa B (0.4ml/min)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Attendibilità e ripetibilità • T ambiente e tempi di analisi brevi • Procedura in corso di validazione • Maggiore stabilità [4 giorni] 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede una seconda pompa HPLC • La manutenzione e la pulizia delle linee è necessaria onde evitare formazione di cristallizzazione
<p>Kobra Cell</p> <p>DERIV. POST-COLONNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non è necessaria una seconda pompa per HPLC • Assenza di agenti derivatizzanti 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo per uno strumento dedicato • Manutenzione

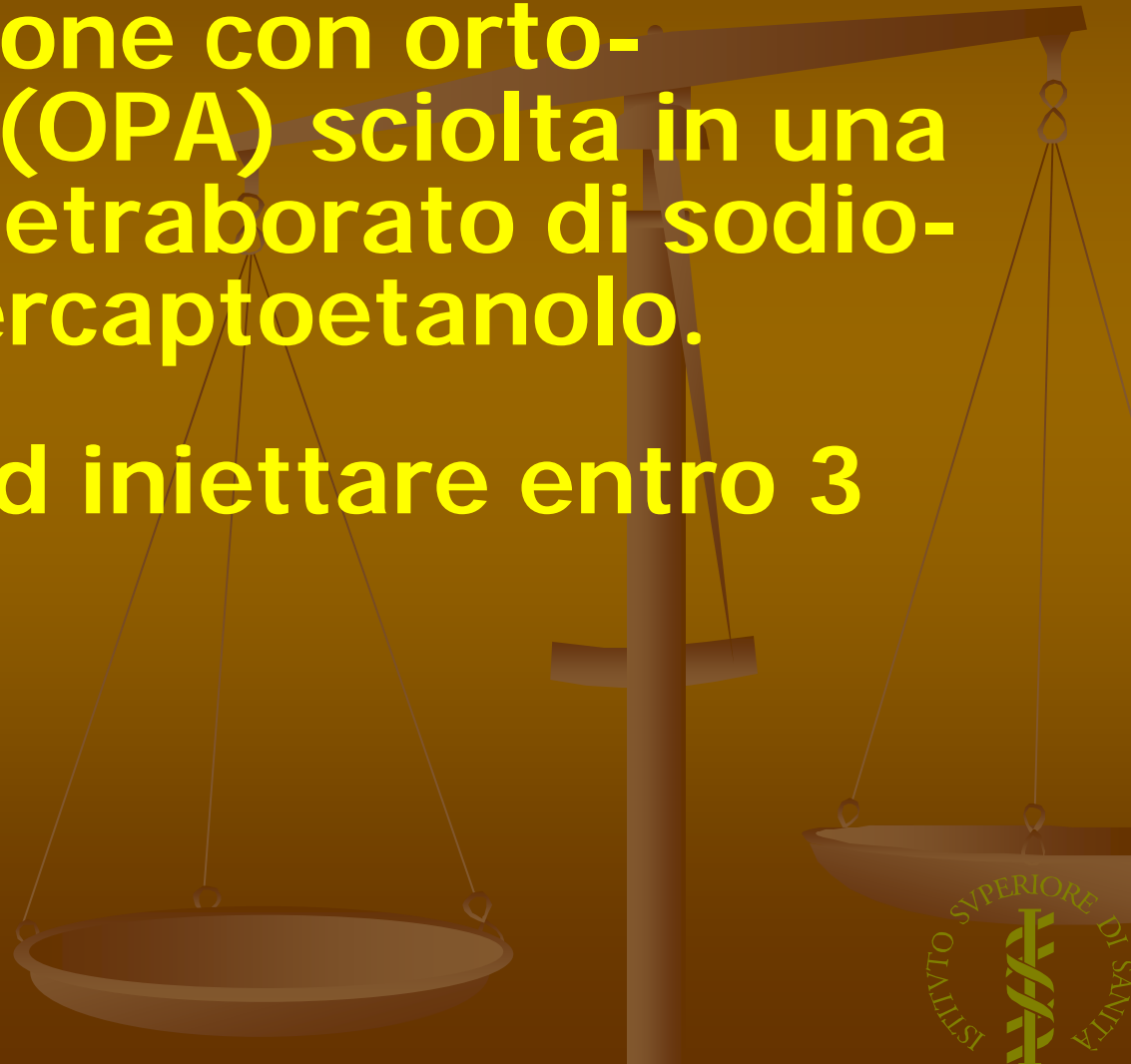
Ocratossina A

- Formazione dell'estere metilico
- Formazione dell'ammonio derivato
- Spettri di assorbimento ed emissione



Fumonisine

- ✓ **Derivatizzazione con orto-ftaldialdeide (OPA) sciolta in una soluzione di tetraborato di sodio-metanolo-mercaptoetanololo.**
- ✓ **Far reagire ed iniettare entro 3 minuti**



ESPRESSIONE DEL RISULTATO
Commission Directive 2003/121/EC

- 🕶 **CALCOLO DEI
FATTORI DI
RECUPERO**
- 🕶 **CALCOLO DELLA
INCERTEZZA**

Criteri di accettazione di un lotto

5.2.2. Accettazione di una partita o sottopartita

- Per le arachidi, i frutti a guscio, la frutta secca e il granoturco destinati alla selezione o ad altri trattamenti fisici nonché per le spezie:
 - accettazione, se il campione globale o la media dei sottocampioni sono conformi al limite massimo, **tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero,**
 - rifiuto, se il campione globale o la media dei sottocampioni superano il limite massimo **al di là di un ragionevole dubbio tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero.**
- Per le arachidi, i frutti a guscio, la frutta secca e i cereali destinati al consumo umano diretto e i cereali, ad eccezione del granoturco, destinati ad essere selezionati o subire altri trattamenti fisici:
 - accettazione, se nessuno dei sottocampioni supera il limite massimo, tenendo conto **dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero,**
 - rifiuto, se uno o più dei sottocampioni superano il limite massimo **oltre un ragionevole dubbio tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero,**
- nel caso di un campione globale < 10 kg:
 - accettazione, se il campione globale è conforme al limite massimo, tenendo conto **dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero,**
 - rifiuto, se il campione globale supera il limite massimo **oltre un ragionevole dubbio tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero.**

Calcolo dei fattori di recupero

- **IL RISULTATO ANALITICO DEVE ESSERE RIPORTATO CORRETTO O NON CORRETTO PER IL RECUPERO.**
- **IL LIVELLO DI RECUPERO DEVE ESSERE RIPORTATO.**
- **PER LA VALUTAZIONE DELLA CONFORMITÀ SARÀ USATO IL RISULTATO ANALITICO CORRETTO PER IL RECUPERO**

Incertezza (approccio fit-for-purpose)

- nel caso di mancanza di metodi di analisi validati da prove interlaboratorio, potrà essere utilizzato il concetto di funzione di incertezza che specifica i livelli massimi di incertezza considerati come adatti allo scopo $U_f = [(LR/2)^2 + (a \times C)^2]^{1/2}$
dove a =fattore numerico costante dipendente da C
 LR =limite di rivelazione
- Il risultato analitico dovrà essere espresso come
 $X \pm U$ (incertezza espansa)
Dove $U = 2U_c$
 $U_c = \Sigma U$ (camp+prepcamp+anal)

DIRETTIVA 2003/121/CE DELLA COMMISSIONE

del 15 dicembre 2003 che modifica la direttiva 98/53/CE che fissa metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari

ALLEGATO II

Nell'allegato II della direttiva 98/53/CE, il punto 4.4. è sostituito dal seguente testo:

«4.4. Calcolo del tasso di recupero e registrazione dei risultati

Il risultato analitico viene registrato, sotto forma corretta o meno, sotto l'aspetto del recupero. Devono essere indicati il modo di registrazione ed il tasso di recupero. Il risultato analitico corretto per il recupero è usato per verificare la conformità (cfr. allegato I, punti 5.2.2, 5.3.2, 5.4.2, 5.5.1.2 e 5.5.2.3).

Il risultato analitico viene registrato secondo la formula $x \pm U$, in cui x è il risultato analitico e U l'incertezza di misurazione ampliata, utilizzando un fattore di copertura di 2, da cui risulta un livello di affidabilità di circa 95 %.»

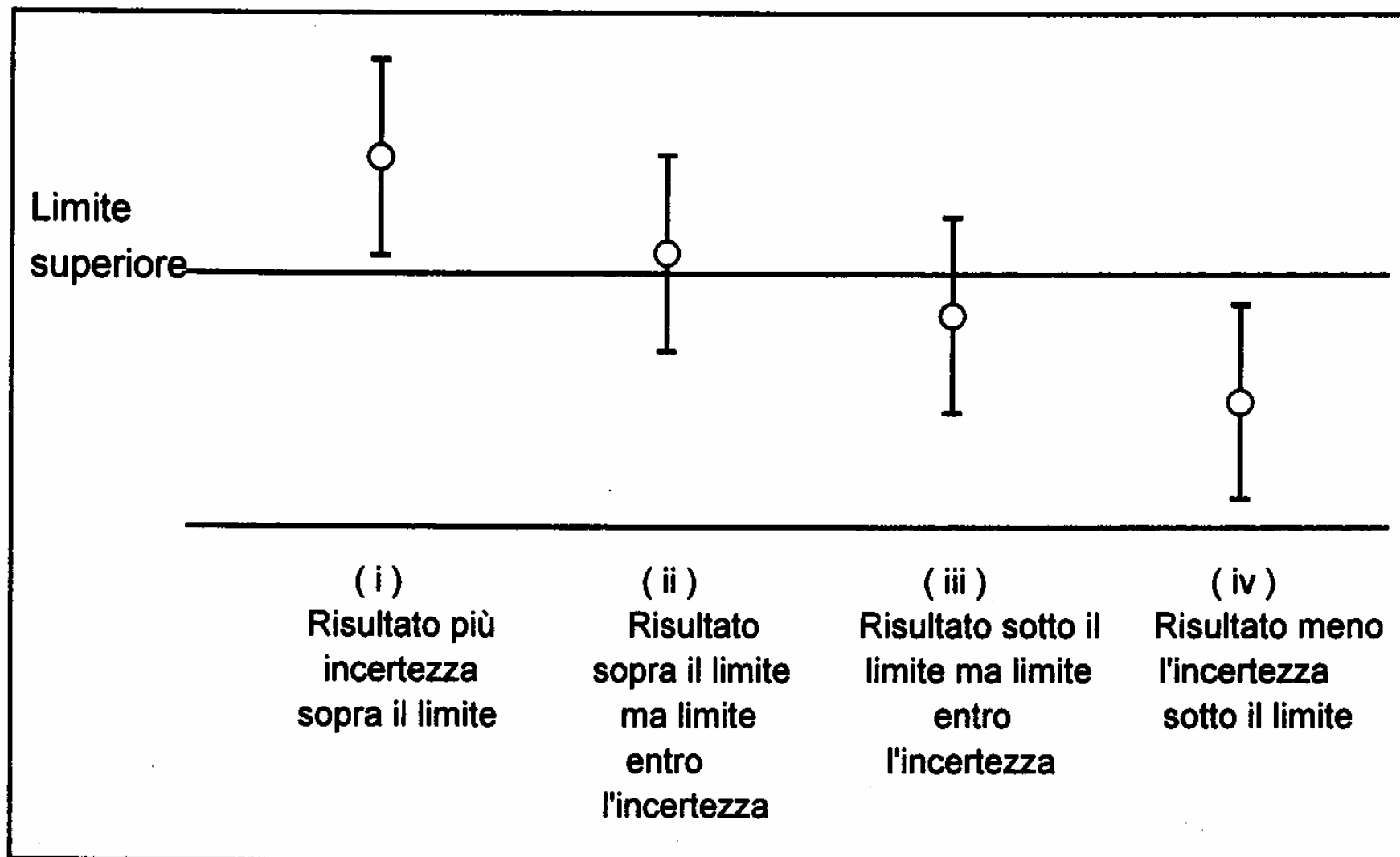


Figura 2: Incertezza e conformità ai limiti

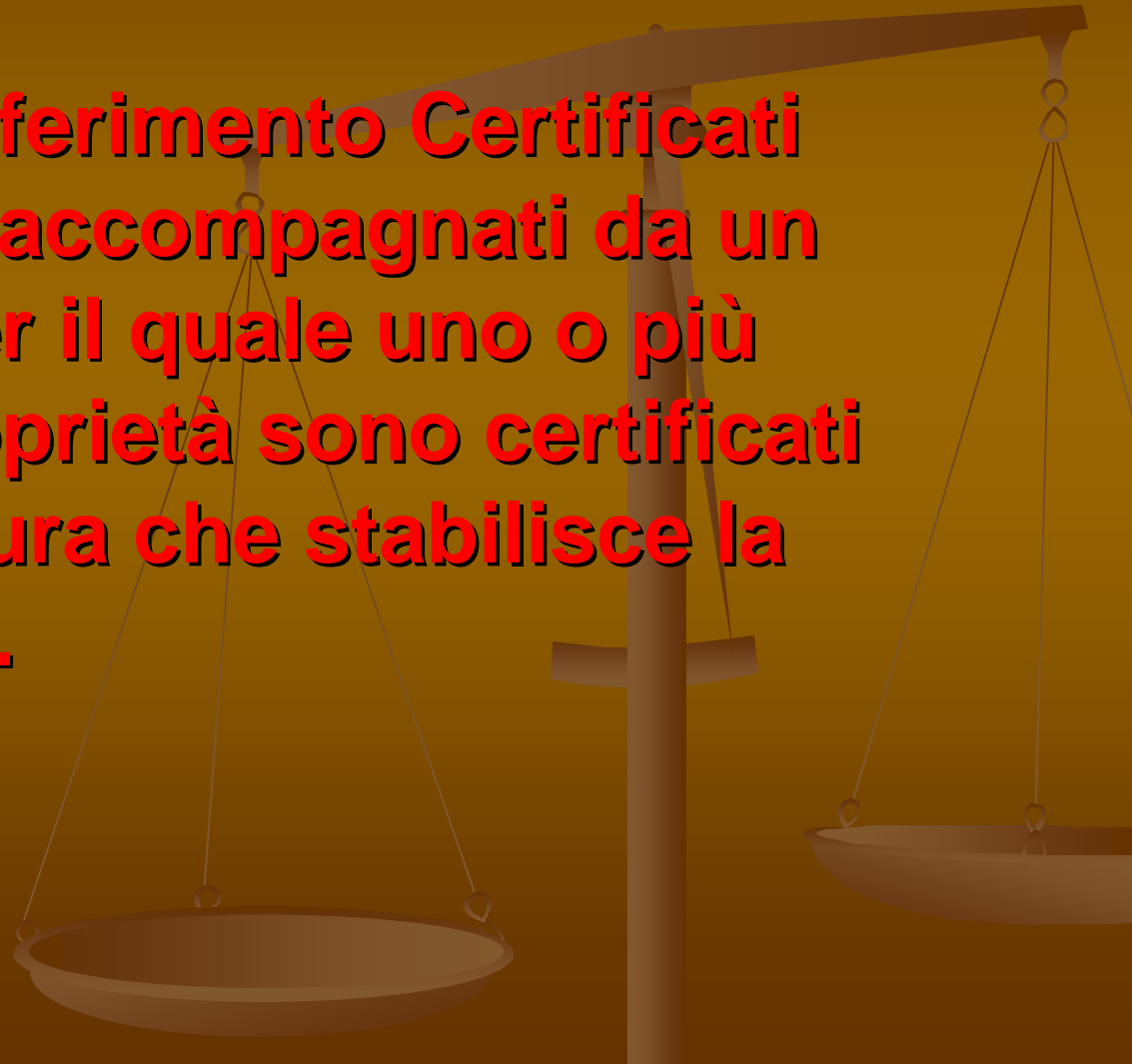
VALUTAZIONE DELLA ACCURATEZZA

- MRC e/o MR
- PROFICIENCY TESTING
- CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI (SPIKES)

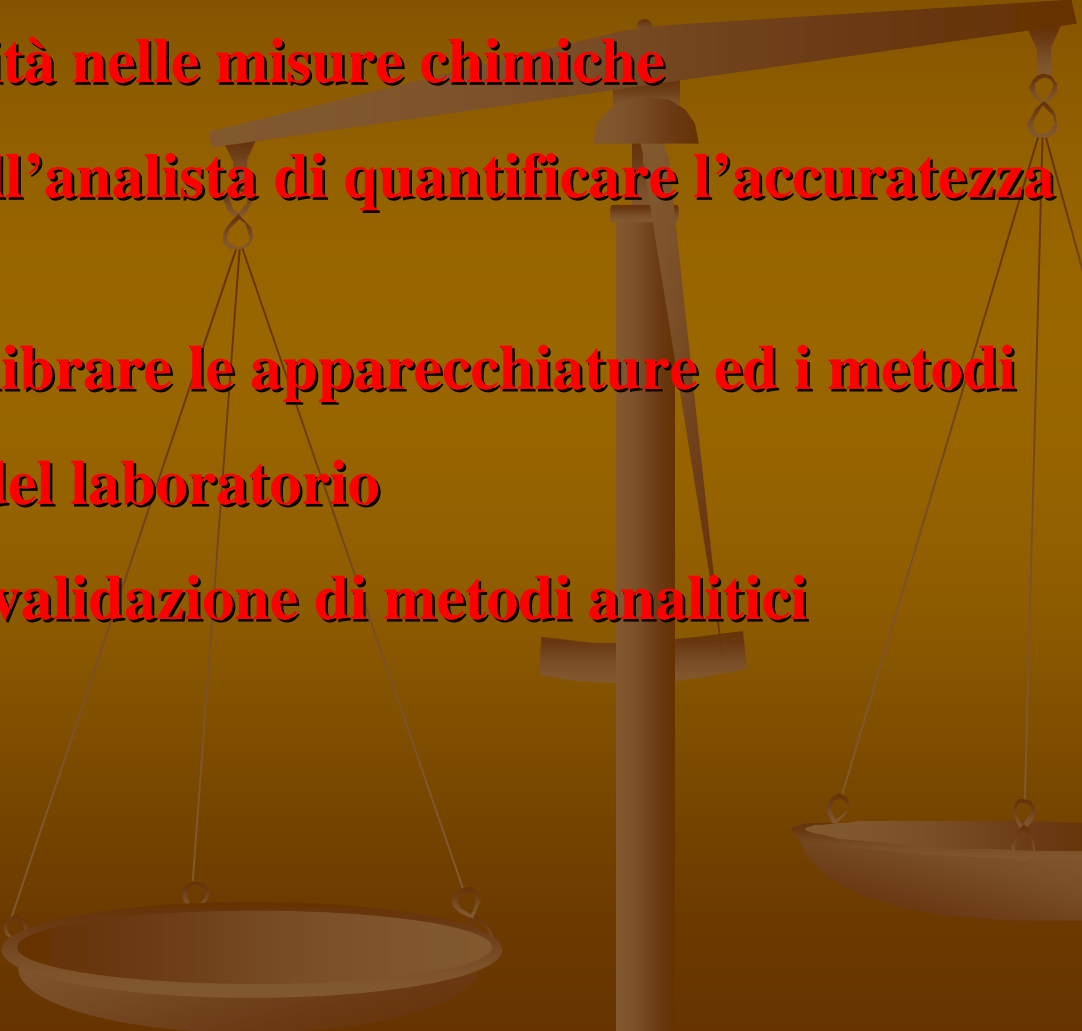


CRM

I Materiali di Riferimento Certificati sono materiali accompagnati da un documento, per il quale uno o più valori delle proprietà sono certificati da una procedura che stabilisce la loro riferibilità .



Perché i materiali di riferimento sono così utili?

- 
1. Procurano la riferibilità nelle misure chimiche
 2. Danno la possibilità all'analista di quantificare l'accuratezza dei suoi risultati
 3. Sono necessari per calibrare le apparecchiature ed i metodi
 4. Testano la efficienza del laboratorio
 5. Sono necessari per la validazione di metodi analitici

MATERIALI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI DISPONIBILI

Internet: <http://www.irmm.jrc.be:8080/>

CRM	MATRICE	MICOTOSSINA
CRM 282	LATTE IN POLVERE	AFM1 $< 0.05 \pm \mu\text{g/kg}$
CRM 283	LATTE IN POLVERE	AFM1 $0.09 \pm 0.02 \mu\text{g/kg}$
CRM 284	LATTE IN POLVERE	AFM1 $0.31 \pm 0.06 \mu\text{g/kg}$
CRM 285	LATTE IN POLVERE	AFM1 $0.76 \pm 0.05 \mu\text{g/kg}$
CRM 401	BURRO DI ARACHIDI	AFB ₁ $< 0.2 \mu\text{g/kg}$ AFB ₂ $< 0.1 \mu\text{g/kg}$ AFG ₁ $< 0.1 \mu\text{g/kg}$ AFG ₂ $< 0.1 \mu\text{g/kg}$
CRM 385	BURRO DI ARACHIDI	AFB1 $7.0 \pm 0.8 \mu\text{g/kg}$ AFB2 $1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/kg}$ AFG1 $1.7 \pm 0.3 \mu\text{g/kg}$ AFG2 $0.3 \pm 0.2 \mu\text{g/kg}$
CRM 262	FARINA DI ARACHIDI DEGRASSATA	AFB1 $< 3.0 \mu\text{g/kg}$
CRM 263	FARINA DI ARACHIDI DEGRASSATA	AFB ₁ $43.3 \pm 2.8 \mu\text{g/kg}$
CRM 264	FARINA DI ARACHIDI DEGRASSATA	AFB1 $206 \pm 13 \mu\text{g/kg}$
CRM 375	MANGIMI COMPOSTI	AFB1 $< 1 \mu\text{g/kg}$
CRM 376	MANGIMI COMPOSTI	AFB1 $9.3 \pm 0.5 \mu\text{g/kg}$
CRM 377	FARINA DI MAIS	DON $< 50 \mu\text{g/kg}$
CRM 378	FARINA DI MAIS	DON $430 \pm 40 \mu\text{g/kg}$
CRM 396	FARINA DI GRANO	DON $< 50 \mu\text{g/kg}$
CRM 379	FARINA DI GRANO	DON $670 \pm 20 \mu\text{g/kg}$
CRM 471	GRANO	OA $< 0.6 \mu\text{g/kg}$
CRM 472	GRANO	OA $8.2 \pm 1.0 \mu\text{g/kg}$

Dr. Doris Florian

Commercialisation of Reference Materials and Methods &
Scientific Liaison

Institute for Reference Materials and Measurements

Retieseweg, B-2440 Geel, Belgium

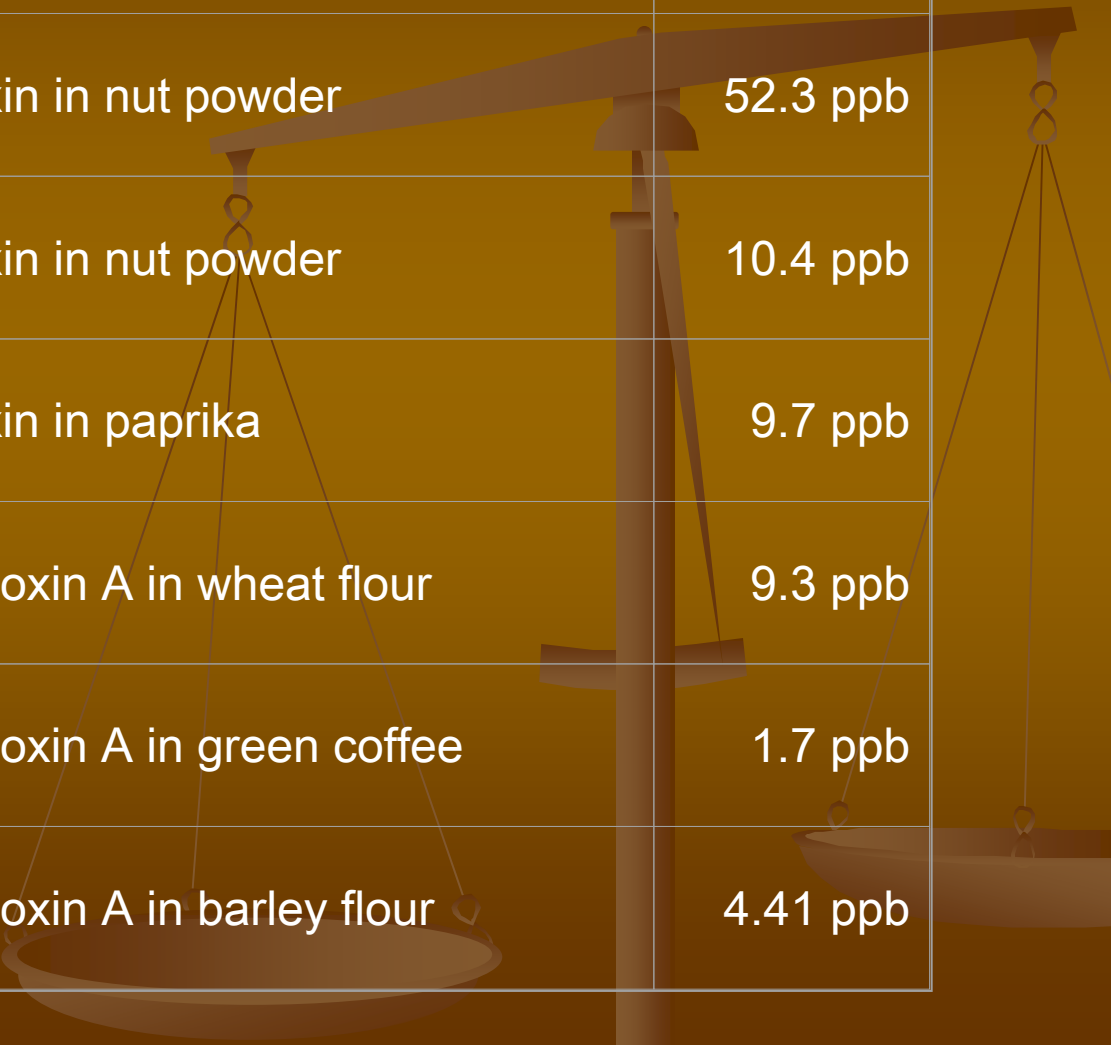
Phone +32(0)14 571-272

Fax +32(0)14 584-273

E-mail doris.florian@irmm.jrc.be



Matrices currently available



CODE Nº	BATCH	PRODUCT	µg/KG
P28	T0408	Aflatoxin in nut powder	52.3 ppb
P28	T0412	Aflatoxin in nut powder	10.4 ppb
P28	T0422	Aflatoxin in paprika	9.7 ppb
P29	T1702	Ochratoxin A in wheat flour	9.3 ppb
P29	T1704	Ochratoxin A in green coffee	1.7 ppb
P29	T1705	Ochratoxin A in barley flour	4.41 ppb

Materiali di riferimento

<i>Numero di riferimento</i>	<i>Matrice</i>	<i>Analita</i>
T0437	Mais	Aflatossine totali (C_{TOT} 3.66 ppb)
T0438	Semi di girasole	Aflatossine totali (C_{TOT} 3.74 ppb)
T1610 e T1611	Succo di mela (chiaro)	Patulina
T1612	Purea di mela (Baby food)	Patulina
	Succo di mela (opalescente)	Patulina
T1712	Caffè verde	Ocratossina A
T1715	Caffè tostato	Ocratossina A
T1714	Uva passa	Ocratossina A
T2206	Mais	Zearalenone
T2207	Farina di grano	DON

Dove acquistare i Materiali di Riferimento del FAPAS

**ORSELL s.r.l.
41012 CARPI (Modena)
Via B. Peruzzi, 26
Tel. 059-652504 - Fax 059-652330
E-mail: rinaldi@orsell.it
Dr Matteo Rinaldi**



Criteri per la scelta di un metodo immunologico



Necessità di un metodo rapido di screening

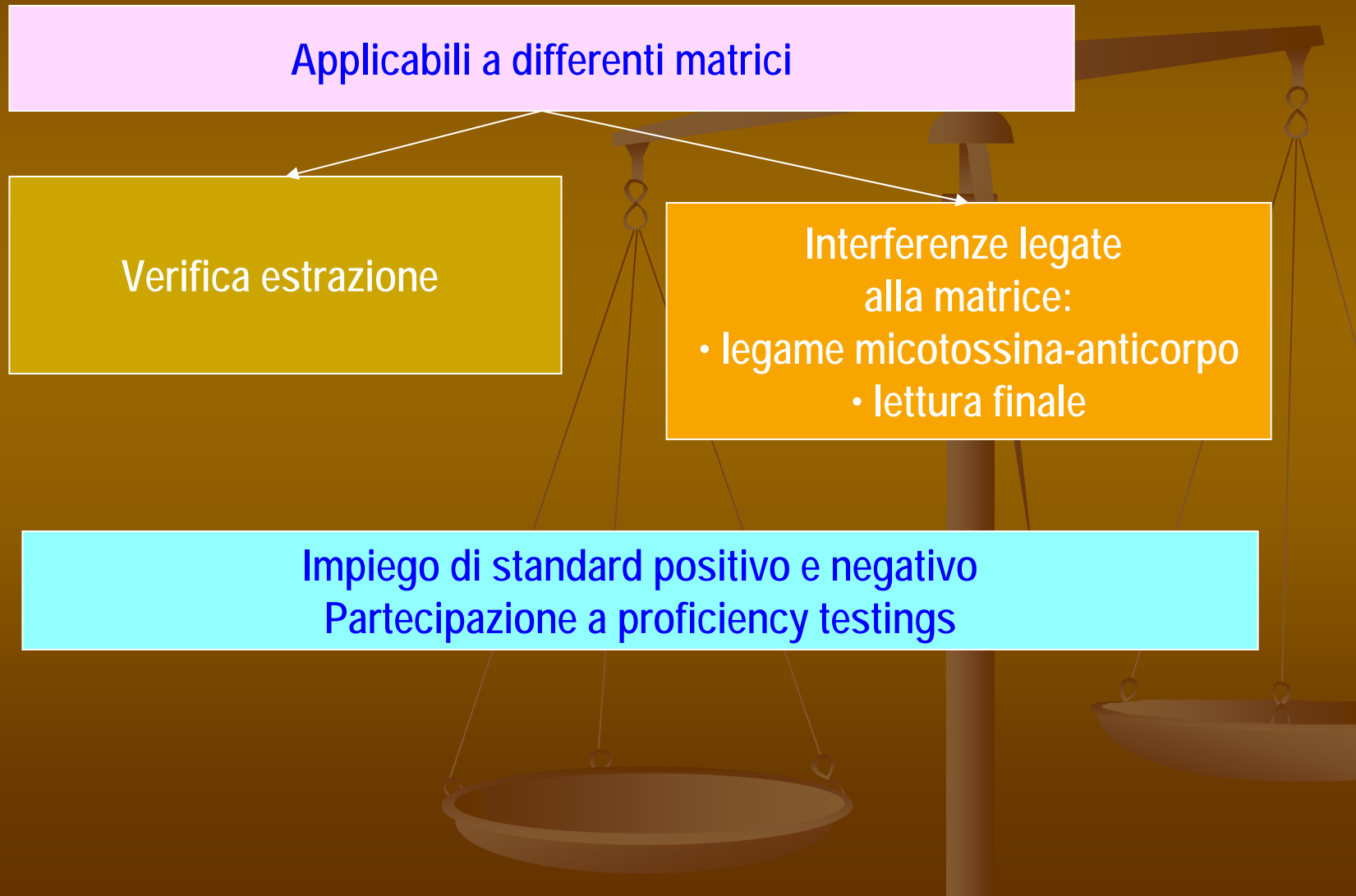
Un metodo di screening viene definito come un metodo che permette di eliminare velocemente un gran numero di campioni negativi con lo scopo di ridurre il numero di analisi da effettuare con una metodica più accurata

Percentuale di falsi
negativi prossima
allo zero

Rapidità di esecuzione

Costi contenuti

Necessità di utilizzare una metodica facilmente adattabile a diversi tipi di matrici alimentari



Fornitori kit diagnostici

Diessechem	Via Meucci, 61/b - 20128 MILANO Tel. 02 26305484 E-mail: diessefood@diessechem.com Internet: www.diessechem.com
ORSELL s.r.l.	Via B. Peruzzi, 26 - 41012 CARPI (Modena) Tel. 059 652504 - Fax 059 652330 E-mail: rinaldi@orsell.it Dr Matteo Rinaldi www.rbiopharmrhone.com
Safe Food – L&N srl	Via S. Vitale , 41 – 43030 S. Vitale Baganza (PR) Tel. 0521 830123 E-mail: matteo.luppi@safefood.it Internet: www.safefood.it Dr Matteo Luppi
Tecna	Area Science Park - Padriciano, 99 34012 Trieste - Italy Tel. 040 3755341 Internet: www.tecnalab.com E-mail: tecna@tecnalab.com Dr Maurizio Paleologo



Carlo Brera

Istituto Superiore di Sanità

Reparto OGM e Xenobiotici di origine fungina

Tel. e Fax 06 49902377

E-mail: carlo.brera@iss.it