


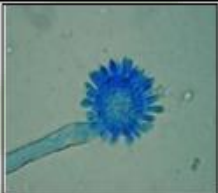

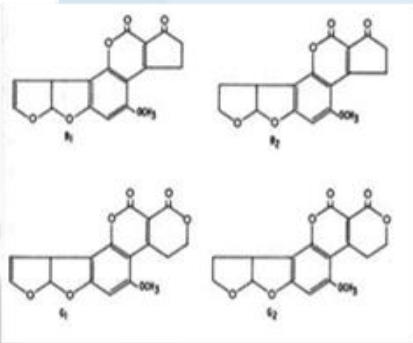

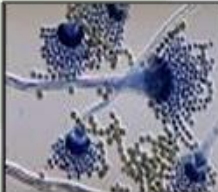


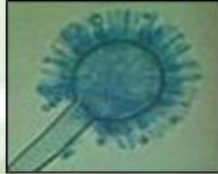

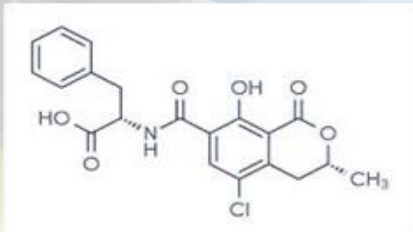



Ricerca di micotossine: metodo immunoenzimatico e analisi HPLC

WP3 - Controllo della qualità dei prodotti fermentati attraverso l'analisi microbiologica e chimica delle olive e delle salamoie di fermentazione.

Task 3 – Task leader: Dott.ssa L. Di Giacinto, (CREA-IT PESCARA). Collaborazione con Dott.ssa Tiziana Monforte (Agenzia Dogane e Monopoli - Laboratorio Chimico di Palermo).

Task 3.1 – Partecipanti: Dott. A. Cammerata, Dott.ssa V. Del Frate. (CREA-IT ROMA)

Introduzione

			<i>Aspergillus parasiticus</i> (Aflatossine B1, B2, G1 e G2)	
			<i>Aspergillus flavus</i> (Aflatossina B1 e B2)	
			<i>Aspergillus ochraceus</i> (Ocratossina A)	
			<i>Penicillium verrucosum</i> (Ocratossina A)	

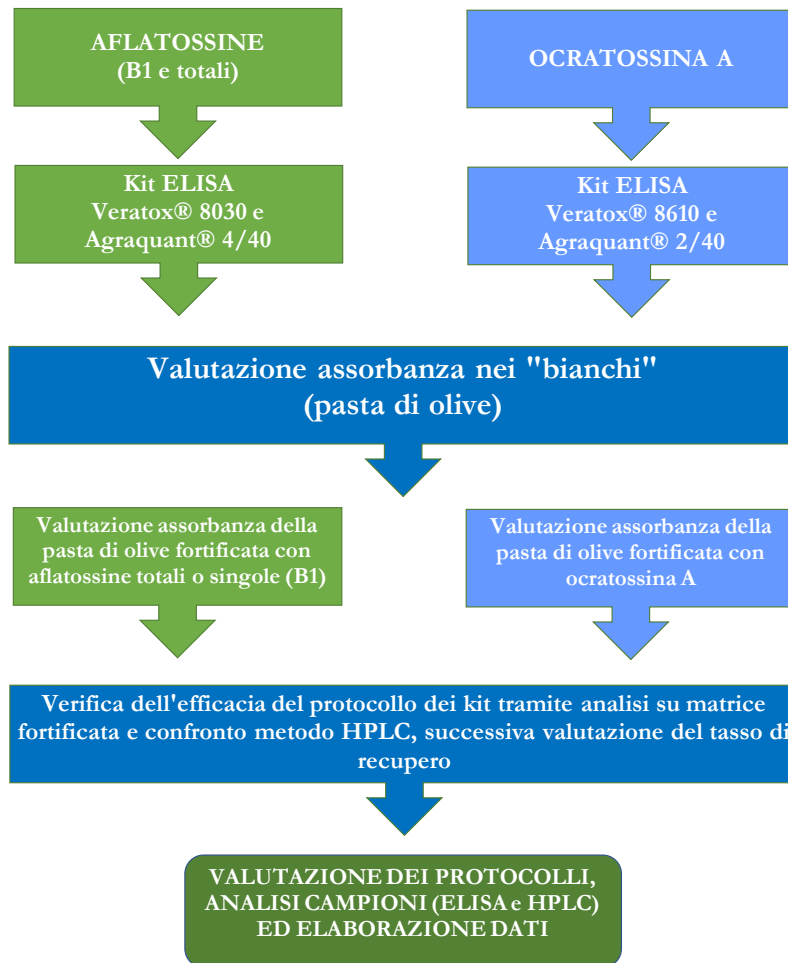
Obiettivi

1. Valutazione dell'eventuale applicabilità di alcuni metodi ELISA nell'analisi di aflatossine e ocratossina A nelle olive da mensa. Il confronto con l'analisi cromatografica potrà costituire una premessa importante per un'ulteriore validazione sulla matrice "olive" dei metodi stessi;
2. Valutazione del grado di diffusione e dei livelli di contaminazione delle micotossine d'interesse su campioni di olive di diverso tipo (varietà, provenienza, ecc.)



Descrizione attività, materiali e metodi

PRIMA FASE



Pasta di olive

Prelievo di 3 g e aggiunta di 15 ml Metanolo 70% v/v in acqua

Agitazione Vortex

Filtrazione e successiva centrifugazione

Prelievo 8 ml ed evaporazione con Rotovapor[®]

Campione risospeso con 3 ml di Metanolo 70% v/v in acqua

Prelievo di 2 ml di campione e aggiustamento del pH (6÷7)

ANALISI ELISA KIT Veratox[®] e Agraquant[®]: AFLATOSSINE E OCRATOSSINA A

Risultati preliminari su campioni commerciali **AFLATOSSINE TOTALI**

I° STEP - Prove su campioni di olive **NON fortificati (bianchi)**; la matrice non ha prodotto interferenze nel riconoscimento antigene-anticorpo

II° STEP – Prove su campioni **fortificati**; conferma su quanto osservato sui bianchi (buon riscontro delle concentrazioni ottenute rispetto a quelle attese).

Il kit Veratox® ha una specificità di reazione maggiore nei confronti delle aflatoSSine B1 e B2, mentre per l'AgraQuant® la percentuale di specificità è articolata:

AFLA B1 = 100%, AFLA B2 = 65%, AFLA G1 = 70% e AFLA G2 = 42%.

Estrazione delle micotossine con **alcol metilico 70% v/v in acqua.**

Veratox®	n. campioni = 3	recupero medio = 55% ± 4 (AFLA totali)
AgraQuant®	n. campioni = 3	recupero medio = 55% ± 6 (AFLA totali)
AgraQuant®	n. campioni = 1	recupero = 76% (AFLA B1)

Veratox®: LOQ= 5 µg/kg; AgraQuant®: LOQ= 4 µg/kg

Risultati preliminari su campioni commerciali OCRATOSSINA A

I° STEP - Prove su campioni di olive **NON fortificati (bianchi)**; la matrice non ha prodotto interferenze nel riconoscimento antigene-anticorpo

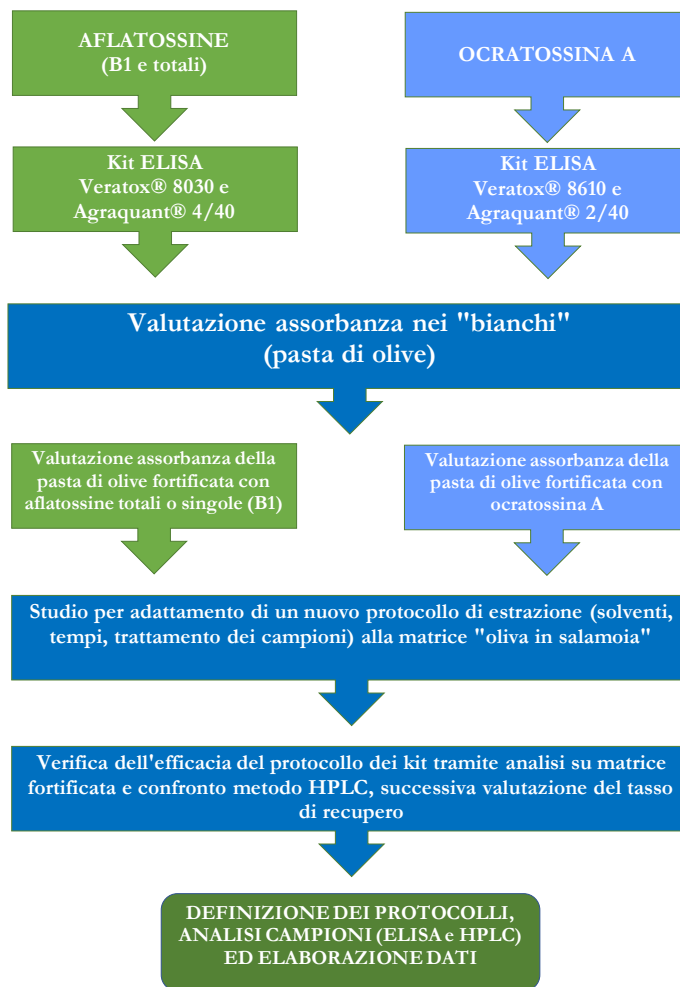
II° STEP – Prove su campioni **fortificati**; confermano quanto osservato sui bianchi. I risultati non sono stati soddisfacenti per entrambi i kit (Veratox® e AgraQuant®) con **recupero % \leq 40%**.

Estrazione delle micotossine con **alcol metilico 70% v/v in acqua**.

Veratox®: LOQ= 2 µg/kg; AgraQuant®: LOQ= 2 µg/kg

Descrizione attività, materiali e metodi

SECONDA FASE



Pasta di olive

Prelievo di 3 g e aggiunta di 15 ml Diclorometano
(maggiore potere estraente rispetto alcol metilico 70% v/v in acqua)

Agitazione Vortex

Filtrazione e successiva centrifugazione

Prelievo 8 ml ed evaporazione con Rotovapor[®]

Campione risospeso con 3 ml di Metanolo assoluto

Prelievo di 2 ml e aggiunta di acqua deionizzata (per conc. Metanolo 70%)

Centrifugazione e prelievo di 2 ml di campione e aggiustamento del pH (6÷7)

ANALISI ELISA KIT Veratox[®] e Agraquant[®]: AFLATOSSINE E OCRATOSSINA A

Prove dopo modifica metodo

concentrazioni comprese tra 6 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Veratox®	n. campioni = 6	recupero medio = 71% \pm 11 (AFLA B1)
AgraQuant®	n. campioni = 6	recupero medio = 91% \pm 20 (AFLA B1)

concentrazioni comprese tra 5 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Veratox®	n. campioni = 17	recupero medio = 55% \pm 7 (OTA)
AgraQuant®	n. campioni = 15	recupero medio = 79% \pm 13 (OTA)

RISULTATI sui campioni del progetto

Numero 4 invii intervallo 6 mesi

I invio: Nocellara del Belice, Nocellara Etnea, Bella di Cerignola, Itrana Bianca

II invio: Nocellara del Belice, Nocellara Etnea, Bella di Cerignola, Itrana Bianca

III invio: Nocellara del Belice, Conservolea Nera, Bella di Cerignola, Itrana Bianca

IV Invio: Nocellara del Belice, Hojiblanca Nera, Bella di Cerignola, GR2177

PROGETTO DEAOLIVA

WP3, Task 3.1, linea 4

RISULTATI sui campioni del progetto

OCRATOSSINA A valori medi (n=3) in ppb

Varietà	Metodo ELISA								HPLC
	I Invio		II Invio		III Invio		IV Invio		
	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	
<i>Nocellara del Belice</i>	1,82	3,41	1,82	1,67	<LOQ	<LOQ	2,04	1,54	<LOQ
metodo c. vetrano	<LOQ	4,28	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,29	2,42	1,79	<LOQ
campagna 2020	2,58	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,06	3,00	<LOQ	<LOQ
<i>Nocellara Etnea</i>	2,41	5,53	2,41	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
metodo naturale	1,73	5,59	1,73	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
campagna 2020	2,40	4,88	2,40	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
<i>Bella di Cerignola</i>	1,85	6,21	<LOQ	3,98	<LOQ	<LOQ	2,07	<LOQ	<LOQ
metodo savigliano	2,05	5,16	2,05	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,82	1,64	<LOQ
campagna 2020	1,67	3,95	1,67	2,80	3,00	<LOQ	2,11	1,90	<LOQ
<i>Itrana Bianca</i>	<LOQ	3,00	<LOQ	3,00	-	-	-	-	<LOQ
metodo naturale	<LOQ	2,96	<LOQ	2,96	-	-	-	-	<LOQ
campagna 2019	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,83	-	-	-	-	<LOQ
<i>Conservolea Nera</i>	-	-	-	-	1,62	<LOQ	-	-	<LOQ
metodo californiano I° essiccazione	-	-	-	-	<LOQ	1,66	-	-	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	2,53	<LOQ	-	-	<LOQ
<i>Hojiblanca Nera</i>	-	-	-	-	1,99	1,92	1,90	<LOQ	<LOQ
denocciolata	-	-	-	-	4,57	<LOQ	2,85	<LOQ	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	3,86	<LOQ	1,70	<LOQ	<LOQ
<i>GR 2177</i>	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ
metodo californiano denocciolate	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ

RISULTATI sui campioni del progetto

Ocratossina A (ELISA)

Varietà	Concentrazione (ppb)
Bella di Cerignola	2.57±1.37 ^b
Conservolea Nera	1.94±0.61 ^b
GR 2177*	-
Hojiblanca Nera	2.60±1.12 ^b
Itrana Bianca	2.89±0.41 ^b
Nocellara Etnea	3.27±1.71 ^a
Nocellara del Belice	2.08±0.73 ^b

Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; *N/A; valori medi (n=3)

RISULTATI sui campioni del progetto

Ocratossina A (ELISA)

Metodi	Concentrazione (ppb)
Denocciolato	2.10±0.58 ^b
Metodo Castel Vetrano	2.08±0.73 ^b
Metodo Californiano I° essiccazione	1.94±0.61 ^b
Metodo Californiano Denocciolato	3.10±1.31 ^{ab}
Metodo Naturale	3.17±1.47 ^a
Metodo Sivigliano	2.57±1.37 ^b

Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; valori medi (n=3)

RISULTATI sui campioni del progetto

Ocratossina A (ELISA)

KIT	Concentrazione (ppb)
OTA Agraquant [®]	2.91±1.56 ^a
OTA Veratox [®]	2.28±0.84 ^b

Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; valori medi (n=3)

RISULTATI sui campioni del progetto

AFLATOSSINE valori medi (n=3) in ppb

Metodo ELISA

Varietà	I Invio		II Invio		III Invio		IV Invio		HPLC
	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	Veratox®	Agraquant®	
Nocellara del Belice	<LOQ	2,78	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,88	<LOQ	<LOQ	<LOQ
metodo c. vetrano	<LOQ	2,74	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
campagna 2020	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Nocellara Etna	<LOQ	2,49	<LOQ	2,49	-	-	-	-	<LOQ
metodo naturale	3,74	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
campagna 2020	<LOQ	2,29	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
Bella di Cerignola	<LOQ	2,93	<LOQ	2,93	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
metodo sivigliano	<LOQ	3,42	<LOQ	3,42	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
campagna 2020	<LOQ	3,00	<LOQ	3,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Itrana Bianca	<LOQ	3,86	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
metodo naturale	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
campagna 2019	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	<LOQ
Conservolea Nera	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	<LOQ
metodo californiano I° essiccazione	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	<LOQ
Hojiblanca Nera	-	-	-	-	<LOQ	4,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ
denocciolata	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	<LOQ	3,44	<LOQ	<LOQ	<LOQ
GR 2177	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ
metodo californiano denocciolate	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ
campagna 2022	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ

RISULTATI sui campioni del progetto

Aflatossine (ELISA)

Varietà	Concentrazione (ppb)
Bella di Cerignola	3.12±0.59 ^b
Conservolea Nera	3.10±0.29 ^b
GR 2177*	-
Hojiblanca Nera*	-
Itrana Bianca	3.73±0.50 ^a
Nocellara Etnea	2.77±0.57 ^b
Nocellara del Belice	2.86±0.37 ^b

Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; *N/A; valori medi (n=3)

RISULTATI sui campioni del progetto

Aflatossine (ELISA)

Metodi	Concentrazione (ppb)
Denocciolato*	-
Metodo Castel Vetrano	2.86±0.37 ^b
Metodo Californiano I° essiccazione	3.10±0.29 ^b
Metodo Californiano Denocciolato	3.71±0.58 ^a
Metodo Naturale	2.99±0.68 ^b
Metodo Sivigliano	3.12±0.59 ^b

Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; *N/A; valori medi (n=3)

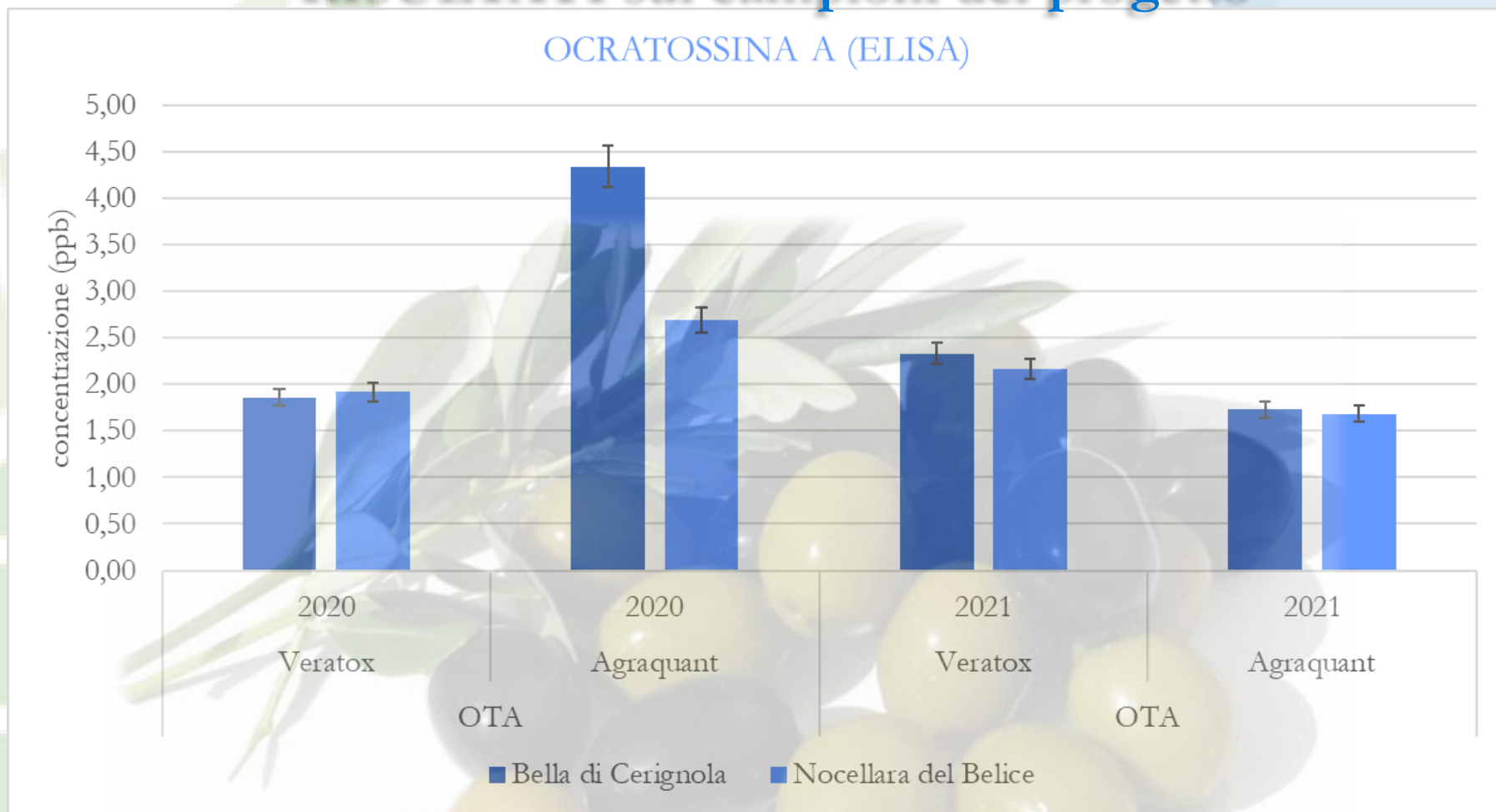
RISULTATI sui campioni del progetto

Aflatossine (ELISA)

KIT	Concentrazione (ppb)
OTA Agraquant [®]	3.08±0.61 ^{ab}
OTA Veratox [®]	3.53±0.56 ^a

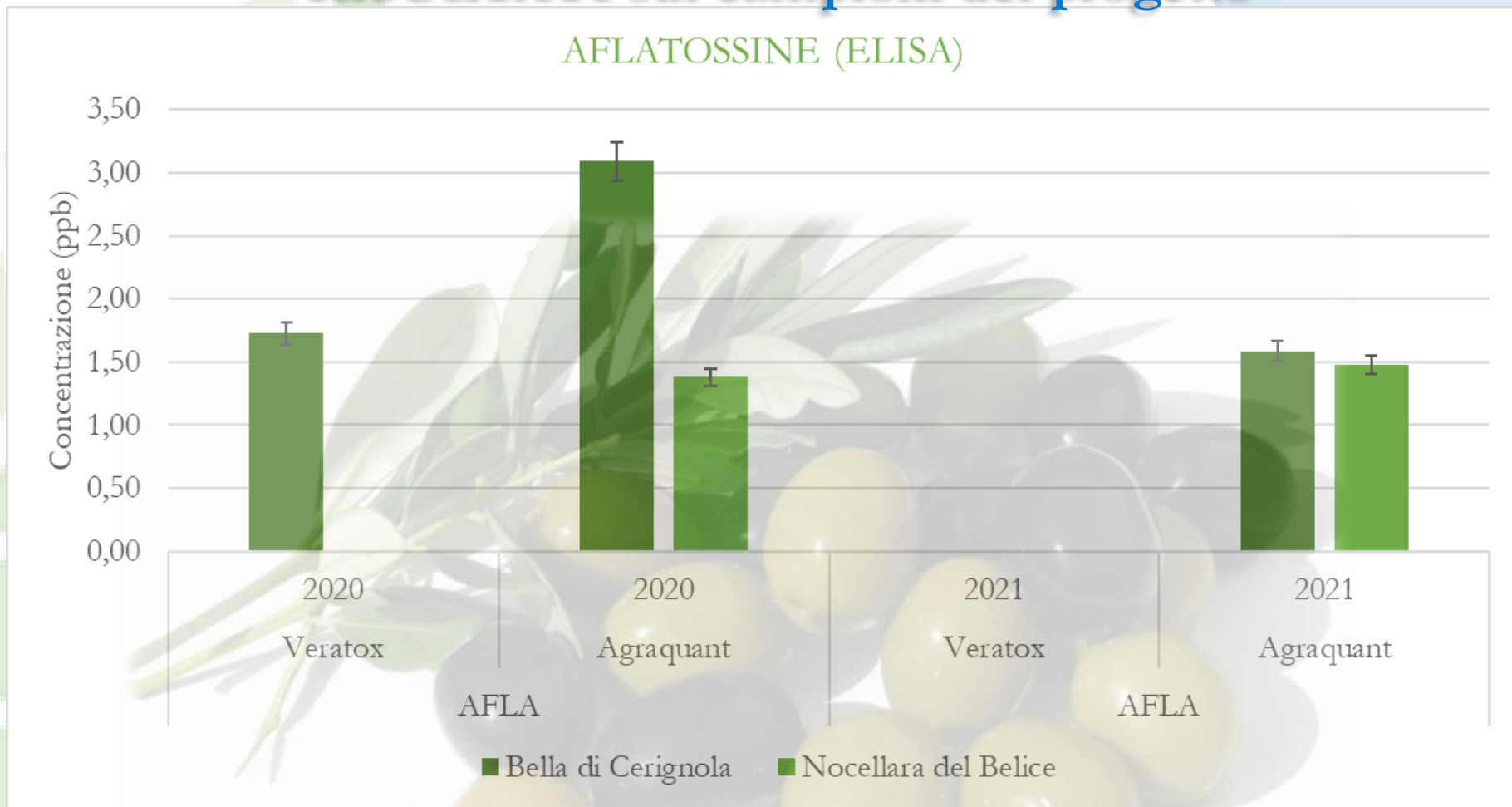
Elaborazione valori di concentrazione considerando <LOQ=N/A; valori medi (n=3)

RISULTATI sui campioni del progetto



Elaborazione valori di concentrazione considerando <math><LOQ=0</math>; valori medi (n=6)

RISULTATI sui campioni del progetto



Elaborazione valori di concentrazione considerando $<LOQ=0$; valori medi (n=6)

Conclusioni

Il metodo **ELISA** è risultato, grazie alla sua elevata sensibilità diagnostica, un **metodo di *screening* iniziale** applicabile come programma di controllo sulla valutazione delle micotossine nella matrice olive.

- ✓ Fondamentale il campionamento (aliquote);
- ✓ Con un valore positivo è doveroso effettuare un'analisi più specifica (HPLC).

Vantaggi

- Riduzione dei costi di analisi;
- Riduzione del tempo di analisi.

Svantaggi

- Presenza di falsi positivi

