



**VALIDAZIONE DEL LATERAL FLOW & DEL TEST ELISA  
PER LA QUANTIFICAZIONE DI AFLATOSSINA M1 & B1,  
CONDOTTA DAL LABORATORIO LILICAM TALAVERA DE  
LA REINA, SPAGNA**

**Jesús Romero Asensio**

Laboratorio LILCAM, Talavera De La Reina, Spagna



## Introduzione a LILCAM

- CMT Lab
- 5000 produttori di latte
  - 600 latte di mucca
  - 1400 latte di pecora
  - 3000 latte di capra
- 300 industrie
- 900,000 campioni analizzati nel 2018
  - 650,000 Pagamento di Qualità
  - 250,000 DHI





# Introduzione



- Le Aflatossine sono micotossine prodotte da due specie di *Aspergillus*, un fungo che si trova soprattutto in zone caratterizzate dal clima caldo e umido.
- Poiché le aflatossine sono note per le loro proprietà genotossiche e cancerogene<sup>1</sup>, l'esposizione del consumatore tramite gli alimenti deve essere mantenuta quanto più bassa possibile.
- Le Aflatossine possono essere presenti in prodotti alimentari come arachidi, frutta a guscio, granturco, riso, fichi e altra frutta secca, spezie, oli vegetali grezzi e semi di cacao, a seguito di contaminazioni fungine avvenute prima e dopo la raccolta.
- L'Aflatossina B1 è la più diffusa nei prodotti alimentari ed è una delle più potenti in termini di genotossicità e cancerogenicità.
- L'Aflatossina M1 è uno dei principali metaboliti dell'Aflatossina B1 nell'uomo e negli animali e può essere presente nel latte proveniente da animali nutriti con mangimi contaminati da Aflatossina B1.
- È opportuno limitare il contenuto della sola Aflatossina B1 e quindi della Aflatossina M1.

<sup>1</sup>Reports of the Scientific Committee for Food, 35th series, (Relazioni del comitato scientifico dell'alimentazione umana, 35a serie), parere del comitato scientifico dell'alimentazione umana su aflatossine, ocratossina A e patulina, pagg. 45-50, [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf\\_reports\\_35.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_35.pdf)



# Introduzione



EN

Foodstuffs

IT

Parte 2: Micotossine

Section 2: Mycotoxins

Foodstuffs <sup>(1)</sup>		Maximum levels (µg/kg)		
2.1.	<b>Aflatoxins</b>	B <sub>1</sub>	Sum of B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> and G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
2.1.13.	Raw milk <sup>(6)</sup> , heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products	—	—	0,050

Prodotti alimentari <sup>(1)</sup>		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1.	<b>Aflatossine</b>	B <sub>1</sub>	Somma di B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
2.1.13.	Latte crudo <sup>(6)</sup> , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	—	—	0,050

EN

Feeds

IT

Undesirable substances	Products intended for animal feed	Maximum content in mg/kg (ppm) relative to a feedingstuff with a moisture content of 12 %
(1)	(2)	(3)
7. Aflatoxin B <sub>1</sub>	Feed materials with the exception of:	0,05
	— groundnut, copra, palm-kernel, cotton seed, babassu, maize and products derived from the processing thereof	0,02
	Complete feedingstuffs for cattle, sheep and goats with the exception of:	0,05
	— dairy cattle	0,005
	— calves and lambs	0,01
	Complete feedingstuffs for pigs and poultry (except young animals)	0,02
	Other complete feedingstuffs	0,01
Complementary feedingstuffs for cattle, sheep and goats (except complementary feedingstuffs for dairy animals, calves and lambs)	0,05	

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
(1)	(2)	(3)
7. Aflatossina B <sub>1</sub>	Materie prime per mangimi, ad eccezione di:	0,05
	— arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,02
	Mangimi completi per bovini, ovini e caprini, ad eccezione di:	0,05
	— animali da latte	0,005
	— vitelli, agnelli e capretti	0,01
	Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02
	Altri mangimi completi	0,01
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,05	



# Introduzione



EN

IT

(a) Performance criteria for aflatoxins

Criterion	Concentration Range	Recommended Value	Maximum permitted Value
Blanks	All	Negligible	—
Recovery — Aflatoxin M1	0,01-0,05 µg/kg	60 to 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 to 110 %	
Recovery — Aflatoxins B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	50 to 120 %	
	1-10 µg/kg	70 to 110 %	
	> 10 µg/kg	80 to 110 %	

a) Criteri di rendimento per le aflatossine

Criterio	Intervallo di concentrazione	Valore raccomandato	Valore massimo consentito
Bianchi	Tutti	Trascurabile	—
Recupero — Aflatossina M1	0,01-0,05 µg/kg	60-120 %	
	> 0,05 µg/kg	70-110 %	
Recupero — Aflatossine B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	50-120 %	
	1-10 µg/kg	70-110 %	
	> 10 µg/kg	80-110 %	



## Metodi



### Aflatossina M1

#### Lateral Flow

- Intervallo: 0-150ppt
- 200µl di campione (no centrifugazione)
  - Tempo di saggio: 10min

#### ELISA

- Intervallo : 0-250ppt
- 100µl di campione (no centrifugazione)
  - Tempo di saggio: 75min

**ILVO**

Flanders research institute for agriculture,  
fisheries and food.

Technology and Food Science unit  
Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle, Belgium  
tel. + 32 9 272 30 00 - fax + 32 9 272 30 01  
T&VBU@ilvo.vlaanderen.be

### Aflatossina B1

#### Lateral Flow

- Intervallo: 0-8ppb
- Estrazione: 1:3 con il metanolo 70%
  - 200µl di campione (no diluizione)
    - Tempo di saggio: 8min

#### ELISA

- Intervallo: 0-40ppb
- Estrazione : 1:3 con il metanolo 70%
  - 100µl di campione (no diluizione)
    - Tempo di saggio: 5min

**f a p a s**



# Aflatossina M1 – Campioni di Latte- Recovery

## Lateral Flow

Concentration AFM1 (ng/L)	Mean (ng /L)	CV%	Minimum reading	Maximum reading	Recovery (%)
Blank (<5 ng/L)	3.1	-	1.3	4.9	-
15	16.2	11.1	13.1	26.0	108
25	26.4	10.9	21.9	37.2	105.6
50	52.3	5.7	46.8	58.9	104.6
75	72.5	9.2	63.8	102.5	96.6

103.7 Mean

## ELISA

Concentration AFM1 (ng/L)	Mean (ng/L)	CV%	Minimum reading	Maximum reading	Recovery (%)
Blank (<5 ng/L)	1.40	-	0.00	2.90	-
15	15.74	10.9	13.48	20.13	104.9
25	26.32	6.3	23.36	28.98	105.3
50	48.09	7.2	41.34	55.75	96.2
75	69.47	6.4	62.91	76.94	92.6

99.8 Mean



# Aflatoxina M1 – Campioni di Latte - Recovery

## Lateral Flow

Reference material	Lot number	Certified value (ng/kg)	Range for $ Z =2$	Result (ng/kg)	Recovery (%)
A.I.A. Reference Material Lyophilized Milk	MRM1 250918	10.8	6.5-15.3	9.8	98
		23.3	12.0-34.1	22.7	
		49.3	33.0-65.3	49.2	
		59.0	39.8-78.0	61.4	
FAPAS QC Material Milk Powder T04300QC	-	10.1	5.7-14.6	10.7	106

## ELISA

102 Mean

Reference material	Lot number	Certified value (ng/kg)	Range for $ Z =2$	Result (ng/kg)	Recovery (%)
A.I.A. Reference Material Lyophilized Milk	MRM1 250918	10.8	6.5-15.3	9.1	96
		23.3	12.0-34.1	22.3	
		49.3	33.0-65.3	50.2	
		59.0	39.8-78.0	60.1	
FAPAS QC Material Milk Powder T04300QC	-	10.1	5.7-14.6	9.9	98

97 Mean



# Aflatossina M1 – Campioni di Latte - Selettività



Family	Compound	MRL (µg/L)	Concentration spiked in milk (µg/L)	Result (ng/L) of Lateral Flow	Result (ng/L) of ELISA
Mycotoxins	Zearalenone		0.250	7.9	1.43
	Ochratoxin A		0.500	6.3	0.38
	Deoxynivalenol		0.500	5.5	0.24
	Fumonisin B1		0.500	7.4	1.28
	Fumonisin B2		0.500	7.0	1.62
	Aflatoxin M2	0.05	0.050	<b>8.1</b>	<b>6.09</b>
Penicillins	Benzylopenicillin	4	400	7.8	0.20
Cefalosporins	Cefalonium	20	2000	7.3	1.51
Tetracyclines	Oxytetracyclin	100	10000	5.1	2.64
Macrolides	Erythromycin A	40	4,000	8.1	2.13
Aminoglycosides	Neomycin B	1500	150000	9.0	2.13
Quinolones	Enrofloxacin	100	10000	5.2	2.42
Sulfonamides	Sulfadiazine	100	10000	5.7	3.35
Diamino Pyrimidine derivatives	Trimethoprim	50	5000	0.0	2.77
Other chemotherapeutics	Dapsone	5	500	5.3	3.21



# Aflatossina M1 – Campioni di Latte - Robustezza



## Temperatura del latte

Milk temperature	2-4°C		20°C	
Blank (<5 ng/L)	Lateral Flow	ELISA	Lateral Flow	ELISA
Mean concentration	<b>6.5</b>	<b>0.00</b>	<b>5.7</b>	<b>0.00</b>
Min concentration	4.9	2.65	3.1	0.00
Max concentration	7.5	3.45	8.5	0.00
<b>Milk spiked with aflatoxin M1 at 50 ng/L</b>				
Mean concentration	<b>51.6</b>	<b>49.28</b>	<b>51.6</b>	<b>50.14</b>
Min concentration	47.9	50.33	49.8	50.41
Max concentration	54.6	51.01	54.3	50.65

## Latte crudo intero e Latte crudo scremato

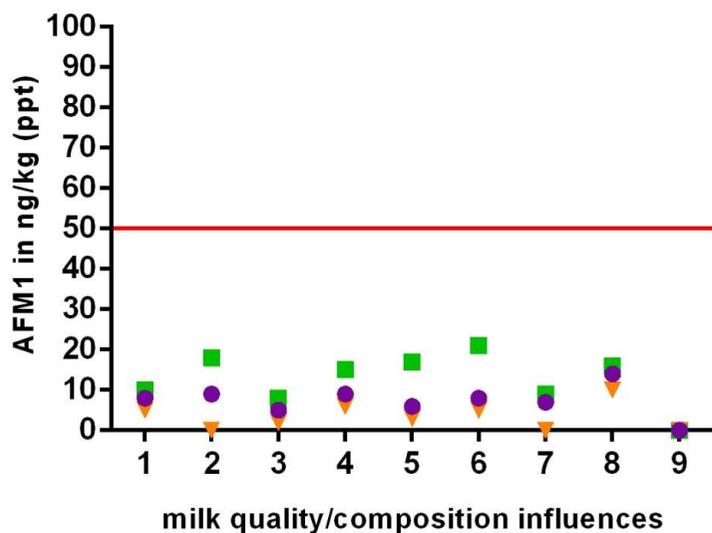
	Full cream milk		Defatted milk	
Blank (<5 ng/L)	Lateral Flow	ELISA	Lateral Flow	ELISA
Mean concentration	<b>8.0</b>	<b>2.40</b>	<b>5.4</b>	<b>0.83</b>
Min concentration	4.5	0.00	1.7	0.00
Max concentration	10.0	4.40	8.9	2.72
<b>Milk spiked with aflatoxin M1 at 50 ng/L</b>				
Mean concentration	<b>52.0</b>	<b>47.33</b>	<b>49.9</b>	<b>46.45</b>
Min concentration	49.5	41.15	47.1	43.39
Max concentration	54.1	51.69	52.8	49.77



# Aflatossina M1 – Campioni di Latte – Qualità del latte / Composizione

Risultati di campioni di latte blank 10 replicati)

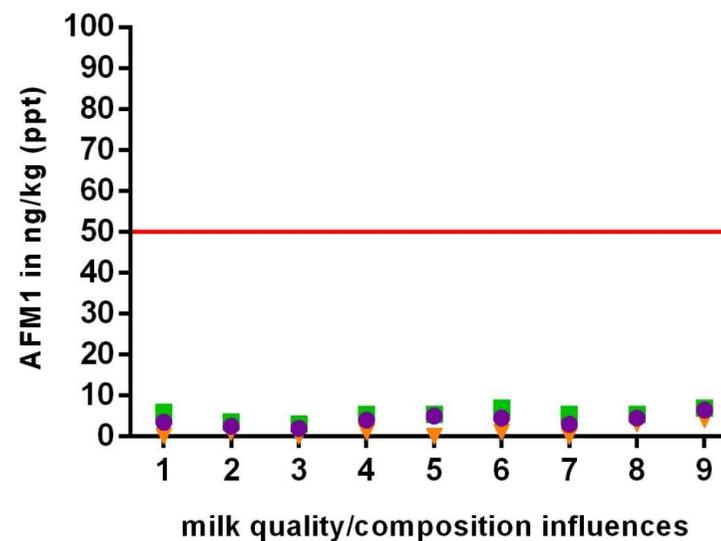
## Lateral Flow



- MAX
- ▼ MIN
- MEAN

- 1: Normal raw milk
- 2: Somatic Cell Count  $>10^6$ /ml
- 3: High bacterial count ( $>1.8 \times 10^6$ /ml)
- 4: Low fat content ( $<2$ g/100ml)
- 5: High fat content ( $>6$ g/100ml)
- 6: Low protein ( $<3$ g/100ml)
- 7: High protein ( $>4$ g/100ml)
- 8: Low pH (6.0)
- 9: High pH (7.5)

## ELISA

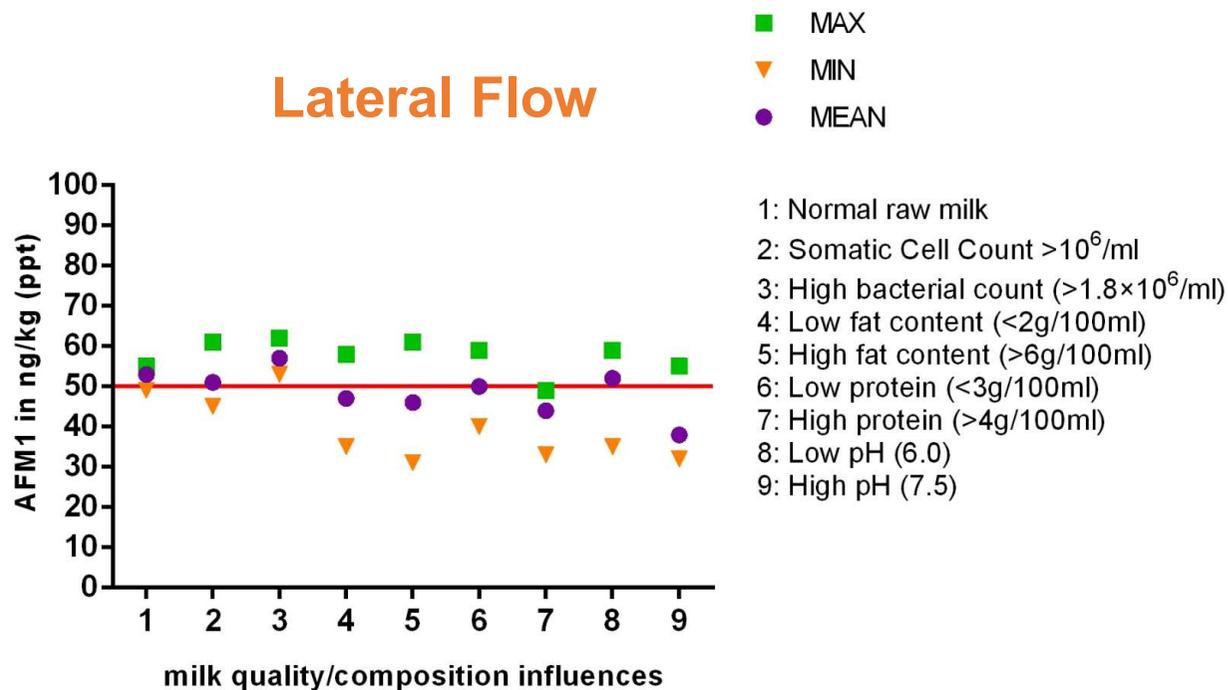




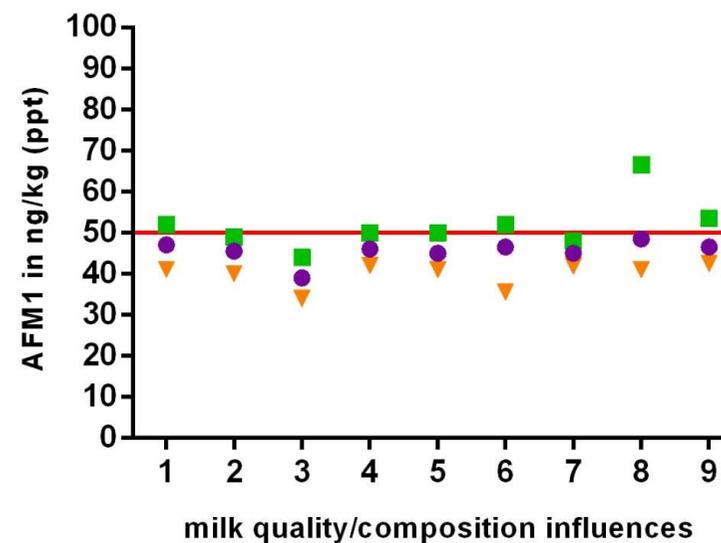
# Aflatossina M1 – Campioni di Latte – Qualità del latte / Composizione

## Risultati di campioni di latte spikati (50ng/L AFM1) (10 replicati)

### Lateral Flow



### ELISA

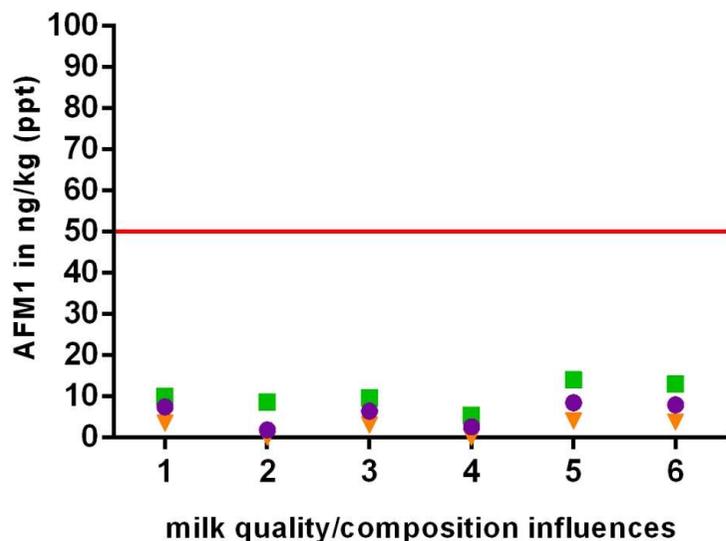




# Aflatossina M1 – Campioni di Latte – Tipo di latte / Specie animali

Risultati di campioni di latte blank 10 replicati)

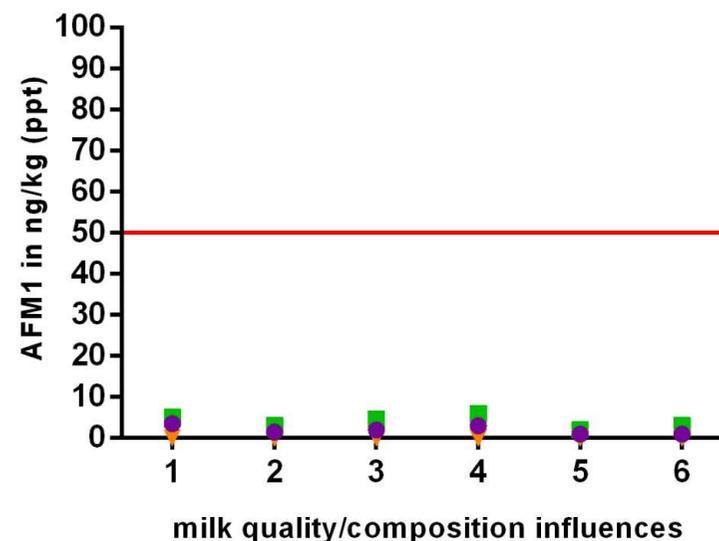
## Lateral Flow



■ MAX  
▼ MIN  
● MEAN

1: Normal raw cows' milk  
2: Pasteurized cows' milk  
3: UHT cows' milk  
4: Reconstituted cows' milk powder  
5: Normal raw goats' milk  
6: Normal raw ewes' milk

## ELISA

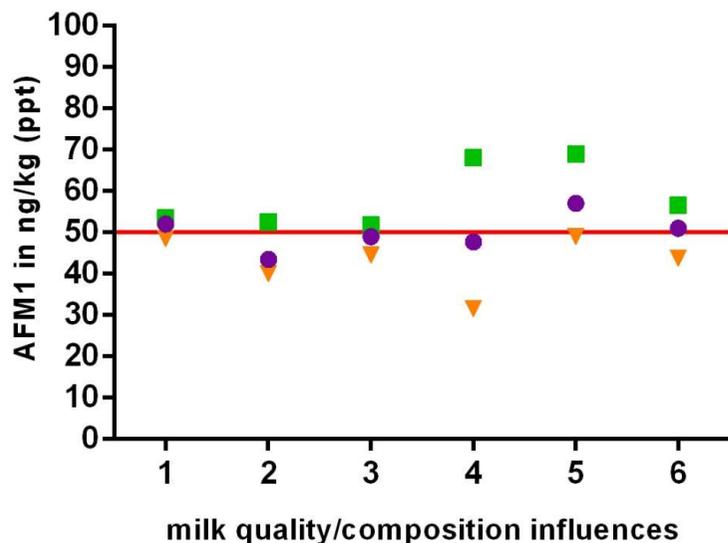




# Aflatossina M1 – Campioni di Latte – Tipo di latte / Specie animali

Risultati di campioni di latte spikati (50ng/L AFM1) (10 replicati)

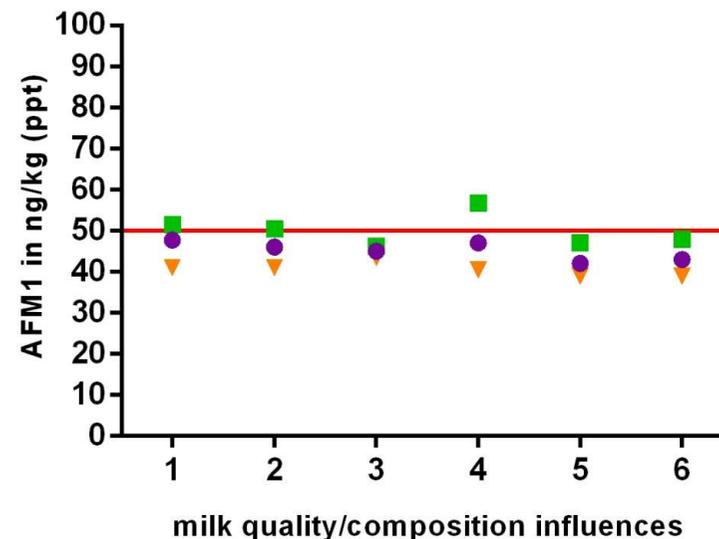
## Lateral Flow



- MAX
- ▼ MIN
- MEAN

- 1: Normal raw cows' milk
- 2: Pasteurized cows' milk
- 3: UHT cows' milk
- 4: Reconstituted cows' milk powder
- 5: Normal raw goats' milk
- 6: Normal raw ewes' milk

## ELISA

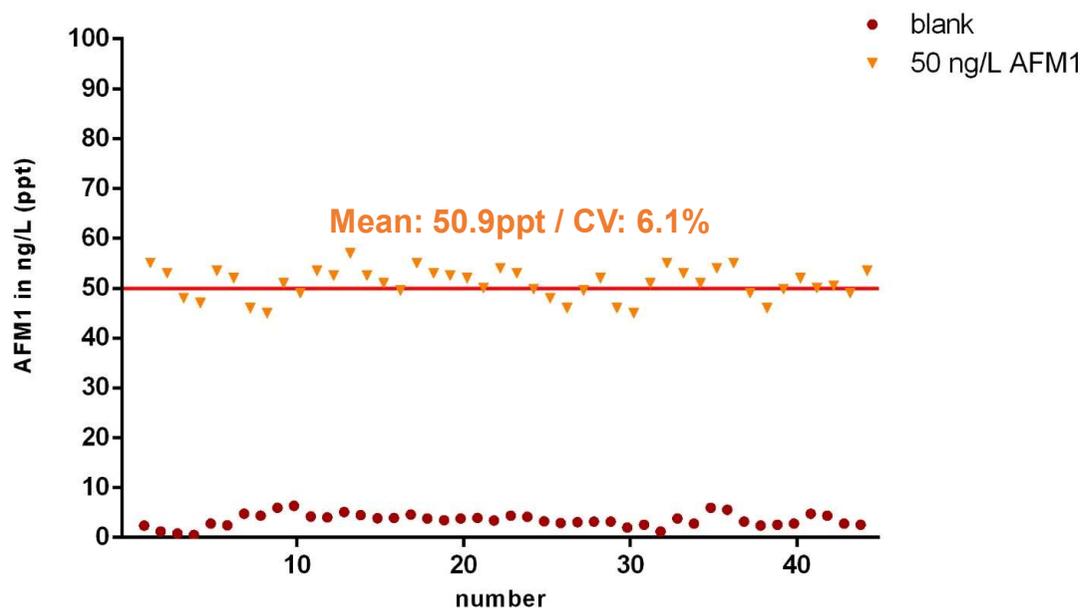




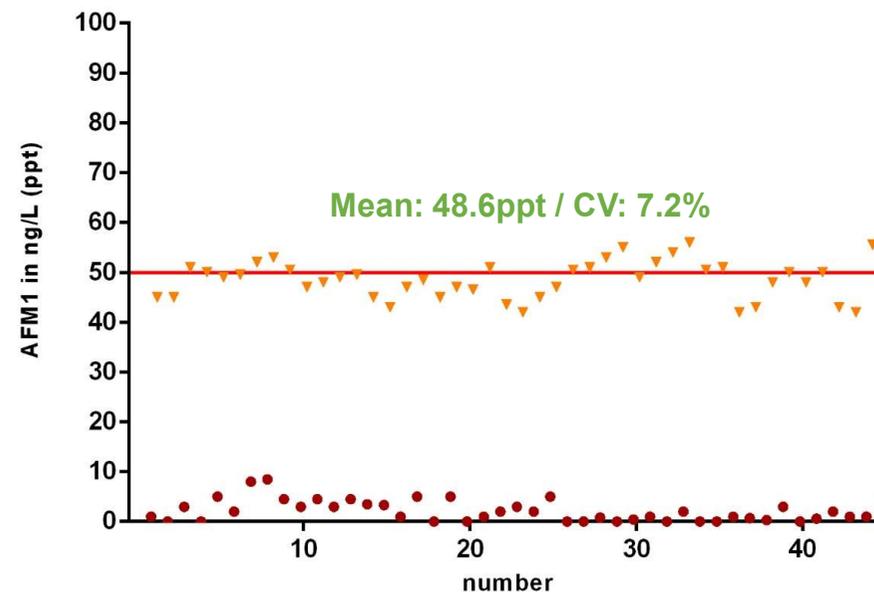
# Aflatossina M1 – Campioni di Latte – Stabilità dell'analisi

Resultati di campioni di latte blank e di campioni di latte spikati (50ng/L AFM1) - controllo positivo (n=45)

## Lateral Flow



## ELISA





# Aflatossina B1 – Campioni di Mais - Recovery

## Lateral Flow

Concentration AFB1 (ng/ml)	Mean (ng/ml)	CV%	Minimum reading	Maximum reading	Recovery (%)
Blank (<0.25 ng/ml)	0.2	-	0	0.24	-
2	1.84	9.1	1.5	2.6	92.0
4	3.86	7.9	3.2	5.4	96.5
8	7.43	7.2	6.8	10.9	92.3

93.6 Mean

## ELISA

Concentration AFB1 (ng/ml)	Mean (ng/ml)	CV%	Minimum reading	Maximum reading	Recovery (%)
Blank (<0.25 ng/ml)	0.2	-	0	0.20	-
2	1.91	8.1	1.4	2.8	95.5
4	3.75	6.8	3.0	5.1	93.8
8	7.67	5.3	6.4	10.1	95.9

95.1 Mean



# Aflatossina B1 – Campioni di Mais - Recovery



## Lateral Flow

Reference material	Lot number	Certified value (ng/kg)	Range for $ Z  \leq 2$	Result (ng/kg)	Recovery (%)
FAPAS Maize T04312QC	N° 34	3.07	1.72-4.42	2.95	96.1
FAPAS Maize T04319QC	N° 13	4.69	2.63-6.76	4.59	97.9

## ELISA

Reference material	Lot number	Certified value (ng/kg)	Range for $ Z  = 2$	Result (ng/kg)	Recovery (%)
FAPAS Maize T04312QC	N° 34	3.07	1.72-4.42	3.11	101.3
FAPAS Maize T04319QC	N° 13	4.69	2.63-6.76	4.78	101.9

97 Mean

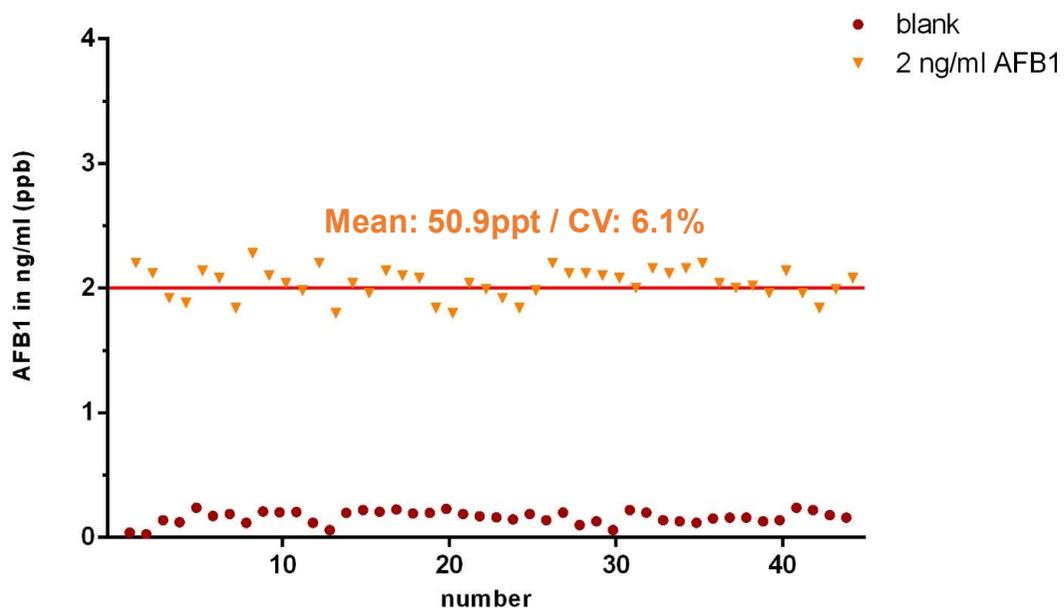
101.6 Mean



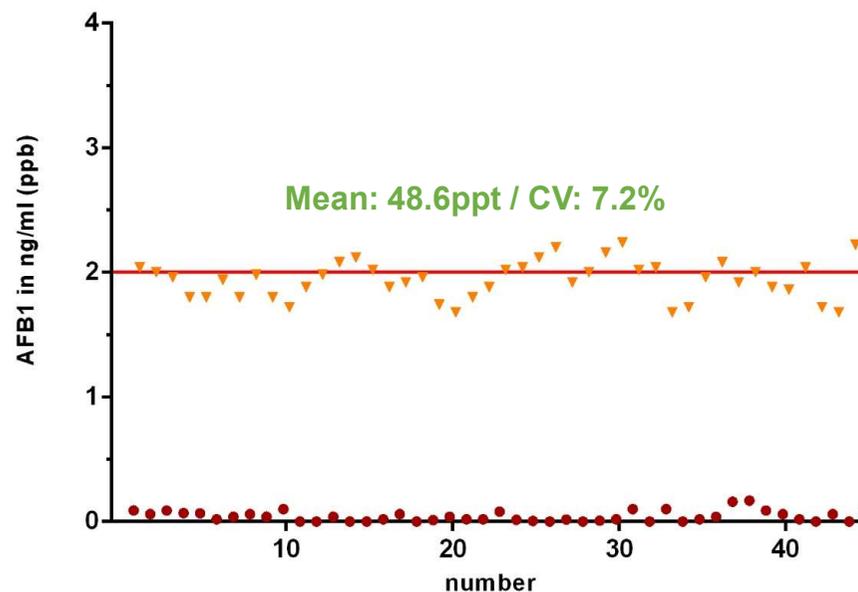
# Aflatossina B1 – Campioni di Mais – Stabilità dell'analisi

Resultati di campioni di mais blank e di campioni di mais spikati (2ng/g AFB1) - controllo positivo (n=45)

## Lateral Flow



## ELISA





## Conclusioni

- La tecnologia Lateral Flow ed ELISA sembrano di essere uno strumento prezioso per l'analisi di campioni di latte e mais
- La precisione di entrambi i metodi è migliore rispetto alla precisione del metodo di conferma cromatografico.
- Entrambi i test sono preziosi e robusti per il rilevamento dell'Aflatossina M1 o dell'Aflatossina B1 nel latte e nei prodotti lattiero-caseari o nei campioni di mais, rispettivamente



**GRACIAS POR VUESTRA  
ATENCIÓN**

