

Studio di validazione interlaboratorio per la  
determinazione dell'ochratossina A in prodotti a base di  
carne suina

Emanuela Gregori

ISS, 10-12 giugno 2019

- In Italia, è in vigore una legislazione nazionale complementare a quella comunitaria che, **per quanto riguarda i prodotti carnei**, a norma della Circolare del Ministero della Salute n.10 del 9 giugno 1999, definisce il valore guida di contaminazione per **l'ocratossina A pari a 1 µg/kg**.
- Con il **mandato 520/N del marzo 2013**, la **Commissione Europea ha incaricato il CEN di predisporre Standard Europei** e Specifiche tecniche nel settore dei metodi di analisi per le micotossine nei prodotti alimentari.
- LNR – Micotossine ha ottenuto di
  - sviluppare un metodo rispondente ai requisiti conformi alla normativa vigente, mediante validazione in house
  - preparare, omogeneizzare e caratterizzare i materiali oggetto dello studio inter-laboratorio
  - valutare le prestazioni analitiche dello studio
  - redigere il metodo di analisi proposto che potrà diventare il metodo di riferimento CEN.

Guida Eurachem

## Idoneità per lo scopo dei metodi analitici

Guida per i laboratori sulla validazione  
dei metodi e argomenti correlati

Seconda edizione 2014

# Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis

{*Note:* These guidelines incorporate symbols, terminology, and recommendations accepted by consensus by the participants at the IUPAC Workshop on Harmonization of Collaborative Analytical Studies, Geneva, Switzerland, May 4–5, 1987 [*Pure Appl. Chem.* **60**, 855–864(1988)]; published as “Guidelines for Collaborative Study of Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis,” *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 694–704(1989)]. The original

characteristics of a method, although many sections are also appropriate for other types of studies.

### *Alternatives for Method Selection*

- (1) Sometimes obvious (only method available).
- (2) Critical literature review (reported within-laboratory attributes are often optimistic).

## ESTRAZIONE

- 5,0 g di campione
- + 20 ml di metanolo: sodio bicarbonato 10% 60:40,
- agitatore a braccia per 40 minuti
- 5000 giri per 10 min
- filtro microfibra di vetro



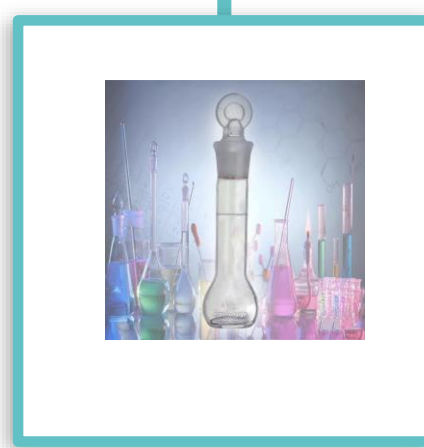
## PURIFICAZIONE

- 7 ml + 49 ml sol. 0,01% Tween 20 in PBS
- filtro microfibra di vetro
- 50 ml di estratto in IAC
- lavaggio con 20 ml H<sub>2</sub>O



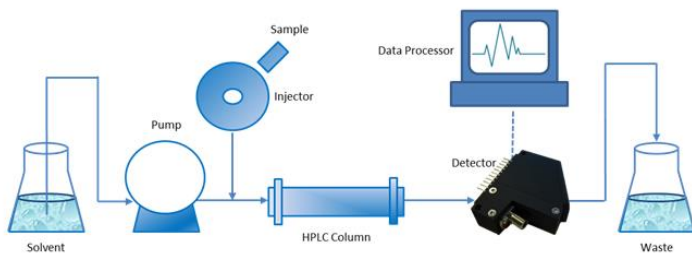
## ELUIZIONE

- eluizione con 750  $\mu$ l (x2) di MeOH per HPLC
- eluizione con 750  $\mu$ l (x2) di H<sub>2</sub>O per HPLC
- raccolta del solvente



### ANALISI HPLC - Fluorimetria

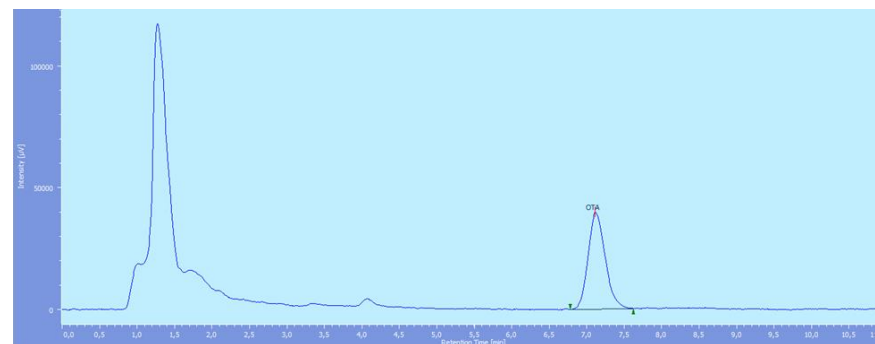
- Colonna cromatografica:  
C18 a fase inversa (150x4.6 mm, 5 $\mu$ m)
- Volume di iniezione: 100  $\mu$ l
- Fase mobile: acetonitrile:metanolo:ac. acetico 2% (35:25:40)
- Flusso (in colonna): 1,0 ml/min
- Rivelatore FLD 333 nm ( $\lambda$  di eccitazione) e 460 nm ( $\lambda$  di emissione)



### CURVA DI TARATURA

- MRC OTA
- 6 soluzioni di lavoro
- Iniezione in singolo per ogni seduta analitica

Soluzione di taratura n.	Concentrazione della soluzione (ng/ml)
1	0,10
2	0,20
3	0,50
4	1,00
5	2,50
6	4,50



## MATERIALI

### PROSCIUTTO

- Nat. contaminato low level (H\_LL)
- Nat. contaminato high level (H\_HL)
- Addizionato low level (SH\_LL)
- Addizionato medium level (SH\_ML)
- Addizionato high level (SH\_HL)



### CARNE DI MAIALE MACINATA

- Nat. contaminato (CP)
- Addizionato (SCP)



### FEGATO

- Nat. contaminato (L)
- Addizionato (SL)

### RENE, POLMONE, PATÈ....



## Campioni naturalmente contaminati

Prodotti a base di carne di maiale	Livello	N	Media $\mu\text{g}/\text{kg}$	$S_r$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	RSDr %	$U_E$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$ (%)
Prosciutto	Low	12	0,88	0,07	8	0,17 (19%)
	Medium	10	2,23	0,29	13	0,47 (21%)
	High	12	11,77	0,68	6	1,68 (14%)
Carne macinata	Low	12	0,65	0,06	9	0,11 (18%)
Fegato	Medium	12	3,11	0,30	10	0,59 (19%)

Prodotti a base di carne di maiale	Livello µg/kg	N	Media µg/kg	Sr, µg/kg	RSDr, %	Recupero %	U <sub>E</sub> , µg/kg (%)
<b>Prosciutto</b>	0,5 (LOQ)	14	0,50	0,05	10	97	0,09 (18%)
	2,0	8	1,59	0,19	9	75	0,28 (18%)
	10	25	7,92	0,82	10	77	1,19 (15%)
<b>Rene</b>	0,5 (LOQ)	6	0,42	0,07	16	84	0,10 (25%)
	1,0	7	0,74	0,10	14	74	0,15 (20%)
	2,0	10	1,41	0,14	10	70	0,21 (16%)
<b>Fegato</b>	0,5 (LOQ)	7	0,36	0,03	8	71	0,07 (21%)
	1,0	7	0,72	0,11	15	72	0,15 (21%)
	2,0	7	1,34	0,12	9	67	0,97 (21%)
<b>Carne macinata</b>	2,0	11	2,18	0,1	5	83	0,30 (14%)
<b>Polmone</b>	2,0	6	1,24	0,15	12	66	0,33 (27%)
<b>Patè</b>	0,5 (LOQ)	6	0,42	0,04	9	84	0,10 (24%)

**Validazione intralaboratorio (in-house)**

**Campioni addizionati**



## SELEZIONE

5 cp prosciutto: (bianco, nat. cont. low level (H\_LL); nat. cont. high level (H\_HL) e addizionati)  
 2 cp fegato (nat. cont. e addizionato)  
 1 cp carne macinata (nat. cont.)



## PREPARAZIONE

Macinazione in tritacarne ripetendo l'operazione per almeno 5 volte  
 Aliquote in tubi Falcon da 50 ml



## TEST STATISTICI

- **Test di omogeneità**  
 8 campioni analizzati in doppio  
 Analisi varianza (ANOVA) (Fearn and Thomson, 2001)
- **Test di stabilità**  
 6 campioni divisi in gruppo a) per 2 giorni T= -20°C  
 gruppo b) per 2 giorni T= 25°C

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}$$

$$\mu_N = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N}}$$

Total count data (frequency)

id	idm	idp	idc	idm	idp	idc	idm	idp	idc	idm	idp	idc
1	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
2	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
3	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
4	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
5	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
6	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
7	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
8	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
9	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
10	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
11	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
12	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
13	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
14	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
15	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
16	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
17	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
18	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
19	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco
20	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco	Falco

## SPEDIZIONE

Ogni partecipante ha ricevuto:

- 16 campioni ( 8 campioni in doppio cieco) alcuni naturalmente contaminati ed altri addizionati nell'intervallo 0,5 µg/kg -12 µg/kg di OTA.
- un campione di famigliarizzazione
- una copia del metodo nel format CEN
- le istruzioni per condurre le procedure di "Spiking" e di presentazione di risultati.

NB. I materiali sono stati spediti a temperature controllata.

## RACCOLTA DEI RISULTATI

## ANALISI STATISTICA DEI DATI

- Analisi degli outliers  
Test di Cochran e di Grubbs, cicli ripetuti
- Valutazione risultati
- Calcolo ripetibilità, riproducibilità, recupero %
- Calcolo valore di HorRat

1. Melanie Adam - ILCTR, LUA, Trier, Germany
2. Pedro Burdaspal - Centro Nacional de Alimentación, Madrid, Spain
3. Giannina Chessa - IZS Sardegna, Sassari, Italy
4. Annalisa De Girolamo - CNR , Istituto di patologia vegetale, Bari, Italy
5. Eftychia Christou - State General Laboratory, Ministry of Health, Nicosia, Cyprus
6. Giorgio Fedrizzi - IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Bologna, Italy
7. Jon Griffin - Kent County Council, Kent Scientific Services, Kent, UK
8. Chris Hunt - Edinburgh Scientific and Environmental Services, Edinburgh, UK
9. Piotr Jedziniak - National Veterinary Research Institute, PUŁAWY, Poland
10. Michael Kierszten - Tayside Scientific Services, Dundee, UK
11. Andrea Macaluso - IZS Sicilia, Palermo, Italy
12. Susan Mac Donald – FERA, York, UK
13. Claire Milligan - R-Biopharm Rhône Ltd, Glasgow, Scotland
14. Amelia Moreno - Ainia, Begoña Company, Parque Tecnológico de Valencia, Spain
15. Amedeo Pietri - Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Italy
16. Marketa Pospichalova - UKZUZ - Central Institute for Supervising and Testing in Agricultural, Brno, Czech Republic
17. Gabrijela Tavčar-Kalcher - Institute for Food Safety, Feed and Environment, Ljubljana, Slovenia
18. Annika Tevell Åberg - National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden
19. Tania Toscani - Consorzio del Prosciutto di Parma, Italy
20. Amalia Vasile - Institutul de Igiene Publica si Sanatate Veterinara, Bucarest, Romania
21. Claudia Vescovi - Agenzia Provinciale per l'Ambiente, Bolzano, Italy
22. Roberta Virgili - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (SSICA), Parma, Italy

**8 lab. nazionali + 14 EU = 22 partecipanti (19 lab ufficiali, 3 lab privati)**

**Table 1 — Precision data for ham, canned chopped pork and pork liver, naturally contaminated**

Parameters	Ham	Ham	Ham	Chopped pork	Pork liver
	no 1 (blank) <sup>a</sup>	no 2	no 3	no 4	no 5
Number of participating laboratories	21	21	21	21	21
Number of non compliant results	0	3	4	1	3
Number of outliers	0	1	1	3	0
Number of accepted results	20	17	16	17	18
Mean $\bar{x}$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	0,62	8,51	0,68	2,23
Repeatability limit $r$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	0,07	1,37	0,14	0,47
Repeatability standard deviation $s_r$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	0,03	0,49	0,05	0,17
Relative repeatability standard deviation $\text{RSD}_r$ , %	-	4	6	8	7
Reproducibility limit $R$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	0,29	4,22	0,29	0,94
Reproducibility standard deviation $s_R$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	0,10	1,51	0,10	0,33
Relative reproducibility standard deviation $\text{RSD}_R$ , %	-	17	18	15	15
Fortification level, $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	-	-	-
Recovery, %	-	-	-	-	-
HorRat values	-	0,8	0,8	0,7	0,7

<sup>a</sup> Where no data are given, statistic calculation was not possible.

**Validazione  
inter-  
laboratorio**

**Campioni  
naturalmente  
contaminati**

**Table 1 — Precision data for spiked ham and spiked pork liver**

Parameters	Ham spk	Ham spk	Ham spk	Pork liver spk
	no 6	no 7	no 8	no 9
Number of participating laboratories	21	21	21	21
Number of non compliant results	2	3	3	1
Number of outliers	0	1	1	2
Number of accepted results	19	17	17	18
Mean $\bar{x}$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,36	1,45	7,72	3,64
Repeatability limit $r$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,20	0,61	3,11	1,45
Repeatability standard deviation $s_r$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,04	0,06	0,31	0,38
Relative repeatability standard deviation $\text{RSD}_r$ , %	11	4	4	10
Reproducibility limit $R$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,20	0,61	3,11	1,45
Reproducibility standard deviation $s_R$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,07	0,22	1,11	0,52
Relative reproducibility standard deviation $\text{RSD}_R$ , %	19	15	14	14
Fortification level, $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,5	2,0	10,0	4,2
Recovery, %	72	72	77	86
HorRat values	0,9	0,7	0,7	0,6

**Validazione  
inter-  
laboratorio**

**Campioni  
addizionati**

Metodo di facile e veloce esecuzione, specifico grazie all'utilizzo delle colonnine di immunoaffinità e della fluorimetria.

Cromatogrammi esenti da interferenti

Matrici: diverse tipologie di carne suina (prosciutto, fegato, carne macinata, rene, ecc)

Campo di applicazione (0,4 - 12)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of OTA ; LOQ= 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$

**CEN/TC 275**

Date: 2018-12

**FprEN 17251:2019**

CEN/TC 275

Secretariat: DIN

**Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in pork meat and derived products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)**

# Grazie della attenzione

[emanuela.gregori@iss.it](mailto:emanuela.gregori@iss.it)





# Collaborative trial\_Preparation of test materials

## HOMOGENEITY TEST (1)

Testing homogeneity  $\longrightarrow$  the variance of the mean value of the analyte, within and between the parcels, is small in comparison with the whole variability of the method.

The material is considered *sufficiently homogeneous* with acceptable variability when the true sampling variance ( $\sigma_{\text{sam}}^2$ ) is imposed to be under a limit value ( $\sigma_{\text{all}}^2$ ), which is set as the maximum allowed sampling variance.

- ISO GUIDE 80:2014(E)
- Fearn, T. and Thompson, M., 2002, A new test for 'sufficient homogeneity'. Analyst, 126, 1414-1417.

## HOMOGENEITY TEST (2)

Duplicate analyses for each material

- ✓First step → Absence of outliers  
(Cochran test, significant 99% level of confidence)
  
- ✓Second step →
  - i. the target standard deviation ( $\sigma_p$ ), following Horwitz equation
  - ii. the analytical standard deviation ( $s_{an}$ ), from the sum of squared differences of the duplicate analyses
  - iii. the sampling standard deviation, ( $s_{sam}$ ) from the sum of squared differences
  - iv. the variances of the sum of standard deviations of duplicate analyses

## HOMOGENEITY TEST (3)

- ✓ Second step  $\longrightarrow$
- ❑ setting  $\sigma_{all}$  as  $0.3 \sigma_p$
  - ❑ if  $s^2_{sam} < c$  (with  $c$ =critical value,  $c = F1\sigma^2_{all} + F2s^2_{an}$ )
  - ❑ it was verified the absence or presence of evidence that the sampling standard deviation exceeds the allowable fraction of the target standard equation (significant at 95% level of confidence).

Parameters	Ham		Chopped pork	Liver
	H_LL	H_HL	CP	L
<b>Cochran test (Critical value)</b>	0,505 (0,653)	0,385 (0,754)	0,417 (0,718)	0,349 (0,684)
<b><math>S^2_{sam}</math> (Critical value)</b>	0,017 (0,022)	0,760 (2,816)	0,001 (0,020)	0,152 (0,314)
<b>Difference of the average values (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	0,024	0,037	0,017	0,056

## STABILITY TEST

The stability test should check that any changes that occur are of insignificant magnitude in relation to any kind of analytical and sampling variability.

### Analysis of

- ❖ a control subset (n=5 samples in duplicate)
  - kept under strict stable conditions (T=-20°C, no light)
- ❖ experimental subset (n=5 samples, in duplicate)
  - left at T=4°C for 48h

Parameters	Ham		Chopped pork	Liver
	H_LL	H_HL	CP	L
<b>Cochran test</b> (Critical value)	0,505 (0,653)	0,385 (0,754)	0,417 (0,718)	0,349 (0,684)
<b>S<sup>2</sup><sub>sam</sub></b> (Critical value)	0,017 (0,022)	0,760 (2,816)	0,001 (0,020)	0,152 (0,314)
<b>Difference of the average values</b> (µg/Kg)	0,024	0,037	0,017	0,056

The t-test run verified that the differences of mean values were not statistically significant and were all below  $0.1 \sigma_p$  (target standard deviation).