

VALIDATION D'UN KIT D'ANALYSE RAPIDE DETERMINANT LA DOSE D'OCHRATOXINE DANS LE VIN

Mergoni V.*, Bevis S.** , Gualla A.***, Pietri A. ***

* Or Sell srl – Via B. Peruzzi, 26 – 41012 Carpi (MO) – Tél.: +39.059.652504 Fax: +39.059.652330

** R- Biopharm Rhone Ltd- Unit 3.06 Kelvin Campus, West of Scotland Science Park, Maryhill Road, Glasgow, Scotland G20 OSP. Tél.: +44(0)141.9452924 Fax: +44(0)141.945.2925

*** Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione (Institut des Sciences des aliments et de la nutrition) - Facoltà di Agraria (Faculté d'Agriculture) - Università Cattolòica del S. Cuore (Université Catholique du S. Coeur) – Via Emilia Parmense, 84 – 29100 Piacenza – Tél.: +39.0523.599135 Fax: +39.0523.599136

Introduction

L'ochratoxine A (OTA), produite par différentes moisissures de type *Aspergillus* et *Penicillium*, est une substance très connue, carcinogène et néphrotoxique, aussi bien pour les animaux que pour les humains. L'ochratoxine A peut être présente dans certaines denrées alimentaires telles que les céréales, les raisins secs, le café et le vin. En janvier 2005, la Commission Européenne a fixé un seuil limite de 2,0 µg/l (ppb) pour l'OTA dans le vin. Il devient donc fondamental de valider des méthodes qualitatives en mesure de détecter des teneurs en OTA à des niveaux égaux ou proches des limites législatives européennes. L'objectif de l'étude suivante est d'évaluer l'efficacité d'un kit d'analyse rapide utilisé pour la détermination de l'ochratoxine A dans trente échantillons de vins rouges italiens naturellement contaminés.

Méthodologie

Déroulement du test pour l'analyse de l'ochratoxine

Préparation des échantillons

- Prendre 20 ml de vin rouge et ajuster son pH à 7,8 en utilisant de l'hydroxyde de sodium 4N. Retirer 6 ml de vin et diluer avec 6 ml de tampon phosphate (PBS). Bien homogénéiser.

- Verser 12 ml de l'échantillon dilué à travers la colonne d'immunoaffinité du kit d'analyse rapide à raison d'une goutte par seconde environ ou par gravitation.

- Rincer la colonne en diluant 2 X 10 ml de 2PEG dans du PBS.

- Placer un tube à essai directement sous la colonne et verser lentement par gravitation 1 ml de méthanol à travers la colonne afin d'éluer l'ochratoxine A de la colonne.

- Durant le processus d'éluion, il est conseillé de procéder à un rétrobalayage ou à une inversion de la direction du flux de méthanol à deux ou trois reprises afin de s'assurer de la complète éluion de l'ochratoxine A de la colonne. Introduire de l'air à travers la colonne à l'aide d'une seringue afin de récupérer les dernières gouttes d'éluat dans le tube.

- Collecter à l'aide d'une pipette 2 ml de tampon de dilution fourni dans le kit d'analyse rapide. Verser à travers la colonne et récupérer dans le même tube. Mélanger par inversion.

Procédure de l'essai sur le kit d'analyse rapide



- Vérifier que les deux ouvertures situées sur la carte présentent chacune deux zones bleu clair.

- Déposer à l'aide d'une micropipette 500µl de l'extrait d'échantillon dans l'ouverture correspondante sur la carte et attendre que l'échantillon ait complètement traversé la membrane.

- Déposer à l'aide d'une micropipette 100µl de conjugué prêt à l'emploi dans les ouvertures et attendre que le conjugué ait complètement traversé la membrane.

- Rincer avec 100µl de tampon de lavage. Laisser le tampon pénétrer la membrane et sécher le tour de l'orifice avec une serviette en papier.

- Introduire 100µl de substrat sur la membrane et laisser la couleur se développer pendant 5 minutes à température ambiante.

- Appliquer 100µl de solution stop et relever les résultats immédiatement après le passage de celle-ci à travers la membrane.

Résultats

Interprétation des résultats du kit d'analyse rapide

La zone témoin doit développer une couleur pourpre nettement visible pour que le résultat du test soit valide.

La couleur de la zone de l'échantillon et de la zone témoin ne sont pas forcément aussi intenses l'une que l'autre.



Résultat négatif

L'échantillon est considéré négatif (moins de 2ppb) lorsque la zone d'échantillon et la zone témoin présentent toutes les deux une couleur pourpre.

Résultat positif

L'échantillon est considéré positif (plus de 2ppb) lorsque la zone d'échantillon ne présente pas de couleur pourpre facilement détectable.

Résultats du kit d'analyse rapide par rapport à la méthode HPLC (chromatographie liquide à haute performance) sur vin rouge :

Échantillon	RÉSULTAT analyse rapide (ppb)	Kit	RÉSULTAT HPLC (ppb)	Échantillon	RÉSULTAT analyse rapide (ppb)	Kit	RÉSULTAT HPLC (ppb)
1	moins de 2		0,52	17	plus de 2		2,20
2	plus de 2		3,79	18	plus de 2		2,50
3	moins de 2		0,71	19	plus de 2		2,59
4	moins de 2		0,98	20	plus de 2		2,04
5	moins de 2		0,09	21	plus de 2		6,20
6	plus de 2		4,18	22	plus de 2		8,80
7	moins de 2		0,18	23	moins de 2		1,98
8	moins de 2		0,89	24	plus de 2		2,09
9	plus de 2		2,89	25	moins de 2		1,65
10	moins de 2		1,13	26	moins de 2		0,04
11	plus de 2		3,80	27	moins de 2		1,22
12	plus de 2		4,50	28	moins de 2		1,35
13	plus de 2		2,96	29	plus de 2		2,02
14	plus de 2		1,26	30	moins de 2		1,42
15	moins de 2		0,20	31	moins de 2		1,37 (valeur certifiée: 1,5 ± 0,15)
16	plus de 2		2,28	32	plus de 2		2,89 (valeur certifiée: 3,0 0,3)

Conclusion

À l'exception d'un échantillon de vin rouge (N° 14), les résultats obtenus avec le kit d'analyse rapide étaient en accord avec ceux de la méthode HPLC.

Lors de cette étude de validation, deux échantillons de vin de référence (N° 31-32) ont été également analysés en utilisant le kit d'analyse rapide et en utilisant une colonne d'immunoaffinité pour la préparation des échantillons en combinaison avec la méthode HPLC. Les deux méthodes ont confirmé les valeurs certifiées.

Il a été conclu que le kit d'analyse rapide est un test de dépistage approprié pour l'analyse d'ochratoxine A dans le vin, à la limite légale de 2,0 µg/l (ppb).