

Avaliação do desempenho do método do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) em leite em pó reconstituído contaminado experimentalmente com aflatoxina M_1 *

Evaluation of competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in milk powder contaminated with known concentrations of aflatoxin M_1

Carlos Augusto Fernandes de Oliveira e Pedro Manuel Leal Germano

Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (C.A.F.O.), Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (P.M.L.G.)

Resumo

O desempenho do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA), mediante o emprego de conjuntos de reativos produzidos em escala comercial, para determinação de aflatoxina, foi avaliado em condições experimentais, através de análises repetidas, em amostras de leite em pó reconstituído contaminadas com concentrações conhecidas da fração M_1 da toxina. Para os níveis de 0,10; 0,20; 0,50; e, 1,00 ng/ml, os percentuais de recuperação foram: 83,0%; 87,5%; 103,0%; e, 111,8%, respectivamente. O desvio-padrão relativo, para as referidas concentrações, foi, respectivamente, 65,5%; 31,8%; 10,9% e 13,6% (n=10, para cada nível de contaminação). Os resultados obtidos demonstram que o método é apropriado para pesquisas e levantamentos sobre a ocorrência de aflatoxina M_1 em leite, sobretudo nas faixas de concentração entre 0,20 - 1,00 ng/ml.

Substitutos do leite humano, toxicidade. Aflatoxina M_1 . ELISA.

Abstract

The evaluation of commercially available test systems of competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for Aflatoxin M_1 (AFM₁) was performed in experimental conditions, through repeated analysis, in samples of milk powder contaminated with known concentrations of the toxin. Recoveries of

*Extrato da tese de doutorado intitulada "Aflatoxina M_1 em leite em pó distribuído pelo programa de alimentação escolar no Município de São Paulo, SP-Brasil: utilização do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA)", apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1994.

Correspondência para/Correspondence to: Pedro Manuel Leal Germano - Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715 - 01246-904 São Paulo, SP - Brasil - Fax: (011)883.3501

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo 95/2290-6.

Recebido em 18.12.1995. Aprovado em 3.4.1996.

AFM₁ added to milk at levels of 0.10, 0.20, 0.50 and 1.00 ng/ml were 83.0%, 87.5%, 103.0% and 111.8% respectively. Relative standard deviations for the above mentioned concentrations were 65.5%, 31.8%, 10.9% and 13.6%, respectively (n = 10, per spiking level). According to these results the ELISA is appropriate for AFM₁ research and/or surveying, mainly for concentrations between 0.20 - 1.00 ng/ml.

Milk substitutes, toxicology. Aflatoxin M₁ ELISA.

INTRODUÇÃO

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um potente hepatocarcinógeno excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B₁, principal metabólito produzido por fungos do gênero *Aspergillus*^{26, 29}. A contaminação do leite de consumo humano por AFM₁ assume destacada relevância em saúde pública, ao se considerar que seus efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens^{3, 11, 26, 27}. Conseqüentemente, torna-se indispensável a adoção de técnicas analíticas exequíveis e confiáveis para a detecção e controle desta toxina no leite²⁰. Este fato reveste-se da maior importância com relação ao leite em pó, dada a sua ampla utilização, no Brasil, em programas destinados à suplementação alimentar de crianças da rede escolar pública.

Os primeiros métodos para a determinação de AFM₁, em amostras de leite e derivados, foram desenvolvidos em meados dos anos 60, tendo como base a propriedade fluorescente da toxina, quando exposta à luz ultra-violeta¹⁵. Deste modo, a técnica de identificação e quantificação utilizada de início, e ainda largamente empregada na atualidade, foi a cromatografia de camada delgada (CCD)¹⁵. Posteriormente, com o desenvolvimento dos métodos por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR), houve um incremento notável no grau de precisão das análises, porém, com o aumento significativo dos custos das análises^{2, 23}.

No início da década de 80 surgiu uma nova perspectiva para a análise de aflatoxinas, com a introdução dos métodos imunquímicos, ou imunoenaios, fundamentados nas reações específicas entre anticorpos e antígenos, com destaque para os de radioimunoensaio, cromatografia de imunoafinidade e de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA)^{8, 18}. O método de ELISA, do tipo direto, porém, é um dos mais utilizados, principalmente para AFM₁²⁰, onde a cor

resultante das soluções pode ser comparada mediante observação visual, com padrões conhecidos, em testes qualitativos^{13, 16, 25}, ou por espectrofotometria, para a obtenção de resultados quantitativos¹⁷.

Existem, atualmente, conjuntos de ELISA, produzidos em escala comercial, para a execução de análise de aflatoxinas em alimentos¹⁸. Esses sistemas são de execução simples, e podem ser empregados diretamente nas amostras, uma vez que não requerem etapas de purificação devido às altas especificidade e sensibilidade dos anticorpos¹⁴. Esta característica representa uma vantagem considerável do método especialmente em relação à análise de AFM₁, em leite e derivados, pois permite a sua aplicação em grande número de amostras, em intervalo de tempo relativamente pequeno, o que não ocorre com os métodos cromatográficos¹⁴. Para o leite "in natura", o método de ELISA, assim aplicado possibilitou a Pestka e col.¹⁹ (1981) a detecção de AFM₁, a partir de 0,25 ng/ml.

Scott²⁰ (1989), em revisão sobre os métodos quantitativos aplicados à análise de AFM₁, em leite e derivados, concluiu que os ensaios de ELISA têm apresentado desempenho satisfatório, inclusive em faixas de concentração ao nível de partes por trilhão (ng/ml). Entretanto, o autor não encontrou referências sobre a realização de estudos interlaboratoriais para a confirmação desses resultados. Por esse motivo, considera-se fundamental a adoção de procedimentos para a avaliação do desempenho deste método, previamente à sua aplicação no laboratório⁶. Esta necessidade é reforçada em razão dos conjuntos de ELISA requererem condições especiais de conservação, pois como material biológico são sensíveis às variações de temperatura que podem ocorrer, em especial, durante o transporte e armazenagem⁸.

O objetivo do presente trabalho é avaliar o desempenho do método de ELISA, quantitativo frente a amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas experimentalmente com AFM₁.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram utilizadas 62,5 g de leite em pó integral divididas em 5 amostras de igual quantidade. Reconstituiu-se cada amostra de leite em pó através da diluição de 12,5 g em 100 ml de água destilada, previamente aquecida a 40°C.

A comprovação da ausência de quantidades detectáveis da toxina foi realizada em laboratório de controle de qualidade, após 3 análises negativas pelo método ZCI (Zuivelcontroleinstitut), sumarizado por Scott²⁰ (1989). Este método foi submetido a estudo interlaboratorial na Holanda, e apresenta, como limite de detecção, 0,1 µg/kg de leite em pó²⁰.

Determinação da Concentração do Padrão de Aflatoxina M₁

O padrão de AFM₁ com 5 µg, depois de dissolvido em volume conveniente de clorofórmio p.a. (3,0 ml), foi calibrado espectrofotometricamente através da técnica preconizada pelo Tropical Development and Research Institute²⁴ (1984). A solução padrão, assim preparada, contendo 1,74 µg/ml da toxina, foi utilizada para a preparação das amostras contaminadas com AFM₁.

Preparação das Amostras

Para a adição da AFM₁ às amostras de leite reconstituído, adotou-se o procedimento utilizado por Della Rosa⁴ (1979) para a contaminação experimental de leite "in natura" com AFM₁. A solução padrão foi, então, transferida para frascos volumétricos de 100 ml, numerados de 1 a 5, correspondendo o primeiro ao controle, sem AFM₁. Os demais continham: 5,8 µl o segundo; 11,5 µl o terceiro; 28,8 µl o quarto; e, 57,5 µl o quinto.

Na seqüência do método, o conteúdo dos frascos foi evaporado até a secagem total, sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, transferiu-se 100 ml do leite reconstituído (aquecido a 40°C) para um dos frascos, sob agitação constante, através da adição de alíquotas de 25 ml, com intervalos de 5 min entre cada uma, até completar o volume. Assim, os frascos de 1 a 5 passaram a conter uma concentração estimada da AFM₁ da ordem de zero; 0,10; 0,20; 0,50 e 1,00 ng/ml, respectivamente.

Análise das Amostras

As amostras preparadas foram analisadas, por um mesmo técnico, através do método de ELISA quantitativo para AFM₁, mediante a utilização de conjuntos de reativos comercialmente produzidos (VeratoxTM). Previamente à execução dos ensaios, as amostras foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm, por 15 min, para a remoção e descarte da camada sobrenadante de gordura. Estabeleceram-se 10 análises para cada amostra, com a finalidade de possibilitar o processamento estatístico dos resultados obtidos, para cada nível de contaminação de AFM₁.

Preparo das Soluções

Os padrões de AFM₁ que acompanham os conjuntos de reativos encontram-se dissolvidos em uma matriz de leite liofilizado, distribuídos em 5 frascos. Para a sua reconstituição, acrescentou-se 2,0 ml de água destilada a cada um dos frascos, seguido de agitação vigorosa. A estabilização completa destas soluções foi alcançada, somente uma hora após a sua preparação, cujas concentrações foram: 0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 µg/ml.

O substrato foi preparado misturando-se 8 partes de tetra-metil-benzidina com uma parte de solução de H₂O₂. O substrato deve ser armazenado em local protegido da luz até o momento de utilização, sendo que sua durabilidade é de 4 - 8 horas. Os demais reativos utilizados nos ensaios foram fornecidos prontos para o uso.

Execução do Ensaio

Em cada seqüência analítica, removeu-se uma microcubeta de mistura para cada amostra, bem como 5 microcubetas para os padrões, colocando-as no suporte. Removeu-se um número igual de microcubetas cobertas com anticorpos. Deste modo, procedeu-se à análise simultânea das 5 amostras em cada seqüência analítica, repetindo-a 10 vezes, de maneira a completar 10 análises para cada amostra.

Os ensaios foram conduzidos mediante a execução das seguintes etapas: em cada uma das microcubetas de mistura, colocou-se 50 µl do conjugado; pipetou-se 200 µl dos padrões e das amostras, nas microcubetas respectivas; após homogeneização, transferiu-se rapidamente, com o auxílio de pipeta multicanal, 100 µl do conteúdo de cada microcubeta de mistura para a correspondente microcubeta coberta com anticorpos, descartando-se as contendo a mistura. Após período de repouso de 30 min, à temperatura ambiente, as microcubetas foram lavadas delicadamente com água destilada e colocadas, na posição invertida, sobre papel absorvente, para a secagem; pipetou-se 100 µl do substrato em cada microcubeta; após nova homogeneização, as microcubetas foram deixadas em repouso adicional por 10 min, à temperatura ambiente; e, pipetou-se 100 µl da solução estabilizadora em cada microcubeta, seguida de nova homogeneização.

Leitura Espectrofotométrica e Interpretação dos Resultados

Procedeu-se à mensuração da absorbância do conteúdo das microcubetas, em leitora própria para ensaios pelo método de ELISA, utilizando filtro de 650 nm, considerando o ar como branco.

Os valores de absorbância dos padrões de 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 µg/ml foram submetidos ao procedimento descrito por Park e col.¹⁷ (1989), para o cálculo dos percentuais de desenvolvimento de cor em relação ao padrão zero. Os resultados, assim obtidos, foram plotados graficamente em papel Logistic-Log, no eixo Y, juntamente com as respectivas concentrações, no eixo X, para estabelecimen-

to da curva de calibração. As concentrações de AFM₁, nas amostras foram expressas em ng/ml de leite reconstituído.

Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises foram submetidos a tratamento estatístico para o cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (coeficiente de variação)⁵ com a finalidade de verificar a precisão do método de análise frente aos níveis de contaminação utilizados nas amostras.

Aplicou-se a distribuição "t" de Student¹, com aproximação normal, no sentido de verificar a ocorrência de possíveis diferenças entre os resultados obtidos e as concentrações reais de AFM₁ nas amostras; adotou-se, como nível de rejeição, alfa igual a 0,01 e o valor crítico de "t" de alfa igual a 3,25 para 9 graus de liberdade. Estabeleceram-se, complementarmente, os limites de confiança, para 99%, das médias obtidas nas análises¹.

A relação entre as concentrações médias obtidas nas análises e as concentrações verdadeiras das amostras foi estabelecida mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, tendo a equação da reta sido determinada mediante a regressão linear simples¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os anticorpos anti-AFM₁, utilizados nos conjuntos VERATOXTM são policlonais, produzidos em coelhos imunizados com AFM₁ conjugados à albumina sérica bovina, reagindo especificamente com o grupo hidroxí-bi-furânico da molécula de AFM₁⁹. Entretanto, podem ocorrer reações cruzadas com outras aflatoxinas, como AFB₁, AFB₂ e AFG₁. Para estas toxinas, a empresa fabricante dos conjuntos estimou os percentuais de reação cruzada relativa de 73%, 18% e 39%, respectivamente. Esses valores

expressam a relação entre a concentração de AFM₁ necessária para reagir com 50% dos anticorpos, e a concentração de outras aflatoxinas necessária para manifestar este mesmo efeito⁸. Contudo, é remota a possibilidade de transferência de resíduos significativos destas aflatoxinas para o leite, com conseqüente interferência nos resultados.

O tempo médio para a execução de cada seqüência analítica, 5 padrões e 5 amostras, foi de aproximadamente 55 min.

Os resultados obtidos nas análises das amostras experimentalmente contaminadas com AFM₁ encontram-se listados na Tabela 1. As análises com a amostra número 1 revelaram-se todas negativas para AFM₁, o que confirma a ausência desta toxina ou de outros interferentes detectáveis pelo método, no leite em pó utilizado no preparo das amostras.

A Tabela 2 relaciona os parâmetros estatísticos adotados para a avaliação intralaboratorial do desempenho do método ELISA, calculados em relação aos valores da Tabela 1. As concentrações médias obtidas nas análises, quando comparadas às concentrações reais das amostras, indicaram percentuais de recuperação entre 83,0% (amostra 2, contendo 0,10 ng/ml) e 11,8% (amostra 5, contendo 1,00 ng/ml). Estes valores encontram-se dentro do esperado, segundo Horwitz¹⁰ (1982), para análises ao nível de partes por bilhão (ng/ml), ou seja, entre 60 - 110% não foram encontradas diferenças entre as concentrações médias e as concentrações reais das amostras, para todos os níveis de contaminação (p > 0,01), o que atesta a inexistência de erros sistemáticos nos resultados obtidos.

Tabela 1 - Resultados obtidos nas análises realizadas em amostras de leite em pó reconstituído, contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (ng/ml). São Paulo, 1994.

Análise	Concentração de AFM ₁ (ng/ml)				
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	1	2	3	4	5
	(0,00)*	(0,10)	(0,20)	(0,50)	(1,00)
1	0,00	0,08	0,20	0,45	0,90
2	0,00	0,06	0,15	0,49	0,98
3	0,00	0,08	0,23	0,46	0,98
4	0,00	0,09	0,16	0,54	1,20
5	0,00	0,21	0,11	0,54	1,07
6	0,00	0,05	0,18	0,43	1,40
7	0,00	0,13	0,10	0,52	1,15
8	0,00	0,01	0,17	0,58	1,10
9	0,00	0,07	0,29	0,60	1,30
10	-**	0,05	0,16	0,54	1,10

* Os números entre parênteses indicam as concentrações reais de AFM₁ nas amostras, em ng/ml;

** A análise 10 da amostra 1 não foi realizada.

Tabela 2 - Resultados estatísticos, obtidos durante a avaliação do desempenho do método ELISA em condições experimentais, em amostras de leite em pó contaminadas com diferentes concentrações de AFM₁ (ng/ml). São Paulo, 1994.

Parâmetro estatístico	Amostras				
	1	2	3	4	5
	(0,00)*	(0,10)	(0,20)	(0,50)	(1,00)
Concentração média (ng/ml)	0,000	0,083	0,175	0,515	1,118
Desvio-padrão (ng/ml)	0,000	0,054	0,056	0,056	0,152
Recuperação média (%)	-	83,0	87,5	103,0	111,8
Desvio-padrão relativo (%)	-	65,5	31,8	10,9	13,6
Valor de "t" **	0,000	-0,989	-1,421	0,844	2,449
LC mínimo *** (ng/ml)	0,000	0,027	0,118	0,457	0,961
LC máximo *** (ng/ml)	0,000	0,139	0,232	0,573	1,275

* Os números entre parênteses indicam as concentrações reais de AFM₁ nas amostras, em ng/ml;

** Todos os valores de "t" foram não significantes (P > 0,01);

*** Limite de confiança para 99%.

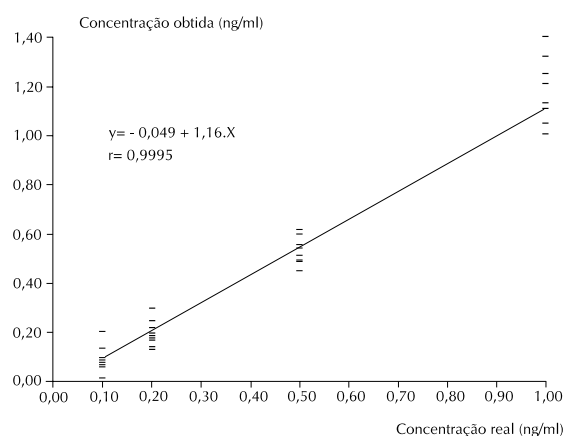


Figura - Relação entre as concentrações médias obtidas nas análises e as concentrações reais das amostras contaminadas experimentalmente com AFM₁.

A Figura mostra a relação entre as concentrações médias obtidas e as concentrações reais das amostras, bem como a dispersão dos resultados individuais em torno das médias. Mediante o emprego da regressão linear simples, observou-se uma reta regida pela equação $Y = -0,049 + 1,16.X$, onde Y representa a concentração obtida na análise, e X, a concentração real de AFM₁ na amostra. O coeficiente de correlação de Pearson (r), entre estas duas variáveis, foi de 0,9995, o que permite considerar satisfatória a exatidão do método.

O desvio-padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação, é uma medida de variabilidade que reflete, de maneira inversamente proporcional, a precisão do método⁵. A precisão, por outro lado, varia de acordo com a concentração da substância pesquisada. Deste modo, quanto menor a concentração, maior o valor do DPR⁵. Os conjuntos de reativos utilizados foram desenvolvidos para a análise de

AFM₁ no leite, considerando-se o limite de tolerância adotado nos Estados Unidos da América (0,5 ng/ml)²². De fato, o método revelou melhor precisão nas análises efetuadas com a amostra 4, contendo AFM₁ neste nível, cuja recuperação média foi de 103,0% e o DPR igual a 10,9%.

A "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), a respeito da repetibilidade do método de ELISA qualitativo para a análise de AFB₁, ao nível de 15 µg/kg, recomenda que o valor do DPR não deva exceder a 20,0%²¹. Dentro deste critério, o método avaliado mostrou-se satisfatório, também, para o nível de 1,00 ng/ml (amostra 5), cujo DPR foi de 13,6%, porém, não nos níveis de 0,10 e 0,20 ng/ml. Horwitz¹⁰ (1982), por outro lado, afirmou que, em análises ao nível de 1 ng/ml, é possível esperar que os resultados gerados em um mesmo laboratório apresentem, normalmente, valores DPR entre 15,0 - 40,0%. Com base neste critério, o qual revela-se mais adequado para a análise de AFM₁ em leite, o método de ELISA demonstrou desempenho satisfatório para concentração entre 0,20 - 1,00 ng/ml.

Considerando que as amostras foram submetidas diretamente ao ensaio, sem qualquer tratamento prévio, além do fato das análises terem sido repetidas pelo mesmo analista, é possível concluir que a variabilidade dos resultados obtidos foi devida, basicamente, às características dos conjuntos e à execução dos ensaios. De acordo com Ward e Morgan²⁸ (1991), os principais fatores que podem diminuir o grau de precisão dos ensaios ELISA incluem: erros no procedimento da análise, pipetagem e preparação dos reagentes imprecisas, homogeneização deficiente das soluções; diferenças entre as microcubetas por cobertura dos anticorpos; e, diferenças entre os conjuntos utilizados.

De acordo com Scott²⁰ (1989), a maioria dos métodos que utilizam a CCD para análise do leite,

apresenta, para níveis de 0,10 - 1,00 ng/ml, percentuais de recuperação entre 80,0 - 120,0%, e DPR intralaboratorial entre 10,0 - 30,0%. Os métodos por CLAR são os que revelam parâmetros de desempenho mais satisfatórios, com recuperação próxima de 100,0% e DPR, geralmente, abaixo de 10,0%²⁰.

O desempenho do método de ELISA para níveis de 0,20 - 1,00 ng/ml, portanto, pode ser comparado aos métodos tradicionais de análise por CCD. Para o nível de 0,50 ng/ml, o método avaliado apresentou parâmetros próximos aos dos métodos por CLAR.

Pestka e col.¹⁹ (1981) avaliaram o método de ELISA, pesquisando AFM₁ em amostras de leite artificialmente contaminadas, submetidas diretamente ao ensaio, observando, para concentrações de 0,25 - 5,00 ng/ml, percentuais de recuperação entre 80,0 - 124,0%, para o produto "in natura", e entre 94,0 - 120,0%, para o desnatado. Porém, o método não foi capaz de detectar concentrações iguais ou abaixo de 0,10 ng/ml.

A comparação dos resultados obtidos no presente estudo, com o de outros pesquisadores, é dificultada pelo fato de que, na grande maioria, os diferentes métodos imunoenzimáticos para AFM₁, mencionados, utilizam procedimentos de purificação das amostras, previamente à execução dos ensaios¹⁸. Deste modo, com a retirada dos interferentes da amostra, os níveis de detecção podem ser drasticamente reduzidos, situando-se entre 0,002 - 0,10 ng/ml⁷, ou seja, abaixo dos níveis adotados no presente trabalho. Com a adoção de procedimentos de purificação, a precisão dos métodos, também, é melhorada, embora com prejuízo para uma das principais vantagens do ELISA: simplicidade de execução⁸.

Os parâmetros estatísticos, adotados no presente estudo, comprovaram a confiabilidade dos resultados originados pelo método de ELISA. No entanto, os métodos analíticos são, usualmente, avaliados com

base em outros atributos importantes, sobretudo a aplicabilidade e a praticabilidade¹⁰.

Tendo em vista a simplicidade de execução e, sobretudo, a possibilidade de utilização do ensaio diretamente nas amostras, o método de ELISA AFM₁ revelou-se bastante prático, embora o custo por análise seja ligeiramente superior ao dos métodos por CCD.

A importância de cada atributo depende da finalidade que se pretende para o método em questão. Nas análises de monitoramento ou nas que envolvam procedimentos de fiscalização, a praticabilidade é muito importante, porém, é secundária em relação à confiabilidade do método¹⁰. Conseqüentemente, a exatidão e a precisão do método devem ser suficientemente elevadas de maneira a detectar a substância pesquisada em uma determinada concentração. Deste modo, o método de ELISA mostrou-se adequado para tal propósito, considerando níveis de AFM₁ a partir de 0,5 ng/ml de leite em pó reconstituído.

A praticabilidade, no entanto, é fundamental em levantamentos ao nível de campo, onde se faz necessária a análise de grande número de amostras no menor prazo possível. Neste contexto, os resultados do presente trabalho demonstraram bom desempenho do método de ELISA em concentrações de 0,20 - 1,00 ng/ml, o qual pode ser aplicado, sobretudo, em pesquisas de campo sobre a ocorrência de AFM₁. É recomendável, porém, que esse método seja submetido, também, a estudos interlaboratoriais, para a comprovação destes resultados.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Controle de Qualidade da Nestlé Ind. & Com. Ltda, pela análise da toxina; a "Sigma Chemical Company", pelo fornecimento do padrão AFM₁; à "Neogen Corporation", pela cessão dos reativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo, EPU, 1981.
2. CHU, F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *J. Food Protec.*, **47**:562-9, 1984.
3. CULLEN, J.M.; RUEBNER, B.H.; HSIEH, L.S.; HYDE, D.M.; HSIEH, D.S.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fisher rats compared to aflatoxin B₁. *Cancer Res.*, **47**:1913-7, 1987.
4. DELLA ROSA, H.V. Determinação de resíduos de aflatoxina M₁ em leite por fluordensitometria. São Paulo, 1979. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
5. DUX, J.P. *Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory*. New York, Van Nostrand Reinhold, 1986.
6. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Manuals of food quality control: the food control laboratory*. Rome, 1986. (FAO Food and Nutrition Paper, 14/1).

7. FRÉMY, J.M. & CHU, F.S. Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ at picogram levels in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**: 1098-101, 1984.
8. FRÉMY, J.M. & CHU, F.S. Immunochemical methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. *Mycotoxins in dairy products*. London, Elsevier Applied Science, 1989. p. 97-125.
9. HARDER, W.O. & CHU, F.S. Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. *Experientia*, **35**: 1104-6, 1979.
10. HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.*, **54**:67A-76A, 1982.
11. HSIEH, D.P.H. An assessment of liver cancer risk posed by aflatoxin M₁ in the Western world. In: Lacey, J., ed. *Trichothecenes and other mycotoxins*. New York, John Wiley & Sons, 1985, p. 521-8.
12. JOHNSON, R. & BHATTACHARYYA, G. *Statistics, principles and methods*. New York, John Wiley & Sons, 1987.
13. KOELTZOW, D.E. & TANNER, S.N. Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**:584-9, 1990.
14. MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R.; TERPLAN, G. Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassay zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. *Arch. Lebens. Hyg.*, **42**:3-6, 1991.
15. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Micotoxinas*. Washington, 1983. (Critérios de Salud Ambiental, 11).
16. PARK, D.L.; MILLER, B.M.; HART, L.P.; YANG, G.; MCVEY, J.; PAGE, S.W.; PESTKA, J.J.; BROWN, L.H. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening aflatoxin B₁ in cottonseed products and mixed feed: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:326-32, 1989.
17. PARK, D.L.; MILLER, B.M.; TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; VEKICH, A.; BIDIGARE, B.; MCVEY, J.L.; BROWN, L.H. Visual and semiquantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B₁ in corn and peanut products: follow-up collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:638-43, 1989.
18. PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technol.*, **49**:120-8, 1995.
19. PESTKA, J.J.; LI, Y.; HARDER, W.O.; CHU, F.S. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**:294-3011, 1981.
20. SCOTT, P.M. Methods for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products - a review of performance characteristics. *Food Addit. Contam.*, **6**:283-305, 1989.
21. SCOTT, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K. ed. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. v.2, p.1184-213.
22. STOLOFF, L.; VAN EGMOND, H.P.; PARK, D.L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, **8**:213-22, 1991.
23. STUBBLEFIELD, R.D. & VAN EGMOND, H.P. Chromatographic methods of analysis for aflatoxin M₁. In: Van Egmond, H.P., ed. *Mycotoxins in dairy products*. London, Elsevier Applied Science, 1989. p. 57-95.
24. TROPICAL DEVELOPMENT AND RESEARCH INSTITUTE. *Micotoxin training manual*. London, TDRI, 1984.
25. TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; PARK, D.L.; POHLAND, A.E. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B₁, B₂ and G₁ in corn, cottonseed, peanut butter and poultry feed: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:957-62, 1989.
26. VAN EGMOND, H.P. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. In: Van Egmond, H.P., ed. *Mycotoxins in dairy products*. London, Elsevier Applied Science, 1989. p. 11-55.
27. WAKHISI, J. Exposure of rat offsprings to aflatoxin risks through suckling mothers dosed with aflatoxin B₁. *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, **8**:275-80, 1989.
28. WARD, C.M. & MORGAN, M.R.A. Reproducibility of a commercially available kit utilizing enzyme-linked immunosorbent assay for determination to aflatoxin in peanut butter. *Food Addit. Contam.*, **8**:9-15, 1991.
29. WOOD, G.E. Aflatoxin M₁. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K., eds. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton, CRC Press, 1991. p. 145-64.